

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

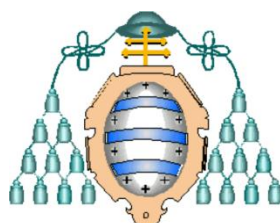
PROGRAMA DE DOCTORADO QUÍMICA ORGANOMETÁLICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA E INORGÁNICA

**SÍNTESIS DE PRECURSORES FARMACÉUTICOS
ENANTIOMÉRICAMENTE PUROS MEDIANTE
MÉTODOS BIOCATALÍTICOS**

TESIS DOCTORAL

JESÚS ANTONIO RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

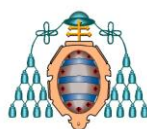
PROGRAMA DE DOCTORADO QUÍMICA ORGANOMETÁLICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA E INORGÁNICA

**SÍNTESIS DE PRECURSORES FARMACÉUTICOS
ENANTIOMÉRICAMENTE PUROS MEDIANTE
MÉTODOS BIOCATALÍTICOS**

Memoria presentada por Jesús Antonio Rodríguez Rodríguez para optar al grado de

Doctor por la Universidad de Oviedo



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Vicerrectorado de Ordenación Académica
y Nuevas Titulaciones



CENTRO INTERNACIONAL
DE POSTGRADO
CAMPUS DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL

RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Síntesis de precursores farmacéuticos enantioméricamente puros mediante métodos biocatalíticos.	Inglés: Synthesis of optically pure pharmaceutical building blocks through biocatalytic methods.
2.- Autor	
Nombre: JESÚS ANTONIO RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ	
Programa de Doctorado: QUÍMICA ORGANOMETÁLICA (MENCIÓN DE CALIDAD)	
Órgano responsable: UNIVERSIDAD DE OVIEDO	

RESUMEN (en español)

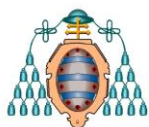
La Biocatálisis ha alcanzado gran importancia en los últimos años impulsada por un incremento de su utilización por parte del sector industrial. Las biotransformaciones son consideradas herramientas muy útiles para el desarrollo de transformaciones sintéticas por su alta selectividad, y porque tienen lugar generalmente en condiciones suaves de reacción y no agresivas para el medio ambiente.

Esta memoria está dividida en una introducción y cuatro capítulos.

En la **introducción** de esta memoria se ha realizado una revisión bibliográfica relacionada con el estado actual de la biocatálisis dentro de la química industrial. También se resumen algunos aspectos generales de la biocatálisis relacionados con el tipo de procesos utilizados en esta memoria.

En el **primer capítulo** se ha estudiado la resolución cinética enzimática de derivados del antidepresivo venlafaxina, analizándose un gran número de variables de las condiciones de reacción en los procesos llevados a cabo directamente con estos intermedios o con derivados de los mismos.

En el **segundo capítulo**, se ha planteado la síntesis y resolución enzimática de la cianhidrina derivada de la α -tetralona mediante procesos de



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Vicerrectorado de Ordenación Académica
y Nuevas Titulaciones



CENTRO INTERNACIONAL
DE POSTGRADO
CAMPUS DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL

hidrólisis y acilación enzimática. Además, se ha extendido el método a la resolución de las cianhidrinas derivadas de la α -indanona y la 4-cromanona. Los resultados se han recogido en:

J. Rodríguez-Rodríguez, V. Gotor, R. Brieva, “*Lipase catalyzed resolution of the quaternary stereogenic center in ketone-derived benzo-fused cyclic cyanohydrins*” *Tetrahedron: Asymmetry*, **2011**, 22, 1218–1224.

En el **tercer capítulo**, se ha llevado a cabo la síntesis y resolución enzimática de *trans*-3,4-dihidroxi-pirrolidinas mediante procesos de acilación enzimática o hidrólisis de sus derivados, los resultados han sido recogidos en:

J. Rodríguez-Rodríguez, R. Brieva, V. Gotor, “*Biocatalytic preparation of chiral 3,4-dihydroxypyrrrolidines*” *Tetrahedron*, **2010**, 66, 6789-6796.

En el **cuarto capítulo**, ha sido estudiada en profundidad la síntesis y resolución enzimática de *trans*-3-amino-4-hidroxipirrolidinas mediante procesos de acilación e hidrólisis enzimática de varios derivados de estos compuestos. Los resultados obtenidos serán publicados próximamente.

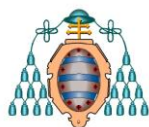
RESUMEN (en Inglés)

The Biocatalysis has become very important driven by increased use by the industrial sector in recent years. Biotransformations are considered useful tools for the development of synthetic transformations because of its high selectivity and because they usually taken place in mild and environmentally non-aggressive reaction conditions.

This Doctoral Dissertation is organized in an introduction and four chapters.

In the **introduction** of this report has been reviewed the literature related to the current state of industrial chemistry and also some general aspects related to the biocatalytic processes used in this thesis. The different chapters of this thesis are written below.

The **first chapter** is focused on the enzymatic resolution of antidepressant venlafaxine derivatives, several reaction conditions are analyzed with the process carried out directly with these intermediates or their derivatives.



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Vicerrectorado de Ordenación Académica
y Nuevas Titulaciones



CENTRO INTERNACIONAL
DE POSTGRADO
CAMPUS DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL

In the **second chapter**, have raised the synthesis and enzymatic resolution of the cyanohydrin of α -tetralone using enzymatic hydrolysis and acylation processes. Furthermore, the method has been extended to the resolution of cyanohydrins of α -indanone and 4-chromanone. The results have been published in:

J. Rodríguez-Rodríguez, V. Gotor, R. Brieva, “*Lipase catalyzed resolution of the quaternary stereogenic center in ketone-derived benzo-fused cyclic cyanohydrins*” *Tetrahedron: Asymmetry*, **2011**, 22, 1218–1224.

In the **third chapter**, was carried out the synthesis and enzymatic resolution of *trans*-3,4-dihidroxipirrolidinas by enzymatic acylation or hydrolysis processes of its derivatives, the results have been collected in:

J. Rodríguez-Rodríguez, R. Brieva, V. Gotor, “*Biocatalytic preparation of chiral 3,4-dihydroxypirrolidines*” *Tetrahedron*, **2010**, 66, 6789-6796.

In the **fourth chapter**, has been studied in detail the synthesis and enzymatic resolution of *trans*-amino-4-hidroxipirrolidinas by enzymatic acylation and hydrolysis processes of various derivatives of these compounds. The obtained results will be proximate published.

FOR-MAT-VOA-009-BIS

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA E INORGÁNICA
SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN
QUÍMICA ORGANOMETÁLICA (Mención de Calidad)

*A mis padres,
a mis hermanas
y a Beatriz.*

"It matters if you just don't give up"

Stephen Hawking

La elaboración de una tesis representa el esfuerzo de varios años de trabajo y, aunque la mayor parte de los méritos recaen en una persona, es el resultado, tanto directa como indirectamente, de la colaboración de un grupo de personas. En estas líneas quiero dejar constancia de mis más sinceros agradecimientos a todos aquellos que me han apoyado durante todo este tiempo y que culmina con la exposición de este proyecto.

El hecho de nombrar a una serie de personas supone siempre un riesgo, pues es fácil olvidarse de alguna de ellas, aunque es inevitable tener que hacer una mención especial a las siguientes personas, dirigiéndome en primer lugar hacia mis directores de tesis:

A mi director de tesis Vicente Gotor por haberme dado la oportunidad de vivir la experiencia investigadora formando parte de su grupo de investigación, por su apoyo durante el trascurso de esta tesis doctoral y por la confianza depositada en mí.

A mi directora de tesis Rosario Brieva por su inmejorable labor docente, así como el gran apoyo que durante estos años he recibido de su parte, dándome consejos útiles y buenas ideas en los momentos más difíciles.

A mis padres, Manuel y Ana María, porque sin vosotros nunca habría llegado hasta donde estoy, animándome a continuar mis estudios y apoyándome siempre incondicionalmente. Además, me habéis infundido valores fundamentales y, especialmente, me habéis inculcado que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para el éxito. Gracias porque sin vosotros no habría conseguido llegar a ser quien soy.

A mis hermanas, Covadonga y Laura, porque he sentido un gran apoyo a lo largo de mi vida, dándome excelentes consejos para mis problemas y siendo cómplices de mis errores, porque sé que siempre podré contar con vosotras.

A Beatriz, por tu cariño, por tu apoyo incondicional, por ayudarme en todos mis problemas, por estar a mi lado en todos los buenos y malos momentos, por hacer que cada día merezca más la pena vivir el siguiente y por muchas otras cosas que no se pueden expresar con palabras.

Gracias también a Pompeyo que, además de ser un gran nadador y entrenador, ha participado directamente en la elaboración de la portada de esta tesis.

Finalmente, quisiera darles las gracias a todos y cada uno de los compañeros de laboratorio de Bioorgánica por mantener un excelente ambiente de trabajo a lo largo de estos años.

Muchísimas gracias a todos.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

[α]	Rotación óptica específica
Ac	Acetilo
AcOCHCH₂	Acetato de vinilo
AcOEt	Acetato de etilo
AcOH	Ácido acético
APCI	Ionización química a presión atmosférica
Asp	Aspartato
Bn	Bencilo
Boc	<i>tert</i> -Butiloxicarbonilo
BuLi	Butillitio
^tBuOMe	<i>tert</i> -butil metil éter
<i>c</i>	Grado de conversión
CAL-A	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> tipo A
CAL-B	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> tipo B
Cbz	Benciloxicarbonilo
CG	Cromatografía de gases
conc.	Concentración
(+)-CSO	(+)-(canforsulfonil)oxaziridina
Cu(OTf)₂	Triflato de cobre (II)
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doble doblete
ddd	Doble doblete de dobletes
DEPT	<i>Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
disolv.	Disolvente
DMAP	4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)piridina
DMF	(<i>N,N</i>)-Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido

enz.	Enzima
<i>E</i>	Razón enantiomérica
<i>ee</i>	Exceso enantiomérico
<i>ee_s</i>	Exceso enantiomérico de sustrato
<i>ee_p</i>	Exceso enantiomérico de producto
En.	Entrada
eq.	Equivalente
ES	Complejo enzima-sustrato
ESI	Ionización por <i>electrospray</i>
Et	Etilo
Et₃N	trietilamina
EtOH	Etanol
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramo
His	Histidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HRMS	Espectrometría de masa de alta resolución
Hz	Hertzio
IE	Impacto electrónico
IR	Espectroscopia de infrarrojo
IT	Intermedio tetraédrico
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>k_{cat}</i>	Constante catalítica
<i>k_{cat}/K_M</i>	Constante de especificidad
<i>K_M</i>	Constante de Michaelis-Menten
L	Litros
m	Multiplete
M	Molaridad

m-CPBA	Ácido <i>meta</i> -cloroperbenzoico
Me	Metilo
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
MeONa	Metóxido de sodio
MHz	Megahertzios
min	Minuto
mL	Mililitro
MS	Espectrometría de masas
N	Normalidad
NEt₃	Trietilamina
Nu-H	Nucleófilo
Pd(AcO)₂	Acetato de paladio (II)
Ph	Fenilo
pH	Potencial de hidrógeno
Phe	Fenilalanina
PPh₃	Trifenilfosfina
ppm	Partes por millón
PSL	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i>
PSL-C	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> inmovilizada sobre un soporte cerámico
PSL-D	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> inmovilizada sobre diatomita
PSL IM	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> inmovilizada sobre tierra de diatomita
PSL SD	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> en forma de polvo fijada a diatomita
py	piridina
reg.	Disolución reguladora
rend.	Rendimiento

RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
s	Singulete
S	Sustrato
sa	Singulete ancho
Ser	Serina
t	Triplete
<i>t</i>	Tiempo
T	Temperatura
TBAHSO₄	bisulfato de tetrabutilamonio
THF	Tetrahidrofurano
TMSCl	Cloruro de trimetilsililo
t_r	Tiempo de retención
TsCl	Cloruro de tosilo
uma	Unidad de masa atómica
μL	Microlitro
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
V_{max}	Velocidad máxima
Xa	Factor de coagulación

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1 LA INDRUSTRIA Y LA BIOCATÁLISIS.....	4
2 ENZIMAS Y BIOTRASFORMACIONES.....	7
3 LIPASAS.....	11
3.1 Lipasas utilizadas en esta memoria.....	14
4 RESOLUCIÓN CINÉTICA ENZIMÁTICA	17
CAPÍTULO I: Síntesis y resolución enzimática de precursores de venlafaxina.	21
INTRODUCCIÓN.....	23
ANTECEDENTES	29
OBJETIVOS	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
I.1 ACILACIÓN ENZIMÁTICA DEL (±)-1-[2-AMINO-1-(4- METOXIFENIL)ETIL]CICLOHEXANOL.....	44
I.2 REACCIONES DE HIDRÓLISIS Y TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICAS EN DERIVADOS DEL (±)-1-[2-AMINO-1-(4- METOXIFENIL)ETIL]CICLOHEXANOL.....	46
I.3 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL (±)-1-[CIANO-(4- METOXIFENIL)METIL]CICLOHEXANOL.....	49
I.4 SÍNTESIS DE β^2 -AMINOÉSTERES PRECURSORES DE VENLAFAXINA Y REACCIONES DE RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA.....	50
I.5 DETERMINACIÓN DE LOS EXCESOS ENANTIOMÉRICOS	53
CONCLUSIONES.....	59

Índice

PARTE EXPERIMENTAL	63
I.6 REACTIVOS Y DISOLVENTES	65
I.7 TÉCNICAS DE ANÁLISIS	66
I.8 PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS	67
I.8.1 Síntesis de 1-[ciano-(4-metoxifenil)metil]ciclohexanol (±)-2	67
I.8.2 Síntesis de 1-[2-amino-1-(4- metoxifenil)etil]ciclohexanol, (±)-3	68
I.8.3 Síntesis de N-[2-(1-hidroxiciclohexil)-2-(4-metoxi- fenil)]etilacetamida, (±)-4	69
I.8.4 Síntesis de N-[2-(1-hidroxiciclohexil)-2-(4-metoxi- fenil)]etilmetoxiacetamida, (±)-5	70
I.8.5 Síntesis de N-[2-(1-hidroxiciclohexil)-2-(4- metoxifenil)]etilacetoxiacetamida, (±)-6	71
I.8.6 Síntesis de N-[2-(1-hidroxiciclohexil)-2-(4- metoxifenil)]etilhidroxiacetamida, (±)-7	72
I.8.7 Síntesis de (±)-3-(1,3-dioxoisoindolin-2-il)-2-(4- metoxifenil)propanoato de metilo, (±)-9	73
I.8.8 Síntesis de 3-amino-2-(4-metoxifenil)propanoato de metilo, (±)-10	74
I.8.9 Síntesis de 3-acetamido-2-(4-metoxifenil)propanoato de metilo, (±)-11	75
I.8.10 Síntesis de 3-aliloxicarbonilamino-2-(4- metoxifenil)propanoato de metilo, (±)-12	76

CAPÍTULO II: Resolución catalizada por lipasas del centro estereogénico cuaternario en cianhidrinas de cetonas benzofusionadas.	79
INTRODUCCIÓN.....	81
ANTECEDENTES	87
OBJETIVOS	95
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	99
II.1 ACILACIÓN ENZIMÁTICA DEL (±)-1-HIDROXI-1,2,3,4-TETRAHIDRONAFTALENO-1-CARBONITRILO	102
II.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ACETATO DE (±)-1-CIANO-1,2,3,4-TETRAHIDRO-1-NAFTILO	104
II.3 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ACETOXIACETATO DE (±)-1-CIANO-1,2,3,4-TETRAHIDRO-1-NAFTILO.....	105
II.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL METOXIACETATO DE (±)-1-CIANO-1,2,3,4-TETRAHIDRO-1-NAFTILO.....	108
II.5 APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DESARROLLADA A LA RESOLUCIÓN DE LAS CIANHIDRINAS DIRIVADAS DE LA α -INDANONA Y 4-CROMANONA.....	112
II.6 DETERMINACIÓN DE LOS EXCESOS ENANTIOMÉRICOS	114
II.7 ASIGNACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA	121
CONCLUSIONES.....	125
PARTE EXPERIMENTAL.....	129
II.8 REACTIVOS Y DISOLVENTES.....	131
II.9 TÉCNICAS DE ANÁLISIS.....	132

Índice

II.10 PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS.....	133
II.9.1 Síntesis de (±)-1-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno-1-carbonitrilo, (±)-14.....	133
II.9.2 Síntesis de (±)-acetato de 1-ciano-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftilo, (±)-15	134
II.9.3 Síntesis de (±)-acetoxiacetato de 1-ciano-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftilo, (±)-16	135
II.9.4 Síntesis de (±)-metoxiacetato de 1-ciano-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftilo, (±)-18	136
II.9.5 Síntesis de (±)-1-hidroxiindano-1-carbonitrilo, (±)-24.....	137
II.9.6 Síntesis de (±)-metoxiacetato de 1-cianoindan-1-ilo, (±)-25	138
II.9.7 Síntesis de (±)-4-hidroxicromano-4-carbonitrilo, (±)-27.....	139
II.9.8 Síntesis de (±)-metoxiacetato de 4-cianocroman-4-ilo, (±)-28	140
II.9.9 Procedimiento general para la hidrólisis enzimática de las cianhidrinas aciladas (±)-15, (±)-16, (±)-18, (±)-25, (±)-28	141
II.9.10 Procedimiento general para la acetilación enzimática de la cianhidrina de la tetralona (±)-14	141
II.9.11 Síntesis de R-(+)-1,2,3,4-tetrahidro-1-trimetilsilioxinaftaleno-1-carbonitrilo, (R)-30	142
II.9.12 Síntesis de S-(-)-metoxiacetato de 1-ciano-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftilo, (S)-18	143

CAPÍTULO III: Preparación biocatalítica de <i>trans</i>-3,4-dihidroxipirrolidinas enantiopuras.	145
INTRODUCCIÓN.....	149
ANTECEDENTES	159
OBJETIVOS	165
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	169
III.1 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA <i>TRANS</i> -(±)-3,4-DIACETOXI-1-BENCILOXICARBONILPIRROLIDINA.....	172
III.2 ACILACIÓN ENZIMÁTICA DE LA <i>TRANS</i> -(±)-1-BENCILOXICARBONIL-3,4-DIHDROXIPIRROLIDINA ..	181
III.3 DETERMINACIÓN DE LOS EXCESOS ENANTIOMÉRICOS	183
III.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CADA COMPUESTO EN EL MEDIO DE REACCIÓN.....	184
III.5 ASIGNACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA	186
CONCLUSIONES.....	189
PARTE EXPERIMENTAL.....	193
III.6 REACTIVOS Y DISOLVENTES	195
III.7 TÉCNICAS DE ANÁLISIS	196
III.8 PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS.....	197
III.8.1 Síntesis de 1-benciloxicarbonil-3-pirrolina, 33.....	197
III.8.2 Síntesis de 1-benciloxicarbonil-3,4-epoxipirrolidina, 34	198
III.8.3 Síntesis de <i>trans</i> -(±)-3,4-diacetoxi-1-benciloxicarbonilpirrolidina, <i>trans</i> -(±)-35	199

Índice

III.8.4 Síntesis de <i>trans</i> -(±)-1-benciloxicarbonil-3,4-dihidroxipirrolidina, <i>trans</i> -(±)-37	200
III.8.5 Síntesis de <i>trans</i> -(±)-3-acetoxi-1-benciloxicarbonil-4-hidroxipirrolidina, <i>trans</i> -(±)-36.....	201
III.8.6 Procedimiento general para la hidrólisis enzimática de <i>trans</i> -(±)-3,4-diacetoxi-1-benciloxicarbonilpirrolidina, <i>trans</i> -(±)-35.....	202
III.8.7 Procedimiento general para la acetilación enzimática de <i>trans</i> -(±)-1-benciloxicarbonil-3,4-dihidroxipirrolidina, <i>trans</i> -(±)-37	202
III.8.8 Síntesis de (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-1-benciloxicarbonil-3,4-dihidroxipirrolidina, (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-37	203
III.8.9 Síntesis de (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-diacetoxi-1-benciloxicarbonilpirrolidina, (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-35.....	204
CAPÍTULO IV: Preparación biocatalítica de <i>trans</i>-3-amino-4-hidroxipirrolidinas enantiopuras.....	207
INTRODUCCIÓN.....	209
ANTECEDENTES	215
OBJETIVOS	223
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	227
IV.1. ACETILACIÓN ENZIMÁTICA DE LA <i>TRANS</i> -(±)-3-AMINO-1-BENCILOXICARBONIL-4-HIDROXIPIRROLIDINA Y DERIVADOS	230
IV.2. HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE LOS DERIVADOS DE <i>TRANS</i> -(±)-4-ACETOXI-3-AMINO-1-BENCILOXICARBONILPIRROLIDINA.....	237

IV.3 DETERMINACIÓN DE LOS EXCESOS ENANTIOMÉRICOS	242
IV.4 ASIGNACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA	246
CONCLUSIONES.....	251
PARTE EXPERIMENTAL.....	255
IV.5 REACTIVOS Y DISOLVENTES.....	257
IV.6 TÉCNICAS DE ANÁLISIS.....	258
IV.7 PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS.....	259
IV.7.1 Síntesis de <i>trans</i> -(±)-3-azido-1-benciloxicarbonil-4-hidroxi- <i>pirrolidina</i> , <i>trans</i> -(±)-38	259
IV.7.2 Síntesis de <i>trans</i> -(±)-3-amino-1-benciloxicarbonil-4-hidroxi- <i>pirrolidina</i> , <i>trans</i> -(±)-39	260
IV.7.3 Síntesis de <i>trans</i> -(±)-3-acetamido-1-benciloxicarbonil-4-hidroxi- <i>pirrolidina</i> , <i>trans</i> -(±)-40	261
IV.7.4 Síntesis de <i>trans</i> -(±)-3-acetamido-4-acetoxi-1-benciloxicarbonil- <i>pirrolidina</i> , <i>trans</i> -(±)-41	262
IV.7.5 Síntesis de <i>trans</i> -(±)-1-benciloxicarbonil-3- <i>terc</i> -butoxicarbonilamino-4-hidroxi- <i>pirrolidina</i> , <i>trans</i> -(±)-42	263
IV.7.6 Síntesis de <i>trans</i> -(±)-4-acetoxi-1-benciloxicarbonil-3- <i>terc</i> -butoxicarbonilamino- <i>pirrolidina</i> , <i>trans</i> -(±)-43	264
IV.7.7 Síntesis de <i>trans</i> -(±)-1-benciloxicarbonil-3-dialilamino-4-hidroxi- <i>pirrolidina</i> , <i>trans</i> -(±)-44	265
IV.7.8 Síntesis de <i>trans</i> -(±)-4-acetoxi-3-dialilamino-1-benciloxicarbonil- <i>pirrolidina</i> , <i>trans</i> -(±)-45	266
IV.7.9 Procedimiento general para la acilación enzimática..	267

Índice

IV.7.10 Procedimiento general para la hidrólisis enzimática	267
IV.7.11 Preparación de (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-1-benciloxycarbonil-3- <i>terc</i> -butoxicarbonilamino-4-hidroxi-pirrolidina, (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-42.....	268
IV.7.12 Preparación de (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-3-amino-1-benciloxycarbonil-4-hidroxi-pirrolidina, (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-39.....	269
IV.7.13 Preparación de dihidrocloruro de (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-3-amino-4-hidroxi-pirrolidina, (3 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)-46.....	270
IV.7.14 Obtención de (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-4-acetoxi-3-dialilamino-1-benciloxycarbonil-pirrolidina, (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-45	271
IV.7.15 Preparación de (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3-dialilamino-1-benciloxycarbonil-4-hidroxi-pirrolidina, (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-44	272
IV.7.16 Preparación de (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3-amino-1-benciloxycarbonil-4-hidroxi-pirrolidina, (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-39	273

INTRODUCCIÓN

A lo largo de los siglos el ser humano se ha caracterizado por usar, de una forma más o menos racional, los recursos que la naturaleza ha puesto a su disposición. Pero no fue hasta después de la Revolución Industrial cuando el hombre ha centrado todos sus esfuerzos en sacar el mayor rendimiento al medio que le rodea, ya sea explotando los recursos naturales o imitando mecanismos de producción del medio natural. Esta tendencia se observa en todos los ámbitos de trabajo, siendo la química una de las ciencias que más soluciones busca en el entorno.

Más concretamente, los químicos orgánicos buscan constantemente nuevos compuestos útiles; para ello no sólo extraen de la naturaleza todo tipo de nuevos productos, sino que utilizan los recursos naturales para comprobar sus posibles beneficios y tratar de desarrollar métodos que le proporcionen los productos encontrados de una forma más eficiente.

Introducción

1 LA INDRUSTRIA Y LA BIOCATÁLISIS

La historia de la química industrial es un relato en continuo cambio. En el siglo XIX, la química industrial tenía un relativamente pequeño campo de aplicación, debido a los limitados medios de los que disponían los fabricantes. Fue durante el siglo XX cuando la química industrial moderna logró el progreso necesario para producir una gran variedad de productos y materiales en grandes cantidades, los cuales ya forman parte de la sociedad moderna.¹ Este creciente aumento en la cantidad de productos consumidos ha generado un gran gasto de recursos al utilizar métodos clásicos de síntesis, con la correspondiente repercusión medioambiental. Es aquí donde los procesos catalíticos cobran un papel importante porque aportan una solución al problema del gasto de materias primas y su correspondiente repercusión económica y ecológica.²

La utilización de métodos biocatalíticos está cada vez más demandada por ser éstos una prometedora alternativa como catalizadores. Su uso comenzó a principios del siglo XX, mas concretamente, en 1930 los enzimas ya se utilizaban en métodos industriales de producción.³ Desde entonces ha aumentado el número de aplicaciones biotecnológicas basado en el continuo desarrollo en la producción de enzimas, así como sus aplicaciones en procesos de transformación.⁴ Actualmente, en la aplicación industrial hay un continuo aumento en la utilización de métodos biocatalíticos para la obtención de muy diversos productos,⁵ este espectro general de aplicaciones en la industria queda reflejado en la figura 1.

¹ Ali, B. M. Ali and J. G. Speight, *Handbook of Industrial Chemistry - Organic Chemicals*, ed. M. F. McGraw-Hill, New York, **2005**.

² R. Sheldon, *Green Chemistry in the Pharmaceutical Industry*, ed. P. J. Dunn, A. Wells and M. T. Williams, Wiley-VCH, Weinheim, **2010**

³ M. Papagianni, *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 244–263.

⁴ A. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 548–556.

⁵ D. Vasic-Racki, *Industrial Biotransformations*, ed. A. Liese, K. Seelbach and C. Wandrey, Wiley-VCH, Weinheim, 2nd ed. **2006**.

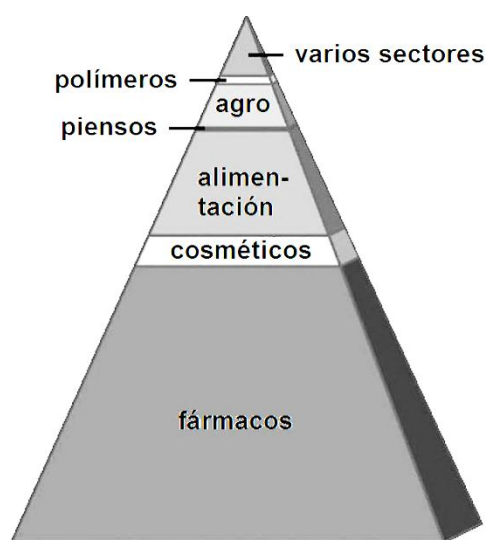


Figura 1: Biotransformaciones en diferentes campos de la industria.

Concretamente es en la industria farmacéutica donde se encuentra, con diferencia, la mayor cantidad de procesos biocatalíticos dentro de la industria química en general.

La mayor parte de los compuestos que las compañías farmacéuticas tienen en sus líneas de producción son ópticamente activos y este porcentaje sigue en aumento. La introducción de sustancias enantiopuras también está regulada por las cada vez más estrictas normas de la FDA (Food and Drug Administration) en EEUU y el Comité Europeo de Especialidades Farmacéuticas en Europa. Las autoridades encargadas de la inscripción de nuevos compuestos activos demandan cada vez más la síntesis específica de un estereoisómero. Ya desde 1992 la FDA y el Comité Europeo de Especialidades Farmacéuticas estipularon que la acción fisiológica de cada enantiómero de un producto farmacéutico debe ser caracterizada individualmente.⁶

Este considerable esfuerzo se justifica por el importante papel que juega la quiralidad de los procesos biológicos. Está demostrado que la actividad biológica depende de la configuración de los carbonos asimétricos en moléculas ópticamente activas.

Esta actividad puede ser muy diferente para una pareja de enantiómeros. Algunos ejemplos ya clásicos que muestran este hecho son:

⁶ M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788 – 824.

Introducción

la *R*-carvona, de olor a meta, que presenta un aroma muy diferente a su enantiómero la *S*-carvona, de olor a alcaravea (olor característico de la hierba alcaravea o comino de prado, *Carum carvi*) cuyo olor es muy parecido al anís.⁷

Otro ejemplo es el caso de etambutol donde un enantiómero se usa en el tratamiento de la tuberculosis mientras que el otro provoca ceguera.

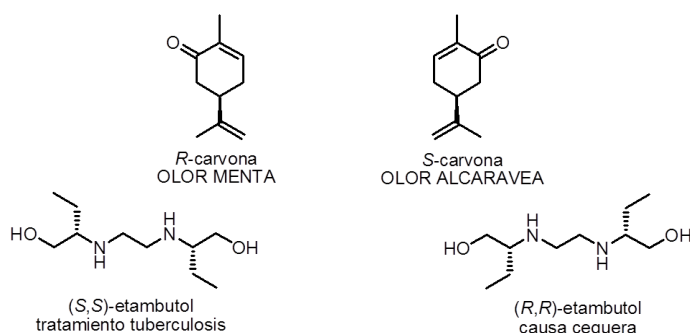


Figura 2: Ejemplos de la importancia de la quiralidad.

La implantación de la biotecnología en la industria se debe, principalmente, a la creciente necesidad de compuestos enantiopuros y polifuncionalizados; particularmente en la industria farmacéutica.⁸ Algunas de las razones que hacen tan atractivas a las biotransformaciones para su utilización en métodos sintéticos industriales son:^{9,10,11}

Los enzimas actúan como catalizadores no tóxicos.

Son muy selectivos para la obtención de productos enantiopuros.

Puede generar una disminución del gasto de materias primas en el proceso de síntesis.

Trabajan en condiciones suaves de reacción: temperatura ambiente, presión atmosférica y niveles de pH moderados; con su consecuente reducción en el consumo energético.

Su utilización en medios acuosos se caracteriza por no ser tóxica.

La biocatálisis tiene el potencial para prevenir consumos grandes de metales y disolventes orgánicos.

⁷ A. Lehninger, D. Nelson, M. Cox, *Principios de bioquímica*, 2ª ed. Omega, Barcelona, 1995.

⁸ H. Meyer, N. Turner, *Mini-Rev. Org. Chem.* **2009**, *6*, 300–306.

⁹ A. Schmid, F. Hollmann, J. Park, B. Buehler, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 359–366.

¹⁰ R. Wohlgenuth, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 713–724.

¹¹ R. Wohlgenuth, *Curr. Opin. Microbiol.* **2010**, *13*, 283–292.

Hay que decir que en muchos casos, se puede tener la impresión que la base de la biocatálisis es, *per se*, mas ecológica que otras alternativas químicas. Algunas de las cualidades de los enzimas hacen que esto no siempre sea así y es necesario la evaluación de cada proceso biocatalítico para poder llegar a considerar que dicho proceso es ecológico o no.

*“La esperanza es que la aplicación de las reacciones catalizadas por enzimas resulte muy ecológica, aunque en la actualidad no siempre es así.”*¹²

2 ENZIMAS Y BIOTRASFORMACIONES

Los enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas aumentando la velocidad de las mismas, sin consumirse en el proceso y sin modificar el sentido de los equilibrios químicos; estos procesos están englobados dentro de lo que se denomina biocatálisis. La biocatálisis se define de modo general como la mediación de reacciones químicas por parte de sistemas biológicos, ya sean en su forma de enzimas aisladas, células enteras o extractos de células libres.¹³ Así, es posible convertir un compuesto químico, al que se denomina sustrato, en otro, denominado producto, empleando un enzima como catalizador. En los últimos años la biocatálisis ha mostrado un auge espectacular apoyada por las interesantes propiedades que presentan los biocatalizadores, ya que son altamente selectivos, trabajan en condiciones de reacción suaves, son respetuosos con el medio ambiente y capaces de aceptar una gran variedad de sustratos.¹⁰ Estas características han sido aprovechadas por el sector industrial para el desarrollo de procesos enzimáticos económicamente rentables destinados a la preparación de productos de alto valor añadido.^{14,15}

Cuando los enzimas se utilizan aislados del organismo del que proceden se pueden realizar reacciones en disolventes orgánicos.¹⁶ Por otro lado, si se utilizan los microorganismos completos, en los que está incluido el enzima de interés, presentan como principal ventaja la de no tener que

¹² C. Slater, M. Savelski, W. Carole and D. J. C. Constable, *Green Chemistry in the Pharmaceutical Industry*, ed. P. J. Dunn, A. Wells and M. T. Williams, Wiley-VCH, Weinheim, **2010**.

¹³ T. Hudlicky, J. W. Reed, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3117-3132.

¹⁴ S. Sanchez, A. L. Demain, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 224-230.

¹⁵ B. M. Nestl, B. A. Nebel, B. Hauer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 187-193.

¹⁶ G. Carrea, S. Riva, *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Medium*; Wiley-VCH: Weinheim (Alemania) **2008**.

Introducción

aislar el enzima de la célula ya que por lo general suele ser un método muy laborioso.

En los últimos años se están desarrollando métodos para la obtención de proteínas modificadas genéticamente para ser utilizadas como enzimas (enzimas mutantes), con el fin de mejorar las propiedades catalíticas de los enzimas originales.

Los enzimas, también llamados biocatalizadores, presentan una alta especificidad, característica que los hace especialmente atractivos para la síntesis orgánica y para la industria farmacéutica; donde el interés por conseguir compuestos de elevada pureza enantiomérica está continuamente en aumento.¹⁷

Los procesos enzimáticos presentan tres tipos de selectividad:

Enantioselectividad: capacidad para distinguir entre los dos enantiómeros de una mezcla racémica, consiguiendo que sólo uno reaccione.^{18,19,20}

Quimioselectividad: preferencia por uno de los diferentes grupos funcionales presentes en una molécula. Así, por ejemplo, se ha conseguido acilar enzimáticamente un alcohol en presencia de una amina.²¹

Regioselectividad: capacidad de diferenciar uno de los centros químicamente equivalentes de un compuesto y realizar allí una transformación.²²

A las reacciones catalizadas por microorganismos o por enzimas aislados se denominan biotransformaciones, éstas suponen un excelente complemento a las técnicas convencionales de síntesis de fármacos; entendiendo estas biotransformaciones como la implantación de la biocatálisis en procesos de química orgánica.^{23,24,25}

Para realizar una biotransformación es necesario tener en cuenta el tipo de biocatalizador que se va a emplear (microorganismo o enzima aislado). La elección de un tipo u otro de biocatalizador dependerá de varios factores como son el tipo de reacción que catalizará, la necesidad de usar

¹⁷ N. Ran, L. Zhao, Z. Chen, J. Tao, *Green Chem.* **2008**, *10*, 361-372.

¹⁸ Y. Hirose, K. Kariya, J. Sasaki, Y. Kurono, H. Ebike, K. Achiwa, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 7157-7160.

¹⁹ V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales, *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*. Wiley-VCH, Weinheim (Alemania) **2008**.

²⁰ W.-D. Fessner, T. Anthonsen, *Modern Biocatalysis*.

²¹ N. Chinsky, A. L. Margolin, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 386-388.

²² S. Riva, J. Chopineau, A. P. G. Kieboom, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 584-589.

²³ J. M. Woodley, *Trends. Biotechnol.* **2008**, *26*, 321-327.

²⁴ R. N. Patel, *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 659-701.

²⁵ J. Tao, X.-H. Xu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 43-50.

cofactores o no, la escala a la que se quiere realizar el proceso y el presupuesto del que se dispone. Así, la utilización de microorganismos o células enteras resulta barata ya que no es necesario añadir cofactores enzimáticos por estar incluidos en los mismos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que presenta algunos inconvenientes como la necesidad de trabajar a altas diluciones o la de tener que incubar el microorganismo previamente, proceso que puede llevar varios días; también se pueden producir reacciones laterales debido al metabolismo celular.

Todos los problemas que presenta el trabajar con células enteras se pueden solucionar cuando se trabaja con enzimas aislados, aunque presentan como inconveniente el aislamiento del enzima del microorganismo al que pertenecen, ya que son métodos caros y costosos; no obstante, hoy en día existen un gran número de enzimas comercialmente accesibles, y aunque en algunos casos son caros, este problema se solventa al ser posible su reutilización.

Hasta hace pocos años se pensaba que los biocatalizadores eran muy específicos y tradicionalmente se clasifican de acuerdo con el tipo de reacciones que catalizan.

Tipo de enzima	Reacción catalizada
Oxidorreductasas	Reacción de oxido-reducción
Transferasas	Transferencia de grupos
Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis
Liasas	Adiciones a dobles enlaces
Isomerasas	Reacciones de isomerización
Ligasas	Formación de enlaces

Tabla 1: Clasificación de los enzimas según las reacciones que catalizan.²⁶

Sin embargo, en los últimos años se ha descubierto que hay enzimas que muestran una inusual promiscuidad catalítica; catalizando reacciones diferentes a su reacción natural.^{27,28} Así, algunas lipasas han demostrado que pueden actuar como liasas catalizando reacciones aldólicas, de adición tipo Michael o reacciones de epoxidación de alquenos.^{29,30,31}

²⁶ K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry*, 6ª ed.; Springer: Berlin, **2011**.

²⁷ R. J. Kazlauskas, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 195-201.

²⁸ E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504-4523.

²⁹ A. Magnusson, K. Hult, M. Holmquist, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4354-4355.

³⁰ O. Torres, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Commun.* **2004**, 1724-1725.

³¹ E. G. Ankudey, H. F. Olivo, T. L. Peeples, *Green Chem.* **2006**, *8*, 923-926.

Introducción

La selectividad y especificidad de las reacciones no es la única ventaja de este tipo de procesos. Las reacciones catalizadas por enzimas se llevan a cabo en condiciones suaves, que minimizan los problemas de isomerización o epimerización de los productos. También hay que tener en cuenta que los biocatalizadores se muestran muy eficaces, llegando a acelerar hasta 10^{12} veces la velocidad de una determinada reacción.

Por último, los procesos biocatalíticos son menos peligrosos, no contaminantes y consumen menos energía que los métodos químicos convencionales, especialmente aquellos en los que se utilizan como catalizadores metales pesados.

Por todas estas razones, las reacciones enzimáticas representan una alternativa efectiva y a veces preferible a la química sintética tradicional. Durante las últimas décadas, el número de trabajos relacionados con la catálisis enzimática ha crecido de forma exponencial, lo que se ha reflejado en diferentes procesos industriales que ya desde hace años se encuentran operativos.³²

A mediados de la década de los 80 se descubrió que los enzimas podían llevar a cabo transformaciones en medios anhidros manteniendo prácticamente inalterada su actividad natural.³³ Estos biocatalizadores necesitan una microcapa de agua alrededor de la proteína, conocida como capa esencial de agua; por ello disolventes hidrofílicos, como la dimetilformamida, son menos adecuados para este tipo de transformaciones si se comparan con disolventes más hidrofóbicos como el acetato de etilo, debido a que los primeros disuelven con mayor facilidad esa capa esencial, lo que hace que el enzima cambie de conformación y pierda su actividad catalítica.

Entre las ventajas de usar biocatalizadores en disolventes orgánicos se pueden mencionar:

Los sustratos orgánicos se disuelven mucho mejor, minimizando los problemas de difusión y la inhibición por parte del sustrato y/o del producto.

Si se evita el agua, se evitan reacciones laterales indeseadas de hidrólisis o ácido-base.

Los procesos de aislamiento y de purificación de los productos finales de la reacción se facilitan.

³² A. Schmid, J. S. Dordick, B. Haver, A. Hener, M. Wubbolts, B. Wiltholt, *Nature* **2001**, *409*, 258-268.

³³ A. Zaks, A. M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 3192-3196.

Algunos enzimas son térmicamente más estables en disolventes no acuosos, soportando temperaturas más elevadas durante más tiempo.

Una modificación realizada sobre los enzimas ha sido la de inmovilizarlos sobre soportes sólidos, lo que permite separar el enzima del medio de reacción por filtración, incluso cuando se trabaja en medio acuoso, aumentar su estabilidad y facilita la reutilización del biocatalizador.

3 LIPASAS

En las biotransformaciones que se han realizado en esta memoria se han utilizado lipasas. Las lipasas son triglicerol hidrolasas cuya principal función biológica es la de catalizar la hidrólisis de triglicéridos para dar ácidos grasos y glicerol. Actualmente se han caracterizado un gran número de ellas y se ha visto que presentan distinto grado de eficiencia y de especificidad.³⁴

La estructura primaria de varias lipasas se ha obtenido por secuenciación de sus aminoácidos o de sus ácidos nucleicos. El número de aminoácidos de dicha estructura varía de 270 a 641. Todas las lipasas estudiadas hasta ahora tienen secuencias homólogas, incluyendo las del entorno de la serina del centro activo (glicina-Y-serina-Z-glicina, donde Z e Y son restos que pueden variar).

Las estructuras tridimensionales de varias lipasas, determinadas por rayos X, ponen de manifiesto la similitud entre ellas. El patrón de plegamiento hace que la disposición espacial del centro catalítico sea muy parecida.³⁵

Una característica fundamental de las lipasas, que las diferencia de otras hidrolasas y las convierte en los enzimas con mayor potencial sintético, es la interacción que presentan con los sustratos. La catálisis en medio acuoso con lipasas presenta muy baja actividad con sustratos hidrosolubles, pero cuando la concentración del sustrato es tan alta que sobrepasa el límite de solubilidad formando una segunda fase lipófila, se produce un gran incremento en la actividad de la lipasa. Esta propiedad se conoce como activación interfacial.³⁶ El hecho de que las lipasas durante la

³⁴ R. D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608-1633.

³⁵ M. Cygler, P. Grochulski, R. J. Kazlauskas, J. D. Schrag, F. Bouthillier, B. Rubin, A. N. Serreqi, A. K. Gupta, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3180-3186.

³⁶ R. Verger, *Trends. Biotechnol.* **1997**, *15*, 32-38.

Introducción

catálisis estén expuestas a una fase lipídica demuestra que son capaces de trabajar en entornos hidrofóbicos manteniendo su actividad.^{37,38}

Por ello, cuando las lipasas ejercen su catálisis en medios orgánicos es posible reemplazar su nucleófilo natural, el agua, por otros como alcoholes (reacciones de transesterificación), aminas (reacciones de aminólisis),^{39,40,41,42} amoníaco (reacciones de amonólisis),^{24, 43, 44} peróxidos, tioles, hidrazinas, etc.

Se ha demostrado que el mecanismo catalítico de las lipasas y proteasas en medio orgánico es similar al que tiene lugar en agua.⁴⁵ Se ajusta a la cinética de Michaelis-Menten con la formación de un complejo enzima-sustrato previo a la formación de los enlaces covalentes. También se forma un intermedio estable acil-enzima. Con la utilización de inhibidores específicos se ha comprobado que interviene el mismo conjunto de aminoácidos del sitio catalítico que en la reacción en agua. La principal diferencia con la reacción en agua es que se trata de una catálisis heterogénea, por lo que pueden aparecer limitaciones de difusión que en agua no existen.

En el esquema siguiente se representa el mecanismo de acción de las enzimas denominadas serín-hidrolasas,⁴⁶ entre las que se encuentran las lipasas.

³⁷ U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis*, Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **1999**.

³⁸ A. Ghanem, H. Y. Aboul-Enein, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3331-3351.

³⁹ V. Gotor, R. Brieva, C. González, F. Rebolledo, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 9207-9214.

⁴⁰ V. M. Sánchez, F. Rebolledo, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1464-1470.

⁴¹ L. E. Iglesias, V. M. Sánchez, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 2675-2677.

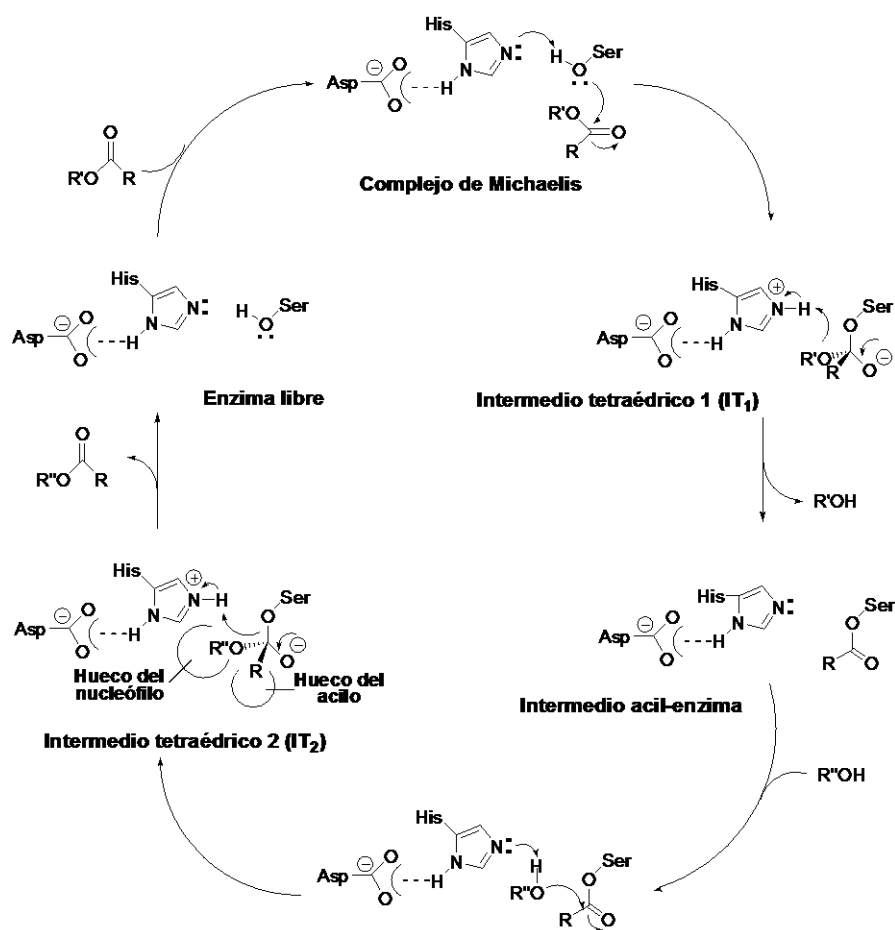
⁴² V. Gotor, *Enzymes in Action: Green Solutions for Chemical Problems*, NATO Science Series Vol. 33, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **2000**, 117-132.

⁴³ M. J. García, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *38*, 6141-6142.

⁴⁴ E. García Urdiales, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 721-726.

⁴⁵ L. Hedstrom, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501-4523.

⁴⁶ A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, 3ª Ed.; Freeman, Nueva York (USA), **2000**.



Esquema 1: Mecanismo catalítico de la serina-hidrolasa.

En primer lugar, se observa como el agente de acilación interactúa con el enzima formando el complejo de Michaelis-Menten.

Seguidamente se produce una transferencia de protones mediada por una triada catalítica (presente en el centro activo de la enzima) compuesta por una serina, una histidina, y un residuo aspartato (normalmente) o glutarato, originando el ataque del hidroxilo de la serina al carbonilo del agente de acilación y formándose el intermedio tetraédrico 1 (IT₁).

Este complejo evoluciona hacia la formación del intermedio acil-enzima mediante la donación de un protón del nitrógeno de la histidina al heteroátomo del grupo saliente, liberándolo.

A continuación, mediante la activación del nucleófilo por parte de la histidina tiene lugar el ataque del nucleófilo (el natural es el agua, aunque son aceptados otros muchos) al carbonilo unido a la serina, obteniéndose el intermedio tetraédrico 2 (IT₂).

Introducción

Por último, mediante el paso del protón del nitrógeno de la histidina hacia el oxígeno de la serina el enzima queda libre y puede volver a entrar en un nuevo ciclo catalítico, obteniéndose a la vez el nucleófilo ya acilado.

3.1 Lipasas utilizadas en esta memoria.

Las lipasas de *Candida antarctica* tipo A y B (CAL-A y CAL-B) y de *Pseudomonas cepacia* (PSL) son con diferencia las hidrolasas más utilizadas como biocatalizadores y las que se han utilizado en esta memoria. Como principales ventajas de éstas y otras lipasas son su disponibilidad comercial a bajo coste, no necesitan cofactor y son muy activas en disolventes orgánicos.

La lipasa de *Candida antarctica* tipo B (CAL-B) es una proteína globular pequeña cuya cadena polipeptídica está compuesta de 317 aminoácidos,⁴⁷ los cuales adoptan una configuración tridimensional conocida como pliegue de la hidrolasa (Figura 3).

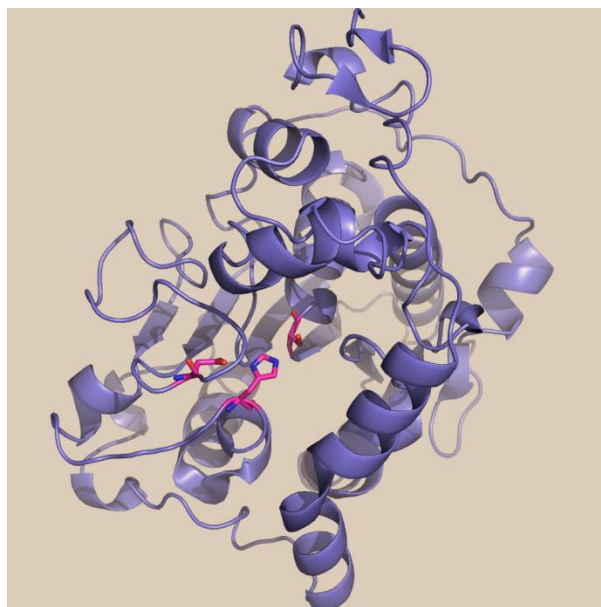


Figura 3: Estructura tridimensional de la CAL-B.

Esta enzima proviene de la levadura *Candida antarctica* originariamente aislada en la Antártida. Su estructura presenta en su centro

⁴⁷ S. Lutz, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2743-2748.

activo dos canales casi paralelos que se extienden desde la serina del centro activo hasta la superficie y que difieren en el tamaño de sus huecos. El hueco grande hidrofóbico aloja el fragmento acilo del sustrato y en el hueco más pequeño situado por debajo de la triada catalítica se coloca el nucleófilo.

El tamaño restringido de dicho centro activo sumado a las fuertes interacciones existentes entre los aminoácidos de la cadena proteica y los sustratos explica la excelente enantioselectividad que muestra frente a alcoholes secundarios⁴⁸ y otros nucleófilos como aminas primarias.^{49,50,51} Entre sus aplicaciones más importantes se encuentra la preparación de aminas y amidas, tanto quirales como aquirales a través de procesos de aminólisis y amonólisis enzimática.⁵²

La lipasa de *Candida antarctica* tipo A (CAL-A) es una proteína que pertenece a la familia de las α/β hidrolasas y su mecanismo de actuación es el típico de las serin-hidrolasas,⁵³ compuestas por 441 aminoácidos, donde la triada catalítica está compuesta por los aminoácidos Ser184, His336 y Asp334.

Una característica de ésta lipasa, que no tienen otras, es que posee una tapa compuesta por una hebra de 92 aminoácidos al lado del centro activo y se cree que interviene directamente en el comportamiento del mismo. Esta lipasa ha recibido mucha menos atención que la CAL-B a pesar de que la CAL-A, en general, es más eficaz para la hidrólisis en disolventes orgánicos, es más resistente a temperaturas más elevadas y trabaja en un intervalo más amplio de pH que la CAL-B.⁵⁴ La CAL-A es inusualmente buena aceptando alcoholes terciarios⁵⁵ y muestra buena selectividad por la N-acilación de β -aminoésteres.^{56,57}

⁴⁸ V. Gotor, *Biocatal. Biotransform.* **2000**, *18*, 87-103.

⁴⁹ F. van Rantwijk, M. A. P. J. Hacking, R. A. Sheldon, *Monats. Chem.* **2000**, *131*, 549-569.

⁵⁰ I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 201-209.

⁵¹ F. Van Rantwijk, R. Sheldon, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 502-519.

⁵² V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 1125-1143.

⁵³ R. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem.*, **1998**, *37*, 1609-1633.

⁵⁴ D. Ericsson, A. Kasrayan, P. Johansson, T. Bergfors, A. Sandström, J. Bäckvall, S. Mowbray, *J. Mol. Biol.*, **2008**, *376*, 109-119

⁵⁵ J. Bosley, J. Casey, A. Macrae, G. MyCock, **1997**, U.S. Patent 5658769.

⁵⁶ S. Gedy, A. Liljeblad, L. Lázár, F. Fülöp, L. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, *12*, 105-110.

⁵⁷ T. Liljeblad, L. Kanerva, *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 5831-5854.

Introducción

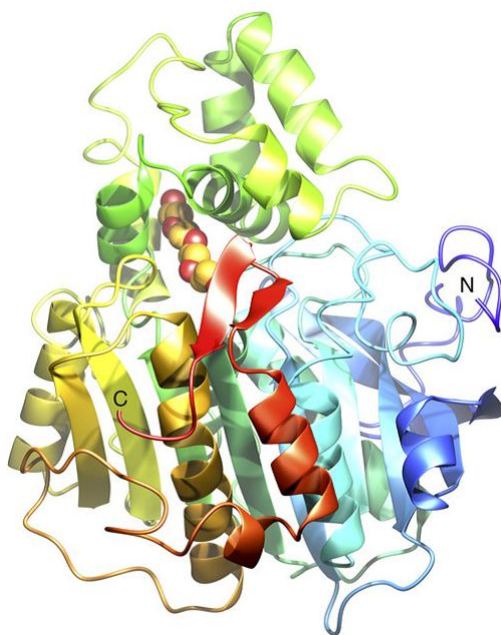


Figura 4: Estructura tridimensional de la CAL-A, en el centro activo se muestra la posición que adopta el polietilenglicol (reperesentado por bolas amarillas y rojas).⁵⁵

La lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PSL) al igual que el resto de las lipasas es una α/β hidrolasa en la que los aminoácidos Ser87, His286 y Asp264 forman la triada catalítica.^{58,59,60,61} Además los hidrógenos del grupo amida presentes en los aminoácidos Leu17 y Gln88 también intervienen en la catálisis al estabilizar mediante la formación de enlaces por puente de hidrógeno el oxianión intermedio que se forma durante el proceso catalítico. El centro activo de la PSL está constituido por tres huecos enlazantes siendo los dos huecos hidrofóbicos los causantes de la enantiodiscriminación. El pH óptimo de trabajo de esta lipasa es 7.0.

Si bien tradicionalmente ha recibido este nombre, en los últimos años es común referirse a esta enzima como lipasa de *Burkholderia cepacia*, lo que ha creado en ciertos sectores confusión por las abreviaturas que ha recibido esta enzima en la bibliografía (PSL, PCL o BCL).

Cabe destacar que la PSL permite la resolución de alcoholes secundarios. Esta lipasa, ha sido ampliamente utilizada en la resolución de

⁵⁸ K. K. Kim, K. Y. Hwang, H. S. Jeon, S. Kim, R. M. Sweet, C. H. Yang, S. W. Suh, *J. Mol. Biol.* **1992**, 227, 1258-1262.

⁵⁹ K. K. Kim, H. K. Song, D. H. Shin, K. Y. Hwang, S. W. Suh, *Structure* **1997**, 5, 173-185

⁶⁰ K. Lemke, M. Lemke, F. Theil, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6268-6273.

⁶¹ T. Schulz, J. Pleiss, R. D. Schmid, *Protein Sci.* **2000**, 9, 1053-1062.

estos alcoholes mediante procesos de acilación o hidrólisis,^{62,63,64} en la preparación de β -aminoácidos a través de procesos de aminólisis⁶⁵ o en la desimetrización de alcoholes donde muestra una elevada selectividad comparándola con otras lipasas.^{66,67,68}

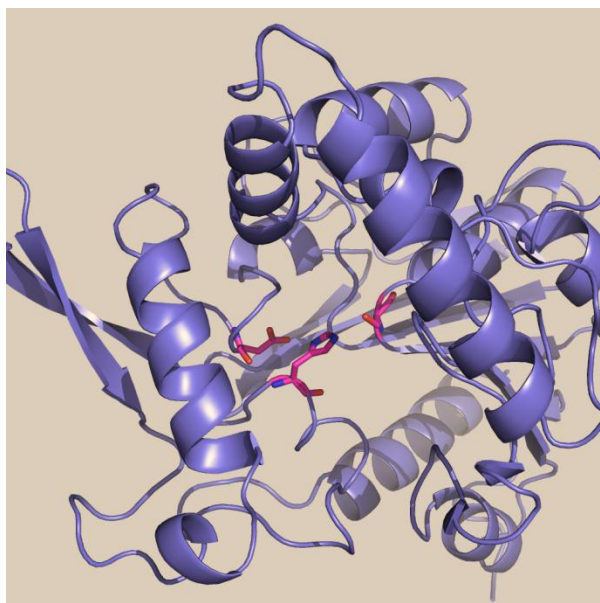


Figura 5: Estructura tridimensional de la PSL.

4 RESOLUCIÓN CINÉTICA ENZIMÁTICA

Las reacciones enzimáticas utilizadas en esta memoria son resoluciones cinéticas, que como se ha mencionado se ajustan al mecanismo de Michaelis-Menten.

Inicialmente, el sustrato se une de forma covalente al centro activo del enzima para formar el complejo enzima-sustrato (ES) que se denomina complejo de Michaelis. La concentración de este intermedio viene dada por la constante de Michaelis (K_M), que es la constante de disociación del

⁶² M. Bucciarelli, P. Davoli, A. Forni, I. Moretti, F. Prati, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 2489-2494.

⁶³ A. Kamal, M. Sandbhor, K. V. Ramana, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 815-820.

⁶⁴ A. Kirschner, P. Langer, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2871-2874.

⁶⁵ A. Liljeblad, L. T. Kanerva, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5831-5854.

⁶⁶ O. Nordim, B. Nguyen, C. Vorde, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2000**, 367-376.

⁶⁷ C. Genter, D. R. Schmid, J. Pleiss, *J. Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2002**, *26*, 57-66.

⁶⁸ Y. Kawanami, K. Itoh, *Chem. Lett.* **2005**, *34*, 682-683.

Introducción

complejo (ES). Esta constante, representa químicamente la concentración de sustrato a la que la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. A continuación tiene lugar la formación y liberación del producto. La constante de velocidad de pseudoprimer orden que rige esta transformación (k_{cat}), representa el número máximo de moléculas de sustrato transformadas en producto por unidad de tiempo y por unidad de enzima (o por cada sitio activo). Un último parámetro a destacar en este mecanismo es la constante de especificidad (k_{cat}/K_M), que representa la constante de velocidad aparente de segundo orden de la reacción enzimática global a concentraciones muy bajas de sustrato.

En una resolución cinética la pureza enantiomérica de sustrato y producto varía con el avance de la reacción. Por esta razón, comparar los valores de los excesos enantioméricos (ee) no tienen demasiado sentido a menos que se comparen a conversiones iguales. Por ello para analizar la enantioselectividad de una reacción enzimática se necesita un parámetro que permita comparar distintos procesos de resolución independientemente del grado de conversión alcanzado. Este parámetro es la relación entre las constantes de especificidad de ambos enantiómeros y se le denomina enantioselectividad⁶⁹ o razón enantiomérica (E) de una resolución enzimática. Ésta mide la habilidad de un enzima para distinguir entre dos enantiómeros de una mezcla racémica bajo determinadas condiciones de reacción como temperatura, disolvente, etc.

$$E = \frac{(k_{cat}/K_M)_R}{(k_{cat}/K_M)_S}$$

Ecuación 1: Expresión matemática para la E .

Como regla general, las reacciones con valores de E por debajo de 15 no tienen utilidad para fines prácticos. Solo valores de E superiores a 100 pueden conseguir producto y/o sustrato enantiopuros a conversiones cercanas al 50%.

Existen varios métodos para el cálculo de valores de E ,^{70,71} siendo el grado de conversión (c), el exceso enantiomérico de sustrato (ee_s) y el exceso enantiomérico de producto (ee_p) variables experimentales que pueden ser utilizadas para conocer el valor de la magnitud. Para reacciones irreversibles

⁶⁹ C. S. Chen, Y. Fuyimoto, G. Girdaukas, C. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294-7299.

⁷⁰ J. Rackels, A. Straathof, J. J. Heijnen, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 1051-1056.

⁷¹ A. J. J. Straathof, J. A. Jongejan, *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *21*, 559-571.

que siguen una cinética de Michaelis-Menten y en las que no existe inhibición por producto, la E se puede calcular con la siguiente ecuación:

$$E = \frac{\ln \left[\frac{1 - ee_p}{1 + (ee_s / ee_p)} \right]}{\ln \left[\frac{1 + ee_s}{1 + (ee_s / ee_p)} \right]}$$

Ecuación 2: Expresión para el cálculo de la E usando ee_s y ee_p .

Hasta este punto se ha realizado una introducción general presentando las características generales de la Biocatálisis, las ventajas que plantea en síntesis orgánica y su implantación en procesos industriales. Esta introducción se ha centrado en las lipasas, que han sido ampliamente utilizadas en este trabajo. A continuación se procederá a comentar los resultados de esta Tesis Doctoral, que se ha estructurado en cuatro capítulos.

CAPÍTULO I:

Síntesis y resolución enzimática de precursores de venlafaxina.

INTRODUCCIÓN

El 1-[2-dimetilamino-1-(4-metoxifenil)etil]ciclohexanol también conocido como venlafaxina es un antidepresivo de la familia de las feniletilaminas y se caracteriza por ser un potente inhibidor de la recaptación de la serotonina (la serotonina es un compuesto sintetizado por las neuronas en el sistema nervioso central y se cree que representa un papel importante como neurotransmisor, en la inhibición de la ira, la agresión, la temperatura corporal, el humor, el sueño, el vómito, la sexualidad, y el apetito; estas inhibiciones están relacionadas directamente con síntomas de depresión). Además, su mecanismo de acción se relaciona con el de otros antidepresivos conocidos como fluoxetina, sertralina y paroxetina; ya que está directamente asociado a la potenciación de la actividad neurotransmisora en el sistema nervioso central, pero a diferencia de estos, ejerce acción moderadora sobre la noradrenalina y más débilmente sobre la dopamina. La ventaja de la venlafaxina frente a otros antidepresivos es que controla los síntomas depresivos en lapsos de tiempo mas cortos.^{72,73}

⁷² P. Mahaney, L. Gavrin, E. Trybulski, G. Stack, A. Vu, S. Cohn, F. Ye, J. Belardi, A. Santilli, J. Sabatucci, J. Leiter, G. Johnston, J. Bray, K. Burroughs, S. Cosmi, L. Leventhal, E. Koury, Y. Zhang, C. Mugford, D. Ho, S. Rosenzweig-Lipson, B. Platt, V. Smith, D. Deecher, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4038-4049

⁷³ M. Abou-Gharbia, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2-9

Introducción

Este antidepresivo se comercializa como Effexor en su forma clorohidratada, tal y como se puede ver en la figura I.1.

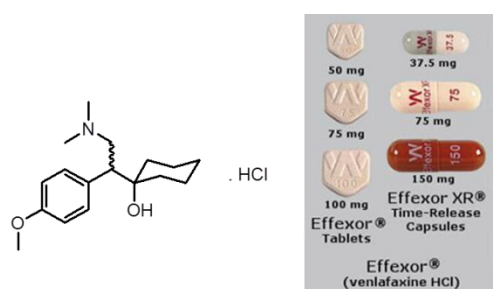


Figura I.1: Clorohidrato de venlafaxina o Effexor.

Este compuesto es metabolizado en un 90-95% en el hígado en otros metabolitos como son la *N,O*-desmetilvenlafaxina, la *N*-desmetilvenlafaxina y la *O*-desmetilvenlafaxina.

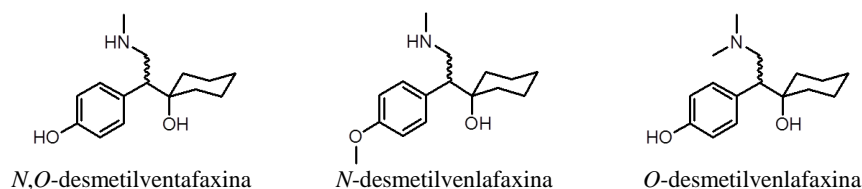


Figura I.2: Metabolitos formados en el hígado a partir de la venlafaxina.

La *O*-desmetilvenlafaxina es uno de los metabolitos mayoritarios y presenta la misma actividad biológica que su predecesor, aunque esta mucho más biodisponible ya que el clorohidrato de venlafaxina es metabolizado en el hígado generando que sus niveles de concentración en el organismo disminuyan rápidamente. Además, es un inhibidor de la recaptación de la serotonina y de la norepinefrina (la norepinefrina o noradrenalina se biosintetiza a partir de la dopamina en las vesículas y puede actuar como hormona o como neurotransmisor, un incremento en los niveles de norepinefrina incrementa el ritmo de las contracciones del corazón, promueve la liberación de glucosa de las reservas al torrente sanguíneo e incrementa el flujo sanguíneo hacia los músculos; también afecta a partes del cerebro responsables de la atención y de las respuestas controladas).

Se sabe que el enantiómero *S* de la venlafaxina es el responsable de la recaptación de serotonina, mientras que el enantiómero *R* es el responsable de la inhibición de la recaptación de la norepinefrina.^{74,75}

Por ello, teniendo en cuenta la nueva política de las agencias reguladoras respecto a los medicamentos que van apareciendo en el mercado, es evidente la necesidad de poner a punto rutas sintéticas para la preparación enantioselectiva de los dos enantiómeros del fármaco.

⁷⁴ J. Yardley, G. Husbands, G. Stack, J. Butch, J. Bicksler, J. Moyer, E. Muth, T. Andree, H. Fletcher, *J. Med. Chem.*, **1990**, *10*, 2899-2905

⁷⁵ S. Howell, D. Hicks, J. Scatina, S. Sisenwine, *Xenobiotica*, **1994**, *4*, 315-327

ANTECEDENTES

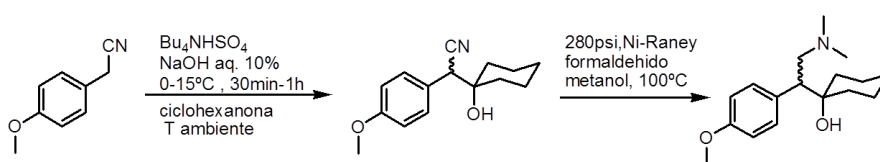
Como ha quedado reflejado en la introducción, es necesario el diseño de rutas para la síntesis enantioselectiva de la venlafaxina por sus propiedades antidepresivas y la distinta actividad que presenta cada enantiómero.

En la bibliografía se pueden encontrar varias rutas sintéticas para la obtención de la venlafaxina, en la mayoría de ellas se llega a la venlafaxina en su forma racémica, tal y como se muestra en los antecedentes de este capítulo.

Varias de las rutas sintéticas para la preparación de la venlafaxina son variantes de la síntesis que se detalla a continuación.

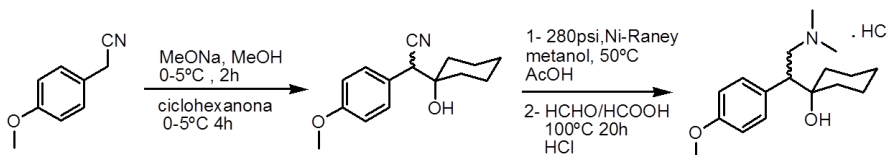
Antecedentes

Esta síntesis se lleva a cabo en dos pasos de reacción, en el primero se parte del 4-metoxiacetonitrilo que se condensa con la ciclohexanona para llegar al cianoalcohol; el cual, mediante una hidrogenación en presencia de formaldehído, es transformado en la venlafaxina en forma racémica tal y como se ilustra en el esquema I.1 de reacción.^{76,77}



Esquema I.1: Síntesis de la venlafaxina racémica.

Una variante de esta síntesis consiste en usar una disolución de metóxido de sodio en metanol para generar el carbanión, posteriormente se hace la hidrogenación en presencia de ácido acético en lugar de formaldehído y por último, se procede a la metilación de la venlafaxina utilizando formaldehído y ácido fórmico para finalmente aislar el clorhidrato de venlafaxina.^{78,79}



Esquema I.2: Síntesis de la venlafaxina racémica.

Otra variante de los métodos anteriores emplea butillitio como base a baja temperatura para generar el carbanión. La reducción del nitrilo se lleva a cabo utilizando un catalizador de rodio-alúmina.⁸⁰

En cuanto a la síntesis asimétrica de la venlafaxina, se ha descrito la preparación del enantiómero (*S*) partiendo del (*S*)-3-amino-2-(4-metoxi)fenilpropionato de metilo, el cual se sintetiza a partir de

⁷⁶ S. P. Chavan, D.A. Khobragade, S. K. Kamat, L. Sivadasan, K. Balakrishnan, T. Ravindranathan, M. K. Gurjar, U. R. Kalkote, *Tetrahedron Lett.*, **2004**, *45*, 7291-7295

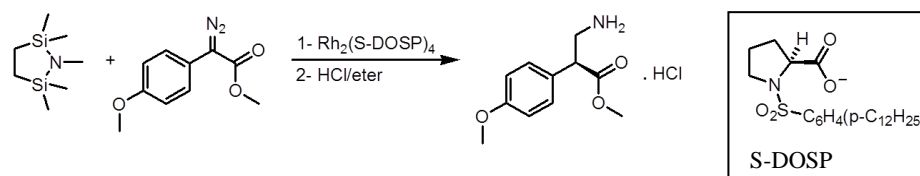
⁷⁷ Basappa, C. V. Kavitha, K. S. Rangappa, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*, 3279-3281

⁷⁸ C. V. Kavitha, S. Lakshmi, Basappa, K. Mantelingu, M. A. Sridhar, J. S. Prasad, K. S. Rangappa, *J. Chem. Crystallography*, **2005**, *35*, 957-963

⁷⁹ M. Saravanan, B. Satyanarayana, P. Reddy, *Org. Process Res. Dev.*, **2011**, *15*, 1392-1395

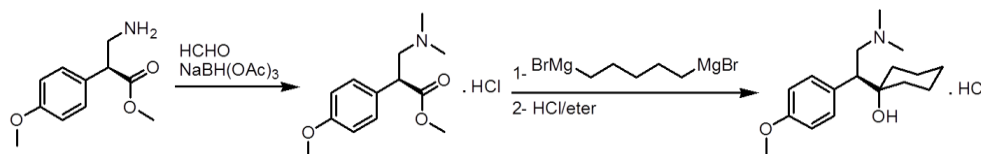
⁸⁰ G. Husbands, J. Yardley, A. Muth, US-4535186, **1985**

2-(4-metoxifenil)-2-diazoacetato de metilo, ^{81,82} N-metil-1-aza-2,5-disilaciclopentano y un catalizador quiral de rodio.



Esquema I.3: Síntesis de la (S)-3-amino-2-(4-metoxi)fenilpropionato de metilo.

Una vez obtenido el (S)-3-amino-2-(4-metoxi)fenilpropionato de metilo se trata con formaldehído y triacetilborohidruro sódico, seguido de 1,5-dibromuro de pentilmagnesiano para formar el anillo de ciclohexanol de la venlafaxina.



Esquema I.4: Síntesis de la (S)-venlafaxina.

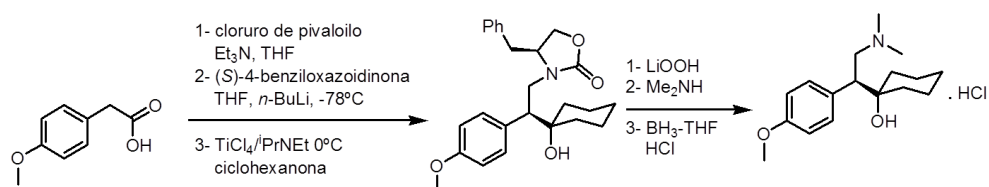
Otra alternativa para la preparación de la (S)-venlafaxina se lleva a cabo a partir del ácido 4-metoxifenilacético.⁸³ La inducción asimétrica se consigue mediante el tratamiento del ácido de partida con la (S)-4-benciloxazolidinona. Posteriormente, se hace el acoplamiento con la ciclohexanona seguido de la eliminación de la oxazolidinona para dar el hidroxiaácido quiral. Éste se transforma en hidroxiamida por tratamiento con dimetilamina. La reducción final de esta hidroxiamida permite obtener la venlafaxina de forma enantiopura, tal y como se muestra en el esquema I.5 de reacción.

⁸¹ H. Davies, A. Ni, *Chem. Commun.*, **2006**, 3110-3112

⁸² H. Davies, O. Loe, *Synthesis*, **2004**, 16, 2595-2608

⁸³ P. Mahaney, M. Antane, J. Sun, WO 2007/067501 A1, **2007**

Antecedentes



Esquema I.5: Síntesis de la (S)-venlafaxina.

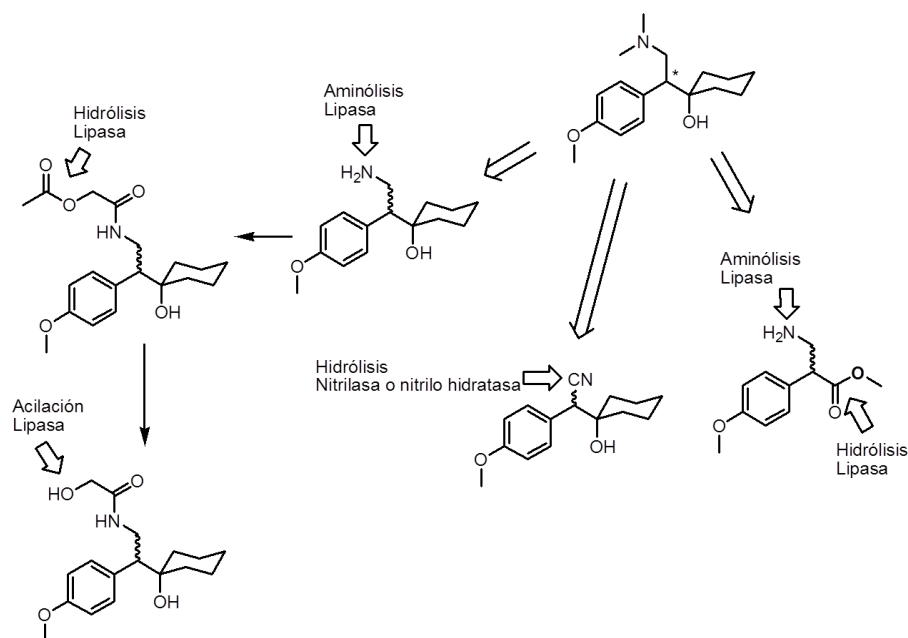
La venlafaxina quiral podría obtenerse a través de una metodología quimioenzimática, ya que varios de los intermedios en las distintas síntesis, o derivados de los mismos, podrían ser sustratos adecuados para llevar a cabo procesos de aminólisis, hidrólisis o transesterificación enzimática. En la presente memoria se estudian estas alternativas para obtener dichos precursores de forma enantiopura.

OBJETIVOS

En la introducción y los antecedentes de este capítulo se ha puesto de manifiesto la importancia de encontrar métodos para la preparación enantioselectiva de ambos enantiómeros del antidepresivo venlafaxina. Por ello en este capítulo se ha planteado como objetivo la síntesis y el estudio de la resolución de varios intermedios en la síntesis del fármaco mediante procesos de hidrólisis y acilación enzimática.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Varios de los intermedios en las rutas sintéticas para la preparación de venlafaxina mostradas en los antecedentes pueden ser sustratos adecuados en procesos biocatalíticos de resolución. En el siguiente esquema se resumen los distintos procesos, en general catalizados por lipasas, que se han estudiado en este capítulo.



Esquema I.6: Alternativas para la síntesis de la venlafaxina enantiopura.

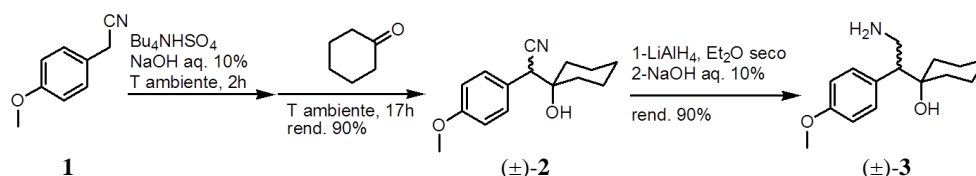
A continuación, se resumirán las distintas alternativas probadas.

Resultados y discusión

I.1 ACILACIÓN ENZIMÁTICA DEL (±)-1-[2-AMINO-1-(4-METOXIFENIL)ETIL]CICLOHEXANOL

El primer intermedio estudiado como sustrato en reacciones de aminólisis enzimática fue el (±)-1-[2-amino-1-(4-metoxifenil)etil]-ciclohexanol (±)-3.

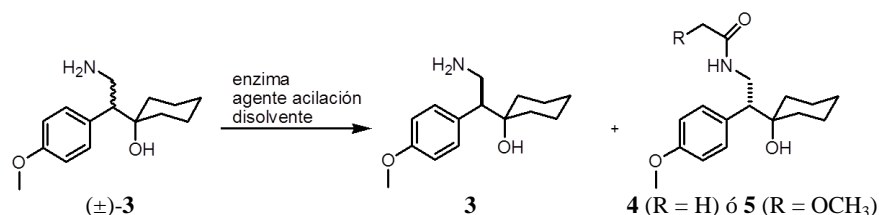
El compuesto (±)-3 se sintetizó de acuerdo con el método descrito en los antecedentes,^{77,78} a partir del 4-metoxifenilacetonitrilo **1** (esquema I.7).



Esquema I.7: Síntesis de (±)-3.

El segundo paso de reacción se modificó llevándose a cabo la reducción del intermedio (±)-2 con hidruro de litio y aluminio para obtener el sustrato de partida (±)-3 con excelente rendimiento.

Una vez obtenido el sustrato de partida se procedió a estudiar la reacción de aminólisis empleando diferentes biocatalizadores.



Esquema I.8: Acilación del (±)-3.

Tabla I.1: Acilación enzimática de (±)-3 a 30°C, acetato de etilo y en tolueno.

Entrada	equivalentes AcOEt	enzima	t reacción (días)	%ee ^a 3	%ee ^a 4	c ^b (%)	E
1	5	CAL-A	3	6	93	6	27
2	5	CAL-B	3	2	83	3	11
3	5	PSL-C	4	-	-	-	-

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Conversión, $c=[ee_s/(ee_s+ee_p)]$.

La reacción de aminólisis se realizó disolviendo el sustrato (±)-3 en tolueno, con 5 equivalentes de acetato de etilo como agente de acilación y se

incubó a 30°C. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla I.1, donde se puede observar que la lipasa PSL-C no cataliza la reacción, mientras que tanto la CAL-A como la CAL-B si la catalizan, aunque con muy bajas conversiones y enantioselectividades moderadas.

Con el fin de incrementar estas conversiones se probaron los diferentes acetatos que se muestran en la tabla I.2, como agentes de acilación.

Tabla I.2: Acilación enzimática de (\pm)-3 a 30°C, con 5 equivalentes de agente de acilación y en tolueno.

Entrada	agente de acilación	enzima	t reacción (días)	%ee ^a		c ^b (%)	E
				3	4		
1	AcOMe	CAL-A	3	18	93	16	31
2	AcOPr	CAL-A	3	-	-	-	-
3	AcO ⁱ Pr	CAL-A	3	7	81	7	10
4	AcOBu	CAL-A	3	-	-	-	-
5	AcO ^t Bu	CAL-A	3	-	-	-	-
6	AcOMe	CAL-B	4	8	57	13	4
7	AcOPr	CAL-B	4	11	77	13	9
8	AcO ⁱ Pr	CAL-B	4	5	12	30	1
9	AcOBu	CAL-B	4	10	51	17	3
10	AcO ^t Bu	CAL-B	4	-	-	-	-

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Conversión, $c=[ee_s/(ee_s+ee_p)]$.

Cabe destacar el resultado obtenido en la aminólisis con acetato de metilo catalizada con CAL-A (entrada 1). La conversión se incremento hasta un 16% tras tres días de reacción, lográndose una enantioselectividad moderada de 31. A pesar de que estos resultados son mejores que los obtenidos con acetato de etilo, no son suficientemente satisfactorios para que la reacción tenga utilidad práctica.

En las reacciones catalizadas por CAL-B las enantioselectividades son demasiado bajas, por lo que no se siguió estudiando este biocatalizador.

Se intentó optimizar el proceso catalizado por CAL-A utilizando acetato de metilo, puesto que en estas condiciones se obtuvo la enantioselectividad más alta.

Se probaron diferentes disolventes orgánicos, obteniéndose los resultados obtenidos en la tabla I.3.

Resultados y discusión

Tabla I.3: Acilación enzimática de (\pm)-**3** a 30°C, 5 equivalentes de agente de acilación y en diferentes disolventes.

Entrada	agente acilación	disolvente	enzima	<i>t</i> reacción (días)	%ee ^a		<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i>
					3	4		
1	-	AcOMe	CAL-A	3	3	20	15	2
2	AcOMe	THF	CAL-A	3	7	68	9	6
3	AcOMe	^t BuOMe	CAL-A	3	13	56	18	4
4	AcOMe	Et ₂ O	CAL-A	3	28	80	26	12
5	AcOMe	CH ₂ Cl ₂	CAL-A	4	-	-	-	-
6	AcOMe	CH ₃ CN	CAL-A	4	-	-	-	-
7 ^c	MeOAcOEt	tolueno	CAL-A	2	-	-	-	-

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Conversión, $c=[ee_s/(ee_s+ee_p)]$. ^c El producto de reacción sería 5.

En algunos casos se lograron mejorar las conversiones obtenidas hasta un 18% en *tert*-butil metil éter o 26% en éter etílico, sin embargo, la enantioselectividad del proceso fue más baja que en tolueno.

Finalmente se probó la acilación enzimática del sustrato (\pm)-**3** con metoxiacetato de etilo como dador de acilo (entrada 7), este éster suele dar buenos resultados en procesos de aminólisis enzimática.

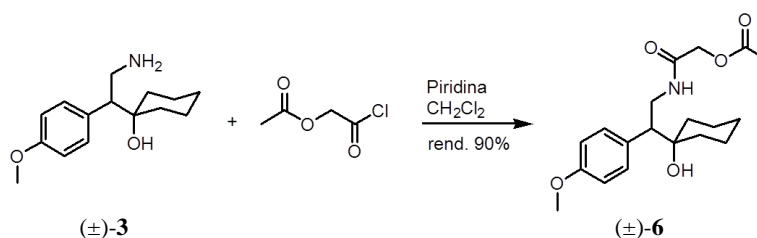
La reacción se llevó a cabo en tolueno utilizando CAL-A como biocatalizador. Sin embargo, los resultados no fueron los esperados y tras dos días de reacción no se observó conversión en este proceso.

I.2 REACCIONES DE HIDRÓLISIS Y TRANSESTERIFICACIÓN ENZIMÁTICAS EN DERIVADOS DEL (\pm)-1-[2-AMINO-1-(4-METOXIFENIL)ETIL]CICLOHEXANOL

Una vez analizados los resultados de estas reacciones enzimáticas, se decidió preparar nuevos sustratos sobre los que probar reacciones de hidrólisis y acilación catalizados por lipasas. Teniendo en cuenta que el carbono asimétrico en el sustrato (\pm)-**3** es un carbono terciario, es posible que existan impedimentos estéricos para encajar de forma adecuada en el centro activo del enzima. En los sustratos que se prepararon, el grupo sobre el que actuará el enzima está más alejado del carbono asimétrico. Esta estrategia ya ha sido utilizada en otras ocasiones para la resolución de

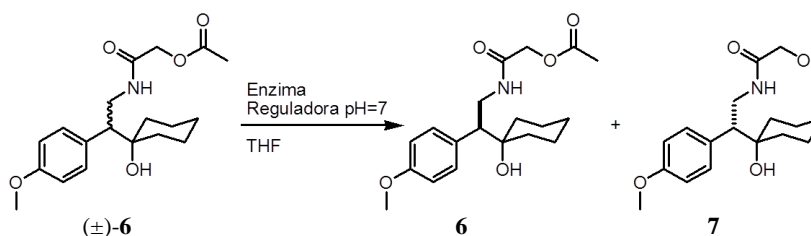
sustratos con centros estereogéneos impedidos.⁸⁴ En primer lugar se sustituyó el grupo amino con el grupo acetoxiacetilo.

Para ello se sintetizó el nuevo sustrato haciendo reaccionar el (±)-1-[2-amino-1-(4-metoxifenil)etil]ciclohexanol (±)-**3** con el cloruro de acetoxiacetilo, en diclorometano y en presencia de piridina. De esta manera se obtiene el producto (±)-**6** con buen rendimiento.



Esquema I.9: Síntesis de (±)-**6**.

Una vez obtenido el sustrato de partida se procedió a realizar la hidrólisis enzimática.



Esquema I.10: Hidrólisis enzimática de (±)-**6**.

La hidrólisis enzimática del sustrato (±)-**6** se lleva a cabo en una mezcla de tetrahidrofurano y disolución reguladora fosfato de pH 7 en una proporción 1:1 en volumen. Se probaron tres lipasas: CAL-A, CAL-B y PSL-C. Los resultados de los diferentes experimentos se recogen a continuación.

⁸⁴ V. Recuero, Ferrero, M.; Gotor-Fernández, V.; Brieva, R. Gotor, V. Tetrahedron: Asymmetry 2007, 18, 994-1002.

Resultados y discusión

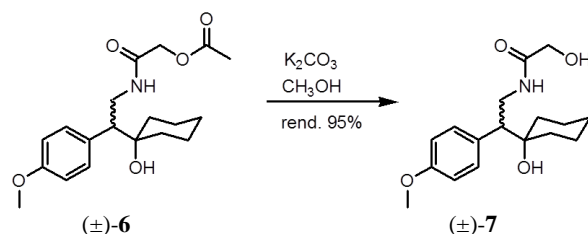
Tabla I.4: Hidrólisis enzimática de (\pm)-**6** a 30°C, en THF/disolución reguladora fosfato pH=7.

Entrada	reg./disolv.	enzima	t reacción (h)	%ee ^a		c ^b (%)	E
				6	7		
1	1:1	CAL-A	65	-	-	-	-
2	1:1	CAL-B	1,5	2	16	14	1
3	1:1	PSL-C	1,5	<1	<1	24	1

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Conversión, determinada por HPLC.

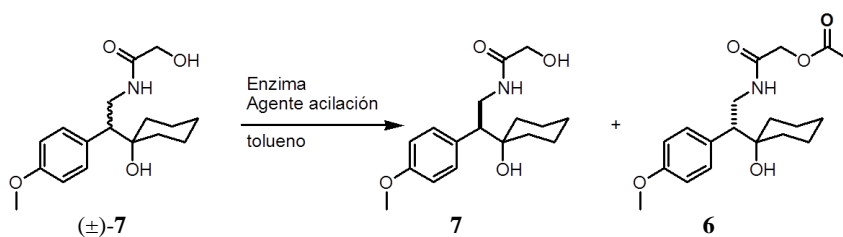
Ninguna de las reacciones probadas dio un resultado satisfactorio, aunque la reacción catalizada con PSL muestra una elevada velocidad. No obstante, el producto obtenido de dicha reacción es prácticamente racémico.

La hidrólisis del producto (\pm)-**6** con una disolución de carbonato potásico en metanol permite obtener el (\pm)-*N*-hidroxiacetil-1-[2-amino-(4-metoxifenil)etil]ciclohexanol (\pm)-**7** con excelente rendimiento, este compuesto se puede emplear como sustrato en reacciones de acilación enzimática.



Esquema I.11: Síntesis de (\pm)-**7**.

Las reacciones de acetilación enzimática del sustrato (\pm)-**7** se realizaron en tolueno, utilizando como agente de acilación acetato de etilo o acetato de vinilo y se incubaron a 30°C. En estas condiciones se probaron los biocatalizadores CAL-A, CAL-B y PSL-C. Los resultados se recogen en la tabla I.5.



Esquema I.11: Acilación enzimática de (\pm)-**7**.

Tabla I.5: Acilación enzimática de (\pm)-**7** a 30°C.

Entrada	agente acilación	disolvente	enzima	<i>t</i> reacción (h)	%ee ^a		<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i>
					7	6		
1	-	AcOEt	CAL-A	14	12	54	18	4
2	-	AcOEt	CAL-B	14	2	3	58	1
3	-	AcOEt	PSL-C	14	4	11	57	1
4	AcOEt	tolueno	CAL-A	22	17	13	6	2
5	AcOEt	tolueno	CAL-B	22	14	6	6	2
6	AcOEt	tolueno	PSL-C	22	5	<1	6	4
7	AcOCHCH ₂	tolueno	CAL-A	0,5	7	48	12	3
8	AcOCHCH ₂	tolueno	CAL-B	0,5	10	1	97	1
9	AcOCHCH ₂	tolueno	PSL-C	0,5	14	15	49	2

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Conversión, $c = [ee_s / (ee_s + ee_p)]$.

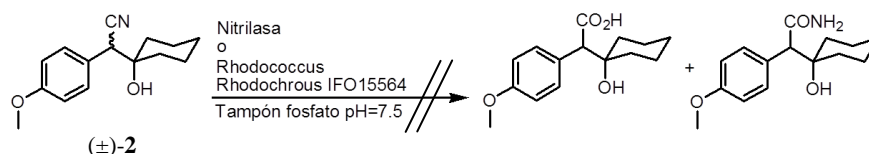
Cuando la reacción se hace en acetato de etilo (el cual actúa como disolvente y al mismo tiempo como agente de acilación) las tres lipasas catalizan la reacción, alcanzándose una conversión alta en pocas horas, pero no muestran enantioselectividad. Lo mismo ocurre si las reacciones se llevan a cabo en tolueno utilizando acetato de etilo o de vinilo como dadores de acetilo, aunque con una velocidad más lenta en el caso de usar el acetato de etilo.

I.3 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL (\pm)-1-[CIANO-(4-METOXIFENIL)METIL]CICLOHEXANOL

En la ruta sintética del (\pm)-1-[2-amino-1-(4-metoxifenil)etil]-ciclohexanol (\pm)-**3** se obtiene el (\pm)-1-[ciano-(4-metoxifenil)metil]-ciclohexanol (\pm)-**2** como producto intermedio (ver esquema I.6). Este compuesto puede ser utilizado como sustrato en reacciones de hidrólisis con nitrilasas. Estas reacciones pueden ser catalizadas tanto por enzimas aisladas como por el microorganismo del que proceden.

Se realizó la hidrólisis de (\pm)-**2** con diferentes nitrilasas comerciales: NIT1001, NIT1002, NIT1003, NIT1004 y NIT107. También se ejecutó la reacción con el microorganismo *Rhodococcus rhodochrous* IFO 15564.

Resultados y discusión



Esquema I.13: Hidrólisis de (±)-2 utilizando diferentes nitrilasas.

Las reacciones con las diferentes nitrilasas comerciales y el microorganismo se llevaron a cabo en disolución reguladora de fosfato a pH=7.5 y se incubaron a 30°C, transcurridos 7 días de reacción no se observó reacción en ninguno de los casos. Lo mismo ocurrió cuando las reacciones con las nitrilasas comerciales se realizaron a 50°C.

La ausencia de reactividad de estos procesos puede ser debida a la insolubilidad del sustrato (±)-2 en agua, circunstancia difícil de solventar debido a la imposibilidad de utilizar las nitrilasas aisladas o el microorganismo en presencia de un disolvente orgánico que mejoraría la solubilidad del sustrato en el medio de reacción, dada la sensibilidad de estos enzimas o del microorganismo a la presencia de disolventes orgánicos en el medio de reacción.

I.4 SÍNTESIS DE β^2 -AMINOÉSTERES PRECURSORES DE VENLAFAXINA Y REACCIONES DE RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA

En los antecedentes de este capítulo se mostró la síntesis de la (*S*)-venlafaxina a partir del β^2 -aminoéster (*S*)-3-amino-2-(4-metoxifenil)propionato de metilo. Una posible alternativa de esta síntesis podría ser la resolución enzimática del β^2 -aminoéster ya que es un posible sustrato tanto en reacciones de hidrólisis enzimática del grupo éster como en reacciones de acilación enzimática del grupo amino.

Por otra parte, en la actualidad existe un gran interés en la síntesis estereoselectiva de β -aminoácidos, debido a sus propiedades farmacológicas y a sus crecientes aplicaciones en química médica.^{85,86,87,88} Los métodos estereoselectivos de síntesis de los β^3 y $\beta^{2,3}$ -aminoácidos han sido más

⁸⁵ N. Sewlald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 5794-5795.

⁸⁶ E. Juaristi, "Synthesis of β -aminoacids", Wiley-VCH, New York, **1997**.

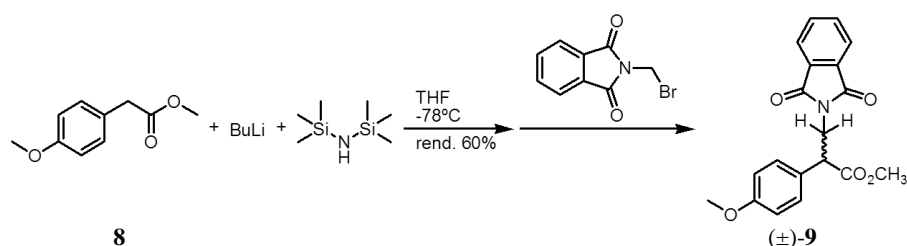
⁸⁷ M. Liu, P. Sibi, *Tetrahedron*, **2002**, 58, 7991-8035.

⁸⁸ S. Abele, D. Seebach, *Eur. J. Org. Chem.*, **2002**, 1-15.

estudiados tanto químicamente como mediante métodos biocatalíticos.⁸⁹ Sin embargo; los β^2 -aminoácidos, debido posiblemente a que su síntesis es más laboriosa, han sido mucho menos estudiados, aunque el número de publicaciones sobre la síntesis de estos compuestos ha ido en aumento durante los últimos años. Los β^2 -aminoácidos se han sintetizado mediante la ayuda de auxiliares quirales,^{82,90,91} organocatálisis^{92,93} o mediante métodos biocatalíticos.^{94,95}

Por tanto, el sustrato que se pretende resolver, no solo tiene interés desde el punto de vista de su aplicación en la síntesis de la (*S*)-venlafaxina, sino que la puesta a punto de un método enzimático para la resolución de β^2 -aminoésteres tendría un interés mucho más general.

La síntesis de este β^2 -aminoéster se realizó partiendo del 4-metoxifenilacetato de metilo **8**.



Esquema I.14: Síntesis de (±)-9.

Se comienza generando in situ el bistrimetilsililamiduro de litio por la reacción de la bistrimetilsililamina con butillitio a baja temperatura. La posterior adición del compuesto **8** y la ftalimida de bromometilo da lugar al (±)-3-(1,3-dioxoisoindolin-2-il)-2-(4-metoxifenil)propanoato de metilo (±)-**9**, precursor del β^2 -aminoalcohol deseado. El tratamiento de (±)-**9** con hidrazina en una mezcla tetrahidrofurano/metanol a reflujo permite obtener el 3-amino-2-(4-metoxifenil)propionato de metilo (±)-**10**.

⁸⁹ A. Liljeblad, L.T. Kanerva, *Tetrahedron*, **2006**, 62, 5831-5854.

⁹⁰ R. Moumné, B. Denise, K. Guitot, H. Rudler, S. Lavielle, P. Karoyan, *Eur. J. Org. Chem.*, **2007**, 1912-11920.

⁹¹ M. Calmès, F. Escalé, C. Glot, M. Rolland, J. Martinez, *Eur. J. Org. Chem.*, **2000**, 2459-2466.

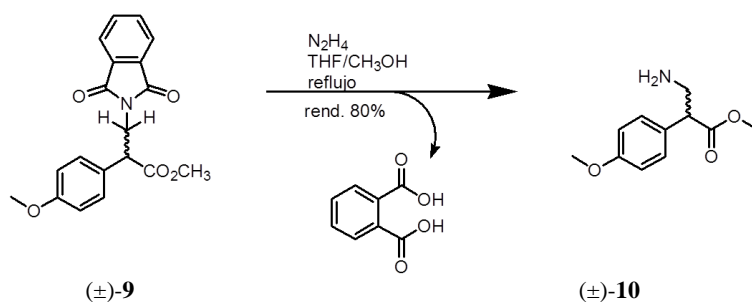
⁹² N. J. A. Martin, X. Cheng, B. List, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 13862-13863.

⁹³ Y. Chi, E. English, W. Pomerantz, W. Horne, L. Joyce, L. Alexander, W. Fleming, E. Hopkins, S. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6050-6055.

⁹⁴ M. Fitz, E. Forró, E. Vigóczki, L. Lázár, F. Fülöp, *Tetrahedron Asymmetry*, **2008**, 19, 1114-1119.

⁹⁵ M. Swiderska, J. Stewart, *Org. Lett.* **2006**, 8, 6131-6133.

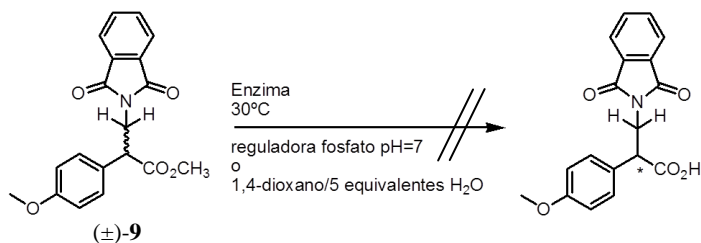
Resultados y discusión



Esquema I.15: Síntesis de (±)-10.

Tanto el compuesto (±)-9, obtenido como intermedio en la síntesis del aminoéster, como el (±)-10 pueden ser sustratos en reacciones de resolución mediante procesos enzimáticos, por ello se han estudiado ambas posibilidades.

La hidrólisis enzimática de (±)-9 se realizó en las condiciones que se indica en el esquema I.16.

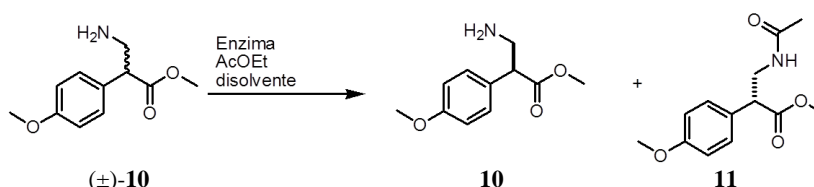


Esquema I.16: Hidrólisis enzimática del (±)-9.

Se hicieron pruebas de hidrólisis enzimática de (±)-9 con diferentes biocatalizadores (CAL-A, CAL-B, PSL-C), aunque ninguna de las pruebas realizadas dio lugar al producto de hidrólisis en las distintas condiciones probadas.

Dada la poca reactividad que presenta el sustrato (±)-9 se decidió no realizar ninguna prueba más con éste y se pasó a realizar experimentos con 3-amino-2-(4-metoxifenil)propionato de metilo (±)-10.

Como en ocasiones anteriores se probaron reacciones de acilación enzimática de (±)-10 con las lipasas CAL-A, CAL-B y PSL-C. Las reacciones se realizaron en 1,4-dioxano y se utilizó como agente de acilación acetato de etilo, tal y como se muestra en el siguiente esquema I.17 de reacción.



Esquema I.17: Acilación enzimática de $(\pm)\text{-10}$.

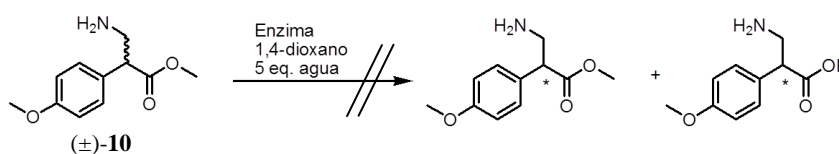
Tabla I.7: Acilación enzimática de $(\pm)\text{-11}$ a 30°C, en 1,4-dioxano, con acetato de etilo.

Entrada	equivalentes AcOEt	enzima	<i>t</i> reacción (días)	% <i>ee</i> ^a 10	% <i>ee</i> ^a 11	<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i>
1	5	CAL-A	5	2	11	13	1
2	5	CAL-B	1	29	34	46	3
3	5	PSL-C	4	32	27	55	2

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Conversión, $c = [ee_s / (ee_s + ee_p)]$.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla I.7 donde se puede ver que las tres lipasas catalizan la reacción de acilación en estas condiciones, aunque no son enantioselectivas.

Al tratarse de un aminoéster es posible realizar la resolución de $(\pm)\text{-10}$ mediante una reacción de hidrólisis enzimática. Esta hidrólisis se probó con las tres lipasas antes mencionadas en 1,4-dioxano, a 30°C y 5 equivalentes de agua.



Esquema I.18: Hidrólisis enzimática de $(\pm)\text{-10}$.

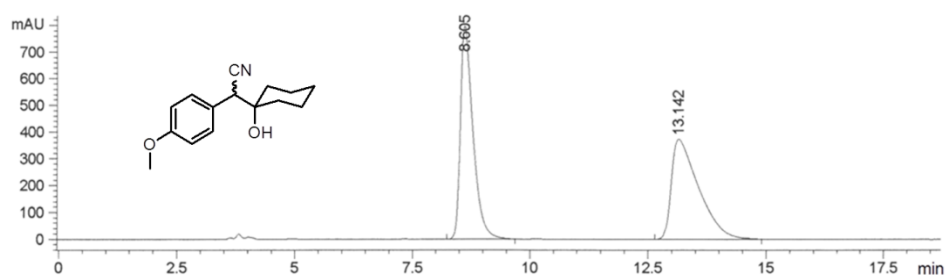
Transcurridos tres días de reacción ninguna de las lipasas probadas cataliza la reacción de hidrólisis del sustrato $(\pm)\text{-10}$ en estas condiciones.

I.5 DETERMINACIÓN DE LOS EXCESOS ENANTIOMÉRICOS

El exceso enantiomérico del compuesto $(\pm)\text{-2}$ se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) utilizando columna de relleno quiral (Chiralpak AS, 0.46 cm de diámetro y 25 cm de longitud), a una longitud de onda de 210 nanómetros, a 30°C y como fase móvil una mezcla

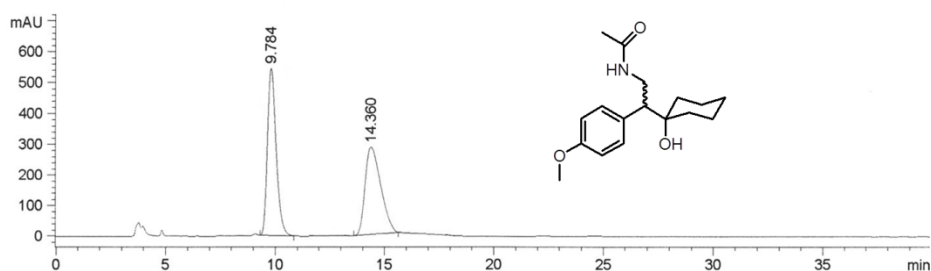
Resultados y discusión

n-hexano/etanol 85:15 a un flujo de 0,8 mL/min. En todos los casos, se inyectaron 20 μ L de muestra disuelta en la misma mezcla de elución.

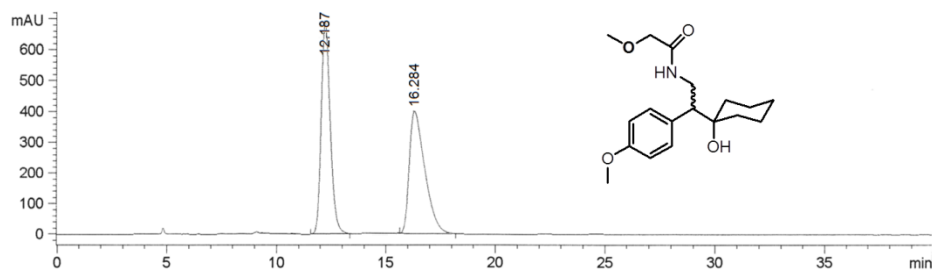


Cromatograma I.1: HPLC para el compuesto (±)-2.

Para determinar el exceso enantiomérico del compuesto (±)-3 se derivatizó al compuesto (±)-4 o al compuesto (±)-5, dependiendo de la reacción enzimática que se haya realizado. Los excesos enantioméricos de los compuestos (±)-4 y (±)-5 se determinaron mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) utilizando columna de relleno quiral (Chiralpak AS, 0.46 cm de diámetro y 25 cm de longitud), a una longitud de onda de 210 nanómetros, a 30°C y como fase móvil una mezcla *n*-hexano/etanol 85:15 a un flujo de 0,8 mL/min. En todos los casos, se inyectaron 20 μ L de muestra disuelta en la misma mezcla de elución.

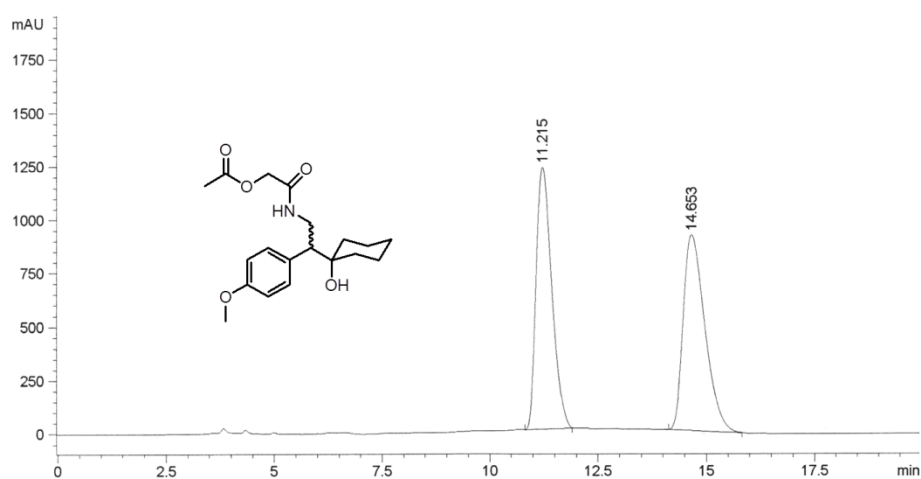


Cromatograma I.2: HPLC para el compuesto (±)-4.



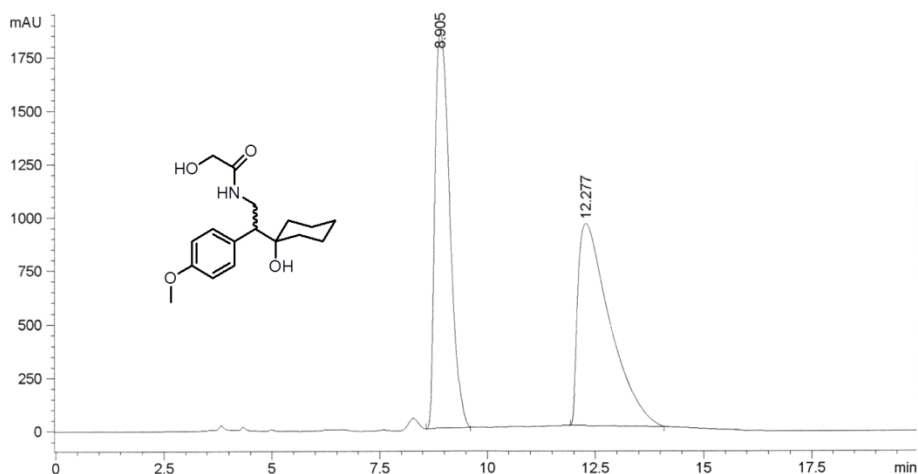
Cromatograma I.3: HPLC para el compuesto (±)-5.

El exceso enantiomérico de los compuestos (±)-6 y (±)-7 se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) utilizando columna de relleno quiral (Chiralpak OD, 0.46 cm de diámetro y 25 cm de longitud), a una longitud de onda de 210 nanómetros, a 30°C y como fase móvil una mezcla *n*-hexano/isopropanol 80:20 a un flujo de 0,8 mL/min. En todos los casos, se inyectaron 20 μ L de muestra disuelta en la misma mezcla de elución.



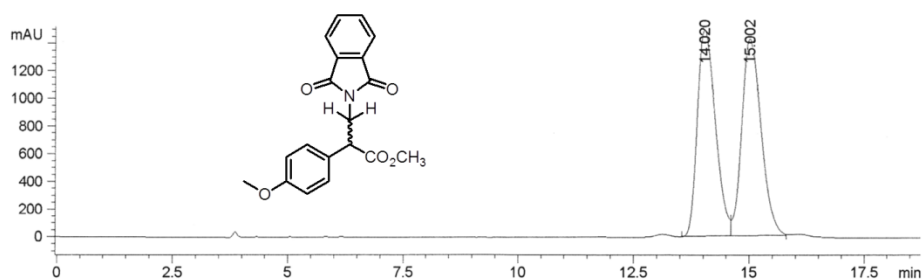
Cromatograma I.4: HPLC para el compuesto (±)-6.

Resultados y discusión



Cromatograma I.5: HPLC para el compuesto (±)-7.

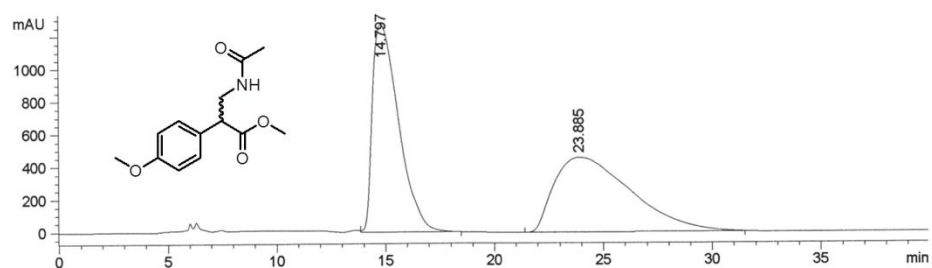
El exceso enantiomérico del compuesto (±)-9 se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) utilizando columna de relleno quiral (Chiralpak OD, 0.46 cm de diámetro y 25 cm de longitud), a una longitud de onda de 210 nanómetros, a 20°C y como fase móvil una mezcla *n*-hexano/isopropanol 85:15 a un flujo de 0,8 mL/min. En todos los casos, se inyectaron 20 μ L de muestra disuelta en la misma mezcla de elución.



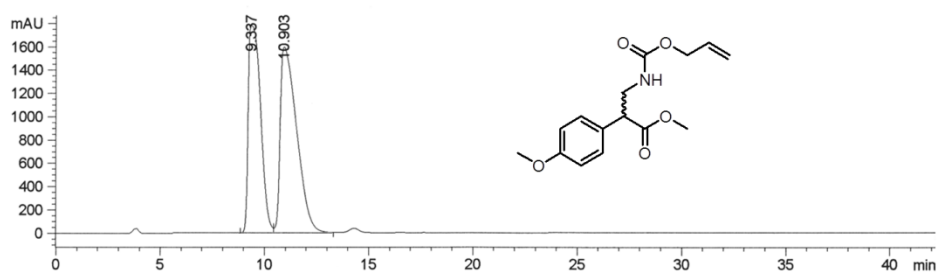
Cromatograma I.6: HPLC para el compuesto (±)-9.

Para determinar el exceso enantiomérico del compuesto (±)-10 se derivatizó al compuesto (±)-12. Los excesos enantioméricos de los compuestos (±)-11 y (±)-12 se determinaron mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) utilizando columna de relleno quiral (Chiralpak AS, 0.46 cm de diámetro y 25 cm de longitud), a una longitud de onda de 210 nanómetros, a 30°C y como fase móvil una mezcla *n*-hexano/isopropanol

75:25 a un flujo de 0,8 mL/min. En todos los casos, se inyectaron 20 μ L de muestra disuelta en la misma mezcla de elución.



Cromatograma I.7: HPLC para el compuesto (\pm)-11.



Cromatograma I.8: HPLC para el compuesto (\pm)-12.

CONCLUSIONES

En este capítulo se ha estudiado la resolución enzimática de varios precursores del antidepresivo venlafaxina.

Los sustratos que se han sintetizado son intermedios en distintas síntesis del fármaco.

Se han analizado un gran número de variables de las condiciones de reacción en los procesos llevados a cabo directamente con estos intermedios o bien con derivados de los mismos.

Aunque hasta el momento no se ha encontrado una ruta quimioenzimática viable desde el punto de vista práctico para la síntesis del fármaco en su forma enantiopura, cabe destacar los resultados obtenidos en la acilación de la amina (\pm)-1-[2-amino-1-(4-metoxifenil)etil]-ciclohexanol (\pm)-3 catalizada por CAL-A, en la que se ha llegado a obtener el producto con una alta pureza enantiomérica (exceso enantiomérico del 93%) aunque con bajo rendimiento.

PARTE EXPERIMENTAL

I.6 REACTIVOS Y DISOLVENTES

Los reactivos utilizados fueron suministrados por Aldrich o Alfa, sin ser necesarios tratamientos previos de purificación.

Los disolventes empleados fueron sometidos previamente a un tratamiento de secado y almacenamiento en atmosfera de nitrógeno. En el caso del diclorometano y del acetonitrilo el agente desecante fue el hidruro cálcico, la piridina se destiló sobre hidróxido sódico y el 1,4-dioxano, tetrahidrofurano, tolueno y *terc*-butil metil éter fueron tratados con sodio en presencia de benzofenona como indicador. Los disolventes para HPLC fueron adquiridos a Romil y a J. T. Baker.

La lipasa tipo A de *Candida antarctica* (Immobilized Lipase NZL-101; CAL-A; 6,2U/g utilizando laureato de etilo, 1-butanol, isooctano a 30°C) fue suministrada por Codexis. La lipasa de tipo B de *Candida antártica* (Novozym 435, CAL-B, 7300PLU/g) fue donada por Novo Nordisk Co. La lipasa *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre partículas de cerámicas (PSL-C, 783 U/g) fue adquirida a Amano Pharmaceutical Co. Las nitrilasas NIT1001, NIT1002, NIT1003, NIT1004 fueron compradas a BioCatalytics, mientras que la nitrilasa NIT107 se compró a Codexis. El microorganismo *Rhodococcus rhodochrous* IFO 15564 se ha de crecer previamente antes de su utilización.

Parte experimental

I.7 TÉCNICAS DE ANÁLISIS

Las cromatografías en capa fina (CCF) se realizan sobre un soporte de cromatofolios de gel de sílice 60 de 0.25 mm de espesor que incorporan un revelador de ultravioleta comercializado por Merck.

Las cromatografías en columna fueron realizadas sobre gel de sílice 60 (230-400 mesh) adquirido a Merck. Como eluyente se utiliza mezclas de disolventes, en las proporciones que se indican en los apartados correspondientes a los datos experimentales de cada compuesto.

Los análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se llevaron a cabo en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 1100, LC/MSD con detector UV a 210 nm. Se ha empleado una columna con relleno quiral CHIRALPAK IA, y mezclas de eluyentes hexano/isopropanol.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) y carbono (^{13}C -RMN) así como las secuencias de pulsos adecuadas para realizar experimentos DEPT se realizaron en los espectrómetros Bruker AC-300 DPX (^1H 300.13 MHz y ^{13}C 75.5 MHz). Se usan como disolvente cloroformo deuterado. Los desplazamientos químicos (δ) se dan en valores de partes por millón (ppm) relativas al disolvente utilizado y las constantes de acoplamiento (J) en hertzios (Hz). En la descripción de los espectros utilizaremos las siguientes abreviaturas: s= singulete, sa= singulete ancho, d= doblete, dd= doble doblete, t= triplete, m= multiplete y ma= multiplete ancho.

Los puntos de fusión se han medido con un aparato Gallenkamp en capilar abierto y no están corregidos.

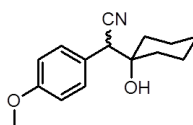
Para la medida de la rotación específica se utilizó un polarímetro Perkin-Elmer 343.

Los espectros de infrarrojo se registran en un espectrómetro UNICAM Mattson 3000 FT, preparando las muestras como pastillas en KBr para los productos sólidos, o puros en ventanas de NaCl. Las bandas de tensión se indican en valores de $\nu_{\text{máx}}$ en cm^{-1} .

Los espectros de masas se realizan en un equipo LC-MS HP 1100 series, utilizando electrospray (ESI) como fuente de ionización. Los valores están referidos a unidades de masa atómica (uma).

I.8 PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS

I.8.1 Síntesis de 1-[ciano-(4-metoxifenil)metil]ciclohexanol (±)-2



A una mezcla del *p*-metoxiacetonitrilo (1 g, 6.8 mmol) en 2 mL de una disolución de NaOH al 10%, se adiciona TBAHSO₄ (50 mg, 0.2 mmol) y se agita vigorosamente durante 2 horas. Transcurrido este tiempo se adiciona la ciclohexanona (670 mg, 6.8 mmol) y se deja agitando toda la noche. Se filtra el sólido obtenido, se realiza un primer lavado con 3x25 mL de agua y por último se realiza un segundo lavado con 3x25 mL de hexano para obtener el producto (±)-2 como un sólido blanco, con un rendimiento del 90%.

Fórmula empírica: C₁₅H₁₉NO₂

Peso molecular: 245.32 g/mol

IR: 3403, 2250, 1035 cm⁻¹

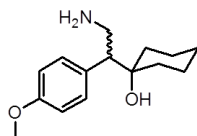
¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.27 (d, 2H, ³J 7.4Hz, Ph), 6.91 (d 2H, ³J 7.4Hz, Ph), 3.82 (s, 3H, CH₃), 3.74 (s, 1H, CH), 1.73-1.53 (m, 11H, OH y CH₂)

¹³C-RMN: (CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm): 159.63 (CO), 130.55 (CH), 123.56 (C), 119.78 (CN), 113.97 (CH), 72.64 (C), 55.25 (CH₃), 49.24 (CH), 34.77 (CH₂), 25.09 (CH₂), 21.46 (CH₂)

Punto de fusión: 123.9-125.1°C

Parte experimental

I.8.2 Síntesis de 1-[2-amino-1-(4-metoxifenil)etil]ciclohexanol, (±)-**3**



Bajo atmosfera de nitrógeno se prepara una suspensión de hidruro de litio y aluminio (174 mg, 4.6 mmol) en éter etílico seco y se enfria en un baño de acetona-hielo-sal (-15°C), una vez frío se adiciona el producto (±)-**2** (250 mg, 1.0 mmol) en pequeñas porciones. Una vez terminada la adición se retira de baño de frío y se agita a temperatura ambiente durante toda la noche. Transcurrido este tiempo se introduce la reacción en un baño de agua-hielo (0°C) y se le adicionan 6 mL de una disolución de NaOH al 10%. Se filtra sobre celita, el filtrado se seca con sulfato sódico anhidro, se filtra y el nuevo filtrado se lleva a sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice usando como eluyente una mezcla de diclorometano/metanol (4:1) para obtener el producto (±)-**3** como un aceite viscoso incoloro, con un rendimiento del 75%.

Fórmula empírica: C₁₅H₂₃NO₂

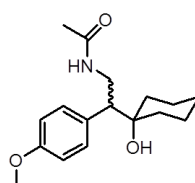
Peso molecular: 249.35 g/mol

IR: 3399, 1036 cm⁻¹

¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.17 (d, 2H, ³J 5.8Hz, Ph), 6.84 (d, 2H, ³J 5.7Hz, Ph), 3.80 (s, 3H, CH₃), 3.28-3.14 (m, 2H, CH₂), 2.66 (ap. t, ³J 4.6Hz, 1H, CH), 2.20 (sa, 3H, NH₂ y OH), 1.66-1.04 (m, 10H, CH₂)

¹³C-RMN: (CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm): 158.24 (CO), 132.38 (C), 130.42 (CH), 113.50 (CH), 73.54 (C), 56.40 (CH), 55.10 (CH₃), 42.21 (CH₂), 37.05 (CH₂), 34.37 (CH₂), 25.72 (CH₂), 21.68 (CH₂), 21.63 (CH₂)

I.8.3 Síntesis de N-[2-(1-hidroxiciclohexil)-2-(4-metoxifenil)]-etilacetamida, (±)-4



Bajo atmósfera de nitrógeno se disuelve (±)-**3** (100 mg, 0.40 mmol) en 5 mL de diclorometano seco. Seguidamente se adiciona la piridina (64 mg, 0.80 mmol) y el anhídrido acético (82 mg, 0,80 mmol). La reacción se deja agitando durante toda la noche. Una vez transcurrido este tiempo se lava la reacción con 3x10 mL de una disolución 1N de ácido clorhídrico. La fase orgánica se seca con sulfato sódico anhidro y se filtra. El filtrado se lleva a sequedad, obteniéndose un crudo que se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice usando como eluyente acetato de etilo para obtener el producto (±)-**4** como un sólido blanco, con un rendimiento del 90%.

Fórmula empírica: C₁₇H₂₅NO₃

Peso molecular: 291.39 g/mol

IR: 3415, 1634, 1035 cm⁻¹

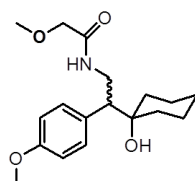
¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.17 (d, 2H, ³J 8.5Hz, Ph), 6.86 (d, 2H, ³J 8.4Hz, Ph), 5.4 (sa, 1H, NH), 4.15 (m, 1H, CH₂), 3.80 (s, 3H, CH₃), 3.46-3.37 (m, 1H, CH₂), 2.76 (dd, ³J 10.1Hz, ²J 4.9Hz, 1H, CH), 1.82 (s, 3H, CH₃), 1.77-1.14 (m, 11H, OH y CH₂)

¹³C-RMN: (CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm): 171.41 (CO), 158.60 (CO), 130.82 (C), 130.46 (CH), 113.72 (CH), 73.20 (C), 55.13 (CH₃), 53.96 (CH), 40.18 (CH₂), 35.94 (CH₂), 34.78 (CH₂), 25.43 (CH₂), 22.40 (CH₃), 21.69 (CH₂), 21.55 (CH₂)

Punto de fusión: 102.1-103.8°C

Parte experimental

I.8.4 Síntesis de N-[2-(1-hidroxiciclohexil)-2-(4-metoxifenil)]etil metoxiacetamida, (±)-5



Bajo atmósfera de nitrógeno se disuelve (±)-3 (90 mg, 0.36 mmol) en 5 mL de diclorometano seco. Seguidamente se adiciona la piridina (80 mg, 0.82 mmol) y el cloruro de metoxiacetilo (75 mg, 0.82 mmol). La reacción se deja agitando durante toda la noche. Una vez transcurrido este tiempo se lava la reacción con 3x10 mL de una disolución 1N de ácido clorhídrico. La fase orgánica se seca con sulfato sódico anhidro y se filtra. El filtrado se lleva a sequedad, obteniéndose un crudo que se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice usando como eluyente acetato de etilo para obtener el producto (±)-5 como un sólido blanco, con un rendimiento del 75%.

Fórmula empírica: C₁₈H₂₇NO₄

Peso molecular: 321.41 g/mol

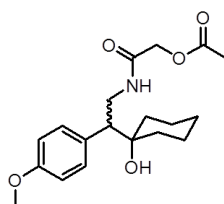
IR: 3389, 1644, 1037 cm⁻¹

¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.17 (d, 2H, ³J 8.7Hz, Ph), 6.84 (d, 2H, ³J 8.7Hz, Ph), 4.04-3.96 (m, 1H, CH), 3.78 (s, 3H, CH₃), 3.74 (s, 2H, CH₂), 3.58-3.48 (m, 1H, CH₂), 3.14(s, 3H, CH₃), 2.82-2.78 (m, 1H, CH₂), 1.84-1.14 (m, 11H, CH₂ y OH)

¹³C-RMN: (CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm): 169.47 (CO), 158.48 (C), 130.92 (C), 130.41 (CH), 113.62 (CH), 72.71 (CH₂), 71.79 (C), 58.92 (CH₃), 55.06 (CH₃), 54.12 (CH), 38.51 (CH₂), 35.81 (CH₂), 35.50 (CH₂), 25.42 (CH₂), 21.72 (CH₂), 21.57 (CH₂)

Punto de fusión: 108.2-109.0°C

I.8.5 Síntesis de N-[2-(1-hidroxiciclohexil)-2-(4-metoxifenil)]etilacetoxiacetamida, (±)-6



Bajo atmósfera de nitrógeno se disuelve (±)-**3** (803 mg, 3.22 mmol) en 40 mL de diclorometano seco. Seguidamente se adiciona piridina (636 mg, 8.05 mmol) y cloruro de acetoxiacetilo (1099 mg, 8.05 mmol). La reacción se deja agitando durante toda la noche. Una vez transcurrido este tiempo se lava la reacción 3 veces con 40 mL de una disolución 1N de ácido clorhídrico. La fase orgánica se seca con sulfato sódico anhidro y se filtra. El filtrado se lleva a sequedad, obteniéndose un crudo que se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice usando como eluyente hexano/acetato de etilo (1:4) para obtener el producto (±)-**6** como un sólido blanco, con un rendimiento del 90%.

Fórmula empírica: C₁₉H₂₇NO₅

Peso molecular: 349.42 g/mol

IR: 3419, 1750, 1661, 1037 cm⁻¹

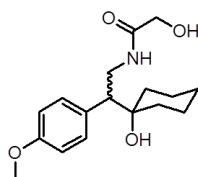
¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.17 (d, 2H, ³J 8.5Hz, Ph), 6.86 (d, 2H, ³J 8.7Hz, Ph), 6.19 (sa, 1H, NH), 4.41 (dd, ³J 25.9Hz, ²J 15.3Hz, 2H, CH₂), 4.08-4.02 (m, 1H, CH₂), 3.99 (s, 3H, CH₃), 3.79-3.43 (m, 1H, CH₂), 2.79 (dd, ³J 9.8Hz, ²J 5.2Hz, 1H, CH), 1.93 (s, 3H, CH₃), 1.75-1.14 (m, 11H, OH y CH₂)

¹³C-RMN: (CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm): 169.12 (CO), 166.75 (CO), 158.64 (C), 130.80 (C), 130.47 (CH), 113.76 (CH), 72.96 (C), 62.69 (CH₂), 55.12 (CH₃), 53.68 (CH), 38.84 (CH₂), 35.93 (CH₂), 35.63 (CH₂), 25.39 (CH₂), 21.74 (CH₂), 21.57 (CH₂), 20.29 (CH₃)

Punto de fusión: 65.6-67.2°C

Parte experimental

I.8.6 Síntesis de N-[2-(1-hidroxiciclohexil)-2-(4-metoxifenil)]etilhidroxiacetamida, (±)-7



Se disuelve (±)-6 (500 mg, 1.43 mmol) en 2.4 mL de metanol. A continuación se adiciona carbonato potásico (396 mg, 2.86 mmol), seguidamente se añaden 2.4 mL de agua destilada y se deja agitando 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se adicionan 10 mL de agua y se extrae 3 veces con 10 mL de acetato de etilo. Se juntan las fases orgánicas y se secan con sulfato sódico anhidro. Se filtra y se lleva a sequedad; obteniéndose el producto (±)-7 como un aceite viscoso incoloro, con un rendimiento del 95%.

Fórmula empírica: C₁₇H₂₅NO₄

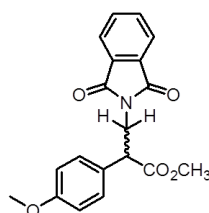
Peso molecular: 307.38 g/mol

IR: 3390, 1651, 1038 cm⁻¹

¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.16 (d, 2H, ³J 8.7Hz, Ph), 6.86 (d, 2H, ³J 8.7Hz, Ph), 6.59 (sa, 1H, NH), 4.07-3.98 (m, 1H, CH₂), 3.92 (s, 2H, CH₂), 3.78 (s, 3H, CH₃), 3.59-3.50 (m, 1H, CH₂), 2.65 (dd, ³J 9.6Hz, ²J 5.2Hz, 1H, CH), 2.48 (sa, 2H, OH), 1.74-1.11 (m, 10H, CH₂)

¹³C-RMN: (CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm): 171.79 (CO), 158.58 (C), 130.87 (C), 130.44 (CH), 113.77 (CH), 73.08 (C), 61.88 (CH₂), 55.15 (CH₃), 54.19 (CH), 38.98 (CH₂), 35.96 (CH₂), 35.10 (CH₂), 25.42 (CH₂), 21.72 (CH₂), 21.57 (CH₂)

I.8.7 Síntesis de (±)-3-(1,3-dioxoisindolin-2-il)-2-(4-metoxifenil)propanoato de metilo, (±)-9



Se disuelve bistrimetilsilamina (582 mg, 3.61 mmol) en 6 mL de THF seco a -78°C , a la mezcla resultante se le adiciona butillitio (213 mg, 3.32 mmol) gota a gota y se agita durante una hora a -78°C . Por otro lado se prepara una disolución de 4-metoxiacetato de metilo (500 mg, 2.77 mmol) en 3,5 mL de THF. Esta disolución se adiciona gota a gota sobre la primera y se agita durante una hora. Transcurrido este tiempo se adiciona, lentamente, una disolución de ftalimida de bromometilo (800 mg, 3.32 mmol) en 4,5 mL de THF y se agita durante 2 horas a -78°C . Seguidamente se retira del baño a -78°C y deja agita 12 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionan 50 mL de HCl 1N y se extrae con 3x50 mL de éter etílico. La fase orgánica se seca con sulfato sódico anhidro, se filtra y se lleva a sequedad. El crudo obtenido se purifica por cromatografía de sílica gel usando como eluyente hexano/acetato de etilo (7:3), para obtener (±)-9 como un sólido blanco con un rendimiento del 60%.

Fórmula empírica: $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{NO}_5$

Peso molecular: 339.34 g/mol

IR: 1774, 1716, 1035 cm^{-1}

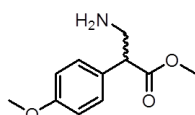
$^1\text{H-RMN}$: (CDCl_3 , 300.13MHz), δ (ppm): 7.79-7.77 (m, 2H, Ph), 7.69-7.66 (m, 2H, Ph), 7.25 (d, 2H, 3J 8.7Hz, Ph) 6.81 (d, 2H, 3J 8.7Hz, Ph), 4.28-4.08 (m, 3H, CH y CH_2), 3.75 (s, 3H, CH_3), 3.66 (s, 3H, CH_3)

$^{13}\text{C-RMN}$: (CDCl_3 , 75.5MHz), δ (ppm): 172.34 (CO), 167.82 (CO), 159.19 (C), 133.87 (CH), 31.74 (C), 129.34 (CH), 123.22 (C), 114.09 (CH), 55.10 (CH_3), 52.18 (CH_3), 48.28 (CH), 40.32 (CH_2)

Punto de fusión: 104.9-106.3 $^{\circ}\text{C}$

Parte experimental

I.8.8 Síntesis de 3-amino-2-(4-metoxifenil)propanoato de metilo, (\pm)-**10**



Se prepara una mezcla de THF (15.5 mL) y metanol (1.7 mL) en la que se disuelve el compuesto (\pm)-**9** (250 mg, 0.74 mmol). A continuación se adiciona la hidrazina (180 mg, 5.53 mmol) y se agita 5 horas a reflujo. Transcurrido ese tiempo se filtra la reacción y el filtrado se lleva a sequedad. El crudo obtenido se purifica por cromatografía de sílica gel usando como eluyente acetato de etilo/metanol (4:1) obteniéndose el producto (\pm)-**10** como un aceite muy viscoso con un rendimiento del 80%.

Fórmula empírica: C₁₁H₁₅NO₃

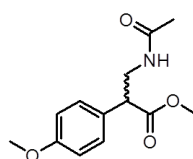
Peso molecular: 209.24 g/mol

IR: 3372, 1731, 1033cm⁻¹

¹H-RMN: (MeOD, 300.13MHz), δ (ppm): 7.38 (d, 2H, ³J 8.7Hz, Ph) 7.09 (d, 2H, ³J 8.7Hz, Ph), 3.97 (s, 3H, CH₃), 3.91-3.84 (m, 4H, CH y CH₃), 3.42 (dd, 1H, ³J 12.8Hz, ²J 8.8Hz, CH₂), 3.10 (dd, 1H, ³J 12.8Hz ³J 6.2Hz, CH₂)

¹³C-RMN: (MeOD, 75.5MHz), δ (ppm): 175.21 (CO), 160.86 (C), 133.12 (C), 130.22 (CH), 115.44 (CH), 55.84 (CH₃), 54.22 (CH₃), 52.61 (CH), 45.54 (CH₂)

I.8.9 Síntesis de 3-acetamido-2-(4-metoxifenil)propanoato de metilo, (±)-11



Bajo atmósfera de nitrógeno se disuelve (±)-**10** (50 mg, 0.24 mmol) en 2,5 mL de diclorometano seco. Seguidamente se adiciona la piridina (47 mg, 0.60 mmol) y el anhídrido acético (61 mg, 0.60 mmol). La reacción se deja agitando durante toda la noche. Una vez transcurrido este tiempo se adicionan 2.5 mL de diclorometano y se lava la reacción 3 veces con 5 mL de una disolución 1N de ácido clorhídrico. La fase orgánica se seca con sulfato sódico anhidro y se filtra. El filtrado se lleva a sequedad, obteniéndose un crudo que se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice usando como eluyente acetato de etilo para obtener el producto (±)-**11** como un aceite muy viscoso, con un rendimiento del 70%.

Fórmula empírica: C₁₃H₁₇NO₄

Peso molecular: 251.28 g/mol

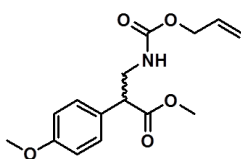
IR: 1727, 1033 cm⁻¹

¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.18 (d, 2H, ³J 8.7Hz, Ph) 6.87 (d, 2H, ³J 8.7Hz, Ph), 5.88 (sa, 1H, NH), 3.88-3.79 (m, 4H, CH y CH₃), 3.71-3.61 (m, 5H, CH₂ y CH₃), 1.95 (s, 3H, CH₃)

¹³C-RMN: (CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm): 173.71 (CO), 170.14 (CO), 159.13 (C), 128.93 (CH), 128.25 (C), 114.29 (CH), 55.20 (CH₃), 53.34 (CH₃), 52.12 (CH), 42.20 (CH₂), 23.15 (CH₃)

Parte experimental

I.8.10 Síntesis de 3-aliloxicarbonilamino-2-(4-metoxifenil)propanoato de metilo, (±)-12



Bajo atmósfera de nitrógeno se disuelve (±)-**10** (50 mg, 0.24 mmol) en 2,5 mL de diclorometano seco. Seguidamente se adiciona la piridina (47 mg, 0.60 mmol) y el cloroformiato de alilo (72 mg, 0.60 mmol). La reacción se deja agitando durante toda la noche. Una vez transcurrido este tiempo se adicionan 2.5 mL de diclorometano y se lava la reacción 3 veces con 5 mL de una disolución 1N de ácido clorhídrico. La fase orgánica se seca con sulfato sódico anhidro y se filtra. El filtrado se lleva a sequedad, obteniéndose un crudo que se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice usando como eluyente hexano/acetato de etilo (1:1) para obtener el producto (±)-**12** como un sólido blanco, con un rendimiento del 71%.

Fórmula empírica: C₁₅H₁₉NO₅

Peso molecular: 293.32 g/mol

IR: 1726, 1033 cm⁻¹

¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.18 (d, 2H, ³J 8.6Hz, Ph) 6.87 (d, 2H, ³J 8.8Hz, Ph), 5.97-5.85 (m, 1H, CH), 5.32-5.06 (m, 2H, CH₂), 5.06 (sa, 1H, NH), 4.56 (d, 2H, ³J 5.4Hz, CH₂), 3.87-3.80 (m, 4H, CH y CH₃), 3.69-3.45 (m, 5H, CH₂ y CH₃)

¹³C-RMN: (CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm): 173.43 (CO), 159.08 (C), 156.04 (CO), 13271.12 (CH), 128.92 (CH), 128.09 (C), 117.60 (CH₂), 114.24 (CH), 65.50 (CH₂), 55.16 (CH₃), 52.11 (CH₃), 50.55 (CH), 43.68 (CH₂)

Punto de fusión: 64.0°-65.7°C

CAPÍTULO II:

Resolución catalizada por lipasas del centro estereogénico cuaternario en cianhidrinas de cetonas benzofusionadas.

INTRODUCCIÓN

La preparación de compuestos ópticamente puros en los que el centro estereogénico es un carbono cuaternario es uno de los retos de la síntesis orgánica actual.⁹⁶ El interés que despiertan este tipo de compuestos se debe tanto a la dificultad que a menudo presenta la construcción de un centro estereogénico con elevada congestión estérica, como a las propiedades terapéuticas que poseen algunos compuestos con esta estructura, entre ellos destacan los aminoácidos α,α -disustituidos,^{97,98,99,100,101} que no se pueden obtener a partir de fuentes naturales, y los alcaloides con grupos amino α -cuaternarios derivados de los mismos.^{102,103}

El desarrollo de métodos de resolución o de síntesis asimétrica de cianhidrinas derivados de cetonas, tiene un gran interés puesto que son productos de partida adecuados para la preparación de un gran número de los compuestos antes citados. En el siguiente esquema se muestran algunas de las estructuras que podrían obtenerse fácilmente.¹⁰⁴

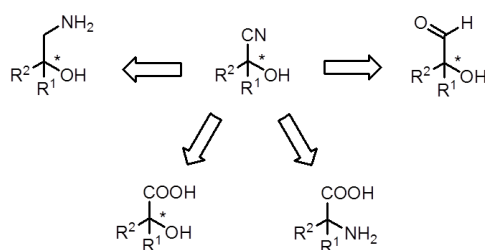


Figura II.1: Compuestos que se pueden obtener a partir de las cianhidrinas derivadas de cetonas.

⁹⁶ E. Corey, A. Guzman-Perez, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, 37, 388-401

⁹⁷ C. Cativiela, M. Ordoñez, *Tetrahedron:Asymmetry*, **2009**, 20, 1-63.

⁹⁸ M. Calaza, C. Cativiela, *Eur. J. Chem.*, **2008**, 20, 3427-3448.

⁹⁹ C. Cativiela, M. Díaz de Villegas, *Tetrahedron:Asymmetry*, **2007**, 18, 569-623.

¹⁰⁰ H. Vogt, S. Bräse, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 406-430.

¹⁰¹ Y. Ohfuné, T. Shinada, *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 5127-5143.

¹⁰² P. Dewick, *Medicinal Natural Products-A Biosynthetic Approach*; Wiley: Chichester, **1997**.

¹⁰³ G. Cordell, *Introduction to Alkaloids-A Biogenetic approach*; Wiley: New York, **1981**.

¹⁰⁴ J. Andexer, J. Langemann, U. Kragl, M. Pohl, *Trends in Biotechnology*, **2009**, 10, 599-607

Introducción

Mientras que la síntesis estereoselectiva de cianhidrinas derivadas de aldehídos ha sido muy estudiada, hay escasos ejemplos de síntesis estereoselectiva de cianhidrinas derivadas de cetonas.¹⁰⁵

Los métodos biocatalíticos representan una interesante alternativa para la preparación de cianhidrinas ópticamente puras. Este capítulo está centrado en la preparación de cianhidrinas derivadas de cetonas enantioméricamente puras mediante un método quimioenzimático.

En concreto se estudiará la resolución de la cianhidrina derivada de la α -tetralona y posteriormente, se extenderá el estudio de este método de resolución enzimático a las cianhidrinas derivadas de α -indanona y 4-cromanona.

La cianhidrina derivada de la α -tetralona es un intermedio en la preparación de diversos productos de interés farmacéutico como las espirooxazolidindionas empleadas como fármacos en el tratamiento de la diabetes crónica.^{106,107} También se emplean en la síntesis de amino derivados que actúan como inhibidores de la tripsinproteasa o de la trombina.

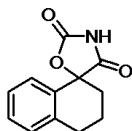


Figura II.2: Fármaco empleado en el tratamiento de la diabetes crónica.

¹⁰⁵ R. Gregory, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 3649-3682

¹⁰⁶ R. Schnur, U.S. Patent 4 226 875, **1980**; Chem Abstr. CAN 94:103345

¹⁰⁷ R. Sarges, R. Schnur, J. Belletire, M. Peterson, *J. Med. Chem.*, **1988**, 31, 230-243

ANTECEDENTES

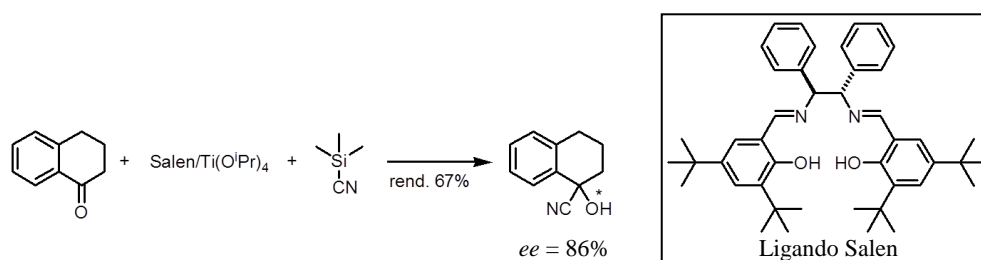
Como se ha visto en la introducción, la cianhidrina derivada de la α -tetralona puede ser precursor de una gran variedad de moléculas orgánicas con un centro estereogénico cuaternario, algunos de ellos de gran interés terapéutico.

En el presente capítulo, se desarrollará un procedimiento biocatalítico para conseguir los dos enantiómeros de la cianhidrina de la α -tetralona.

Son pocos los métodos enantioselectivos de preparación de cianhidrinas derivadas de cetonas. También son muy escasos los métodos que emplean biocatalizadores. En la bibliografía se han encontrado varios métodos para la obtención de la cianhidrina de la α -tetralona que se resumen a continuación.

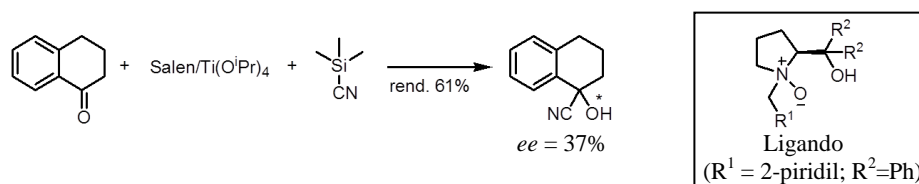
Antecedentes

En el primer ejemplo se sintetiza la cianhidrina de la α -tetralona, junto con otras cianhidrinas derivadas de cetonas, empleando un complejo de titanio (IV) con un ligando Salen (este ligando tiene muchas variantes en función de los grupos que están unidos a su esqueleto principal) como catalizador en la cianosililación que se lleva a cabo con cianuro de trimetilsilicio. Cuando se utiliza el enantiómero (1*S*,2*S*)¹⁰⁸ del ligando Salen el exceso enantiomérico del producto final es del 77% en el caso de la cianhidrina derivada de la α -tetralona con un rendimiento del 75%. Cuando se emplea el enantiómero (1*R*,2*R*)¹⁰⁹ el exceso enantiomérico es del 86% y el rendimiento del 67%.



Esquema II.1: Cianosililación de la α -tetralona empleando Salen/Ti(OⁱPr)₄ como catalizador.

Una variante de la reacción anterior utiliza un catalizador de titanio (IV) con un ligando de tipo pirrolinídico¹¹⁰ que también es polidentado (ver esquema II.2). En este caso, se obtiene un rendimiento del 61% y un exceso enantiomérico de la cianhidrina de la α -tetralona sililada del 37%.



Esquema II.2: Cianosililación de la α -tetralona empleando Ligando/Ti(OⁱPr)₄ como catalizador.

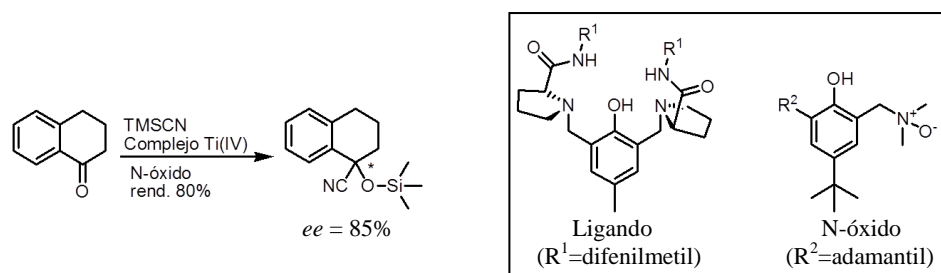
En el siguiente ejemplo los autores realizan la síntesis de varias cianhidrinas de cetona, entre ellas la derivada de la α -tetralona, a través de cianosililación empleando como catalizador un complejo de titanio (IV). Además, se adiciona el N-óxido que se muestra en el esquema II.3 que

¹⁰⁸ B. He, F. Chen, Y. Li, X. Feng, G. Zhang, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 4657-4666

¹⁰⁹ F. Chen, B. Qin, G. Zhang, Y. Jiang and X. Feng, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 10449-10460

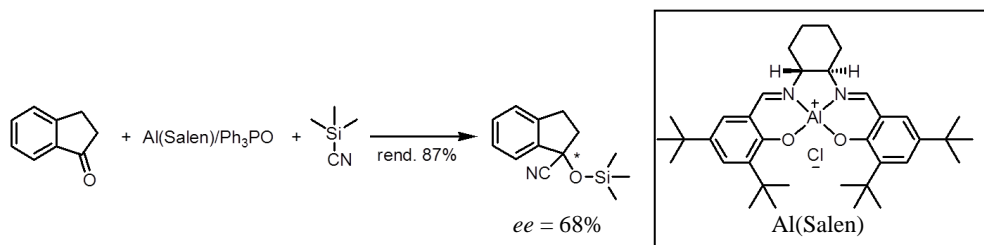
¹¹⁰ Y. Shen, X. Feng, Y. Li, G. Zhang, Y. Jiang, *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 129-137

interviene directamente en el mecanismo de reacción, actuando de conector entre el catalizador y el cianuro de trimetilsililo, según el mecanismo propuesto por los autores. Empleando este método se obtiene un 80% de la cianhidrina de la tetralona sililada con un 85% de exceso enantiomérico.¹¹¹

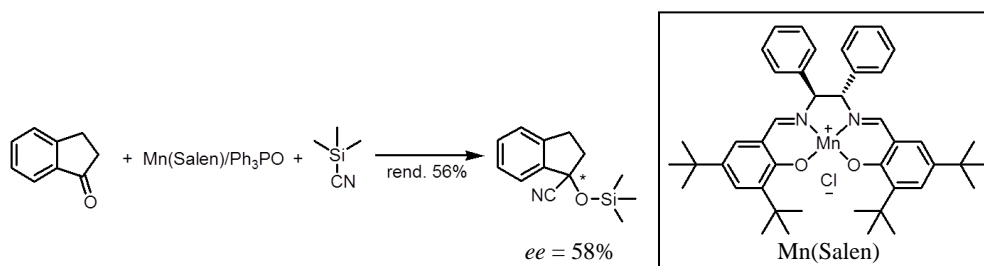


Esquema II.3: Cianosililación de la α -tetralona empleando catalizador de Ti (IV).

En el trabajo de Kim y colaboradores se obtiene la cianhidrina de la α -indanona, empleando de nuevo complejos de aluminio o manganeso con distintos ligandos Salen.^{112,113} Se obtuvieron excesos enantioméricos moderados y rendimientos de moderados a altos (ver esquemas II.4 y II.5).



Esquema II.4: Cianosililación de la α -indanona utilizando el complejo Al(Salen) como catalizador.



Esquema II.5: Cianosililación de la α -indanona utilizando el complejo Mn(Salen) como catalizador.

¹¹¹ K. Shen, X. Liu, Q. Li, X. Feng, *Tetrahedron*, **2008**, 64, 147-153

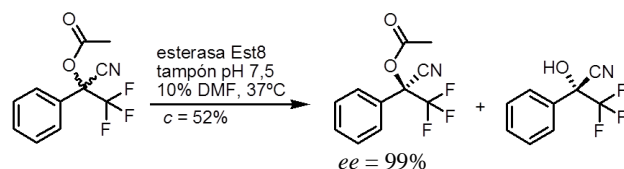
¹¹² S. Kim, J. Kwak, *Tetrahedron*, **2006**, 62, 1165-1169

¹¹³ S. Kim, S. Lee, J. Kwak, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, 17, 1165-1169

Antecedentes

Los métodos biocatalíticos representan una interesante alternativa para la preparación de cianhidrinas ópticamente puras. Utilizando estos métodos se han desarrollado distintas rutas para la preparación de cianhidrinas derivadas de aldehídos.¹¹⁴ Sin embargo, y de la misma forma que ocurre con los métodos químicos convencionales, cuando el sustrato de la reacción enzimática es la cianhidrina derivada de una cetona, la congestión estérica dificulta también la catálisis enzimática y los ejemplos de resolución descritos hasta el momento tanto con lipasas y proteasas^{115,116,117} como con células enteras^{118,119,120} son escasos y solo un reducido número de estructuras se pueden obtener con alto exceso enantiomérico.

Cabe destacar la contribución de Nguyen y colaboradores,¹²¹ en el que se estudia la resolución de distintos alcoholes terciarios, incluyendo algunas cianhidrinas de cetonas, mediante la hidrólisis de sus acetatos con esterasas recombinantes. Aunque muchos de estos alcoholes terciarios se lograron resolver con elevada enantioselectividad, en el caso de las cianhidrinas, solo la hidrólisis del acetato de 1-ciano-2,2,2-trifluoro-1-feniletilo que se muestra en el esquema II.6 ha mostrado una enantioselectividad alta.



Esquema II.6: Hidrólisis enzimática de derivados de cianhidrina de cetona.

Otro ejemplo destacable es la resolución de 1-cicloalquil-1-fenilcianhidrinas mediante procesos de hidrólisis enzimática.⁸⁴ En este caso la congestión estérica del centro estereogénico se evita mediante la

¹¹⁴ J. Holt, U. Hanefeld, *Curr. Org. Chem.* **2009**, *6*, 15-37.

¹¹⁵ M. Wiggers, J. Holt, R. Kourist, S. Bartsch, I. Arends, A. Minnaard, U. Bornscheuer, U. Hanefeld, *J. Mol. Cat. B: Enz.* **2009**, *60*, 82-85.

¹¹⁶ J. Holt, I. Arends, A. Minnaard, U. Hanefeld, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1341-1344.

¹¹⁷ K. Konigsberger, K. Prasad, O. Repič, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 679-687.

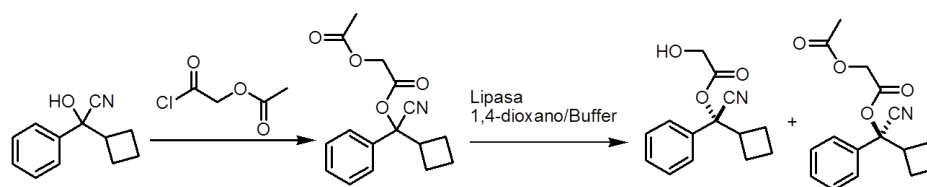
¹¹⁸ M. Paravidino, J. Holt, D. Romano, N. Singh, I. Arends, A. Minnaard, R. Orru, F. Molinari, U. Hanefeld, *J. Mol. Cat. B: Enz.* **2010**, *63*, 87-92.

¹¹⁹ H. Ohta, Y. Kimura, Y. Sugano, T. Sugai, *Tetrahedron*, **1989**, *45*, 5469-5476.

¹²⁰ H. Ohta, Y. Kimura, Y. Sugano, *Tetrahedron* **1988**, *29*, 6967-6960.

¹²¹ G. Nguyen, R. Kourist, M. Paravidino, A. Hummel, J. Rehdorf, R. Orru, J. Holt, U. Hanefeld, U. Bornscheuer, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *63*, 2752-2758.

preparación de un derivado, de forma que la catálisis enzimática se realiza sobre un carbono alejado de este centro. Esta estrategia condujo a un excelente resultado en el caso del derivado ciclobutilo con dos de las lipasas probadas, la CAL-B y la PSL-C (esquema II.7), sin embargo, la enantioselectividad de estos procesos cuando los sustituyentes son ciclos de mayor tamaño es mucho más baja.



Esquema II.7: Hidrólisis enzimática de derivados de cianhidrina de cetona.

OBJETIVOS

En la introducción se ha puesto de manifiesto la importancia de los derivados de las cianhidrinas de cetona en la síntesis de moléculas orgánicas con un centro estereogénico cuaternario, así como la dificultad de la preparación de este tipo de estructuras.

En este capítulo de la memoria se ha planteado como objetivo el estudio de la resolución enzimática de cianhidrinas derivadas de cetonas benzofusionadas mediante procesos de hidrólisis y acilación enzimática. El estudio se centrará en la obtención de ambos enantiómeros de la cianhidrina de la α -tetralona, para posteriormente extender el método a la resolución de las cianhidrinas de la α -indanona y la 4-cromanona.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se detallaran los procesos estudiados, para lograr el primer objetivo que se ha propuesto en este capítulo: la síntesis y resolución de la cianhidrina de la α -tetralona mediante procesos quimioenzimáticos. Posteriormente se pretende extender esta metodología a la síntesis y resolución de las cianhidrinas de la α -indanona y 4-cromanona.

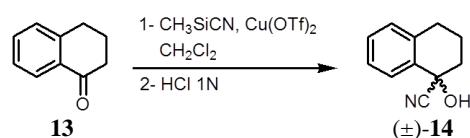
La resolución de la cianhidrina de la α -tetralona se ha abordado como la de cualquier alcohol, mediante procesos de acilación o de hidrólisis de algún derivado.

Se estudiaron en primer lugar los procesos más sencillos, acetilación e hidrólisis del derivado acetilado que, aunque no dieron resultados satisfactorios, como era previsible, han permitido establecer un punto de partida para la preparación de nuevos derivados.

Resultados y discusión

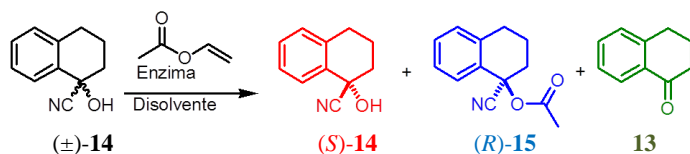
II.1 ACILACIÓN ENZIMÁTICA DEL (±)-1-HIDROXI-1,2,3,4-TETRAHIDRONAFTALENO-1-CARBONITRILO

Inicialmente, los experimentos se orientaron a tratar de resolver el (±)-1-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-carbonitrilo, (±)-**14**, mediante acilación enzimática. La cianhidrina (±)-**14** se puede preparar con elevado rendimiento a partir de la α -tetralona **13** por reacción con el cianuro de trimetilsililo, en presencia de un catalizador de cobre (II). Se obtiene como producto de reacción la cianhidrina de la α -tetralona sililada. El tratamiento con una disolución diluida de ácido clorhídrico permite obtener el producto (±)-**14** tal y como se describe en el esquema II.8.



Esquema II.8: Síntesis de (±)-**14**.

Una vez obtenido el sustrato (±)-**14** se comenzó la búsqueda del biocatalizador más adecuado para llevar a cabo la acilación. Se probaron distintas lipasas (CAL-A, CAL-B y PSL-C) utilizando condiciones habituales en procesos enzimáticos. La reacción se llevó a cabo en tolueno con acetato de vinilo (5 equivalentes) como agente de acilación. Todos los procesos se realizaron a 30°C.



Esquema II.9: Acilación enzimática de (±)-**14**.

Tabla II.1: Acilación enzimática del (±)-**14** en tolueno, a 30°C y 5 equivalentes de acetato de vinilo.

Entrada	enzima	t reacción (días)	% ^a (S)- 14	%ee ^b (S)- 14	% ^a (R)- 15	%ee ^b (R)- 15	% ^a 13
1	CAL-A	6	5	15	14	>99	80
2	CAL-B	14	-	-	-	-	-
3	PSL-C	14	-	-	-	-	-

^a Proporción de productos en el medio de reacción, determinados por HPLC. ^b Exceso enantiomérico, determinados por HPLC.

Los datos recogidos de estas reacciones se muestran en la tabla II.1. Se observa que la CAL-A cataliza la reacción de acilación enzimática del sustrato (\pm)-**14** obteniéndose el compuesto (*R*)-**15** enantiopuro, aunque solo se obtiene un 14% del mismo. Por otra parte, la CAL-B y la PSL-C no catalizan dicho proceso. En este proceso se observa también la eliminación espontánea de cianuro de hidrógeno de la cianhidrina de la α -tetralona, que es el sustrato de partida, obteniéndose de nuevo la α -tetralona. En general, las cianhidrinas se mantienen estables a $\text{pH} \leq 5$ y por encima de estos valores se suelen degradar a la cetona de partida; no obstante, existen casos en que se degradan incluso a un pH menor. A temperaturas superiores a 30°C también se favorece dicha degradación. Lógicamente, la competencia de esta reacción lateral se hace más patente si el proceso de resolución enzimática es lento.

Con el fin de encontrar unas condiciones en las que la reacción enzimática fuera más rápida, minimizando así la formación del producto de descomposición, se realizaron los procesos en distintos disolventes orgánicos. Se realizaron pruebas con tetrahidrofurano, 1,4-dioxano, *tert*-butil metil éter, éter etílico y acetato de vinilo. En este último caso el acetato de vinilo actúa como disolvente y dador de acilo, lo que suele incrementar considerablemente la velocidad de este tipo de procesos enzimáticos. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Tabla II.2: Acilación enzimática del (\pm)-**14** a 30°C y en distintos disolvente.

Entrada	equivalentes AcOCHCH ₂	disolvente	enzima	<i>t</i> reacción (días)	% ^a (<i>S</i>)- 14	%ee ^a (<i>R</i>)- 14	% ^a (<i>R</i>)- 15	%ee ^a (<i>R</i>)- 15	% ^c 13
1	5	THF	CAL-A	6	69	6	<1	>99	30
2	5	1,4-dioxano	CAL-A	6	70	<1	<1	>99	29
3	5	^t BuOMe	CAL-A	6	62	6	5	>99	33
4	5	Et ₂ O	CAL-A	6	42	6	4	>99	54
5	-	AcOCHCH ₂	CAL-A	9	68	12	13	>99	19

^a Proporción de productos en el medio de reacción, determinados por HPLC. ^b Exceso enantiomérico, determinados por HPLC.

Como se puede ver en la tabla, en ninguno de los disolventes probados se consigue aumentar la cantidad de producto acetilado y se sigue observando descomposición de la cianhidrina (\pm)-**14** de partida en su correspondiente cetona.

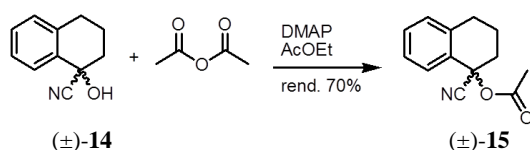
Estos resultados no son sorprendentes, al tratarse de la acilación de un alcohol terciario. Como se ha mencionado en los antecedentes, solo en

Resultados y discusión

algunos casos muy concretos de acilaciones de alcoholes terciarios se han observado enantioselectividades altas.

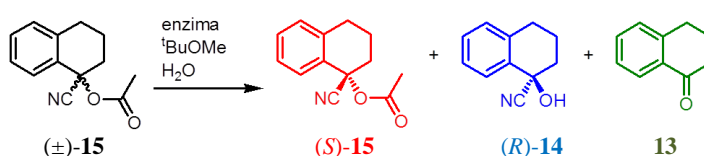
II.2 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ACETATO DE (±)-1-CIANO-1,2,3,4-TETRAHIDRO-1-NAFTILO

Las lipasas suelen catalizar mejor la reacción de hidrólisis de ésteres para dar alcoholes terciarios que su homóloga inversa. Por lo tanto, se realizó la reacción de hidrólisis enzimática del acetato de (±)-1-ciano-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftilo, (±)-**15**. Este sustrato se prepara por acilación de la cianhidrina de la α -tetralona con anhídrido acético en acetato de etilo.



Esquema II.10: Acilación de (±)-**14**.

Una vez obtenido el sustrato (±)-**15** de nuevo se analizan varios biocatalizadores para encontrar el más adecuado en esta reacción de hidrólisis. Se probaron de nuevo las tres lipasas comerciales CAL-A, CAL-B y PSL-C. Las pruebas se llevaron a cabo en *tert*-butil metil éter, a 30°C y una pequeña cantidad de agua destilada, como se muestra a continuación.



Esquema II.11: Hidrólisis enzimática del acetato de (±)-**15**.

Tabla II.3: Hidrólisis enzimática de (±)-**15** a 30°C.

Entrada	equivalentes H ₂ O	disolvente	enzima	t reacción (días)	% ^a (S)- 15	%ee ^b (S)- 15	% ^a (R)- 14	%ee ^b (R)- 14	% ^a 13
1	5	<i>t</i> BuOMe	CAL-A	9	50	67	39	77	11
2	5	<i>t</i> BuOMe	CAL-B	12	-	-	-	-	-
3	5	<i>t</i> BuOMe	PSL-C	12	-	-	-	-	-

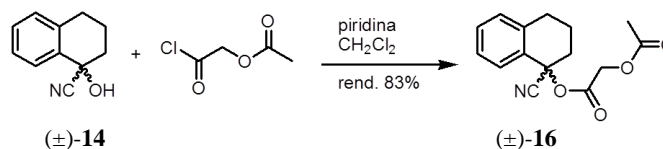
^a Proporción de productos en el medio de reacción, determinados por HPLC. ^b Exceso enantiomérico, determinados por HPLC.

De la misma forma que en la acilación, solo la CAL-A cataliza el proceso. Transcurridos siete días de reacción se observa formación de α -tetralona producida por la descomposición del producto de hidrólisis (*R*)-**14**. Esto impide que se pueda determinar con exactitud la enantioselectividad de la reacción. No obstante, ésta ha de ser baja, ya que los excesos enantioméricos determinados tanto para sustrato como para producto son solo moderados.

II.3 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL ACETOXIACETATO DE (\pm)-1-CIANO-1,2,3,4-TETRAHIDRO-1-NAFTILO

A la vista de los resultados obtenidos en la acetilación y en la hidrólisis del derivado acetilado, se decidió cambiar de estrategia modificando el sustrato. Para ello se le introdujo un grupo espaciador con la intención de alejar el punto de reacción del centro estereogénico cuaternario. Como se ha comentado en los antecedentes esta estrategia dio buenos resultados en un trabajo precedente.

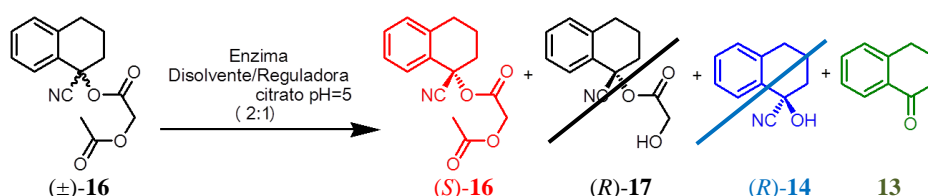
El sustrato se prepara haciendo reaccionar la cianhidrina de la α -tetralona con cloruro de acetoxiacetilo en diclorometano para obtener así el éster (\pm)-**16** con buen rendimiento.



Esquema II.12: Síntesis de (\pm)-**16**.

Una vez sintetizado el sustrato de partida (\pm)-**16**, de nuevo, se probaron como biocatalizadores en el proceso de hidrólisis las lipasas CAL-A, CAL-B y PSL-C. Las reacciones se realizaron a 30°C en una mezcla de 1,4-dioxano y disolución reguladora de citrato a pH 5 en proporción 2 a 1 en volumen.

Resultados y discusión



Esquema II.13: Hidrólisis enzimática de (±)-16.

Sorprendentemente no se obtuvo el producto esperado (*R*)-17 que proviene de la hidrólisis del grupo éster más accesible, sino la α -tetralona que es el producto de descomposición de la cianhidrina (*R*)-14.

Los datos recogidos de los distintos experimentos con las diferentes lipasas se pueden ver en la tabla II.4.

Tabla II.4: Hidrólisis enzimática de (±)-16 en una mezcla de 1,4-dioxano/reguladora citrato 1M de pH = 5 en una proporción 2 a 1 (en volumen).

Entrada	enzima	T (°C)	t reacción (días)	% ^a (<i>S</i>)-16	%ee ^b (<i>S</i>)-16	% ^a 13
1	CAL-A	30	5	40	95	60
2	CAL-B	30	13	-	-	-
3	PSL-C	30	13	60	11	40

^a Proporción de productos en el medio de reacción, determinados por HPLC. ^b Exceso enantiomérico, determinados por HPLC.

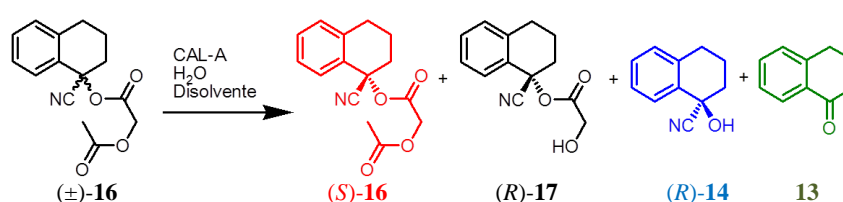
Cabe destacar el elevado exceso enantiomérico del sustrato remanente (*S*)-16 en la reacción catalizada por la CAL-A. En estas condiciones es posible obtener este sustrato con un exceso enantiomérico del 95% y rendimiento del 40%.

La lipasa PSL-C también cataliza el proceso aunque con una enantioselectividad mucho más baja.

La descomposición de la cianhidrina (*R*)-14, para dar su correspondiente cetona, puede ser útil ya que permite reciclar este compuesto para volver a sintetizar el sustrato de partida. Pero desafortunadamente esto implica dos pasos de reacción que son incompatibles con la reacción enzimática, por lo que en este caso no es posible desarrollar una resolución cinética dinámica.

Teniendo en cuenta la alta enantioselectividad obtenida en el proceso catalizado por la CAL-A, se planteó como objetivo, minimizar la cantidad de cetona que se forma en el medio y aislar la cianhidrina que al ser el producto de la reacción tiene la configuración opuesta. De esta manera se lograría la preparación de ambos enantiómeros. Para ello, se redujo la cantidad de agua en el medio de reacción probándose nuevamente las

reacciones de hidrólisis enzimática con una pequeña cantidad de agua en el medio de reacción (5 ó 10 equivalentes) y con diferentes disolventes orgánicos y temperaturas. En la tabla II.5 se muestran los resultados obtenidos de estas reacciones.



Esquema II.14: Hidrólisis enzimática de (±)-16.

Tabla II.5: Hidrólisis enzimática de (±)-16, con CAL-A.

Entrada	eq. H ₂ O	disolvente	T (°C)	t reac. (días)	% ^a (S)-16	%ee ^b (S)-16	% ^a 13	% ^a (R)-14	%ee ^b (R)-14	% ^a (R)-17	%ee ^b (R)-17
1	10	1,4-dioxano	30	6	66	34	7	27	84	-	-
2	5	1,4-dioxano	40	6	44	76	8	48	54	-	-
3	5	tolueno	40	7	74	13	6	20	58	-	-
4	5	THF	40	12	37	97	17	36	65	10	>99
5	5	^t BuOMe	40	4 horas	43	90	3	48	46	6	>99
6	5	Et ₂ O	40	4 horas	37	92	2	53	61	8	>99
7	5	^t BuOMe	30	1	33	>99	3	53	30	11	>99
8	5	^t BuOMe	20	2	32	>99	5	51	37	12	>99

^a Proporción de productos en el medio de reacción, determinados por HPLC. ^b Exceso enantiomérico, determinados por HPLC.

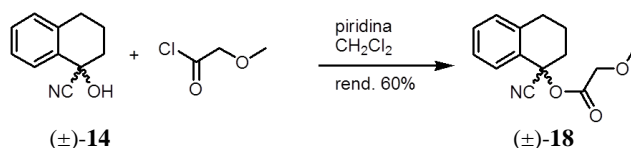
Cuando a la reacción con CAL-A en 1,4-dioxano contiene solo una pequeña cantidad de agua (entradas 1 y 2) se disminuye drásticamente la descomposición de la cianhidrina (R)-14, sin embargo, también disminuye considerablemente la enantioselectividad de la reacción. Al emplear tolueno como disolvente (entrada 3) se obtienen resultados muy similares. Por contrapartida, al emplear *tert*-butil metil éter o éter etílico la reacción es mucho mas rápida (entradas 5 y 6) reduciéndose así la cantidad de 13 que se obtiene por degradación de la cianhidrina de la α -tetralona; también la enantioselectividad de la reacción es más elevada. Sin embargo, en estos disolventes se observa la formación del producto (R)-17 lo que conduce a una complicada mezcla de productos de reacción. El mejor resultado de estos experimentos se obtuvo cuando la reacción se hace a 30°C, en *tert*-butil metil éter y 5 equivalentes de agua destilada ya que se puede obtener un 33% de sustrato remanente (S)-16 enantiopuro y un 12% del producto

Resultados y discusión

(*R*)-**17** también enantiopuro; aunque la separación de estos productos resulta complicada.

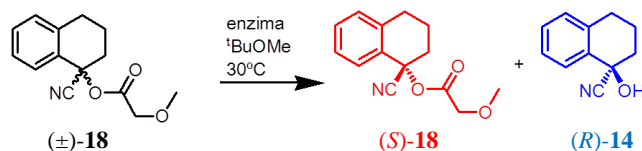
II.4 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DEL METOXIACETATO DE (±)-1-CIANO-1,2,3,4-TETRAHIDRO-1-NAFTILO

Para evitar la formación de (*R*)-**17** se decidió sintetizar un nuevo sustrato que fuese análogo estructuralmente al derivado (±)-**16**, pero que no fuese susceptible de dar dos reacciones de hidrólisis diferentes. Por esto, se decidió sintetizar el metoxiacetato de (±)-1-ciano-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftilo (±)-**18**. A partir de la cianhidrina de la tetralona (±)-**14**, mediante una reacción de éste con cloruro de metoxiacetilo en diclorometano, se obtiene el cianoéster (±)-**18** con buen rendimiento.



Esquema II.15: Síntesis de (±)-**18**.

Al igual que anteriormente, se probaron varias lipasas con el objetivo de determinar cual era el biocatalizador más adecuado para la hidrólisis enzimática. Ésta se llevó a cabo a 30°C en *t*-butil metil éter y una pequeña cantidad de agua destilada (5 equivalentes). Los resultados obtenidos en estas condiciones de reacciones se recogen en la tabla II.6.



Esquema II.16: Hidrólisis enzimática de (±)-**18**.

Tabla II.6: Hidrólisis enzimática de (±)-**18** con diferentes lipasas.

Entrada	equivalentes H ₂ O	disolvente	enzima	T (°C)	<i>t</i> reacción (días)	% <i>ee</i> ^a (<i>S</i>)- 18	% <i>ee</i> ^a (<i>R</i>)- 14	<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i>
1	5	^t BuOMe	CAL-A	30	2 horas	79	61	56	10
2	5	^t BuOMe	CAL-B	30	16	-	-	-	-
3	5	^t BuOMe	PSL-C	30	16	56	94	38	54

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Conversión, $c = [ee_s / (ee_s + ee_p)]$.

Como en los procesos anteriores son las lipasas de CAL-A y PSL-C las que catalizan el proceso. Aunque la CAL-A cataliza la reacción a mayor velocidad, la PSL-C muestra una mayor enantioselectividad con una razón enantiomérica de 54. Cabe destacar que en estas condiciones no se observa la descomposición de la cianhidrina de la α -tetralona.

A continuación se estudió el efecto del disolvente en estos procesos y los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Tabla II.7: Hidrólisis enzimática de (\pm)-**18** con diferentes lipasas.

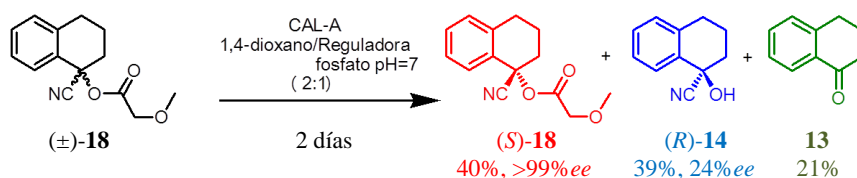
Entrada	equivalentes	disolvente	enzima	T (°C)	t reacción (días)	%ee ^a	%ee ^a	c ^b (%)	E
	H ₂ O					(S)- 18	(R)- 14		
1	5	Eter etílico	CAL-A	30	2 horas	98	80	55	39
2	5	Tolueno	CAL-A	30	4	63	50	56	5
3	5	1,4-dioxano	CAL-A	30	4	97	68	59	22
4	5	THF	CAL-A	30	4	80	88	48	39
5	5	Eter etílico	PSL-C	30	13	31	93	25	36
6	5	THF	PSL-C	30	13	30	94	24	42
7	5	1,4-dioxano	PSL-C	30	10	35	97	27	81

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Conversión, $c=[ee_s/(ee_s+ee_p)]$.

En todos los disolventes las reacciones catalizadas por CAL-A son mucho más rápidas que las catalizadas por PSL-C, aunque la enantioselectividad mostrada por esta segunda enzima es mas alta. Cabe destacar que en la reacción catalizada por la PSL-C en dioxano, se logra obtener la cianhidrina (R)-**14** con elevada pureza óptica, del 97%; aunque con un rendimiento bajo. El sustrato remanente (S)-**18** se puede obtener con elevada pureza óptica en los procesos catalizados por CAL-A cuando se supera el 50% de conversión. Se intentó mejorar este resultado volviendo a analizar las reacciones de hidrólisis del sustrato (\pm)-**18**.

Para ello se llevó a cabo la hidrólisis en una mezcla de 1,4-dioxano y disolución reguladora fosfato de pH 7. En estas condiciones, es de esperar que se produzca la descomposición de la cianhidrina de la α -tetralona, tal y como había ocurrido con el sustrato (\pm)-**16**.

Resultados y discusión



Esquema II.17: Hidrólisis enzimática de (±)-18.

Efectivamente, en la reacción catalizada por la CAL-A es posible obtener un 40% de sustrato (S)-18 enantiopuro tras 48 horas de reacción, aunque no se logra la completa conversión de la cianhidrina en la α -tetralona.

Un último paso para optimizar la enantioselectividad del proceso enzimático fue la utilización de un nucleófilo estructuralmente análogo al grupo saliente del sustrato en un proceso de aminólisis o transesterificación, en lugar de la reacción de hidrólisis.

En la bibliografía se pueden encontrar ejemplos que demuestran que la similitud estructural entre el nucleófilo y el grupo saliente en reacciones de aminólisis enzimáticas influye positivamente en la enantioselectividad de la reacción.¹²²

De acuerdo con esta premisa se realizaron distintas reacciones enzimáticas en las que se utilizaron nucleófilos diferentes al agua, los cuales se muestran en la figura II.5.

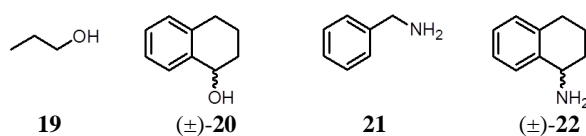
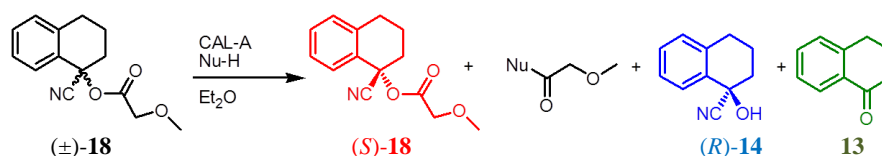


Figura II.5: Nucleófilos utilizados en las reacciones de transesterificación y aminólisis.

Las reacciones se llevaron a cabo empleando las mejores condiciones anteriormente encontradas en las reacciones de hidrólisis. Los resultados de estas reacciones se recogen en la tabla II.8.

¹²² J. Gonzales-Sabín, V. Gotor, F. Rebolledo, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, *15*, 481-488



Esquema II.18: Transesterificación o aminólisis enzimática de (±)-18.

Tabla II.8: Transesterificación o aminólisis enzimática de (±)-18 en éter etílico, a 30°C y 5 equivalentes de diferentes nucleófilos.

Entrada	nucleófilo (5 equivalentes)	enzima	t reacción (horas)	% ^a (S)-18	%ee ^b (S)-18	% ^a 13	% ^a (R)-14	%ee ^b (R)-14	c (%)	E
1	19	CAL-A	3	-	25	-	-	91	22 ^c	27 ^d
2	(±)-20	CAL-A	2	-	65	-	-	69	49 ^c	11 ^d
3	21	CAL-A	1	9	8	91	-	-	91 ^e	1 ^f
4	(±)-22	CAL-A	23	39	>99	61	-	-	61 ^e	143 ^f

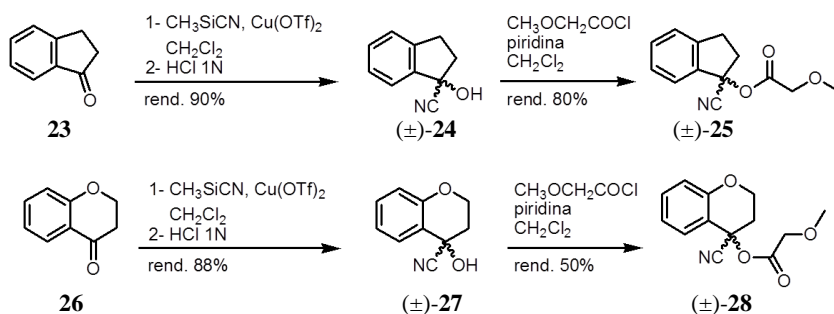
^a Proporción de productos en el medio de reacción, determinados por HPLC. ^b Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^c Conversión, $c = [ee_s / (ee_s + ee_p)]$. ^d Razón enantiomérica, $E = \ln\{(1 - ee_p) / [1 + (ee_s / ee_p)]\} / \ln\{(1 + ee_s) / [1 + (ee_s / ee_p)]\}$. ^e Conversión determinada por HPLC. ^f Razón enantiomérica, $E = \ln[(1 - c)(1 - ee_s)] / \ln[(1 - c)(1 + ee_s)]$.

Como se observa en la tabla II.8 los procesos de transesterificación con **19**, (±)-**20** y **21** no mejoran los resultados obtenidos en las reacciones de hidrólisis. En cambio, cuando se realiza la aminólisis con (±)-**22** se obtiene una enantioselectividad muy alta, lo que permite obtener el sustrato remanente (S)-**18** enantiopuro. La cianhidrina (R)-**14** se descompone completamente a la α-tetralona simplificando el número de productos de reacción y se puede reciclar e incorporar en un nuevo proceso.

Resultados y discusión

II.5 APLICACIÓN DE LA METODOLOGÍA DESARROLLADA A LA RESOLUCIÓN DE LAS CIANHIDRINAS DERIVADAS DE LA α -INDANONA Y 4-CROMANONA

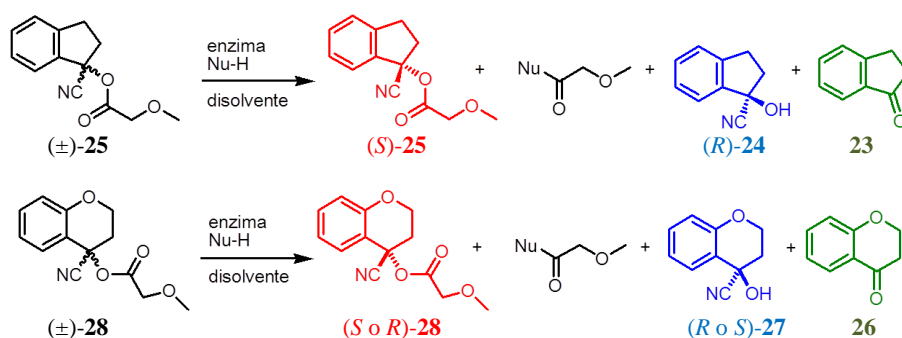
A continuación se trató de extender esta metodología a la resolución cinética de las cianhidrinas de la α -indanona y de la 4-cromanona. Para ello se repitieron las reacciones enzimáticas en las mejores condiciones encontradas para la cianhidrina de la α -tetralona. Éstos se dieron en procesos de hidrólisis y aminólisis del derivado metoxiacetilado, por lo que se procedió a sintetizar los correspondientes análogos de la α -indanona y 4-cromanona.



Esquema II.20: Síntesis de (+)-25 y de (+)-28.

En primer lugar se sintetizaron las correspondientes cianhidrinas (+)-24 y (+)-27 con excelentes rendimientos empleando el cianuro de trimetilsililo y triflato cobre (II) como catalizador en diclorometano. Posteriormente se acilaron las cianhidrinas obtenidas con cloruro de metoxiacetilo dando los correspondientes productos (+)-25 y (+)-28.

Una vez sintetizados los sustratos de partida se procedió a realizar los correspondientes experimentos empleando las lipasas CAL-A y PSL-C, en éter etílico o 1,4-dioxano, a 30°C y utilizando 5 equivalentes del correspondiente nucleófilo. Tal y como se muestra en el esquema de reacción siguiente (esquema II.21).



Esquema II.21: hidrólisis enzimáticas y aminólisis enzimáticas de (±)-25 y de (±)-28.

Los nucleófilos que se utilizaron en estos procesos enzimáticos fueron el agua para la hidrólisis de los sustratos (±)-25 y (±)-28; (±)-22 para la reacción de aminólisis enzimática de (±)-28; y (±)-29 para la aminólisis enzimática de (±)-25.

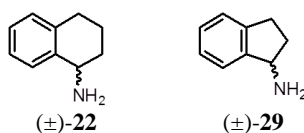


Figura II.6: Nucleofilos utilizados en las reacciones de aminólisis.

Los resultados obtenidos de esta serie de experimentos se recogen en las dos siguientes tablas.

Tabla II.9: Hidrólisis o aminólisis enzimática de (±)-25 a 30°C y 5 equivalentes de diferentes nucleófilos.

Entrada	nucleófilo (5 eq.)	disolvente	enzima	t reac. (h)	% ^a (S)-25	%ee ^b (S)-25	% ^a 23	% ^a (R)-24	%ee ^b (R)-24	c (%)	E
1	reguladora ^g	1,4-dioxano	CAL-A	2	64	<1	36	-	-	36 ^e	1 ^f
2	H ₂ O	éter etílico	CAL-A	1	-	22	-	-	16	58 ^c	2 ^d
3	H ₂ O	1,4-dioxano	PSL-C	336	-	34	-	-	92	27 ^c	33 ^d
4	(±)-29	éter etílico	CAL-A	2	41	7	59	-	-	59 ^e	1 ^f

^a Proporción de productos en el medio de reacción, determinados por HPLC. ^b Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^c Conversión, $c = [ee_s / (ee_s + ee_p)]$. ^d Razón enantiomérica, $E = \ln\{(1 - ee_p) / [1 + (ee_s / ee_p)]\} / \ln\{(1 + ee_s) / [1 + (ee_s / ee_p)]\}$. ^e Conversión determinada por HPLC. ^f Razón enantiomérica, $E = \ln[(1 - c)(1 - ee_s)] / \ln[(1 - c)(1 + ee_s)]$. ^g Mezcla de 1,4-dioxano/reguladora citrato pH=5 (2:1).

Resultados y discusión

Tabla II.10: hidrólisis o aminólisis enzimática de (\pm)-**28** a 30°C y 5 equivalentes de diferentes nucleófilos.

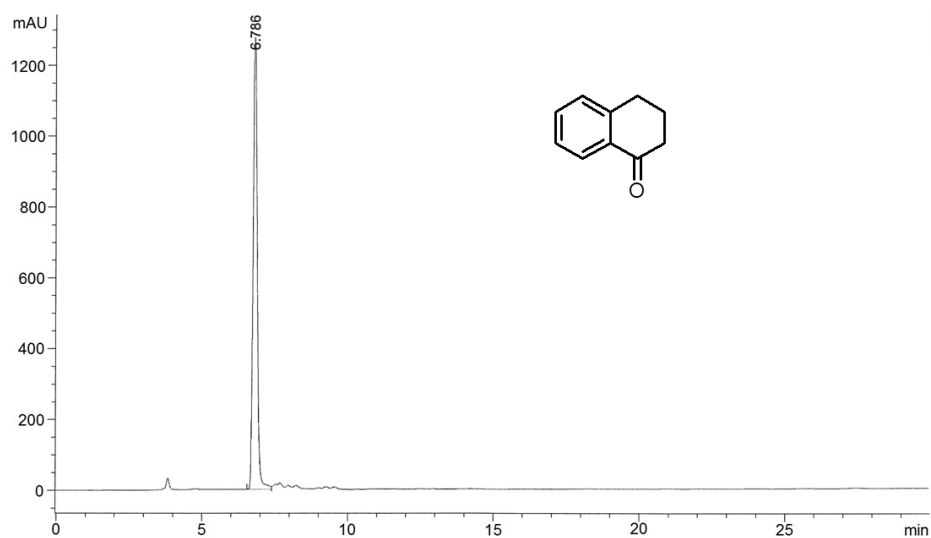
Entrada	nucleófilo (5 eq.)	disolvente	enzima	t reac. (horas)	% ^a	%ee ^b	% ^a	% ^a	%ee ^b	c (%)	E
					28	28	26	27	27		
1	reguladora ^g	1,4-dioxano	CAL-A	2	7	62	38	-	-	38 ^e	1 ^f
2	H ₂ O	Eter etílico	CAL-A	2	9	64	78	13	9	-	-
3	H ₂ O	1,4-dioxano	PSL-C	288	-	35	-	-	71	33 ^c	8 ^d
4	(\pm)-22	Eter etílico	CAL-A	2	33	24	67	-	-	67 ^e	2 ^f

^a Proporción de productos en el medio de reacción, determinados por HPLC. ^b Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^c Conversión, $c=[ee_s/(ee_s+ee_p)]$. ^d Razón enantiomérica, $E=\ln\{(1-ee_p)/[1+(ee_s/ee_p)]\}/\ln\{(1+ee_s)/[1+(ee_s/ee_p)]\}$. ^e Conversión determinada por HPLC. ^f Razón enantiomérica, $E=\ln[(1-c)(1-ee_s)]/\ln[(1-c)(1+ee_s)]$. ^g mezcla de 1,4-dioxano/reguladora citrato pH=5 (2:1).

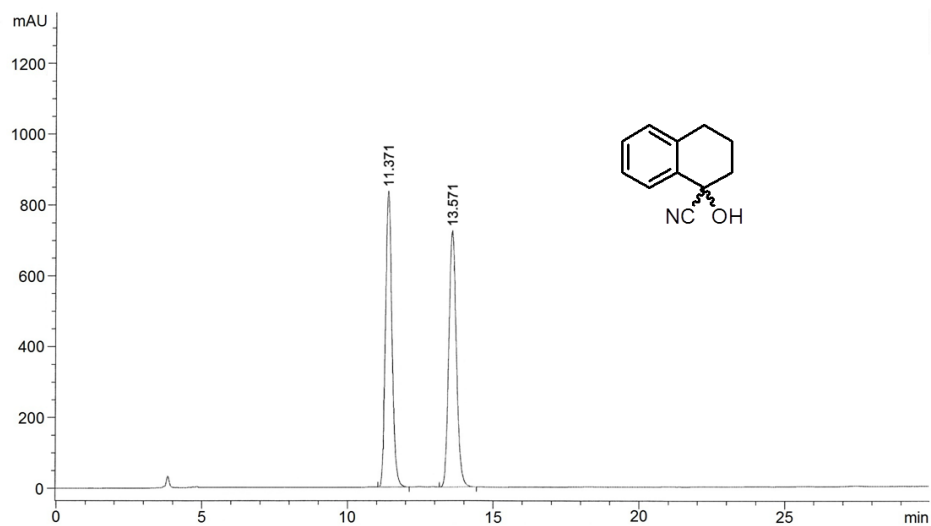
Como se puede ver en las tablas II.9 y II.10, donde se muestran los resultados de las reacciones enzimáticas llevadas a cabo para los sustratos (\pm)-**25** y (\pm)-**28**, los resultados no fueron los deseados. Las reacciones con PSL-C para ambos sustratos son muy lentas y poco enantioselectivas. Por otro lado, las reacciones que se llevaron a cabo con la CAL-A son mucho más rápidas que las anteriores, aunque las enantioselectividades obtenidas fueron bajas. Cabe destacar que la cianhidrina de la α -indanona (*R*)-**24** se puede obtener con rendimiento moderado y buen exceso enantiomérico (entrada 3, tabla II.9) utilizando la lipasa PSL-C como catalizador en un proceso de hidrólisis de su derivado metoxiacetilado (\pm)-**25**.

II.6 DETERMINACIÓN DE LOS EXCESOS ENANTIOMÉRICOS

El exceso enantiomérico de los productos derivados de la cianhidrina de la α -tetralona se determinaron mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) utilizando columna de relleno quiral (Chiralpak OJ-H, 0.46 cm de diámetro y 25 cm de longitud), a una longitud de onda de 210 nanómetros, a 40°C y como fase móvil una mezcla *n*-hexano/isopropanol 90:10 a un flujo de 0,8 mL/min. En todos los casos, la inyección de la muestra se realizó con 20 μ L de una disolución de sustrato a medir en la misma mezcla de elución.

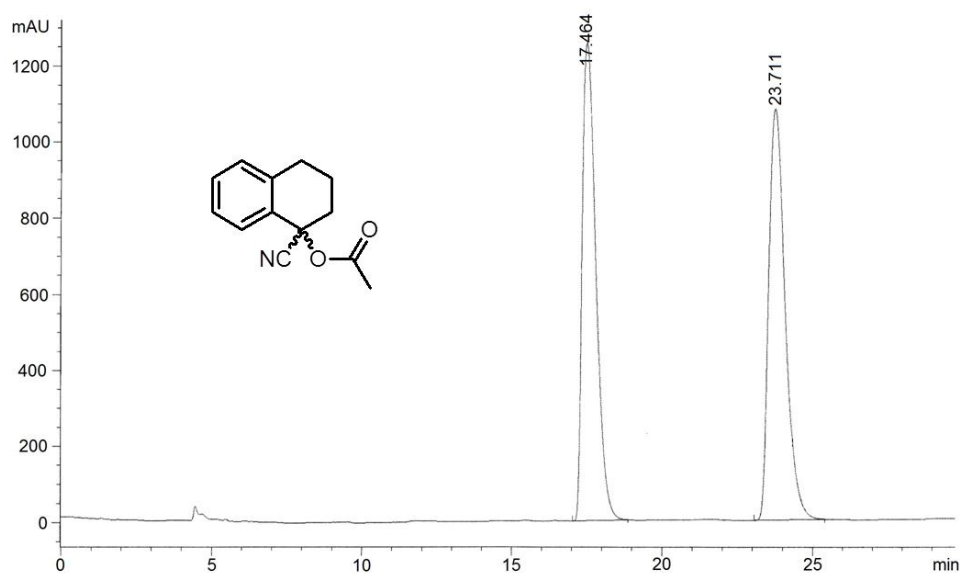


Cromatograma II.2: HPLC para la α -tetralona **13**.

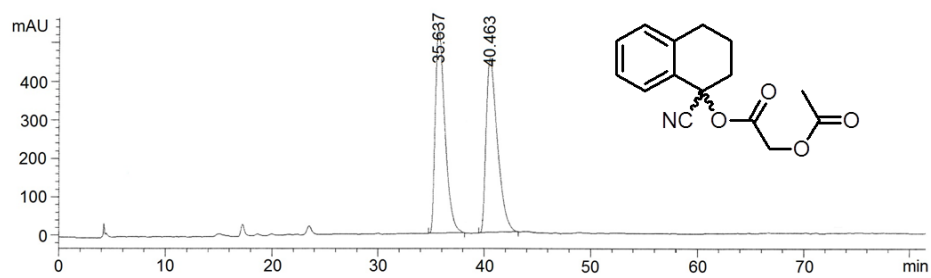


Cromatograma II.2: HPLC para la cianhidrina α -tetralona (\pm)-**14**.

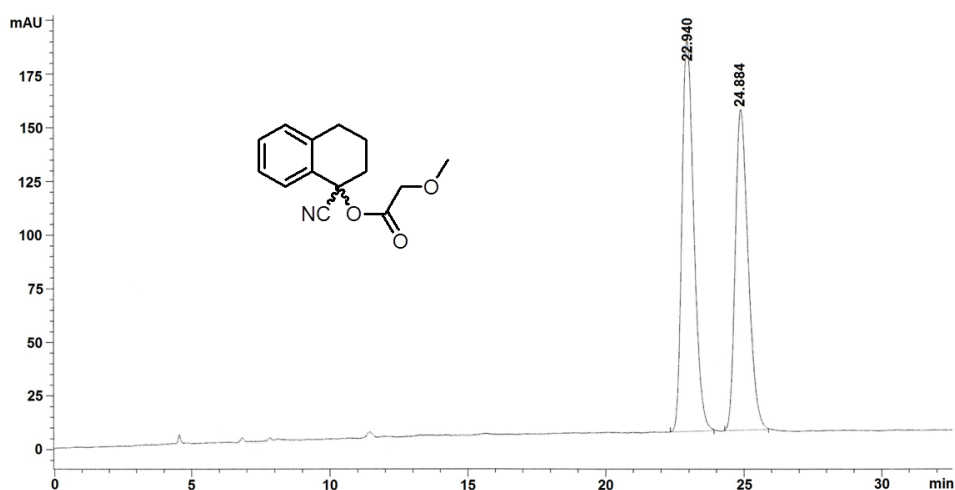
Resultados y discusión



Cromatograma II.3: HPLC para la cianhidrina de la α -tetralona acetilada (\pm)-15.



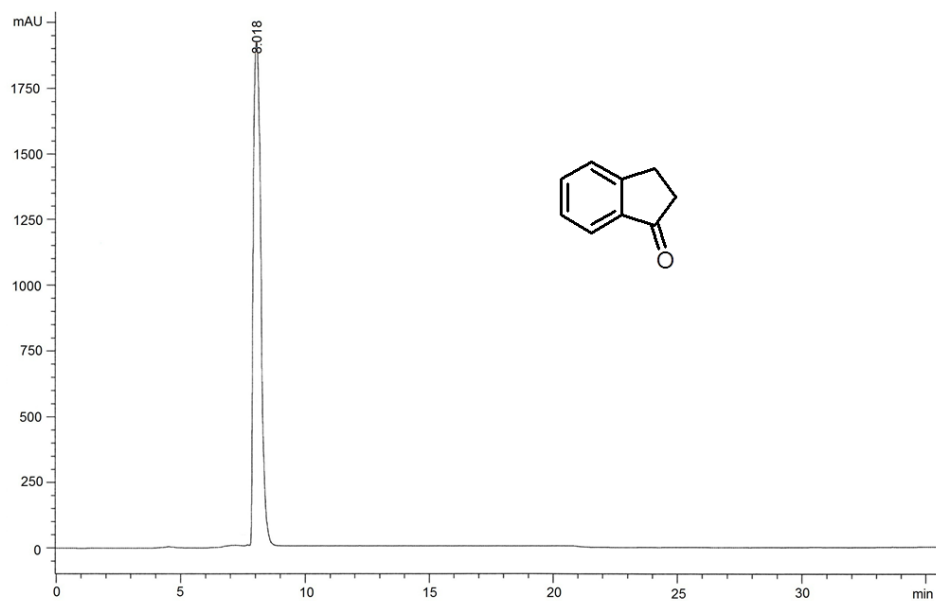
Cromatograma II.4: HPLC para la cianhidrina de la α -tetralona acetoxiacetilada (\pm)-16.



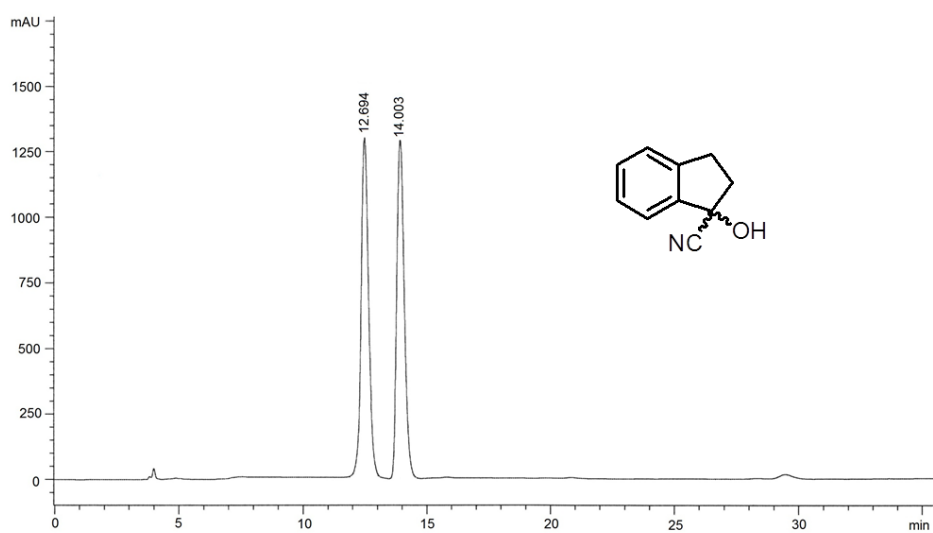
Cromatograma II.5: HPLC para la cianhidrina de la tetralona metoxiacetilada (\pm)-18.

El exceso enantiomérico de los productos derivados de la cianhidrina de la α -indanona se determinaron mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) utilizando columna de relleno quiral (Chiralpak OJ-H, 0.46 cm de diámetro y 25 cm de longitud), a una longitud de onda de 210 nanómetros, a 40°C y como fase móvil una mezcla *n*-hexano/isopropanol 90:10 a un flujo de 0,8 mL/min. En todos los casos, la inyección de la muestra se realizó con 20 μ L de una disolución de sustrato a medir en la misma mezcla de elución.

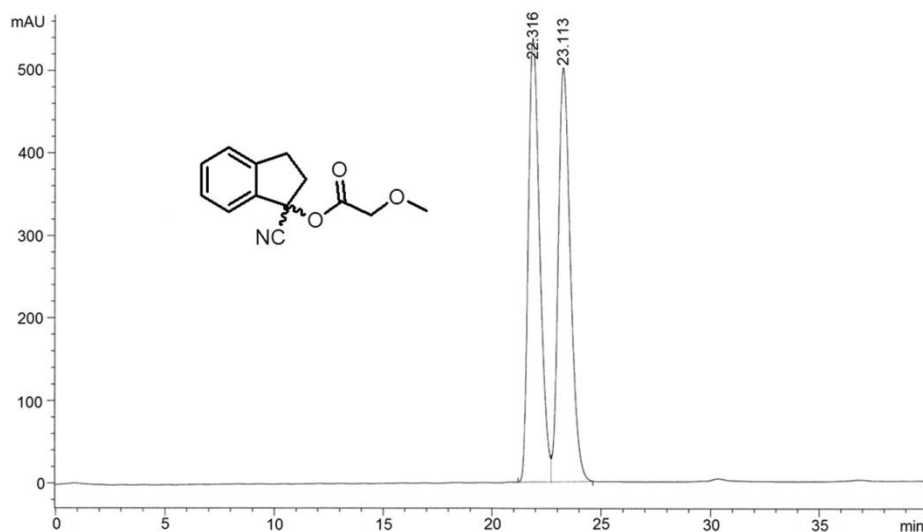
Resultados y discusión



Cromatograma II.6: HPLC para la α -indanona **23**.



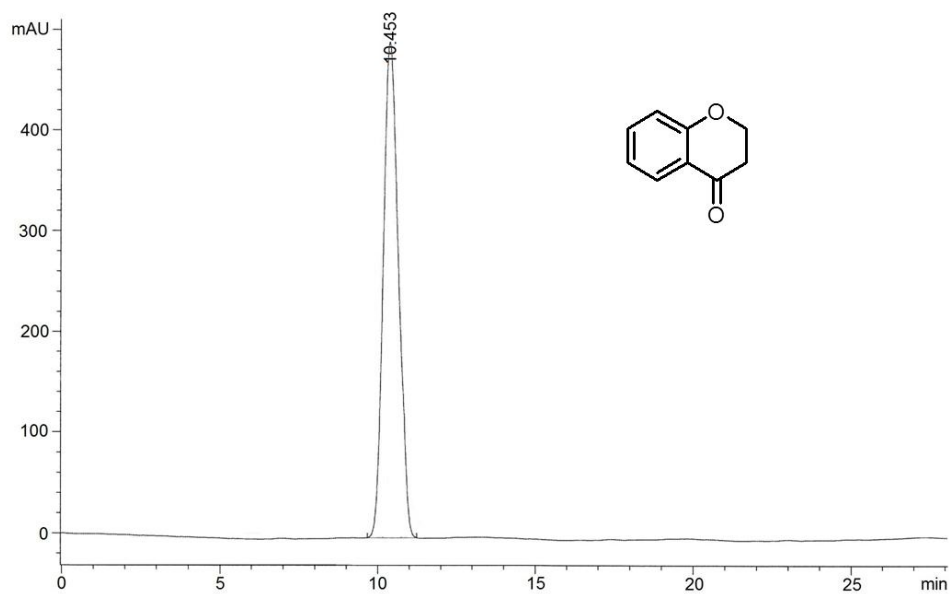
Cromatograma II.7: HPLC para la cianhidrina α -indanona (\pm)-**24**.



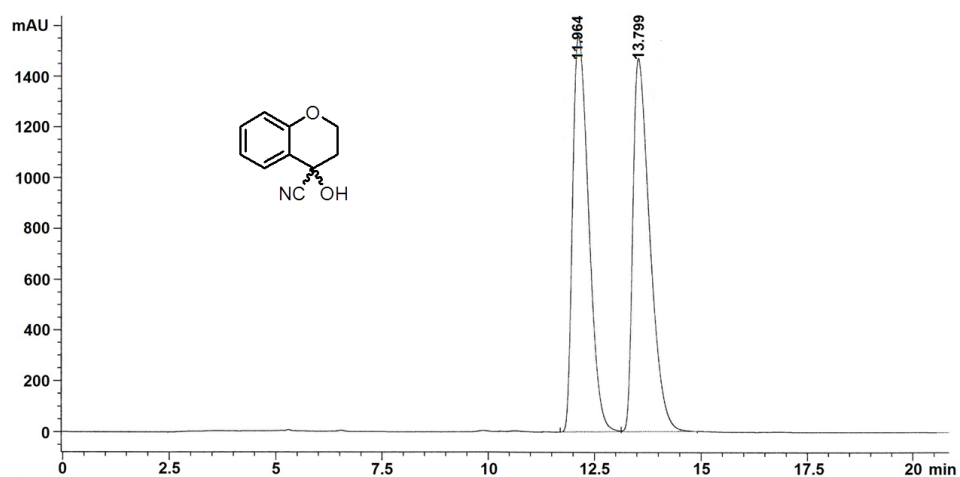
Cromatograma II.8: HPLC para la cianhidrina de la α -indanona metoxiacetilada (\pm)-25.

El exceso enantiomérico de los productos derivados de la cianhidrina de la 4-cromanona se determinaron mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) utilizando columna de relleno quiral (Chiralpak OJ-H, 0.46 cm de diámetro y 25 cm de longitud), a una longitud de onda de 210 nanómetros, a 30°C y como fase móvil una mezcla *n*-hexano/isopropanol 90:10 a un flujo de 0,8 mL/min. En todos los casos, la inyección de la muestra se realizó con 20 μ L de una disolución de sustrato a medir en la misma mezcla de elución.

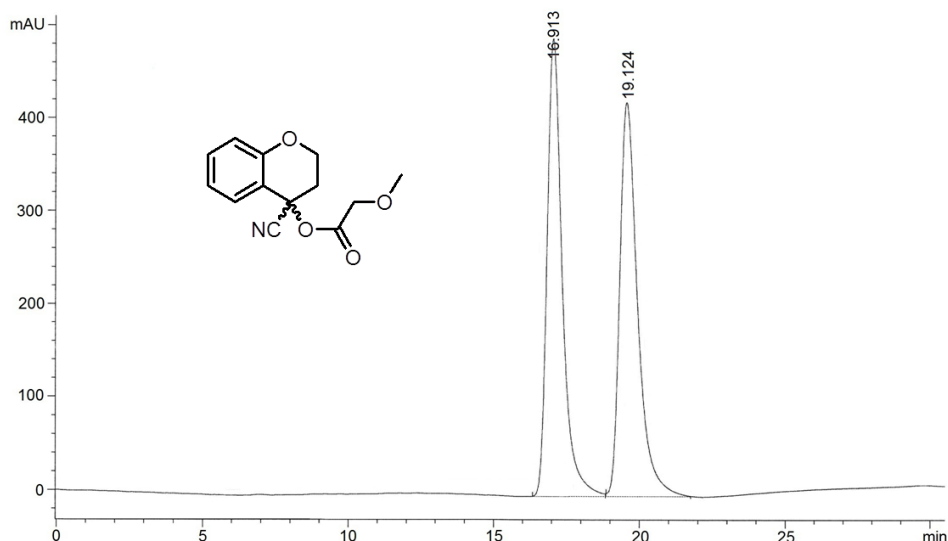
Resultados y discusión



Cromatograma II.9: HPLC para la 4-cromanona **26**.



Cromatograma II.10: HPLC para la cianhidrina 4-cromanona (\pm)-**27**.



Cromatograma II.11: HPLC para la cianhidrina de la 4-cromanona metoxiacetilada (\pm)-**28**.

II.7 ASIGNACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA

Los productos (*R*)-1-trimetilsiloxi-1,2,3,4-tetrahydro-1-naftaleno carbonitrilo (*R*)-**30** y (*R*)-1-trimetilsiloxiindano-1-carbonitrilo (*R*)-**31** se encuentran descritos en la bibliografía¹⁰⁸ y sus rotaciones específicas son $[\alpha]_D^{20} = +11,9^\circ$ ($c = 1,97$; CH_2Cl_2 ; 77% *ee*) y $[\alpha]_D^{20} = +29,1^\circ$ ($c = 2,056$; CH_2Cl_2 ; 79% *ee*) respectivamente.

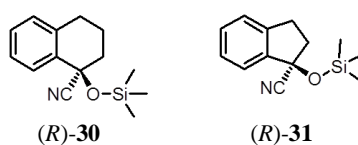
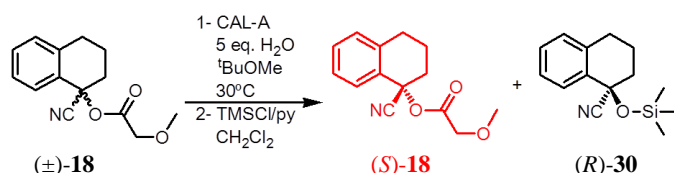


Figura II.7: (*R*)-1-trimetilsiloxi-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno-1-carbonitrilo (*R*)-**30** y (*R*)-1-trimetilsiloxiindano-1-carbonitrilo (*R*)-**31**.

Para determinar la configuración absoluta de los distintos productos obtenidos derivados de la cianhidrina de la α -tetralona se realizó la reacción de hidrólisis enzimática de (\pm)-**18** con CAL-A, 5 equivalentes de agua destilada, en éter etílico y a 30°C. Transcurrido una hora y media se retira el enzima, el disolvente y se introduce el grupo trimetilsililo empleando el cloruro de trimetilsililo.

Resultados y discusión



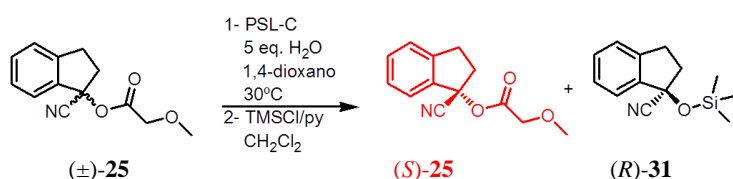
Esquema II.22: Hidrólisis enzimática de (±)-18 seguido de sililación para obtener (S)-18 y (R)-30.

Tras realizar la separación de sustrato y producto mediante cromatografía se determinó que el producto de la reacción enzimática tiene configuración *R*, por lo que el sustrato remanente tendrá configuración *S*.

Una vez determinadas las configuraciones absolutas de estos productos se asignan las configuraciones de (R)-14, (S)-15, (S)-16, por comparación de los cromatogramas de HPLC.

Para determinar la configuración de 17 se aisló este producto de la mezcla de la reacción de hidrólisis enzimática en la que se obtuvo y se trató con cloruro de acetilo para dar el producto acetilado (R)-16, por lo que el compuesto 17 tiene configuración *R*.

La asignación de 25 se hizo de la misma manera que la del producto 18. Se realizó la reacción de hidrólisis enzimática con PSL-C, 5 equivalentes de agua destilada, a 30°C y en 1,4-dioxano. Trascurrido el tiempo de reacción se retira el enzima y el crudo de reacción se trata con cloruro de trimetilsililo en diclorometano.



Esquema II.23: Hidrólisis enzimática de (±)-25 seguido de sililación para obtener (S)-25 y (R)-31.

Tras separación de los productos finales se determinó que el producto de la reacción enzimática tiene configuración *R*, por lo que el sustrato remanente tendrá configuración *S*.

CONCLUSIONES

En este capítulo se ha desarrollado una metodología enzimática para la preparación enantioselectiva de ambos enantiómeros de la cianhidrina de la α -tetralona mediante procesos de hidrólisis o aminólisis catalizados por lipasas.

El mejor resultado se obtiene cuando se utiliza la lipasa CAL-A como biocatalizador en la aminólisis del derivado metoxiacetato de (\pm)-1-ciano-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-ilo. Se ha observado un incremento de la enantioselectividad al utilizar un nucleófilo estructuralmente análogo al grupo saliente en la reacción de aminólisis enzimática.

El enantiómero (R) de la cianhidrina se puede obtener con buen exceso enantiomérico mediante hidrólisis enzimática con CAL-A o PSL-C en éter etílico o 1,4-dioxano respectivamente, usando una pequeña cantidad de agua (5 equivalentes), aunque con rendimientos moderados.

*La cianhidrina de la α -indanona (R)-**24** se puede obtener con rendimiento moderado y buen exceso enantiomérico utilizando la lipasa PSL-C como catalizador en un proceso de hidrólisis de su derivado metoxiacetilado.*

PARTE EXPERIEMENTAL

II.8 REACTIVOS Y DISOLVENTES

Los reactivos utilizados fueron suministrados por Aldrich o Alfa, sin ser necesarios tratamientos previos de purificación.

Los disolventes empleados fueron sometidos previamente a un tratamiento de secado y almacenamiento en atmósfera de nitrógeno. En el caso del diclorometano y del acetonitrilo el agente desecante fue el hidruro cálcico, la piridina se destiló sobre hidróxido sódico y el 1,4-dioxano, tetrahidrofurano, tolueno y *tert*-butil metil éter fueron tratados con sodio en presencia de benzofenona como indicador. Los disolventes para HPLC fueron adquiridos a Romil y a J. T. Baker.

La lipasa tipo A de *Candida antarctica* (Immobilized Lipase NZL-101; CAL-A; 6,2U/g utilizando laureato de etilo, 1-butanol, isooctano a 30°C) fue suministrada por Codexis. La lipasa de tipo B de *Candida antarctica* (Novozym 435, CAL-B, 7300PLU/g) fue donada por Novo Nordisk Co. Las lipasas de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre partículas de cerámicas (PSL-C, 783 U/g).

Parte experimental

II.9 TECNICAS DE ANÁLISIS

Las cromatografías en capa fina (CCF) se realizan sobre un soporte de cromatofolios de gel de sílice 60 de 0.25 mm de espesor que incorporan un revelador de ultravioleta comercializado por Merck.

Las cromatografías en columna fueron realizadas sobre gel de sílice 60 (230-400 mesh) adquirido a Merck. Como eluyente se utiliza mezclas de disolventes, en las proporciones que se indican en los apartados correspondientes a los datos experimentales de cada compuesto.

Los análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se llevaron a cabo en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 1100, LC/MSD con detector UV a 210 nm. Se ha empleado una columna con relleno quiral CHIRALPAK OJ-H, y mezclas de eluyentes hexano/isopropanol.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) y carbono (^{13}C -RMN) así como las secuencias de pulsos adecuadas para realizar experimentos DEPT se realizaron en los espectrómetros Bruker AC-300 DPX (^1H 300.13 MHz y ^{13}C 75.5 MHz). Se usan como disolvente cloroformo deuterado. Los desplazamientos químicos (δ) se dan en valores de partes por millón (ppm) relativas al disolvente utilizado y las constantes de acoplamiento (J) en hertzios (Hz). En la descripción de los espectros utilizaremos las siguientes abreviaturas: s= singulete, sa= singulete ancho, d= doblete, dd= doble doblete, t= triplete, m= multiplete y ma= multiplete ancho.

Los puntos de fusión se han medido con un aparato Gallenkamp en capilar abierto y no están corregidos.

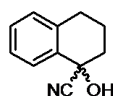
Para la medida de la rotación específica se utilizó un polarímetro Perkin-Elmer 343.

Los espectros de infrarrojo se registran en un espectrómetro UNICAM Mattson 3000 FT, preparando las muestras como pastillas en KBr para los productos sólidos, o puros en ventanas de NaCl. Las bandas de tensión se indican en valores de $\nu_{\text{máx}}$ en cm^{-1} .

Los espectros de masas se realizan en un equipo LC-MS HP 1100 series, utilizando electrospray (ESI) como fuente de ionización. Los valores están referidos a unidades de masa atómica (uma).

II.9 PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS

II.9.1 Síntesis de (±)-1-hidroxi-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno-1-carbonitrilo, (±)-14



A una disolución de α -tetralona (500 mg; 3,4 mmol) en 5 mL diclorometano seco se le adiciona el catalizador de cobre, $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ (124 mg; 0,3 mmol) y el cianuro de trimetilsililo (1,2 mL; 8,9 mmol) bajo atmosfera inerte. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 48 h. A continuación se evapora el diclorometano, se adicionan 2 mL de HCl 1N, 2 mL de acetonitrilo y se agita durante 1 h. Transcurrido este tiempo se adicionan 6 mL de agua y se extrae 3 veces con 10 mL de acetato de etilo. La fase orgánica resultante se lava con 5 mL de agua seguido de 5 mL de una disolución saturada de NaCl. Se seca con sulfato sódico anhidro, se filtra y se lleva a sequedad para obtener el producto (±)-**14** como un aceite marrón, con un rendimiento del 90%.

Fórmula empírica: $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{NO}$

Peso molecular: 173,21 g/mol

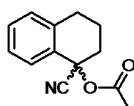
IR: 3401, 2235 cm^{-1}

$^1\text{H-RMN}$: (CDCl_3 , 300.13MHz), δ (ppm): 7.67-7.64 (m, 1H, Ph), 7.29-7.26 (m, 2H, Ph); 7.13-7.10 (m, 1H, Ph), 2.84 (t, 3J 7.3Hz, 2H, CH_2), 2.40-2.31(m, 1H, CH_2), 2.25-2.21 (m, 1H, CH_2), 2.12-1.91 (m, 3H, CH_2 y OH)

$^{13}\text{C-RMN}$: (CDCl_3 , 75.5MHz), δ (ppm): 136.04 (C), 135.06 (C), 129.21 (CH), 129.00 (CH), 127.96 (CH), 126.56 (CH), 122.04 (CN), 69.84 (C), 37.67 (CH_2), 28.27 (CH_2), 18.63 (CH_2)

Parte experimental

II.9.2 Síntesis de (\pm)-acetato de 1-ciano-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftilo, (\pm)-**15**



Se adiciona (\pm)-1,2,3,4-tetrahidro-1-hidroxinaftaleno-1-carbonitrilo, (\pm)-**14**, (100 mg; 0,6 mmol) sobre una disolución de dimetilaminopiridina DMAP (147 mg; 1,2mmol) y anhídrido acético (286 μ L; 3,0 mmol) en 3 mL de acetato de etilo y se deja agitando durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación se lava con agua destilada y la fase acuosa resultante se seca con sulfato sódico anhidro, se filtra y se lleva a sequedad. El crudo resultante se purifica por cromatografía de columna en sílica gel utilizando como eluyente diclorometano obteniéndose el producto (\pm)-**15** como un sólido blanco con un rendimiento del 70%.

Fórmula empírica: C₁₃H₁₃NO₂

Peso molecular: 215,25 g/mol

IR: 2232, 1745 cm⁻¹

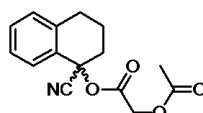
¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.72 (d, ³J 7.3Hz, 1H, Ph), 7.37-7.30 (m, 2H, Ph), 7.17 (d, ³J 6.6Hz, 1H, Ph), 2.91-2.86 (m, 2H, CH₂), 2.65-2.55 (m, 2H, CH₂), 2.13 (s, 3H, CH₃), 2.04-1.95 (m, 2H, CH₂)

¹³C-RMN: (CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm): 168.77 (CO), 136.97 (C), 131.39 (C), 129.82 (CH), 129.45 (CH), 128.91 (CH), 126.76 (CH), 118.71 (CN), 71.80 (C), 33.04 (CH₂), 28.26 (CH₂), 21.28 (CH₃), 18.29 (CH₂)

HRMS-ESI⁺: calculado para C₁₃H₁₃NNaO₂ (M+Na)⁺ m/z 238.0838 encontrado 238.0846

Punto de fusión: 95-97°C

II.9.3 Síntesis de (±)-acetoxiacetato de 1-ciano-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftilo, (±)-**16**



A una disolución de (±)-**14** (1 g; 5,8 mmol) en 50 mL diclorometano se le adiciona piridina (2,3 mL; 29 mmol) y cloruro de acetoxiacetilo (1,5 mL; 29 mmol) bajo atmosfera inerte. La mezcla resultante se agita durante 4h. A continuación se lava la reacción 3 veces con 50 mL de una disolución de ácido clorhídrico 1 N, la fase acuosa resultante se extrae 2 veces con 50 mL diclorometano. Se juntan las fases orgánicas resultantes y se seca con sulfato sódico anhidro, se filtra y se lleva a sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice usando como eluyente diclorometano para obtener el producto (±)-**16** como un sólido blanco, con un rendimiento del 83%.

Fórmula empírica: C₁₅H₁₅NO₄

Peso molecular: 273,28 g/mol

IR: 2242, 1770, 1754 cm⁻¹

¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.68 (d, ³J 7.6Hz, 1H, Ph), 7.38-7.26 (m, 2H, Ph), 7.18 (d, ³J 6.9Hz, 1H, Ph), 4.63 (s, 2H, CH₂), 2.90-2.85 (m, 2H, CH₂), 2.62-2.58 (m, 2H, CH₂), 2.14 (s, 3H, CH₃), 2.05-1.96 (m, 2H, CH₂)

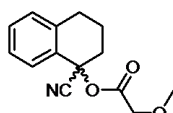
¹³C-RMN: (CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm): 170.09 (CO), 165.73 (CO), 137.06 (C), 130.67 (C), 130.08 (CH), 129.53 (CH), 128.81 (CH), 126.85 (CH), 118.07 (CN), 73.05 (C), 60.42 (CH₂), 33.03 (CH₂), 28.16 (CH₂), 20.01 (CH₃), 18.24 (CH₂)

HRMS-ESI⁺: calculado para C₁₅H₁₅NNaO₄ (M+Na)⁺ m/z 296.0893 encontrado 296.0908

Punto de fusión: 56-58°C

Parte experimental

II.9.4 Síntesis de (\pm)-metoxiacetato de 1-ciano-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftilo, (\pm)-**18**



A una disolución de (\pm)-**14** (400 mg; 2,3 mmol) en 20 mL diclorometano se le adiciona piridina (932 μ L; 11,5 mmol) y cloruro de metoxiacetilo (1 mL; 11,5 mmol) bajo atmosfera inerte. La mezcla resultante se agita durante 12h. A continuación se lava la reacción 3 veces con 10 mL de una disolución de ácido clorhídrico 1 N, la fase acuosa resultante se extrae 2 veces con 10 mL diclorometano. Se juntan las fases orgánicas resultantes y se seca con sulfato sódico anhidro, se filtra y se lleva a sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice usando como eluyente una mezcla de hexano/acetato de etilo (4:1) para obtener el producto (\pm)-**18** como un sólido blanco, con un rendimiento del 60%.

Fórmula empírica: C₁₄H₁₅NO₃

Peso molecular: 245,27 g/mol

IR: 2240, 1767cm⁻¹

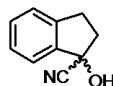
¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.71 (d, ³J 9.3Hz, 1H, Ph), 7.38-7.30 (m, 2H, Ph), 7.18 (d, ³J 9.0Hz, 1H, Ph), 4.07 (s, 2H, CH₂), 3.47 (s, 3H, CH₃), 2.91-2.86 (m, 2H, CH₂), 2.64-2.59 (m, 2H, CH₂), 2.04-1.96 (m, 2H, CH₂)

¹³C-RMN: (CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm): 168.22 (CO), 137.06 (C), 130.90 (C), 130.01 (CH), 129.51 (CH), 128.95 (CH), 126.83 (CH), 118.33 (CN), 72.41 (C), 69.58 (CH₂), 59.49 (CH₃), 33.19 (CH₂), 28.19 (CH₂), 18.27 (CH₂)

HRMS-ESI⁺: calculado para C₁₄H₁₅NNaO₃ (M+Na)⁺ m/z 268.0944 encontrado 268.0945

Punto de fusión: 75-77°C

II.9.5 Síntesis de (\pm) -1-hidroxiindano-1-carbonitrilo, (\pm) -**24**



A una disolución de α -indanona (400 mg; 3,0 mmol) en 4 mL diclorometano seco se le adiciona el catalizador de cobre, $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ (220 mg; 0,6 mmol) y el cianuro de trimetilsililo (2,0 mL; 15,7 mmol) bajo atmosfera inerte. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 48 h. A continuación se evapora el diclorometano, se adicionan 2 mL de HCl 1N, 2 mL de acetonitrilo y se agita durante 1 h. Transcurrido este tiempo se adicionan 5 mL de agua y se extrae 3 veces con 10 mL de acetato de etilo. La fase orgánica resultante se lava con 5 mL de agua seguido de 5 mL de una disolución saturada de NaCl. Se secar con sulfato sódico anhidro, se filtra y se lleva a sequedad para obtener el producto (\pm) -**24** como un aceite marrón, con un rendimiento del 95%.

Fórmula empírica: $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}$

Peso molecular: 159,18 g/mol

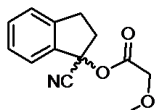
IR: 3509, 2234 cm^{-1}

$^1\text{H-RMN}$: (CDCl_3 , 300.13MHz), δ (ppm): 7.59 (d, $^3J_{\text{HH}}$ 1.3Hz, 1H, Ph), 7.57-7.30 (m, 3H, Ph), 2.23-2.96 (m, 3H, CH_2 y OH) 2.77-2.70 (m, 1H, CH_2), 2.67-2.45 (m, 1H, CH_2)

$^{13}\text{C-RMN}$: (CDCl_3 , 75.5MHz), δ (ppm): 143.12 (C), 141.15 (C), 130.36 (CH), 127.58 (CH), 125.31 (CH), 123.42 (CH), 120.72 (CN), 75.38 (C), 41.03 (CH_2), 29.34 (CH_2)

Parte experimental

II.9.6 Síntesis de (±)-metoxiacetato de 1-cianoindan-1-ilo, (±)-**25**



A una disolución de (±)-**24** (300 mg; 1,9 mmol) en 15 mL diclorometano se le adiciona piridina (760 μ L; 9,5 mmol) y cloruro de metoxiacetilo (861 μ L; 9,5 mmol) bajo atmosfera inerte. La mezcla resultante se agita durante 12h. A continuación se lava la reacción 3 veces con 10 mL de una disolución de ácido clorhídrico 1 N, la fase acuosa resultante se extrae 2 veces con 10 mL diclorometano. Se juntan las fases orgánicas resultantes y se seca con sulfato sódico anhidro, se filtra y se lleva a sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice usando como eluyente una mezcla de hexano/acetato de etilo (4:1) para obtener el producto (±)-**25** como un sólido blanco, con un rendimiento del 80%.

Fórmula empírica: C₁₃H₁₃NO₃

Peso molecular: 231,25 g/mol

IR: 2245, 1763 cm⁻¹

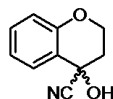
¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.75 (d, ³J 7.2Hz, 1H, Ph), 7.45-7.31 (m, 3H, Ph), 4.04 (s, 2H, CH₂), 3.45 (s, 3H, CH₃), 3.23-3.01 (m, 2H, CH₂), 2.98-2.88 (m, 1H, CH₂), 2.77-2.69 (m, 1H, CH₂)

¹³C-RMN: (CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm): 168.56 (CO), 137.53 (C), 130.94 (CH), 127.48 (C), 126.08 (CH), 125.08 (CH), 117.40 (CN), 78.30 (C), 69.31 (CH₂), 59.41 (CH₃), 39.26 (CH₂), 29.56 (CH₂)

HRMS-ESI⁺: calculado para C₁₃H₁₃NNaO₃ (M+Na)⁺ m/z 254.0788 encontrado 254.0793

Punto de fusión: 58-60°C

II.9.7 Síntesis de (±)-4-hidroxicromano-4-carbonitrilo, (±)-**27**



A una disolución de 4-cromanona (400 mg; 2,7 mmol) en 4 mL diclorometano seco se le adiciona el catalizador de cobre, $\text{Cu}(\text{OTf})_2$ (195 mg; 0,5 mmol) y el cianuro de trimetilsililo (1,8 mL; 14,0 mmol) bajo atmosfera inerte. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 48 h. A continuación se evapora el diclorometano, se adicionan 2 mL de HCl 1N, 2 mL de acetonitrilo y se agita durante 1 h. Transcurrido este tiempo se adicionan 5 mL de agua y se extrae 3 veces con 10 mL de acetato de etilo. La fase orgánica resultante se lava con 5 mL de agua seguido de 5 mL de una disolución saturada de NaCl. Se secar con sulfato sódico anhidro, se filtra y se lleva a sequedad para obtener el producto (±)-**27** como un aceite marrón, con un rendimiento del 88%.

Fórmula empírica: $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$

Peso molecular: 175,18 g/mol

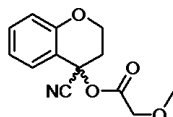
IR: 3424, 2238 cm^{-1}

^1H -RMN: (CDCl_3 , 300.13MHz), δ (ppm): 7.60 (d, 3J 7.7Hz, 1H, Ph), 7.35-7.29 (m, 1H, Ph); 7.05-6.99 (m, 1H, Ph), 6.90 (d, 3J 8.2Hz, 1H, Ph), 4,40-4.25 (m, 2H, CH_2), 3.30 (sa, 1H, OH), 2.52-2.37 (m, 2H, CH_2)

^{13}C -RMN: (CDCl_3 , 75.5MHz), δ (ppm): 153.61 (C), 131.74 (CH), 128.07 (CH), 121.40 (CH), 120.83 (CN), 120.11 (C), 117.83 (CH), 64.24 (C), 61.02 (CH_2), 34.56 (CH_2)

Parte experimental

II.9.8 Síntesis de (±)-metoxiacetato de 4-cianocroman-4-ilo, (±)-**28**



A una disolución de (±)-**27** (150 mg; 0,9 mmol) en 15 mL diclorometano se le adiciona piridina (363 μ L; 4,5 mmol) y cloruro de metoxiacetilo (411 mL; 4,5 mmol) bajo atmosfera inerte. La mezcla resultante se agita durante 12h. A continuación se lava la reacción 3 veces con 10 mL de una disolución de ácido clorhídrico 1 N, la fase acuosa resultante se extrae 2 veces con 10 mL diclorometano. Se juntan las fases orgánicas resultantes y se seca con sulfato sódico anhidro, se filtra y se lleva a sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice usando como eluyente diclorometano para obtener el producto (±)-**28** como un sólido blanco, con un rendimiento del 46%.

Fórmula empírica: C₁₃H₁₃NO₄

Peso molecular: 247,25 g/mol

IR: 2361, 1643 cm⁻¹

¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.73 (d, ³J 7.9Hz, 1H, Ph), 7.38-7.32 (m, 1H, Ph), 7.05-7.00 (m, 1H, Ph), 6.90 (d, ³J 8.4Hz, 1H, Ph), 4.43-4.36 (m, 1H, CH₂), 4.33-4.24 (m, 1H, CH₂), 4.08 (s, 2H, CH₂), 3.47 (s, 3H, CH₃), 2.77-2.73 (m, 2H, CH₂)

¹³C-RMN: (CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm): 168.21 (CO), 154.06 (C), 132.27 (CH), 130.10 (CH), 121.20 (CH), 117.71 (CH), 117.45 (CN), 116.33 (C), 69.50 (CH₂), 67.81 (C), 60.95 (CH₂), 59.55 (CH₃), 32.43 (CH₂)

HRMS-ESI⁺: calculado para C₁₃H₁₃NNaO₄ (M+Na)⁺ m/z 270.0737 encontrado 270.0725

Punto de fusión: 100-102°C

II.9.9 Procedimiento general para la hidrólisis enzimática de las cianhidrinas aciladas (\pm)-15, (\pm)-16, (\pm)-18, (\pm)-25, (\pm)-28

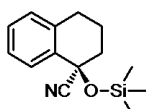
A una disolución de cianhidrina acilada (20 mg) en 1 mL (o 0,6 mL) del disolvente y en presencia de la lipasa se le añade la cantidad de agua destilada que se indica en cada caso (ó 0,3 mL de reguladora) y se incuba (por lo general a 30°C) con agitación orbital a 250 rpm. La reacción se sigue por HPLC usando las condiciones indicadas al final de los “resultados y discusión” en la sección II.6 (de la página 114 a la 121) hasta conseguir la conversión deseada. Una vez detenida la reacción, se separa el enzima por filtración y se lava con el correspondiente disolvente orgánico. Se evapora el disolvente y posteriormente se separa el sustrato remanente y los productos hidrolizados mediante cromatografía de columna de gel de sílice (ver el eluyente en cada caso).

II.9.10 Procedimiento general para la acetilación enzimática de la cianhidrina de la tetralona (\pm)-14

A una disolución de (\pm)-14 (20 mg) en 1 mL del disolvente adecuado y en presencia de la lipasa se le añade la cantidad de acetato de vinilo indicada en cada caso y se incuba (por lo general a 30°C) con agitación orbital a 250 rpm. La reacción se sigue por HPLC usando las condiciones indicadas al final de los “resultados y discusión” en la sección II.6 (de la página 114 a la 121) hasta conseguir la conversión deseada. Una vez finalizada, se separa el enzima por filtración y se lava con el correspondiente disolvente orgánico.

Parte experimental

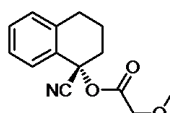
II.9.11 Síntesis de R-(+)-1,2,3,4-tetrahidro-1-trimetilsililoxinaftaleno-1-carbonitrilo, (R)-30



A una disolución de (\pm)-**18** (75 mg) en 3 mL de éter etílico en presencia de 75 mg CAL-A se le añade 27 μ L de agua destilada y se incuba a la temperatura de 30°C con agitación orbital a 250 rpm. Se para la reacción a la hora y media. Una vez finalizada, se separa el enzima por filtración y se lava con éter etílico. Se evapora el disolvente y posteriormente el crudo de reacción se disuelve en diclorometano (3mL), se le adiciona la piridina (71 μ L) y el cloruro de trimetilsililo (136 μ L). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 6 h. Transcurrido este tiempo se purifica por cromatografía de columna de gel de sílice utilizando como eluyente diclorometano.

$$[\alpha]_D^{20} = + 11,5 \text{ (c = 1, CH}_2\text{Cl}_2, ee = 85\%)$$

II.9.12 Síntesis de *S*-(-)-metoxiacetato de 1-ciano-1,2,3,4-tetrahidro-1-naftilo, (*S*)-**18**

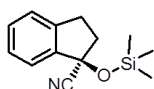


A una disolución de (\pm)-**18** (100 mg) en 4 mL de éter etílico en presencia de 100 mg CAL-A se le añade la 1,2,3,4-tetrahidronaftil-1-amina (292 μ L) y se incuba a la temperatura de 30°C con agitación orbital a 250 rpm. La reacción se sigue por HPLC utilizando columna de relleno quiral (Chiralcel OJ-H, 0.46 cm de diámetro y 25 cm de longitud), a una longitud de onda de 210 nanómetros, a 40°C y como fase móvil una mezcla *n*-hexano/isopropanol 90:10 a un flujo de 0,8 mL/min. Se para la reacción al conseguir una conversión del 60%. Seguidamente, se separa el enzima por filtración y se lava con éter etílico. El filtrado obtenido se lava con 3x10 mL de una disolución de HCl 1N, la fase orgánica se seca con sulfato sódico anhidro y se filtra. Se evapora el disolvente y posteriormente se purifica por cromatografía de columna de gel de sílice utilizando como eluyente hexano/acetato de etilo 4:1.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = - 22,0 \text{ (c = 1, CH}_2\text{Cl}_2, \text{ ee} > 99\%)$$

Parte experimental

II.9.13 Síntesis de *R*-(+)-1-trimetilsililoxiindano-1-carbonitrilo, (*R*)-31



A una disolución de (\pm)-**25** (100 mg) en 5 mL de 1,4-dioxano en presencia de 100 mg PSL-C se le añade 40 μ L de agua destilada y se incuba a la temperatura de 30°C con agitación orbital a 250 rpm. Se detiene la reacción a los 14 días. Una vez finalizada, se separa el enzima por filtración y se lava con 1,4-dioxano. Se evapora el disolvente y posteriormente el crudo de reacción se disuelve en diclorometano (4 mL), se le adiciona piridina (87 μ L) y cloruro de trimetilsililo (135 μ L). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h. Transcurrido este tiempo se purifica por cromatografía de columna de gel de sílice utilizando como eluyente diclorometano.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 10,4 \text{ (c = 0,5; CH}_2\text{Cl}_2, ee = 92\%)$$

CAPÍTULO III:

**Preparación biocatalítica de
trans-3,4-dihidroxipirrolidinas enantiopuras.**

INTRODUCCIÓN

La estructura de 3,4-dihidroxi-pirrolidina aparece frecuentemente en un gran número de compuestos, tanto naturales como sintéticos que poseen importante actividad biológica.^{123,124,125,126,127} Por este motivo, es importante elaborar métodos de síntesis para la obtención de estos heterociclos. En especial la preparación selectiva de los enantiómeros del isómero *trans*, que se muestra en la figura III.1.



Figura III.1: *trans*-(3*S*,4*S*)-dihidroxi-pirrolidina y *trans*-(3*R*,4*R*)-dihidroxi-pirrolidina.

¹²³ D. Suk, D. Rejman, C. Dykstra, R. Pohl, K. Pankiewicz, S. Patterson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2007**, *17*, 2811-2816.

¹²⁴ W. Huebsch, P. Nell, F. Suessmeier, A. Vakalopoulos, D. Meibom, B. Albrecht-Kuepper, K. Zimmermann, WO 2,009,100,827 A1. CAN 151: 288977.

¹²⁵ H. Huang, C. Wong, *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 3100-3106.

¹²⁶ Y. Kang, K. Shin, K. Yoo, K. Seo, S. Park, D. Kim, S. Park, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*, 2385-2390.

¹²⁷ Y. Lee, J. Lee, S. Jung, E. Woo, D. Sik, S. Seo, H. Park, *Antibiot.*, **1994**, *47*, 609-612.

Introducción

A continuación se presentan algunos ejemplos de las distintas aplicaciones de estos compuestos en la síntesis de fármacos.

El anillo de (3*R*,4*R*)-dihidroxipirrolidina forma parte de la estructura de un potente nucleótido para el tratamiento de la *Giardiasis* (causada por el protozoo *Giardia*).¹²³ Este protozoo es muy infeccioso y está muy bien adaptado para la supervivencia y diseminación en medios acuáticos. Anualmente, se estiman 2,5 millones de casos de *Giardiasis* en todo el mundo. En la figura III.2 se muestra el nucleótido.

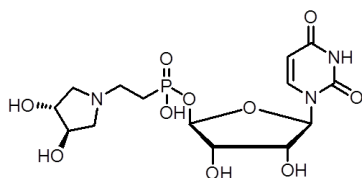
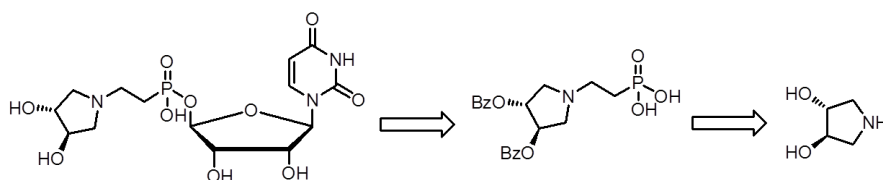


Figura III.2: Agente nucleotido anti-*Giardia*

Este nucleótido se obtiene a partir de la *trans*-(3*R*,4*R*)-dihidroxipirrolidina como se puede observar en el siguiente análisis retrosintético.



Esquema III.1: Análisis retrosintético para la síntesis del agente nucleótido anti-*Giardia*.

También se han encontrado una serie de fármacos, que se presentan como inhibidores de la VIH proteasa.^{128,129} Un ejemplo de ellos es la sulfonamida que se muestra en la figura III.3.

¹²⁸ A. Blum, J. Böttcher, A. Heine, G. Klebe, W. E. Diederich, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2078-2087.

¹²⁹ J. Böttcher, A. Blum, S. Dörr, A. Heine, W. E. Diederich, G. Klebe, *Chem. Med. Chem.* **2008**, *3*, 1337-1344.

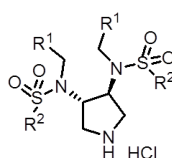
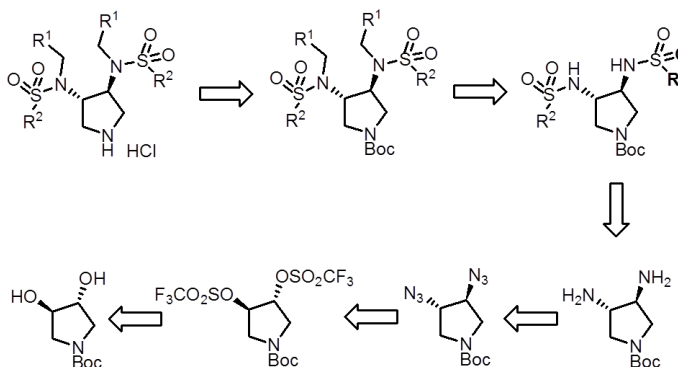


Figura III.3: Inhibidor de la VIH proteasa.

Para la obtención de este heterociclo se parte la *trans*-(3*R*,4*R*)-dihidroxipirrolidina.



Esquema III.2: Análisis retrosintético de la síntesis de las dihidroxipirrolidinas como inhibidores de la VIH proteasa.

Por otro lado, los carbapenems son potentes antibióticos β -lactámicos, que presentan un amplio espectro de actividad antibacteriana. La dihidroxipirrolidina forma parte de la estructura de una nueva serie de 1 β -metilcarbapenems. Se ha estudiado la actividad del fármaco sustituido tanto con el enantiómero *trans*-(*R,R*) como con el *trans*-(*S,S*) de la pirrolidina.¹²⁶

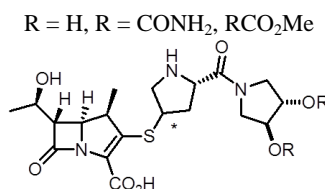
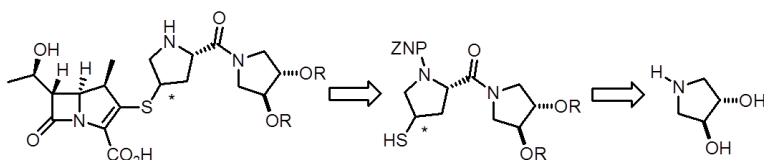


Figura III.4: Estructura 1 β -carbapenems.

Al igual que para los ejemplos anteriores, la síntesis de estos antibióticos parte de la dihidroxipirrolidina como queda ilustrado en el siguiente análisis retrosintético.

Introducción



Esquema III.3: Análisis retrosintético para este tipo de antibióticos.

Además, son numerosos los fármacos, en los que aparece la estructura de 3,4-dihidroxipirrolidina, que presentan actividad como inhibidores de glicosidasas, y por tanto con un gran potencial para el tratamiento de diferentes enfermedades como la diabetes tipo II y diferentes infecciones, tanto virales como bacterianas. Se han encontrado recientemente distintos inhibidores de glicosidasa que actúan contra enfermedades como son el SIDA y el cáncer. Simplemente, la *cis*-dihidroxipirrolidina es, aunque débilmente, inhibidor de un buen número de glicosidasas.¹³⁰

Los derivados *trans*-(3*S*,4*S*) *N*-protegidos de la dihidroxipirrolidina que se muestran en la figura III.5 son buenos inhibidores de la α -D-glucosidasa.

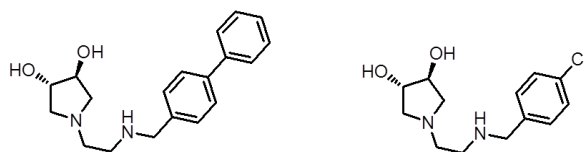


Figura III.5: Inhibidores de la α -D-glucosidasa.

Otro potente inhibidor de la α -D-glucosidasa es la lentiginosina.^{131,132,133} Son varios los métodos sintéticos que se encuentran descritos en la bibliografía para la síntesis de este fármaco. En su estructura se puede apreciar el anillo correspondiente a la dihidroxipirrolidina. En una de las posibles rutas sintéticas de este compuesto se parte de la *trans*-(3*S*,4*S*)-dihidroxipirrolidina para la síntesis del mismo.

¹³⁰ F. Popowycz, S. Gerber-Lemaire, R. Demange, E. Rodriguez-Garcia, A. T. C. Asenjo, I. Robina, P. Vogel, *Bioorg. Med. Chem Lett*. **2001**, *11*, 2489-2493.

¹³¹ M. Alam, Y. Vankar, *Tetrahedron Lett*. **2008**, *49*, 5534-5536.

¹³² R. Lysek, P. Vogel, *Helv. Chim.* **2004**, *87*, 3167-3181.

¹³³ F. Cardona, A. Goti, S. Picasso, P. Vogel, A. Brandi, *J. Carbohydr. Chem.* **2000**, *19*, 585-601.

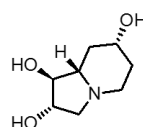
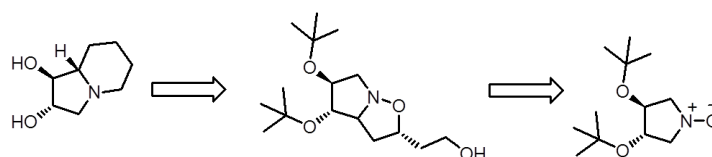


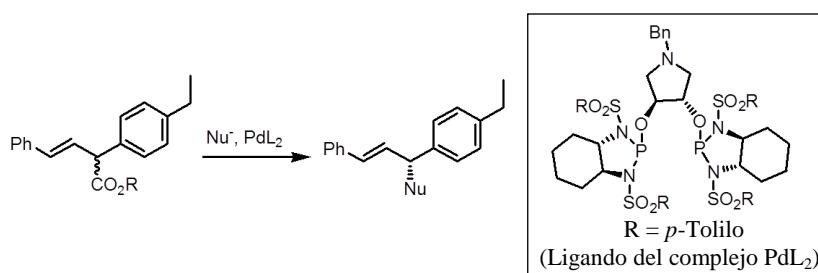
Figura III.6: (+)-lentiginosina.



Esquema III.4: Análisis retrosintético para la síntesis de la (+)-lentiginosina.

La versatilidad de las dihidroxipirrolidinas no solo se reduce a su utilización en la síntesis de fármacos, sino que también es importante en la síntesis de compuestos orgánicos quirales, ya que se pueden usar como auxiliares para la obtención de productos enantiopuros.

El siguiente ejemplo es una muestra de la utilización de derivados de dihidroxipirrolidinas como auxiliares quirales en la alquilación alílica asimétrica.¹³⁴ El esquema III.5 muestra la reacción en la que se usa un complejo de paladio para inducir la quiralidad al producto final.



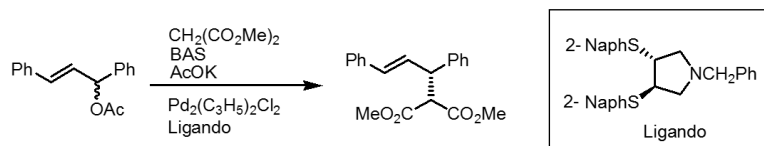
Esquema III.5: Alquilación alílica quiral catalizada el por complejo de Paladio PdL₂.

Una variante de la reacción anterior es la que se puede ver en el esquema III.6, donde el ligando responsable de inducir la quiralidad no está unido al paladio directamente al inicio de la reacción, sino que se adiciona como un reactivo más. Este ligando se sintetiza partiendo de la *trans*-(3*S*,4*S*)-dihidroxipirrolidina.¹³⁵

¹³⁴ C. Market, P. Rösel, A. Pfaltz, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3234-3235.

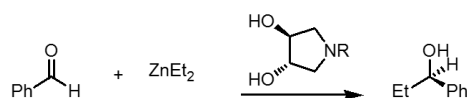
¹³⁵ R. Siedlecka, E. Wjaczynska, J. Skarzewski, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1437-1444.

Introducción



Esquema III.6: Alquilación alílica asimétrica catalizada por Pd.

Tanto la *trans*-(3*S*,4*S*)-dihidroxipirrolidina como la *trans*-(3*R*,4*R*)-dihidroxipirrolidina se han usado como auxiliares quirales en reacciones de adición asimétrica. Por ejemplo, en la adición asimétrica al benzaldehído se emplea como auxiliar quiral la *trans*-(3*S*,4*S*)-dihidroxipirrolidina protegida con 1-metilnaftilo.¹³⁶



Esquema III.7: Alquilación asimétrica con auxiliar quiral dihidroxipirrolidinico donde R = 1-metilnaftilo.

Esta introducción muestra la gran versatilidad de las *trans*-3,4-dihidroxipirrolidinas como precursores en la síntesis de una extensa variedad de productos farmacéuticos y su utilidad como auxiliares quirales en síntesis asimétrica, por ello en este capítulo se propone como objetivo la resolución de estos compuestos mediante métodos biocatalíticos.

¹³⁶ R. Gonsalves, E. S. Serra, D. Murtinho, V. F. Silva, M. Beja, J.A. Paixao, M. R. Silva, A. da Veiga, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2003**, *195*, 1-9.

ANTECEDENTES

La protección regioselectiva de compuestos polihidroxiados basada en reacciones convencionales presenta muchas dificultades. Estos inconvenientes pueden ser resueltos de forma efectiva gracias al uso de biocatalizadores. La acilación e hidrólisis regioselectivas catalizadas por lipasas y proteasas en disolventes orgánicos han sido utilizadas tanto en carbohidratos^{137,138,139} como en otros compuestos polihidroxiados naturales.^{140,141,142} Estos procesos simplifican el número de pasos necesarios, debido a la regioselectividad de los procesos enzimáticos. Además de la elevada regioselectividad, los procesos enzimáticos han mostrado una elevada enantioselectividad en algunos casos.¹⁴³

Como se ha visto en la introducción, las dihidroxipirrolidinas ópticamente puras se emplean como precursores de una gran variedad de compuestos orgánicos, por lo que es importante elaborar métodos de síntesis para la obtención de estos heterociclos. En especial la preparación selectiva de los enantiómeros del isómero *trans*, por sus aplicaciones en la preparación de fármacos enantiopuros o bien como ligandos quirales en síntesis asimétrica.

En el presente trabajo de investigación, se desarrollará un procedimiento quimioenzimático para conseguir los dos enantiómeros de la *trans*-3,4-dihidroxipirrolidina.

¹³⁷ H. J. M. Gijzen, L. Qiao, W. Fitz, C. H. Wong, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 443-373.

¹³⁸ A. Fernandez-Mayoralas, *Top. Curr. Chem.* **1997**, *186*, 1-20.

¹³⁹ B. G. Davis, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2000**, 2137-2160.

¹⁴⁰ H. Waldmann, D. Sebastian, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 911-937.

¹⁴¹ M. Ferrero, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 4319-4347.

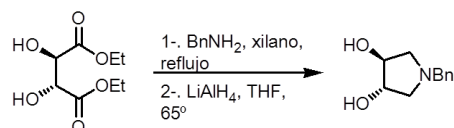
¹⁴² D. Kadereit, H. Waldmann, *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3367-3396.

¹⁴³ L. Solares, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 3284-3291.

Antecedentes

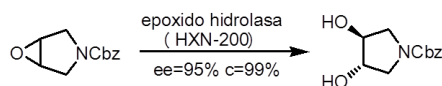
A continuación se muestra un breve resumen de los métodos encontrados en la bibliografía para la obtención de las dihidroxipirrolidinas ópticamente puras.

Generalmente la síntesis de la *trans*-dihidroxipirrolidina se realiza a partir del ácido L-(+)-tartárico como producto de partida, tal y como se muestra en el siguiente ejemplo (esquema III.8).^{125,130,131,133,139,144}



Esquema III.8: Reacción de obtención de la *trans*-(±)-(3*S*,4*S*)-dihidroxipirrolidina a partir del ácido L-(+)-tartárico.

Los métodos biocatalíticos también se han empleado en la preparación de estos compuestos. Se han utilizado una serie de epóxido hidrolasas^{145,146} que catalizan la apertura del epóxido que se muestra en el esquema III.9.



Esquema III.9: Reacción con epóxido hidrolasa.

La hidrólisis asimétrica que realizan estas epóxido hidrolasas permiten obtener uno solo de los dos enantiómeros, concretamente la *trans*-(3*R*,4*R*)-dihidroxipirrolidina N-protegida con un exceso enantiomérico del 95% y una conversión del 98%.

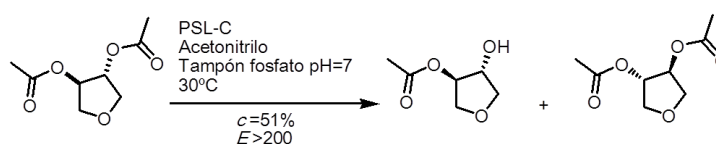
Como antecedentes de la metodología que se empleará en la resolución de las *trans*-dihidroxipirrolidinas cabe mencionar las resoluciones de algunos compuestos de estructura análoga que se han llevado a cabo en el grupo de Bioorgánica de la Universidad de Oviedo. Así por ejemplo se ha resuelto el *trans*-(±)-3,4-diacetoxitetrahydrofurano.¹⁴⁷

¹⁴⁴ J. Skarzewski, A. Gupta, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, 8, 1861-1867.

¹⁴⁵ L. Zhao, B. Han, M. Miller, H. Huang, D. S. Malashock, Z. Zhu, A. Milan, D. E. Robertson, D. P. Weiner, M. J. Burk, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 11156-11157.

¹⁴⁶ D. Chang, M. F. Heringa, B. Witholt, Z. Li, *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 8599-8606.

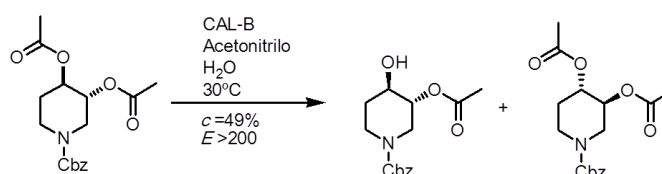
¹⁴⁷ V. Recuero, R. Brieva, V. Gotor *Tetrahedron: Asymmetry*, **2008**, 19, 1684-1688.



Esquema III.10: Hidrólisis enzimática de la *trans*-(±)-3,4-diacetoxitetrahidrofurano.

La hidrólisis con PSL-C muestra una alta enantioselectividad, lo que permite obtener el compuesto monoacetilado con un exceso enantiomérico mayor del 95%, mientras que el sustrato remanente se aísla con un exceso enantiomérico de más del 99%.

Otros compuestos estructuralmente semejantes a las dihidroxipirrolidinas son las piperidinas dihidroxiladas. La hidrólisis enzimática de la *trans*-(±)-3,4-diacetoxipiperidina *N*-protegida se ilustra en el siguiente esquema.¹⁴³



Esquema III.11: Hidrólisis enzimática de la *trans*-(±)-(3,4)-diacetoxipiperidina *N*-protegida.

En esta hidrólisis catalizada con CAL-B se hidroliza un solo grupo acetilo obteniéndose un exceso enantiomérico para el producto mayor del 99%, mientras que el sustrato no reactivo se aísla con un exceso enantiomérico del 97%. Además, la reacción muestra una alta regioselectividad, obteniéndose exclusivamente la hidrólisis en la posición 4.

Teniendo en cuenta el interés de las dihidroxipirrolidinas y el reducido número de rutas sintéticas para la obtención de estos compuestos de forma enantiopura, es evidente el interés que puede tener la puesta a punto de un método enzimático para la preparación de estos compuestos heterociclos.

OBJETIVOS

En todo lo comentado anteriormente se ha puesto de manifiesto la importancia de los derivados 3,4-dihidroxipirrolidínicos en la síntesis de muy diversos productos farmacéuticos, además de ser importantes auxiliares quirales en catálisis asimétrica.

El objetivo de este capítulo es la síntesis y resolución enzimática de trans-3,4-dihidroxipirrolidinas mediante procesos de acilación enzimática o hidrólisis de sus derivados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

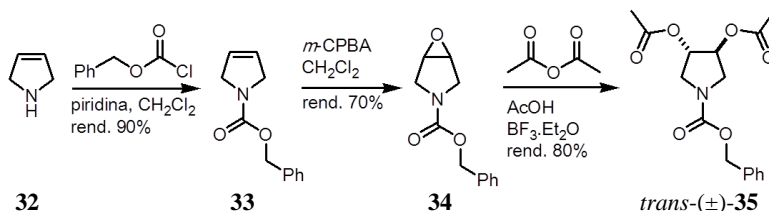
Teniendo en cuenta la utilidad de los procesos biocatalíticos en la resolución de compuestos heterocíclicos hidroxilados mostrados en los antecedentes, así como lo expuesto sobre el interés de las *trans*-3,4-dihidroxipirrolidinas, se propone llevar a cabo su síntesis y resolución mediante los procesos quimioenzimáticos que se describen a continuación.

En general se han estudiado procesos enzimáticos de acilación de los grupos hidroxilo y procesos de hidrólisis de derivados acilados de los mismos.

Resultados y discusión

III.1 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE LA *TRANS*-(±)-3,4-DIACETOXI-1-BENCILOXICARBONILPIRROLIDINA

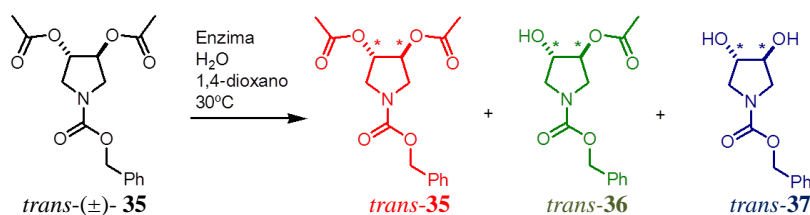
El primer proceso estudiado fue la resolución del derivado diacetilado de la *trans*-(±)-3,4-dihidroxipirrolidina, *trans*-(±)-**35**, mediante hidrólisis enzimática. Este sustrato se puede preparar con elevado rendimiento a partir de la 3-pirrolina **32** mediante el proceso que se describe en el esquema III.12.



Esquema III.12: Síntesis de *trans*-(±)-35.

En primer lugar se protege el grupo amino de la 3-pirrolina **32** mediante una reacción con cloroformiato de bencilo. Una vez protegido el grupo amino se procede a la oxidación del doble enlace con ácido *meta*-cloroperbenzóico para obtener el epóxido **34**. La apertura de **34** con anhídrido acético proporciona el derivado diacetilado *trans*-(±)-**35** que será utilizado como sustrato en los procesos enzimáticos. En todos los procesos se obtuvieron rendimientos elevados.

Una vez obtenido el derivado diacetilado *trans*-(±)-**35** de la dihidroxipirrolidina se comenzó la búsqueda del biocatalizador más adecuado para llevar a cabo la hidrólisis. Por similitud con los heterociclos presentados en los antecedentes, en primer lugar se realizó la hidrólisis en disolvente orgánico (1,4-dioxano) y una pequeña cantidad de agua destilada (5 equivalentes). Se probaron distintas lipasas (CAL-A, CAL-B, PSL-C y PSL-D), como se muestra en el esquema III.13. Todos los procesos se realizaron a 30°C.



Esquema III.13: Hidrólisis enzimática de *trans*-(±)-35.

Tabla III.1: Hidrólisis enzimática del *trans*-(±)-**35** a 30°C, 5 equivalentes de agua y en 1,4-dioxano.

Entrada	enzima	t reacción (h)	%ee ^a	% ^b	%ee ^a	% ^b	%ee ^a	% ^b	c ^c (%)	E
			<i>trans</i> - 35	<i>trans</i> - 35	<i>trans</i> - 36	<i>trans</i> - 36	<i>trans</i> - 37	<i>trans</i> - 37		
1	CAL-A	64,75	7	-	>99	-	-	-	7	>200
2	CAL-B	25,5	12	90	>99	7	>99	4	-	-
3	PSL-C	168	-	-	-	-	-	-	-	-
4	PSL-D	168	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Proporción de producto en el medio de reacción, determinados por CG. ^c Conversión, $c=[ee_s/(ee_s+ee_p)]$.

En los datos recogidos en la tabla III.1 se observa que la CAL-A hidroliza el sustrato *trans*-(±)-**35** obteniéndose el compuesto (3*S*,4*S*)-**36** enantiopuro, pero con una conversión muy baja.

Para la CAL-B la reacción de hidrólisis es bien distinta puesto que, además de obtenerse el compuesto (3*R*,4*R*)-**36** (producto de la hidrólisis de un solo grupo acetilo) se obtiene también el producto (3*R*,4*R*)-**37** (debido a la hidrólisis del segundo grupo acetilo).

Debido a esta hidrólisis secuencial y a la formación de los dos productos finales, además del sustrato remanente, no es posible calcular la conversión ni la razón enantiomérica utilizando las fórmulas habituales. Por este motivo la tabla muestra el tanto por ciento de cada uno de los dos productos y del sustrato remanente en el medio de reacción, calculados mediante cromatografía de gases.

A pesar de que tanto el proceso catalizado por CAL-A como el catalizado por CAL-B muestran bajas conversiones, es interesante observar la elevada enantioselectividad en ambos casos.

Otro dato interesante obtenido de estas reacciones es que ambos enzimas muestran opuesta preferencia estereoquímica, es decir, mientras que la CAL-A es selectiva hacia el enantiómero (3*S*,4*S*), la CAL-B lo es hacia el (3*R*,4*R*); la determinación de la configuración de los productos se muestra más adelante (apartado III.5, página 186).

En lo que respecta a la PSL-C y PSL-D, no catalizan la reacción de hidrólisis en estas condiciones.

Los resultados obtenidos con las lipasas CAL-A y CAL-B son interesantes aunque poco útiles desde el punto de vista práctico dada la baja conversión de la reacción. Para incrementar la velocidad de estos procesos, se decidió aumentar la cantidad de agua adicionada al medio de reacción, manteniendo el resto de variables inalteradas, y se realizó un seguimiento del transcurso de las reacciones. Los resultados obtenidos con cada uno de los biocatalizadores se recogen en las tablas III.2 y III.3.

Resultados y discusión

Tabla III.2: Hidrólisis enzimática del *trans*-(±)-**35** a 30°C, 10 equivalentes de agua y en 1,4-dioxano.

Entrada	enzima	t reacción (días)	%ee ^a	% ^b	%ee ^a	% ^b	%ee ^a	% ^b	c ^c (%)	E
			<i>trans</i> - 35	<i>trans</i> - 35	<i>trans</i> - 36	<i>trans</i> - 36	<i>trans</i> - 37	<i>trans</i> - 37		
1	CAL-A	3	6	-	>99	-	-	-	6	>200
2	CAL-A	4,6	9	-	>99	-	-	-	9	>200
3	CAL-A	6,6	11	-	>99	-	-	-	10	>200
4	CAL-A	12	23	-	>99	-	-	-	19	>200
5	CAL-A	20	38	69	79	28	>99	3	-	-
6	CAL-A	24	42	62	68	32	>99	6	-	-

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Proporción de producto en el medio de reacción, determinados por CG. ^c Conversión, $c=[ee_s/(ee_s+ee_p)]$.

La tabla III.2 muestra como mediante la hidrólisis con CAL-A utilizando 10 equivalentes de agua se puede obtener el producto monohidrolizado (*3S,4S*)-**36** con un buen exceso enantiomérico, pero con una baja conversión, 19% después de 12 días de reacción. A partir de los 20 días disminuye el exceso enantiomérico del (*3S,4S*)-**36** y se detecta una pequeña cantidad del producto dihidrolizado (*3S,4S*)-**37**.

De la misma manera, en la hidrólisis catalizada por CAL-B se obtuvieron los resultados recogidos en la tabla III.3.

Tabla III.3: Hidrólisis enzimática del *trans*-(±)-**35** a 30°C, 10 equivalentes de agua y en 1,4-dioxano.

Entrada	enzima	t reacción (días)	%ee ^a	% ^b	%ee ^a	% ^b	%ee ^a	% ^b	c ^c (%)	E
			<i>trans</i> - 35	<i>trans</i> - 35	<i>trans</i> - 36	<i>trans</i> - 36	<i>trans</i> - 37	<i>trans</i> - 37		
1	CAL-B	3	13	-	>99	-	-	-	12	>200
2	CAL-B	4,6	20	-	>99	-	-	-	17	>200
3	CAL-B	6,6	29	83	>99	8	>99	8	-	-
4	CAL-B	12	48	53	>99	6	>99	23	-	-
5	CAL-B	20	73	63	>99	4	>99	33	-	-

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Proporción de producto en el medio de reacción, determinados por CG. ^c Conversión, $c=[ee_s/(ee_s+ee_p)]$.

En lo que se refiere a la reacción de hidrólisis con CAL-B, al comienzo de la reacción se forma el producto monohidrolizado (*3R,4R*)-**36** con alta enantioselectividad hasta alcanzar una conversión del 17% en cuatro días y medio de reacción. A partir de los 6 días de reacción ya se detecta el producto dihidrolizado (*3R,4R*)-**37** y tras 20 días de reacción se obtiene un 33% de este compuesto. La enantioselectividad de la reacción es muy elevada manteniéndose la preferencia estereoquímica del enzima hacia el enantiómero (*3R,4R*), ambos productos de reacción muestran, en todo momento, un exceso enantiomérico mayor del 99%.

Con el objeto de disminuir el tiempo de reacción se aumentó la cantidad de agua que se adiciona al medio de reacción, utilizando en este caso una proporción 1,4-dioxano/agua 2:1. Sin embargo, los resultados no fueron los esperados ya que no solo no se disminuye el tiempo de reacción sino que aumenta considerablemente, tanto para la CAL-A como para la CAL-B.

En vista de estos resultados, se decidió aumentar la proporción de enzima manteniendo la cantidad de agua en 5 equivalentes. Dicha proporción fue 2:1 en peso respecto a la cantidad de sustrato inicial.

Tabla III.4: Hidrólisis enzimática del *trans*-(±)-**35** a 30°C, 5 equivalentes de agua, en 1,4-dioxano.

Entrada	enz./S (2:1)	t reacción (días)	%ee ^a <i>trans</i> - 35	% ^b <i>trans</i> - 35	%ee ^a <i>trans</i> - 36	% ^b <i>trans</i> - 36	%ee ^a <i>trans</i> - 37	% ^b <i>trans</i> - 37	c ^c (%)	E
1	CAL-A	2	11	-	85	-	-	-	11	14
2	CAL-A	5	28	-	81	-	-	-	25	12
3	CAL-A	6	33	71	76	27	>99	2	-	-
4	CAL-A	11	53	63	79	33	>99	4	-	-
5	CAL-A	15	67	53	61	39	>99	8	-	-
6	CAL-A	19	71	47	49	43	>99	10	-	-
7	CAL-B	2	38	71	>99	9	>99	20	-	-
8	CAL-B	5	79	56	>99	5	>99	40	-	-
9	CAL-B	7	85	52	>99	4	91	46	-	-
10	CAL-B	11	99	45	>99	2	92	55	-	-

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Proporción de producto en el medio de reacción, determinados por CG. ^c Conversión, $c=[ee_s/(ee_s+ee_p)]$.

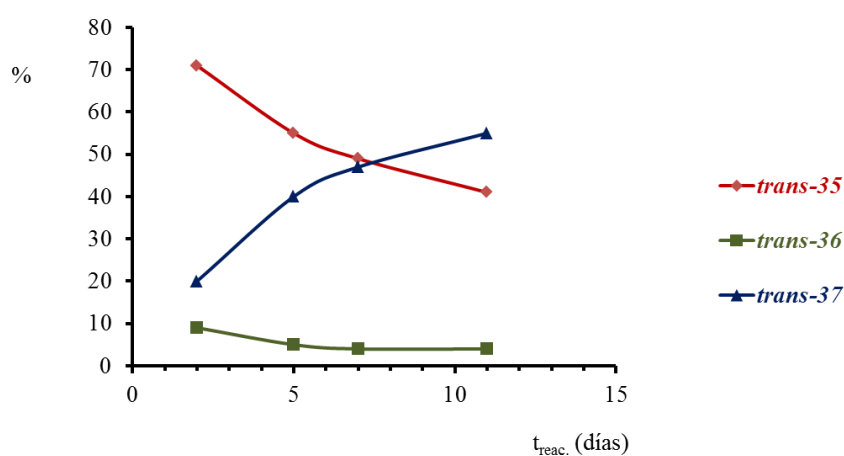
La adición de mayor cantidad de enzima reduce el tiempo de reacción drásticamente en comparación con los resultados de los experimentos realizados anteriormente.

Como se puede ver en la tabla III.4 la hidrólisis con CAL-A es más lenta que la reacción con CAL-B, a partir de los 5 días se observa mezclas de los productos mono y dihidrolizados; siendo este último minoritario. La enantioselectividad del proceso de hidrólisis secuencial es muy elevada, pudiéndose obtener el compuesto (*3S,4S*)-**37** con un exceso enantiomérico mayor del 99%.

La reacción con CAL-B es más rápida y muestra una elevada enantioselectividad en ambos procesos de hidrólisis, obteniéndose tanto el producto (*3R,4R*)-**36** como el (*3R,4R*)-**37** con un exceso enantiomérico mayor del 99%. La concentración del primer producto de hidrólisis (*3R,4R*)-**36** se mantiene muy baja durante todo el proceso.

Resultados y discusión

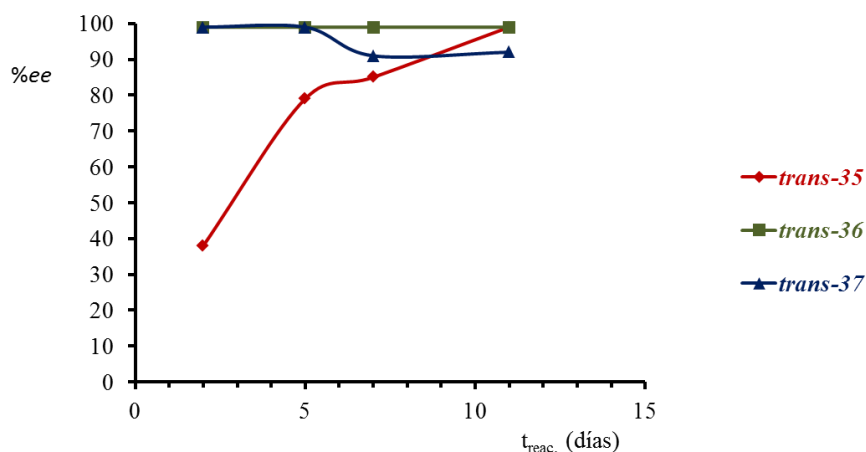
Para visualizar con más claridad cómo evoluciona la reacción de hidrólisis con CAL-B (valores recogidos en la tabla III.4, de la entrada 7 a la 10), en la gráfica III.1, se representa la variación de la concentración de cada compuesto frente al tiempo.



Gráfica III.1: Representación de la cantidad de compuesto en el medio de reacción (%) frente al t_{reacc} (días) para la hidrólisis enzimática del *trans*-(±)-**35** con CAL-B a 30°C, 5 equivalentes de agua y en 1,4-dioxano.

Se observa cómo va disminuyendo la concentración del sustrato *trans*-(±)-**35** a la vez que aumenta la cantidad de producto final (*3R,4R*)-**37**. Por otra parte, la cantidad de producto monohidrolizado (*3R,4R*)-**36** es más o menos constante a lo largo del tiempo.

En la gráfica III.2, se representa la variación del exceso enantiomérico de cada compuesto frente al tiempo.



Gráfica III.2: Representación del % *ee* frente al t_{reacc} (días) para la hidrólisis enzimática del *trans*-(±)-**35** con CAL-B a 30°C, 5 equivalentes de agua y en 1,4-dioxano.

El exceso enantiomérico del sustrato (*3S,4S*)-**35** aumenta a medida que avanza la reacción. El exceso enantiomérico del producto dihidrolizado (*3R,4R*)-**37** se mantiene por enzima del 99% hasta los 5 días de reacción y después comienza a disminuir lentamente. Además, la pequeña cantidad de producto monohidrolizado (*3R,4R*)-**36** se mantiene enantiopuro durante todo el tiempo de reacción.

Con la ayuda de las dos gráficas se puede determinar con más facilidad cuál es el tiempo de reacción óptimo para obtener un elevado exceso enantiomérico en el producto o en el sustrato remanente.

Con el objetivo de optimizar los resultados obtenidos tanto para la reacción de hidrólisis con CAL-A como para la reacción de hidrólisis con CAL-B, se hizo un estudio del efecto del disolvente en estos procesos, probándose los disolventes orgánicos usados más frecuentemente en procesos biocatalíticos. Para cada disolvente se muestran los resultados obtenidos al analizar alícuotas tomadas a diferentes tiempos de reacción (5.5 y 13 días de reacción). Los resultados se recogen en la tabla III.5.

Resultados y discusión

Tabla III.5: Hidrólisis enzimática del *trans*-(±)-**35** a 30°C, 5 equivalentes de agua.

En	enz./S (2:1)	disolv.	<i>t</i> reac. (días)	%ee ^a		% ^b		%ee ^a		% ^b		<i>c</i> ^c (%)	<i>E</i>
				<i>trans</i> - 35	<i>trans</i> - 35	<i>trans</i> - 36	<i>trans</i> - 36	<i>trans</i> - 37	<i>trans</i> - 37				
1	CAL-A	tolueno	5,5	87	64	18	29	>99	7	-	-	-	-
2	CAL-A	tolueno	13	90	55	33	37	61	8	-	-	-	-
3	CAL-A	MeCN	5,5	26	-	>99	-	-	-	21	>200	-	-
4	CAL-A	MeCN	13	42	66	62	23	>99	11	-	-	-	-
5	CAL-A	^t BuOMe	5,5	72	7	36	37	41	55	-	-	-	-
6	CAL-A	^t BuOMe	13	-	-	23	17	5	83	82	1	-	-
7	CAL-A	THF	5,5	10	-	>99	-	-	-	9	>200	-	-
8	CAL-A	THF	13	30	71	71	25	>99	4	-	8	-	-
21	CAL-B	tolueno	5,5	3	>99	-	-	-	-	-	-	-	-
23	CAL-B	tolueno	13	1	>99	-	-	-	-	-	-	-	-
25	CAL-B	MeCN	5,5	53	72	>99	7	>99	19	-	-	-	-
27	CAL-B	MeCN	13	84	54	>99	6	85	40	-	-	-	-
29	CAL-B	^t BuOMe	5,5	72	7	36	37	41	55	-	-	-	-
30	CAL-B	^t BuOMe	13	85	12	6	10	7	78	-	-	-	-
32	CAL-B	THF	5,5	57	69	>99	2	>99	30	-	-	-	-
35	CAL-B	THF	13	92	53	>99	2	91	46	-	-	-	-

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Proporción de producto en el medio de reacción, determinados por CG. ^c Conversión, $c = [ee_s / (ee_s + ee_p)]$.

De los resultados obtenidos se pueden obtener las siguientes conclusiones:

En general los procesos catalizados por CAL-A son más lentos y menos selectivos que los catalizados por CAL-B. No obstante, si se lleva a cabo la hidrólisis enzimática en *tert*-butil metil éter o en tolueno la reacción es más rápida. Aunque con baja o moderada enantioselectividad.

Cabe destacar el resultado que se muestra en la entrada 3, donde se puede obtener el producto (3*S*,4*S*)-**36** enantiopuro al realizar la hidrólisis enzimática en acetonitrilo obteniéndose, en este caso, una conversión del 21%. Este método proporciona el producto monoacetilado enantiopuro exclusivamente.

En cuanto a las reacciones catalizadas por CAL-B, no se consiguieron mejorar los resultados obtenidos en 1,4-dioxano. El tetrahidrofurano puede ser un disolvente adecuado para la CAL-B en este proceso, aunque la hidrólisis es algo más lenta que con el 1,4-dioxano.

A continuación, se estudio el efecto del aumento de la temperatura a 50°C en la reacción de hidrólisis catalizada por CAL-B en las condiciones que mejores resultados dieron en las pruebas anteriores. Los resultados recopilados de estas pruebas se recogen en la siguiente tabla.

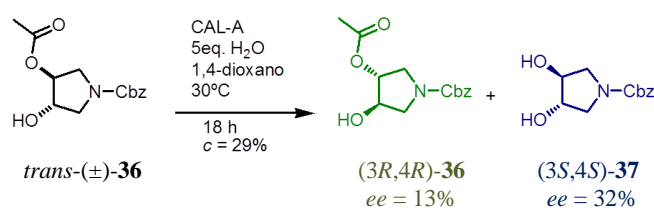
Tabla III.6: Hidrólisis enzimática del *trans*-(±)-**35** a 50°C, 5 equivalentes de agua y en 1,4-dioxano.

Entrada	enz./S (2:1)	t reacción (días)	%ee ^a	% ^b	%ee ^a	% ^b	%ee ^a	% ^b	c ^c (%)	E
			<i>trans</i> - 35	<i>trans</i> - 35	<i>trans</i> - 36	<i>trans</i> - 36	<i>trans</i> - 37	<i>trans</i> - 37		
1	CAL-B	1	87	55	>99	5	92	40	-	-
2	CAL-B	2	98	49	74	6	87	45	-	-
3	CAL-B	5	>99	39	58	8	62	53	-	-

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Proporción de producto en el medio de reacción, determinados por CG. ^c Conversión, $c = [ee_s / (ee_s + ee_p)]$.

En estas condiciones de hidrólisis con CAL-B a 50°C son las mejores si el objetivo de la resolución es la preparación del sustrato remanente (*3S,4S*)-**35**. El aumento de la temperatura permite obtener en unos 5 días un 40% del sustrato (*3S,4S*)-**35** enantiopuro y en 2 días se consigue un 49% del mismo, con un exceso enantiomérico del 98%.

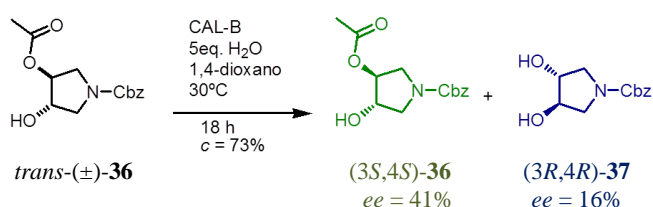
Con el fin de profundizar en el conocimiento de la enantioselectividad de cada una de las reacciones de hidrólisis consecutivas se realizó la hidrólisis enzimática del compuesto monoacetilado racémico *trans*-(±)-**36** empleando tanto CAL-A como CAL-B. Se utilizaron las mejores condiciones encontradas para cada enzima. Los resultados obtenidos quedan recogidos en los esquemas III.14 y III.15.



Esquema III.14: Hidrólisis enzimática de la *trans*-(±)-**36** con CAL-A.

Como se observa, en la hidrólisis enzimática del compuesto monoacetilado *trans*-(±)-**36** con CAL-A es rápida y muestra una baja enantioselectividad ($E = 2$), por lo que se puede concluir que en el proceso secuencial de hidrólisis del derivado diacetilado *trans*-(±)-**35** con CAL-A es la primera de ellas el paso lento y enantioselectivo, dando lugar al producto de hidrólisis (*3S,4S*)-**36**.

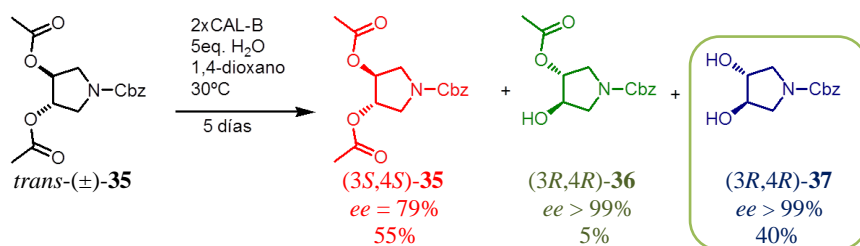
Resultados y discusión



Esquema III.15: Hidrólisis enzimática de la *trans*-(±)-**36** con CAL-B.

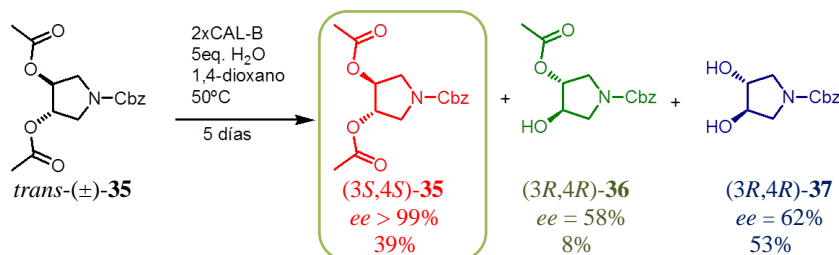
Lo mismo ocurre en el caso de la hidrólisis enzimática del compuesto monoacetilado *trans*-(±)-**36** con CAL-B. La hidrólisis del derivado monoacetilado es rápida y muestra una baja enantioselectividad ($E = 2$), por lo que se llega a la misma conclusión que en el caso anterior.

A modo de resumen se puede decir que para obtener el compuesto *(3R,4R)*-**37** de forma enantiopura las mejores condiciones se consiguen haciendo la hidrólisis enzimática con CAL-B en 1,4-dioxano, adicionando 5 equivalentes de agua y a 30°C; obteniéndose un exceso enantiomérico mayor de 99% después de 5 días de reacción con un 40% de rendimiento.



Esquema III.16: Hidrólisis enzimática de *trans*-(±)-**35** para obtener *(3R,4R)*-**37** enantiopuro.

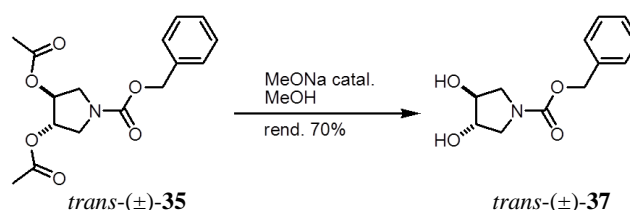
Para obtener el sustrato *(3S,4S)*-**35** enantioméricamente puro lo mejor es utilizar estas mismas condiciones aumentando la temperatura hasta los 50°C, consiguiéndose un exceso enantiomérico mayor de 99% en 5 días de reacción y con un 39% de rendimiento.



Esquema III.17: Hidrólisis enzimática de *trans*-(±)-**35** para obtener *(3S,4S)*-**35** enantiopuro.

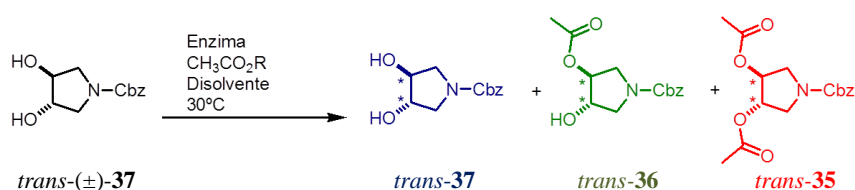
III.2 ACILACIÓN ENZIMÁTICA DE LA *TRANS*-(±)-1-BENCILOXICARBONIL-3,4-DIHIIDROXIPIRROLIDINA

En este apartado se exponen los resultados obtenidos para la reacción de acetilación enzimática que se ha realizado sobre la *trans*-(±)-3,4-dihidroxi pirrolidina *N*-protegida. En primer lugar se preparó el sustrato *trans*-(±)-**37** mediante una hidrólisis convencional del derivado diacetilado *trans*-(±)-**35** (ver esquema III.18).



Esquema III.18: Síntesis de *trans*-(±)-**37**.

Como es habitual en el estudio de cualquier proceso enzimático, en primer lugar se realizaron pruebas con distintos enzimas para determinar el biocatalizador más adecuado para la reacción de acetilación. La reacción se llevó a cabo en las condiciones que se muestra el esquema III.19.



Esquema III.19: Acetilación enzimática de *trans*-(±)-**37**.

Puesto que el 1,4-dioxano fue el disolvente que mejores resultados presentó para la hidrólisis enzimática se decidió utilizarlo para realizar este experimento. Los datos obtenidos se recogen en la tabla III.7.

Resultados y discusión

Tabla III.7: Acetilación enzimática del *trans*-(±)-**37** a 30°C, 5 equivalentes de acetato de etilo y en 1,4-dioxano.

Entrada	enzima	t reacción (días)	%ee ^a		% ^b		%ee ^a		% ^b		c ^c (%)	E
			<i>trans</i> - 37	<i>trans</i> - 37	<i>trans</i> - 36	<i>trans</i> - 36	<i>trans</i> - 35	<i>trans</i> - 35				
1	CAL-A	15	3	-	78	-	-	-	4	8		
2	CAL-B	15	3	-	4	-	-	-	47	1		
3	PSL-C	15	4	-	85	-	-	-	5	13		

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Proporción de producto en el medio de reacción, determinados por CG. ^c Conversión, $c=[ee_s/(ee_s+ee_p)]$.

Tanto la CAL-A como la PSL-C catalizan la reacción de acetilación enzimática para dar el producto de monoacetilación *trans*-**36**, pero con muy bajas conversiones y enantioselectividad. En cambio en la reacción catalizada por CAL-B se consiguen buenas conversiones, aunque la enantioselectividad también es baja. En ambas reacciones los enzimas muestran la misma enantiopreferencia que en el caso de la hidrólisis, es decir, que la lipasa CAL-A acetila preferentemente el enantiómero (3*S*,4*S*); mientras que la CAL-B acetila el (3*R*,4*R*), aunque con muy baja enantioselectividad.

Con el fin de mejorar los resultados obtenidos se estudiaron distintos parámetros que afectan a la reacción. En primer lugar se realizó la acetilación enzimática usando el acetato de etilo como agente de acilación y disolvente, los datos del experimento se recogen en la tabla III.8.

Tabla III.8: Acetilación enzimática del *trans*-(±)-**37** a 30°C en acetato de etilo.

Entrada	enzima	t reacción (días)	%ee ^a		% ^b		%ee ^a		% ^b		c ^c (%)	E ^d
			<i>trans</i> - 37	<i>trans</i> - 37	<i>trans</i> - 36	<i>trans</i> - 36	<i>trans</i> - 35	<i>trans</i> - 35				
1	CAL-A	10	38	17	2	69	72	14	-	-		
2	CAL-B	10	7	16	9	71	80	13	-	-		
3	PSL-C	10	22	-	56	-	-	-	29	4		

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Proporción de producto en el medio de reacción, determinados por CG. ^c Conversión, $c=[ee_s/(ee_s+ee_p)]$.

Las tres lipasas muestran baja enantioselectividad para este proceso. Mientras que con CAL-A y CAL-B se obtienen los dos posibles productos, el mono y el diacetilado, la PSL-C solo cataliza la reacción de monoacetilación.

En segundo lugar se usó como agente de acetilación acetato de vinilo. Los datos obtenidos de este experimento se pueden ver en la siguiente tabla.

Tabla III.9: Acetilación enzimática del *trans*-(±)-**37** a 30°C, 5 equivalentes acetato de vinilo y en 1,4-dioxano.

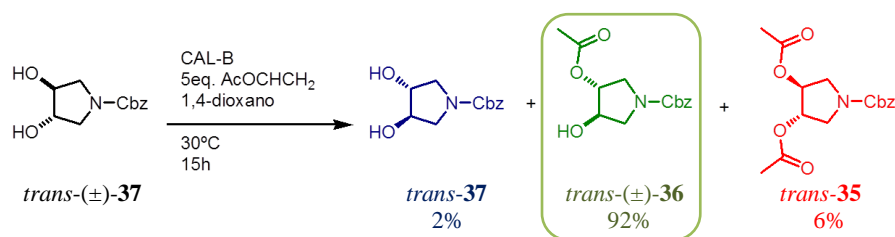
Entrada	enzima	<i>t</i> reac. (días)	%ee ^a	% ^b	%ee ^a	% ^b	%ee ^a	% ^b
			<i>trans</i> - 37	<i>trans</i> - 37	<i>trans</i> - 36	<i>trans</i> - 36	<i>trans</i> - 35	<i>trans</i> - 35
1	CAL-A	4,5	>99	19	1	52	91	29
2	CAL-B	0,5	>99	2	-	92	79	6
3	CAL-B	4,5	-	-	20	68	71	32
4	PSL-C	4,5	>99	12	13	80	47	8

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Proporción de producto en el medio de reacción, determinados por CG.

En estas condiciones se consigue disminuir el tiempo de reacción, además es posible obtener el sustrato remanente (*3R,4R*)-**37** enantiopuro con un 19% de rendimiento, en la reacción catalizada por la CAL-A.

Es interesante el resultado obtenido en la reacción catalizada por la CAL-B: tras doce horas de reacción se puede obtener un 92% del derivado monoacetilado *trans*-(±)-**36**. Aunque el proceso enzimático no es enantioselectivo, presenta una útil alternativa a los procesos químicos convencionales.

Por tanto, a modo de resumen cabe destacar que utilizando la CAL-B es posible la síntesis selectiva de la *trans*-(±)-3-acetoxi-1-benziloxycarbonil-4-hidroxipirrolidina *trans*-(±)-**35** con un 92% de rendimiento según el siguiente esquema de reacción.



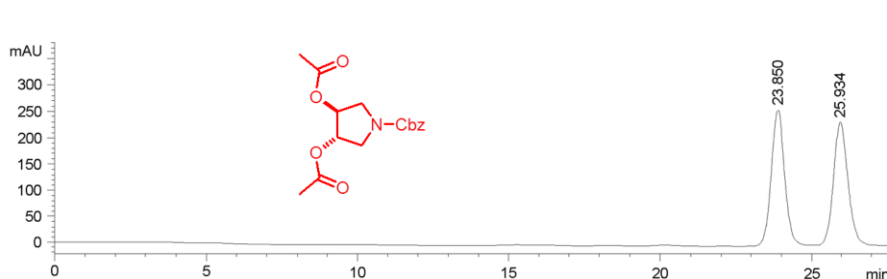
Esquema III.20: síntesis selectiva de *trans*-(±)-**36** con CAL-B.

III.3 DETERMINACIÓN DE LOS EXCESOS ENANTIOMÉRICOS

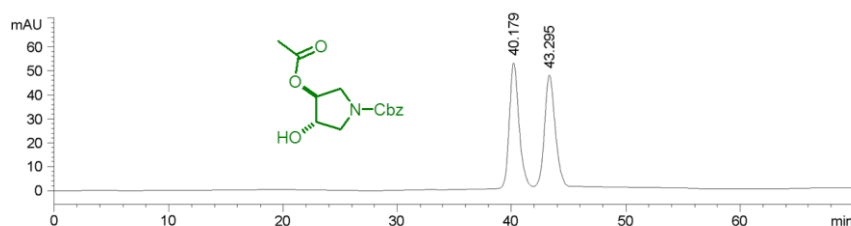
El exceso enantiomérico se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) utilizando columna de relleno quirral (Chiralpak IA, 0.46 cm de diámetro y 25 cm de longitud), a una longitud de onda de 210 nanómetros, a 20°C y como fase móvil una mezcla *n*-hexano/isopropanol 95:5 a un flujo de 0,8 mL/min. En todos los casos, la

Resultados y discusión

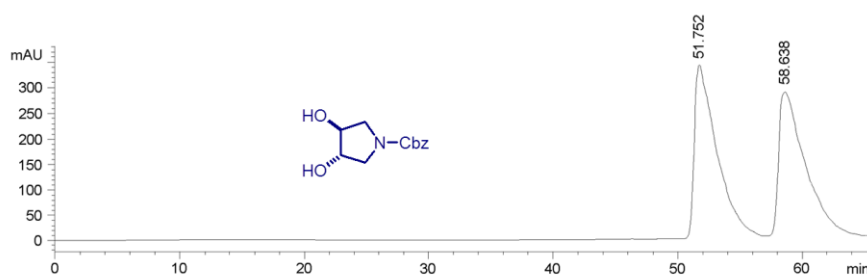
inyección de la muestra se realizó con 20 μL de una disolución del sustrato que se va a medir en la misma mezcla de elución.



Cromatograma III.3: HPLC para el sustrato *trans*-(±)-35.



Cromatograma III.2: HPLC para el producto *trans*-(±)-36.



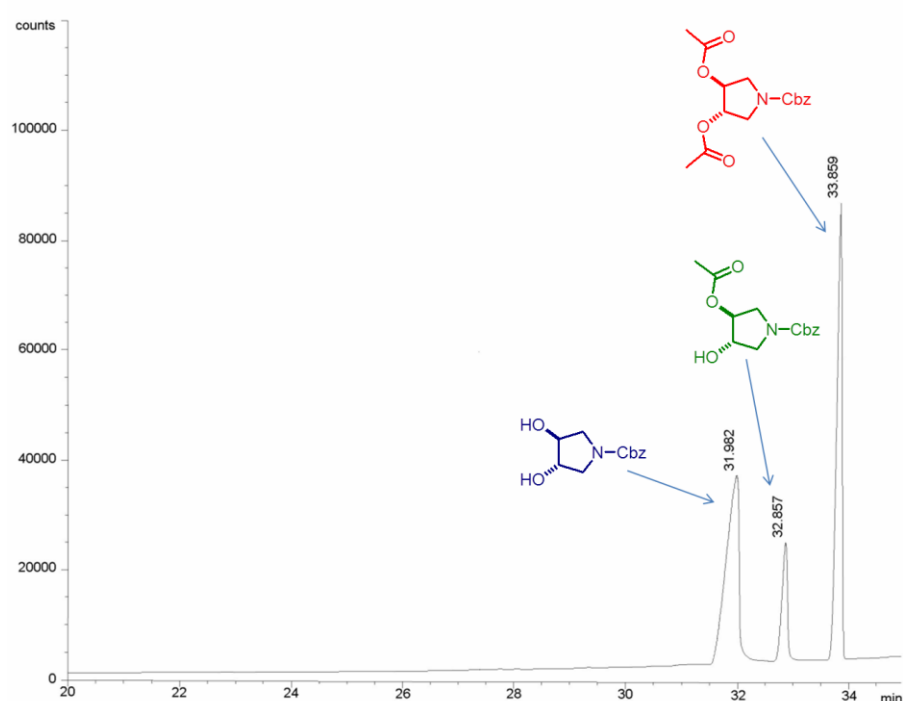
Cromatograma III.3: HPLC para el producto *trans*-(±)-37.

En estas condiciones es posible diferenciar los enantiómeros correspondientes al sustrato y los dos de cada uno de los productos.

III.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CADA COMPUESTO EN EL MEDIO DE REACCIÓN

Para la determinación de la concentración de los compuestos presentes en la reacción se utilizó la cromatografía de gases (CG) utilizando

una columna con relleno aquiral (HP-1, 30 m de longitud, 0.320 mm de diámetro interno y 0,25 μm de pared) y como programa de temperaturas se usó una temperatura inicial de 70°C durante 5 min seguido de una rampa de 5°C/min hasta una temperatura de 230°C, manteniendo esta temperatura de 230°C durante 1 min.



Cromatograma III.4: CG de la mezcla de los compuestos *trans*-(±)-**37**, *trans*-(±)-**36** y *trans*-(±)-**35**.

En estas condiciones se separaron el sustrato y productos en el mismo cromatograma. Además se determinó, mediante distintos patrones, que la respuesta del detector frente a los tres compuestos se puede considerar idéntica; de esta manera la proporción de los picos se pueden relacionar con la cantidad de cada compuesto presente en la mezcla analizada sin un error apreciable.

Resultados y discusión

III.5 ASIGNACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA

El producto (3*R*,4*R*)-1-benciloxicarbonil-3,4-dihidroxipirrolidina (3*R*,4*R*)-**37** se encuentra descrito en la bibliografía¹⁴⁴ y su rotación específica es $[\alpha]_D^{25} = +7,56$ ($c = 1,80$; CHCl_3).

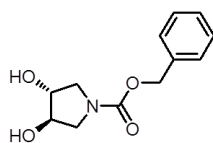
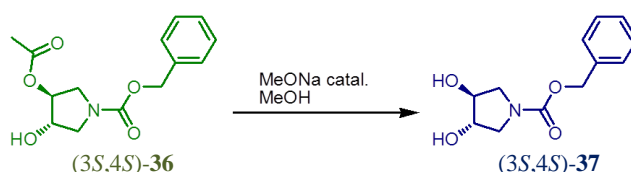


Figura III.7: (3*R*,4*R*)-1-benciloxicarbonildihidroxipirrolidina.

La rotación óptica del producto de reacción obtenido en la hidrólisis catalizada por CAL-B es del mismo signo que el descrito en la bibliografía, por lo que se pudo concluir que el producto de la hidrólisis enzimática, *trans*-**37**, tiene configuración (3*R*,4*R*). Y por tanto el sustrato *trans*-**35**, al ser el enantiómero que queda sin reaccionar posee configuración (3*S*,4*S*).

De la misma manera, se observa la rotación opuesta para el producto de hidrólisis catalizada por la CAL-A, (3*S*,4*S*)-**37**.

Para determinar la configuración del compuesto *trans*-**36** obtenido de la reacción catalizada por CAL-A, se convirtió en el *trans*-**37** mediante hidrólisis con metóxido de sodio en metanol.



Esquema III.21: Hidrólisis no enzimática de (3*S*,4*S*)-**36**.

Posteriormente se comparó su rotación específica con la descrita en la bibliografía, pudiéndose concluir que el producto de la monoacetilado con CAL-A, *trans*-**36**, tiene configuración (3*S*,4*S*).

CONCLUSIONES

En este capítulo se ha llevado a cabo la síntesis y la resolución de la trans-3,4-diacetoxipirrolidina y la trans-3,4-dihidroxipirrolidina N-sustituidas mediante hidrólisis y acetilación enzimáticas respectivamente, siendo el proceso de hidrólisis mucho más eficaz para la obtención de estas pirrolidinas de forma enantiopura.

La lipasa CAL-B cataliza la hidrólisis enzimática enantioselectiva de la trans-(±)-3,4-diacetoxi-1-benciloxicarbonilpirrolidina, trans-(±)-35, para obtener el producto enantiopuro (3R,4R)-1-benciloxicarbonil-3,4-dihidroxipirrolidina, (3R,4R)-37, así como el sustrato remanente (3S,4S)-diacetoxi-1-benciloxicarbonilpirrolidina, (3S,4S)-35, de forma enantiopura.

Mediante acetilación con CAL-B de la trans-(±)-1-benciloxicarbonil-3,4-dihidroxipirrolidina, trans-(±)-37, se obtiene el derivado monoacetilado trans-(±)-3,4-diacetoxi-1-benciloxicarbonilpirrolidina, trans-(±)-35, con excelente rendimiento.

Finalmente, la hidrólisis enzimática catalizada por CAL-A de la trans-(±)-3,4-diacetoxi-1-benciloxicarbonilpirrolidina, trans-(±)-35, conduce al producto monohidrolizado enantiopuro (3S,4S)-3-acetoxi-1-benciloxicarbonil-4-hidroxipirrolidina, (3S,4S)-36.

PARTE EXPERIMENTAL

III.6 REACTIVOS Y DISOLVENTES

Los reactivos utilizados fueron suministrados por Aldrich o Alfa, sin ser necesarios tratamientos previos de purificación.

Los disolventes empleados fueron sometidos previamente a un tratamiento de secado y almacenamiento en atmosfera de nitrógeno. En el caso del diclorometano y del acetonitrilo el agente desecante fue el hidruro cálcico, la piridina se destiló sobre hidróxido sódico y el 1,4-dioxano, tetrahidrofurano, tolueno y *terc*-butilmetileter fueron tratados con sodio en presencia de benzofenona como indicador. Los disolventes para HPLC fueron adquiridos a Romil y a J. T. Baker.

La lipasa tipo A de *Candida antarctica* (Immobilized Lipase NZL-101; CAL-A; 6,2U/g utilizando etillaureato, 1-butanol, isoctano a 30°C) fue suministrada por Codexis. La lipasa de tipo B de *Candida antártica* (Novozym 435, CAL-B, 7300PLU/g) fue donada por Novo Nordisk Co. La lipasa *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre partículas de cerámicas (PSL-C, 783 U/g) fue adquirida a Amano Pharmaceutical Co. La lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre diatomite (PSL-D, 744 U/g) fue suministrada por Aldrich.

Parte experimental

III.7 TECNICAS DE ANÁLISIS

Las cromatografías en capa fina (CCF) se realizan sobre un soporte de cromatofolios de gel de sílice 60 de 0.25 mm de espesor que incorporan un revelador de ultravioleta comercializado por Merck.

Las cromatografías en columna fueron realizadas sobre gel de sílice 60 (230-400 mesh) adquirido a Merck. Como eluyente se utiliza mezclas de disolventes, en las proporciones que se indican en los apartados correspondientes a los datos experimentales de cada compuesto.

Los análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se llevaron a cabo en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 1100, LC/MSD con detector UV a 210 nm. Se ha empleado una columna con relleno quiral CHIRALPAK IA, y mezclas de eluyentes hexano/isopropanol.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) y carbono (^{13}C -RMN) así como las secuencias de pulsos adecuadas para realizar experimentos DEPT se realizaron en los espectrómetros Bruker AC-300 DPX (^1H 300.13 MHz y ^{13}C 75.5 MHz). Se usan como disolvente cloroformo deuterado. Los desplazamientos químicos (δ) se dan en valores de partes por millón (ppm) relativas al disolvente utilizado y las constantes de acoplamiento (J) en hertzios (Hz). En la descripción de los espectros utilizaremos las siguientes abreviaturas: s= singulete, sa= singulete ancho, d= doblete, dd= doble doblete, t= triplete, m= multiplete y ma= multiplete ancho.

Los puntos de fusión se han medido con un aparato Gallenkamp en capilar abierto y no están corregidos.

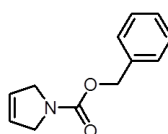
Para la medida de la rotación específica se utilizó un polarímetro Perkin-Elmer 343.

Los espectros de infrarrojo se registran en un espectrómetro UNICAM Mattson 3000 FT, preparando las muestras como pastillas en KBr para los productos sólidos, o puros en ventanas de NaCl. Las bandas de tensión se indican en valores de $\nu_{\text{máx}}$ en cm^{-1} .

Los espectros de masas se realizan en un equipo LC-MS HP 1100 series, utilizando electrospray (ESI) como fuente de ionización. Los valores están referidos a unidades de masa atómica (uma).

III.8 PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS

III.8.1 Síntesis de 1-benciloxycarbonil-3-pirrolina, 33



A una disolución de 3-pirrolina (1 g, 14.5 mmol) en 50 mL diclorometano se le adiciona piridina (5 mL, 36.3 mmol) y cloroformiato de bencilo (3 mL, 36.3 mmol) bajo atmosfera inerte. La mezcla resultante se agita durante 4 h. A continuación se extrae 3 veces con 50 mL de una disolución de ácido clorhídrico 1 N. La fase orgánica resultante se seca con sulfato sódico anhidro, se filtra y se lleva a sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice usando como eluyente una mezcla hexano/acetato de etilo 4:1 para obtener el producto **33** como un aceite incoloro, con un rendimiento del 90%.

Fórmula empírica: C₁₂H₁₃NO₂

Peso molecular: 203.24 g/mol

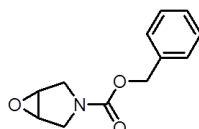
IR: 3058, 1695, 1622 cm⁻¹

¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.33-7.26 (m, 5H, Ph), 5.78 (d, ²J_{gem} 9.0 Hz, 2H, CH₂), 5.17 (s, 2H, CH), 4.18 (d, ³J 3.6Hz, 4H, CH₂)

¹³C-RMN: (CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm): 154.70 (CO), 137.06 (C), 128.55 (CH), 128.02 (CH), 127.95 (CH), 125.85 (CH), 125.78 (CH), 66.84 (CH₂), 53.49 (CH₂)

Parte experimental

III.8.2 Síntesis de 1-benciloxycarbonil-3,4-epoxipirrolidina, **34**



Se disuelve la 3-pirrolina *N*-protegida **33** (1.5 g, 7.4 mmol) en 8 mL de diclorometano y se adiciona otra disolución de 9 mL de ácido *meta*-cloroperbenzoico (1.7 g, 14.8 mmol en 9 mL de diclorometano). La reacción se deja agitando 12 h a temperatura ambiente. A continuación se filtra el sólido formado y el filtrado se extrae con 20 mL de una disolución de sosa al 10%. Se seca la fase orgánica obtenida con sulfato sódico anhidro, se filtra y se lleva a sequedad, obteniéndose el producto **34** como un aceite incoloro con un rendimiento del 70%.

Fórmula empírica: C₁₂H₁₃NO₃

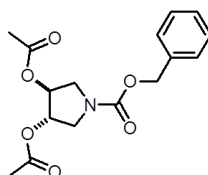
Peso molecular: 219.24 g/mol

IR: 3035, 1698 cm⁻¹

¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.37-7.32 (m, 5H, Ph), 5.12 (d, ²J_{gem} 2.2 Hz, 2H, CH₂), 3.88 (dd, ³J_{trans} 14.7Hz, ³J_{cis} 12.96Hz, 2H, CH), 3.69 (s, 2H, CH₂), 3.40 (dd, ³J 12.8Hz, ²J 4.4Hz, 2H, CH₂)

¹³C-RMN:(CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm): 155.12 (CO), 136.45 (C), 128.35 (CH), 127.80 (CH), 127.91 (CH), 66.84 (CH₂), 55.37 (CH), 54.79 (CH), 47.29 (CH₂), 47.01 (CH₂)

III.8.3 Síntesis de *trans*-(±)-3,4-diacetoxi-1-benciloxycarbonilpirrolidina, *trans*-(±)-**35**



A una disolución de **34** (1,4 g; 6,5 mmol) en 55mL de ácido acético glacial se le añaden 2,5 mL de anhídrido acético (26,1 mmol). A continuación se adicionan 600 μ L (6,5 mmol) y la mezcla resultante se agita durante 12 h. Transcurrido este tiempo se neutraliza el medio ácido con una disolución de sosa 3 N. Se extrae dos veces la fase acuosa con 50 mL de acetato de etilo y se lava tres veces la fase orgánica resultante con 50 mL de una disolución de bicarbonato sódico saturada. Se seca la fase orgánica con sulfato sódico anhidro, se filtra y se lleva a sequedad. El crudo resultante se purifica por cromatografía de columna en sílica gel utilizando como eluyente hexano/acetato de etilo 1:1 para obtener *trans*-(±)-**35** como sólido blanco con un rendimiento del 80%.

Fórmula empírica: C₁₆H₁₉NO₆

Peso molecular: 321.33 g/mol

IR: 1744, 1708 cm⁻¹

¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.39-7.35 (m, 5H, Ph), 5.16 (sa, 4H, CH y CH₂), 3.79-3.74 (m, 2H, CH₂), 3.64-3.54 (m, 2H, CH₂), 2.08 (s, 6H, CH₃)

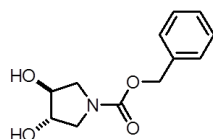
¹³C-RMN: (CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm): 169.60 (CO), 154.60 (CO), 136.36 (C), 128.43 (CH), 128.04 (CH), 127.94 (CH), 74.94 (CH), 74.03 (CH), 67.04 (CH₂), 50.19 (CH₂), 49.96 (CH₂), 20.77 (CH₃)

HRMS-ESI⁺: calculado para C₁₆H₁₉NNaO₆ (M+Na)⁺ m/z 344.1105 encontrado 344.1110

Punto de fusión: 61,2-62,3°C

Parte experimental

III.8.4 Síntesis de trans-(±)-1-benciloxycarbonil-3,4-dihidroxipirrolidina, trans-(±)-37



El compuesto *trans*-(±)-**35** se disuelve en 50 mL de metanol y se añade 1 mL de una disolución de metóxido de sodio 0,5 M en metanol. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 5 h. A continuación se seca el residuo y se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice usando acetato de etilo como eluyente para obtener el producto *trans*-(±)-**37** como un aceite incoloro con un rendimiento del 70%.

Fórmula empírica: C₁₂H₁₅NO₄

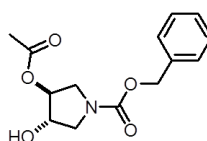
Peso molecular: 237.25 g/mol

IR: 3402, 2947, 1681 cm⁻¹

¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.35-7.32 (m, 5H, Ph), 5.11 (s, 2H, CH₂), 4,14 (sa, 2H, CH), 3.69 (dd, ³J 11.2Hz, ²J 4.3 Hz, 2H, CH₂), 3.41 (d, ³J 11.9Hz, 2H, CH₂), 2.8 (sa, 2H, OH)

¹³C-RMN:(CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm): 155.39 (CO), 136.47 (C), 128.44 (CH), 128.00 (CH), 127.79 (CH), 67.04 (CH₂), 53.35 (CH), 51.64 (CH), 20.97 (CH₂), 14.10 (CH₂)

III.8.5 Síntesis de *trans*-(±)-3-acetoxi-1-benciloxycarbonil-4-hidroxipirrolidina, *trans*-(±)-36



A una disolución de *trans*-(±)-**37** (30 mg; 0,13 mmol) en 1 mL diclorometano se le adiciona piridina (11 μ L; 0,14 mmol) y cloruro de acetilo (10 μ L; 0,14 mmol) bajo atmosfera inerte. La mezcla resultante se agita durante 4h. A continuación se extrae 3 veces con 1 mL de una disolución de ácido clorhídrico 1 N. La fase orgánica resultante se seca con sulfato sódico anhidro, se filtra y se lleva a sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice usando como eluyente una mezcla hexano/acetato de etilo 2:3 para obtener el producto *trans*-(±)-**36** como un aceite incoloro, con un rendimiento del 36%.

Fórmula empírica: C₁₄H₁₇NO₅

Peso molecular: 279.29 g/mol

IR: 3421, 1743, 1687 cm⁻¹

¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.34-7.31 (m, 5H, Ph), 5.14 (s, 2H, CH₂), 5.04-5.02 (m, 1H, CH), 4.27-4.26 (m, 1H, CH), 3.85-3.80 (m, 1H, CH₂), 3.68-3.63 (m, 1H, CH₂), 3.60-3.48 (m, 2H, CH₂), 2.70 (sa, 1H, OH), 2.06 (s, 3H, CH₃)

¹³C-RMN: (CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm): 170.45 (CO), 154.91 (CO), 136.49 (C), 128.41 (CH), 127.98 (CH), 127.85 (CH), 77.70 (CH), 77.12 (CH), 67.00 (CH₂), 52.06 (CH₂), 49.30 (CH₂), 20.88 (CH₃)

HRMS-ESI⁺: calculado para C₁₄H₁₇NNaO₅ (M+Na)⁺ m/z 302.0999 encontrado 302.1002

Parte experimental

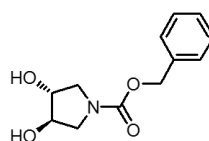
III.8.6 Procedimiento general para la hidrólisis enzimática de *trans*-(±)-3,4-diacetoxi-1-benciloxycarbonilpirrolidina, *trans*-(±)-**35**

A una disolución de *trans*-(±)-**35** (50 mg) en 2 mL del correspondiente disolvente y en presencia de la lipasa (100 mg) se le añade la cantidad de agua necesaria en cada caso y se incuba (por lo general a 30°C) con agitación orbital a 250 rpm. La reacción se sigue por HPLC y CG usando las condiciones descritas en los apartados III.3 y III.4 (páginas de la 183 a la 185) hasta conseguir la conversión deseada. Una vez finalizada, se separa el enzima por filtración y se lava con el correspondiente disolvente orgánico. Se evapora el disolvente y posteriormente se separa el sustrato remanente y los productos hidrolizados mediante cromatografía de columna de gel de sílice utilizando como eluyente hexano/acetato de etilo 2:3.

III.8.7 Procedimiento general para la acetilación enzimática de *trans*-(±)-1-benciloxycarbonil-3,4-dihidroxi-1-pirrolidina, *trans*-(±)-**37**

A una disolución de *trans*-(±)-**37** (25 mg) en 1 mL del correspondiente disolvente y en presencia de la lipasa (25 mg) se le añade el agente de acilación y se incuba (por lo general a 30°C) con agitación orbital a 250 rpm. La reacción se sigue por HPLC y CG usando las condiciones descritas en los apartados III.3 y III.4 (páginas de la 183 a la 185) hasta conseguir la conversión deseada. Una vez finalizada, se separa el enzima por filtración y se lava con el correspondiente disolvente orgánico. Se evapora el disolvente y posteriormente se separa el sustrato remanente y los productos acetilados mediante cromatografía de columna de gel de sílice utilizando como eluyente hexano/acetato de etilo 2:3.

III.8.8 Síntesis de (3*R*,4*R*)-1-benciloxycarbonil-3,4-dihidropirrolidina, (3*R*,4*R*)-37

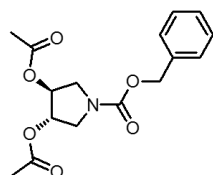


A una disolución de *trans*-(±)-**35** (50 mg) en 2 mL de 1,4-dioxano en presencia de 100 mg CAL-B se le añade la 14 μ L agua y se incuba a la temperatura de 30°C con agitación orbital a 250 rpm. La reacción se sigue por HPLC y CG usando las condiciones descritas en los apartados III.3 y III.4 (páginas de la 183 a la 185). Se detiene la reacción alcanza una conversión del 40%. Una vez detenida, se separa el enzima por filtración y se lava con 1,4-dioxano. Se evapora el disolvente y posteriormente se purifica por cromatografía de columna de gel de sílice utilizando como eluyente hexano/acetato de etilo 2:3.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 6.7 \text{ (c = 1, CHCl}_3, ee > 99\%)$$

Parte experimental

III.8.9 Síntesis de (3*S*,4*S*)-diacetoxi-1-benciloxicarbonilpirrolidina, (3*S*,4*S*)-**35**



A una disolución de *trans*-(±)-**35** (50 mg) en 2 mL de 1,4-dioxano en presencia de 100 mg CAL-B se le añade la 14 μ L agua y se incuba a la temperatura de 50°C con agitación orbital a 250 rpm. La reacción se sigue por HPLC y CG usando las condiciones descritas en los apartados III.3 y III.4 (páginas de la 183 a la 185). Se para la reacción al conseguir una conversión del 61%. Seguidamente, se separa el enzima por filtración y se lava con 1,4-dioxano. Se evapora el disolvente y posteriormente se purifica por cromatografía de columna de gel de sílice utilizando como eluyente hexano/acetato de etilo 2:3.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 17.0 \text{ (c = 1, EtOH, ee>99\%)}$$

CAPÍTULO IV:

**Preparación biocatalítica de
trans-3-amino-4-hidroxi-pirrolidinas enantiopuras.**

INTRODUCCIÓN

Las pirrolidinas son unidades estructurales que se encuentran en un gran número de productos tanto naturales como sintéticos que poseen actividad biológica.^{148,149,150}

Este último capítulo de la memoria se centra en la síntesis y resolución mediante métodos biocatalíticos de la *trans*-3-amino-4-hidroxi-pirrolidina o sus derivados, cuya presencia en la estructura de algunos fármacos es fundamental para su actividad biológica.^{151,152}

¹⁴⁸ A. Attyagalle, D. Morgan, *Chem. Soc. Rev.*, **1984**, *13*, 245

¹⁴⁹ M. Pichon, B. Figadere, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, *7*, 927

¹⁵⁰ D. O'Hagan, *Nat. Prod. Rep.*, **1997**, *14*, 637

¹⁵¹ T. Okada, K. Ezumi, M. Yamakawa, H Sato, T. Tsuji, T. Tsushima, K. Motokawa, Y. Komatsu, *Chem. Pharm. Bull.*, **1993**, *41*, 126

¹⁵² T. Okada, H Sato, T. Tsuji, T. Tsushima, H. Nikai, T. Yoshida, S. Matsuura, *Chem. Pharm. Bull.*, **1993**, *41*, 132

Introducción

Un ejemplo significativo es la quinolona AG-7352^{153,154,155} (también conocida como voreloxina o SNS-595). Este compuesto posee propiedades antitumorales en el tratamiento del cáncer de colon, mama y ovario y pueden ser una alternativa al cisplatino o a la etoposida.

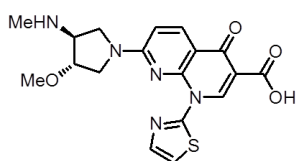


Figura IV.1: Quinolona AG-7352

La 3-metilamino-4-metoxipirrolidina es una parte fundamental en la estructura del antitumoral AG-7352. Estudios de su estereoquímica muestran la influencia de ésta en la actividad y en la citotoxicidad del fármaco.¹⁵⁶

Algunas aminas cíclicas, entre las que se encuentran las 3-amino-4-hidroxipirrolidinas se han estudiado como inhibidores del factor de coagulación Xa con potencial aplicación en la prevención y el tratamiento de la trombosis y otras enfermedades relacionadas.¹⁵⁷

Además, existen otros numerosos ejemplos de compuestos con actividad biológica que poseen esta unidad estructural, por lo que es interesante desarrollar un procedimiento sencillo para su preparación de forma enantioselectiva.

En este último capítulo de la memoria, se ha puesto a punto un método quimioenzimático para la preparación de los dos enantiómeros de la *trans*-3-amino-4-hidroxipirrolidina.

¹⁵³ K. Tomita, Y. Tsuzuki, K. Shibamori, S. Kashimoto, K. Chiba, *217th ACS National Meeting*, **1999**, Abstract 249

¹⁵⁴ K. Chiba, K. Tomita, Y. Tsuzuki, K. Mizuno, Y. Sato, *218th ACS National Meeting*, **1999**, Abstract 127

¹⁵⁵ Y. Tsuzuki, K. Chiba, K. Mizuno, K. Tomita, K. Suzuki, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, *12*, 2989-2997

¹⁵⁶ Y. Tsuzuki, K. Tomita, K. Shibamori, Y. Sato, S. Kashimoto, K. Chiba, *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 2097-2109

¹⁵⁷ K. Groe-BKE-Zbinder, W. Haap, H. Hilpert, N. Panday, F. Ricklin, B. Wirz, WO2006114401A2, **2006**

ANTECEDENTES

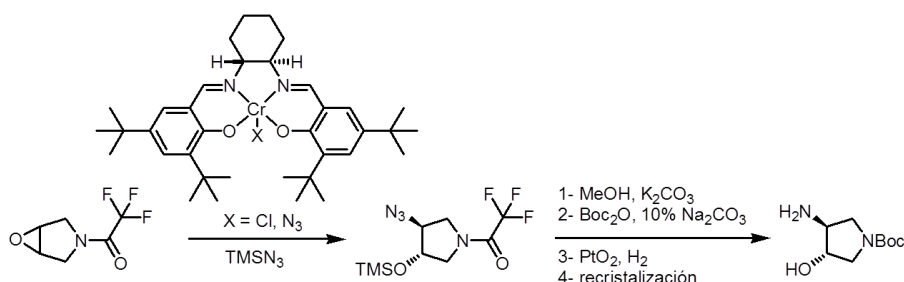
En el presente capítulo, se intenta desarrollar un procedimiento quimioenzimático para conseguir los dos enantiómeros de la *trans*-(±)-3-amino-4-hidroxi-pirrolidina que, como se ha indicado anteriormente, es una estructura que aparece frecuentemente en fármacos y distintos compuestos con actividad biológica.

En la bibliografía se han encontrado varios métodos para la obtención de estos aminoalcoholes que se resumen a continuación.

En varios de los ejemplos encontrados se utilizan ligandos Salen, como el mostrado en la síntesis desarrollada por Schaus y colaboradores¹⁵⁸ (esquema IV.1). Estos autores, emplea un complejo de cromo III con este ligando como catalizador organometálico en la reacción de apertura asimétrica del óxido de pirrolina con azida de trimetilsilicio. El tratamiento posterior del producto obtenido lleva a la 3-amino 4-hidroxi-pirrolidina.

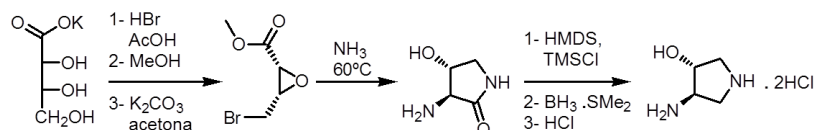
¹⁵⁸ S. Schaus, J. Larrow, E. Jacobsen, *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 4197-4199

Antecedentes



Esquema IV.1: Reacción de obtención de la 3-amino-1-*tert*-butoxicarboli-amino-4-hidroxipirrolidina.

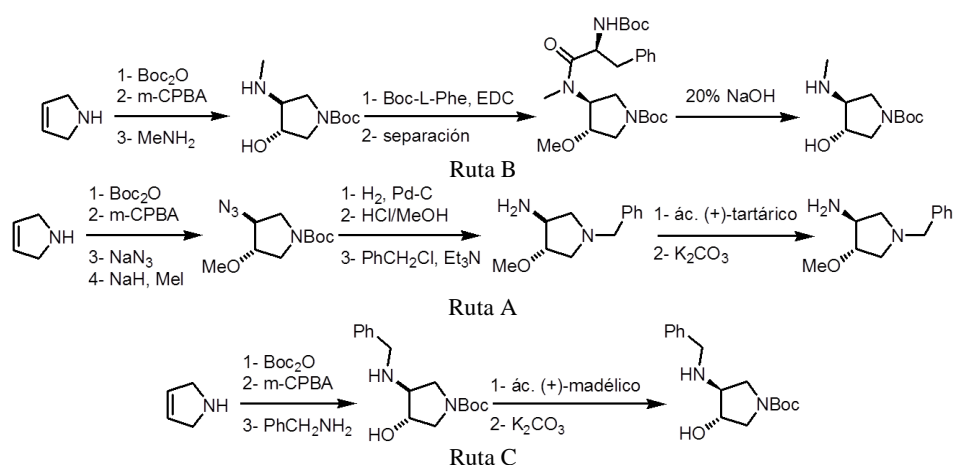
Limber y colaboradores¹⁵⁹ parten de los ácidos D- y L-tetrónicos para obtener los cuatro posibles estereoisómeros de la pirrolidina. El paso clave de esta síntesis es la formación regioselectiva de la D- o L-aminohidroxilactama por tratamiento de 4-bromo-4-desoxi 2,3-*cis* o 2,3-*trans*-anhidrotetronato de metilo, respectivamente, con amoníaco líquido. El esquema IV.2 muestra los pasos de reacción para la preparación del isómero (3*R*,4*R*).



Esquema IV.2: Reacción de obtención del diclorohidrato de la (R,R)-3-amino-4-hidroxipirrolidina.

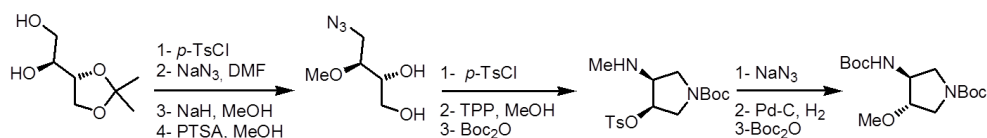
Tsuzuki y colaboradores¹⁵⁵ parten de la 3-pirrolina para llegar a diferentes derivados de la 3-amino-4-hidroxipirrolidina. El esquema IV.3 muestra las tres rutas utilizadas, en la primera de ellas la estereoquímica del producto viene determinada por la utilización de un auxiliar quiral, mientras que en las rutas B y C se resuelve la mezcla racémica mediante la formación de sales diastereoméricas.

¹⁵⁹ G. Limber, I. Lundt, J. Zavilla, *Synthesis*, **1999**, 1, 178-183



Esquema IV.3: Rutas A, B y C para la obtención de la 3-amino-4-hidroxipirrolidina enantiopura.

La ruta descrita por Rao y colaboradores¹⁶⁰ parte del (*S*)-1-[(*R*)-2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il]etan-1,2-diol, que se puede obtener del ácido *D*-isoascorbico,^{161,162} para llevar a cabo la síntesis de la (3*S*,4*S*)-1,3-*terc*-butiloxicarbonil-4-metoxipirrolidina.



Esquema IV.4: Reacción de obtención de la (3*S*,4*S*)-1,3-*terc*-butiloxicarbonilamino-4-metoxipirrolidina.

Davis y colaboradores¹⁶³ describen un método en el que utilizan una adición conjugada de (*S*)-*N*-metil-*N*-(α -metilbenzil)amido de litio como paso clave para la preparación de las pirrolidinas.

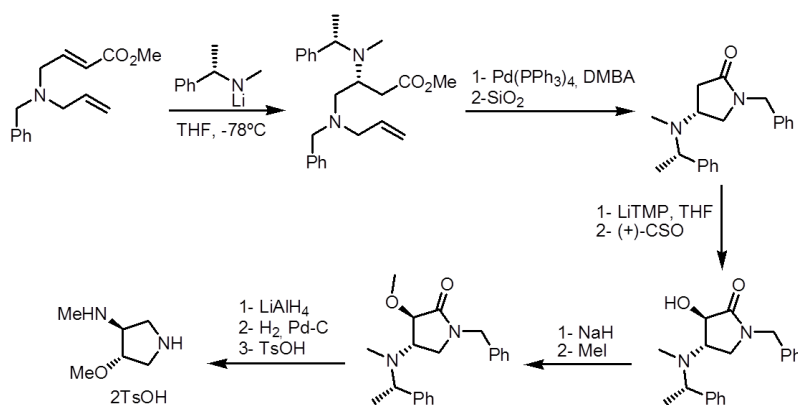
¹⁶⁰ A. Kumar, J. Reddy, B. Rao, *Tetrahedron Letters*, **2003**, *44*, 5687-5689

¹⁶¹ E. Abushnab, R. Venishetti, H. Leiby, K. Singh, A. Mikkilineni, D. Wu, R. Saibaba, P. Panzica, *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 259.

¹⁶² M. Jung, T. Shaw, *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 6304-6311.

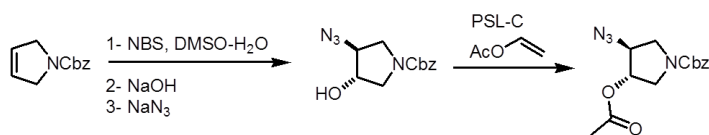
¹⁶³ S. Davis, A. Garner, E. Goddard, D. Kruchinin, P. Roberts, A. Smith, H. Rodríguez-Solla, J. Thomson, S. Toms, *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, *5*, 1961-1969

Antecedentes



Esquema IV.6: Síntesis del tosilato de (3*S*,4*S*)-3-(*N*-metilamino)-4-metoxipirrolidina.

Un método biocatalítico para la preparación de 3-acetoxi-4-azido-1-benciloxicarbonilpirrolidina es el propuesto por Kamal y colaboradores,¹⁶⁴ que se muestra a continuación. Es el único método encontrado en la bibliografía en el que se utilizan biocatalizadores para la resolución cinética de la mezcla racémica de la 3-azido-1-benciloxicarbonil-4-hidroxipirrolidina. Reacciones posteriores podrían conducir a la obtención del aminoalcohol.



Esquema IV.5: Resolución cinética del azidoalcohol empleando como biocatalizador la PSL-C y acetato de vinilo como agente de acilación.

Finalmente, es evidente que la resolución de las *trans*-3,4-dihidroxipirrolidinas que se ha discutido en el capítulo tercero de esta memoria y los métodos biocatalíticos para la resolución de los hidroxiheterociclos mencionados en los antecedentes del mismo, son métodos que hemos tenido en cuenta a la hora de plantear la resolución de la *trans*-3-amino-4-hidroxipirrolidina al ser un aminoalcohol de estructura análoga.^{143,147}

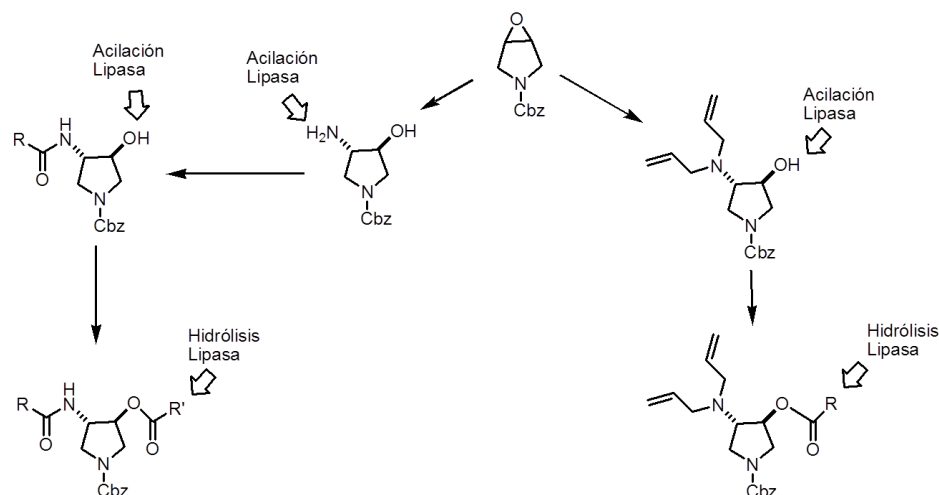
¹⁶⁴ A. Kamal, A. Shaik, M. Sandbhor, M. Mailk, H. Kaga, *Tetrahedron Letters*, **2004**, 45, 8057-8059

OBJETIVOS

En la introducción de este capítulo se ha puesto de manifiesto la importancia de los derivados ópticamente puros de las aminohidroxipirrolidinas en la síntesis de diversos productos farmacéuticos. Por ello se ha planteado como objetivo de este capítulo la síntesis y resolución enzimática de trans-3-amino-4-hidroxipirrolidina mediante procesos de acilación e hidrólisis enzimática de varios derivados de este compuesto.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existen varias alternativas para la resolución de la *trans*-3-amino-4-hidroxipirrolidina por métodos enzimáticos. Una vez protegido el nitrógeno pirrolidínico, es posible llevar a cabo la resolución enzimática mediante procesos de acilación del grupo amino o bien del grupo hidroxilo. En este último caso, será necesaria la previa protección del grupo amino. Es evidente que también existe la posibilidad de acilar ambos grupos y llevar a cabo procesos de hidrólisis. Para cada una de estas resoluciones enzimáticas existen a su vez múltiples alternativas, ya que se pueden utilizar como sustratos distintos derivados. En este capítulo se estudiaron las posibles alternativas que se resumen en el esquema IV.7



Esquema IV.7: Análisis de las posibles alternativas.

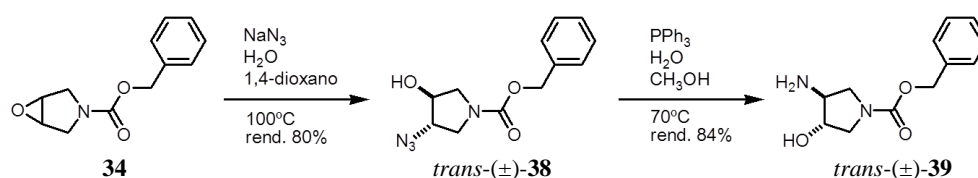
En general, se han elegido los sustratos más simples o aquellos que presentan alguna ventaja adicional, teniendo en cuenta que el objetivo final es la utilización de los productos enantiopuros que se van a obtener como unidades estructurales fundamentales en la síntesis de moléculas más complejas.

De las distintas reacciones de resolución posibles la primera que se planteó fue la más sencilla, la acilación del aminoalcohol, una vez protegido el nitrógeno pirrolidínico.

Resultados y discusión

IV.1. ACETILACIÓN ENZIMÁTICA DE LA *TRANS*-(±)-3-AMINO-1-BENCILOXICARBONIL-4-HIDROXIPIRROLIDINA Y DERIVADOS

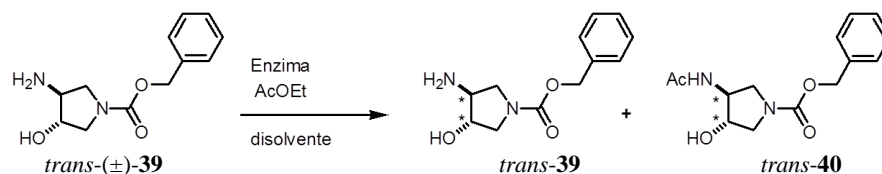
Para la preparación del sustrato *trans*-(±)-3-amino-1-benciloxicarbonil-4-hidroxipirrolidina, *trans*-(±)-**39** se partió del oxido de 1-benciloxicarbonil-3-pirrolina **34** (sintetizado en el capítulo anterior) mediante el proceso que se describe en el esquema IV.1, obteniéndose el aminoalcohol deseado con un alto rendimiento.



Esquema IV.8: Síntesis de *trans*-(±)-**39**.

En primer lugar se realizó la apertura del epóxido **34** con azida de sodio con el fin de obtener el azidoalcohol *trans*-(±)-**38**, que posteriormente se hidrolizó con metanol en presencia de trifenilfosfina y agua con el objetivo de obtener el aminoalcohol *trans*-(±)-**39** sobre el cual se llevarán a cabo reacciones de acilación enzimática.

Una vez obtenido el aminoalcohol *trans*-(±)-**39** de la pirrolidina se comenzó la búsqueda del biocatalizador más adecuado para llevar a cabo la acilación. Para ello se realizaron las reacciones enzimáticas en *tert*-butil metil éter, empleando acetato de etilo como agente de acilación. Se probaron las lipasas CAL-A, CAL-B, PSL-IM y PSL-SD. Los datos recogidos de estas reacciones enzimáticas se muestran en la tabla IV.1.



Esquema IV.9: Acilación enzimática de *trans*-(±)-**39**.

Tabla IV.1: Acilación enzimática de *trans*-(±)-**39** a 30°C, 5 equivalentes de acetato de etilo y en *tert*-butil metil éter.

Entrada	enzima	<i>t</i> reacción (días)	%ee ^a		<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i>
			<i>trans</i> - 39	<i>trans</i> - 40		
1	CAL-A	2	3	19	15	2
2	CAL-B	2	28	20	59	2
3	PSL-IM	2	14	8	63	1
4	PSL-SD	2	-	-	-	-

^aExceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^bConversión, $c=[ee_s/(ee_s+ee_p)]$.

Como se puede observar las lipasas CAL-A, CAL-B y PSL-IM catalizan la reacción con una velocidad moderada, sin embargo la enantioselectividad es baja en todos los casos. Los resultados obtenidos con la CAL-B son mejores que con las otras tres lipasas por lo que se estudio la influencia del disolvente en este proceso. Los resultados se muestran a continuación en la tabla IV.2.

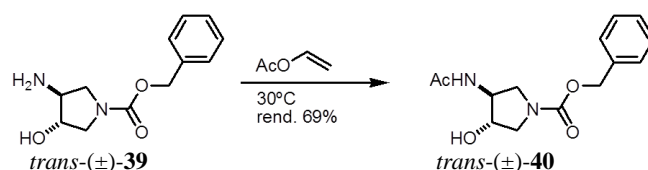
Tabla IV.2: Acilación enzimática de *trans*-(±)-**39** a 30°C, 5 equivalentes de acetato de etilo.

Entrada	disolvente	enzima	<i>t</i> reacción (días)	%ee ^a		<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i>
				<i>trans</i> - 39	<i>trans</i> - 40		
1	tolueno	CAL-B	3	21	-	98	1
2	THF	CAL-B	3	13	36	27	2
3	1,4-dioxano	CAL-B	3	45	54	46	5
4	^t BuOMe	CAL-B	3	29	11	72	2

^aExceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^bConversión, $c=[ee_s/(ee_s+ee_p)]$.

Aunque los resultados obtenidos en 1,4-dioxano muestran una enantioselectividad ligeramente más elevada que en otros disolventes, ésta sigue siendo baja, por lo que se procedió a estudiar la acilación enzimática del grupo hidroxilo.

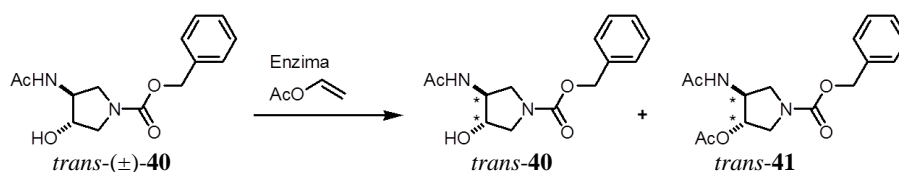
Para ello se preparó el nuevo sustrato *trans*-(±)-4-acetoxi-3-amino-1-benciloxicarbonilpirrolidina, *trans*-(±)-**40** a partir del aminoalcohol *trans*-(±)-**39** por reacción con acetato de vinilo a 30°C.



Esquema IV.10: Acilación con acetato de vinilo de *trans*-(±)-**39**.

Resultados y discusión

Una vez obtenido el producto *trans*-(±)-**40** se probaron de nuevo las lipasas CAL-A, CAL-B, PSL-IM y PSL-SD como biocatalizadores en el proceso enzimático de acilación, en este caso utilizando un éster más activado, el acetato de vinilo, por tratarse de un alcohol secundario. El acetato de vinilo se emplea como agente de acilación y como disolvente en la reacción. Los resultados obtenidos de estos experimentos se recogen en la tabla IV.3.



Esquema IV.11: Acilación enzimática de *trans*-(±)-**40**.

Tabla IV.3: Acilación enzimática de *trans*-(±)-**40** a 30°C, en acetato de vinilo.

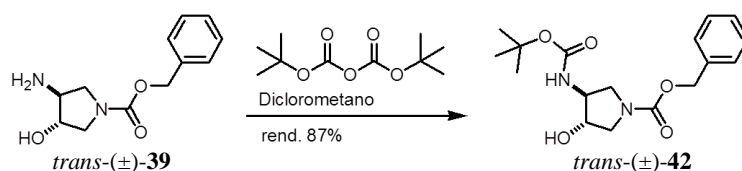
Entrada	enzima	<i>t</i> reacción (días)	%ee ^a		<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i>
			<i>trans</i> - 40	<i>trans</i> - 41		
1	CAL-A	2	19	76	20	9
2	CAL-B	2	45	70	39	9
3	PSL-IM	2	14	39	27	3
4	PSL-SD	2	-	-	-	-

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Conversión, $c = [ee_s / (ee_s + ee_p)]$.

Al igual que ocurría en las reacciones enzimáticas anteriores las lipasas CAL-A, CAL-B y PSL-IM catalizan la reacción de acilación, pero no lo hacen enantioselectivamente.

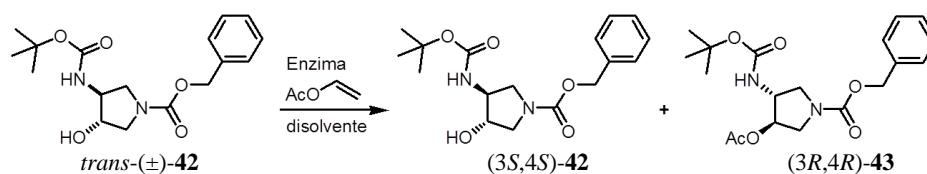
Llegados a este punto se decidió introducir otros grupos protectores en la función amino. La estructura del sustrato es uno de los factores que más influye en la enantioselectividad de los procesos enzimáticos, al tener que acomodarse éste en el centro activo del enzima. Se eligieron los grupos dialilo y el *tert*-butilbenciloxycarbonilo, que se pueden eliminar fácilmente de la función amino sin alterar el grupo benciloxycarbonilo, con el que se ha protegido el nitrógeno pirrolidínico. Ésto permitirá en un futuro realizar desprotecciones selectivas de las distintas funciones.

En el esquema IV.12 se representa la reacción de protección de la *trans*-(±)-3-amino-1-benciloxycarbonil-4-hidroxi-pirrolidina *trans*-(±)-**39** con di-*tert*-butildicarbonato en diclorometano para dar el *trans*-(±)-1-benciloxycarbonil-3-*tert*-butiloxycarbonil-amino-4-hidroxi-pirrolidina, *trans*-(±)-**42** con excelente rendimiento.



Esquema IV.12: Síntesis de *trans*-(±)-42.

Una vez obtenido el sustrato *trans*-(±)-42 se procedió a realizar el “screening” con lipasas (CAL-A, CAL-B, PSL-IM y PSL-SD) a 30°C utilizando *tert*-butil metil éter como disolvente, acetato de vinilo como agente de acilación. Los resultados obtenidos de esta serie de reacciones quedan reflejados en la siguiente tabla IV.4.



Esquema IV.13: Acilación enzimática de *trans*-(±)-42.

Tabla IV.4: Acilación enzimática de *trans*-(±)-42 a 30°C, 5 equivalentes de acetato de vinilo y en *tert*-butil metil éter.

Entrada	enzima	<i>t</i> reacción (días)	%ee ^a		<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i>
			<i>trans</i> -42	<i>trans</i> -43		
1	CAL-A	7	-	-	-	-
2	CAL-B	7	96	58	62	13
3	PSL-IM	7	97	36	73	8
4	PSL-SD	7	-	-	-	-

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Conversión, $c = [ee_s / (ee_s + ee_p)]$.

Las únicas lipasas que catalizan la reacción de acilación del sustrato *trans*-(±)-42 son la CAL-B y la PSL-IM, que presentan buenas conversiones aunque las enantioselectividades son bajas. El efecto del disolvente en las reacciones catalizadas por estas dos enzimas condujo a los resultados que se muestran en la tabla IV.5.

Resultados y discusión

Tabla IV.5: Acilación enzimática de *trans*-(±)-**42** a 30°C, 5 equivalentes de acetato de vinilo.

Entrada	disolvente	enzima	<i>t</i> reacción (días)	%ee ^a		<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i>
				<i>trans</i> - 42	<i>trans</i> - 43		
1	tolueno	CAL-B	5	73	50	59	6
2	1,4-dioxano	CAL-B	5	93	93	50	87
3 ^c	1,4-dioxano	CAL-B	3,5	>99	91	52	123
4	tolueno	PSL-IM	5	82	38	69	5
5	1,4-dioxano	PSL-IM	5	97	23	81	5

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Conversión, $c=[ee_s/(ee_s+ee_p)]$. ^c 10% de trietilamina.

Cabe destacar el resultado obtenido cuando la CAL-B cataliza la reacción de acilación si esta se realiza en 1,4-dioxano (entrada 2). Se obtiene una conversión del 50% y una enantioselectividad de 87. Tanto el producto como el sustrato se obtienen con un elevado exceso enantiomérico (93%).

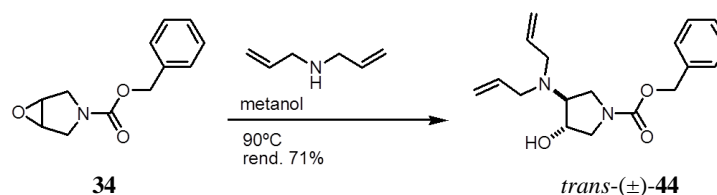
Finalmente, se probó la influencia de la adición de una pequeña cantidad de trietilamina en el medio de reacción (entrada 3) ya que se ha demostrado que la adición de pequeñas cantidades de algunas aminas en reacciones de acilación enzimática incrementa la enantioselectividad del proceso.¹⁶⁵

Cuando la reacción de *trans*-(±)-**42** se lleva a cabo en dioxano con un 10% de trietilamina, se logra incrementar tanto la enantioselectividad del proceso como la velocidad del mismo, se obtiene el producto acetilado (*3R,4R*)-**43** con un exceso enantiomérico del 91%, una conversión del 52% y una enantioselectividad mayor de 100 tras 84 horas de reacción. Esto permite aislar el sustrato remanente (*3S,4S*)-**42** enantiopuro (con un exceso enantiomérico mayor del 99%).

Una vez determinada la configuración absoluta de los productos de estas reacciones (ver sección IV.4, página 247) se concluye que tanto la lipasa CAL-B como PSL-IM muestran la misma preferencia estereoquímica hacia el enantiómero (*3R,4R*) del sustrato.

El segundo sustrato que se propuso para su resolución fue el *trans*-(±)-1-benciloxicarbonil-3-dialilamino-4-hidroxi-pirrolidina, *trans*-(±)-**44**, donde el grupo amino está sustituido con dos grupos alilo. La preparación de este sustrato se realizó en este caso mediante la apertura del epóxido **34** con dialilamina. Se obtuvo el producto *trans*-(±)-**44**, con alto rendimiento (esquema IV.14 de reacción).

¹⁶⁵ F. Theil, *Tetrahedron*, **2000**, 56, 2905-2919


 Esquema IV.14: Síntesis de *trans*-(±)-44.

Una vez obtenido el sustrato *trans*-(±)-44 se procedió a realizar las pruebas con los distintos biocatalizadores (CAL-A, CAL-B, PSL-IM y PSL-SD). Las reacciones se llevaron a cabo a 30°C, en *tert*-butil metil éter y usando acetato de vinilo como agente de acilación (esquema IV.15). Los resultados obtenidos de esta serie de reacciones quedan reflejados en la tabla IV.6.

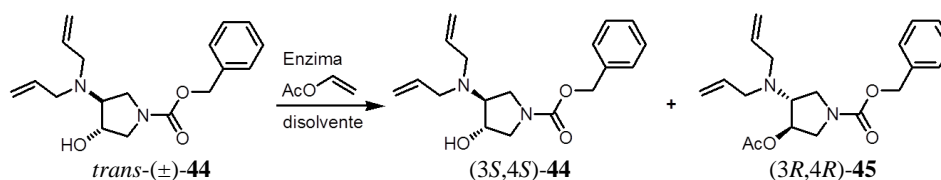

 Esquema IV.15: Acilación enzimática de *trans*-(±)-44.

Tabla IV.6: Acilación enzimática de *trans*-(±)-44 a 30°C, 5 equivalentes de acetato de vinilo y en *tert*-butil metil éter.

Entrada	enzima	<i>t</i> reacción (días)	%ee ^a		<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i>
			<i>trans</i> -44	<i>trans</i> -45		
1	CAL-A	1	4	29	12	2
2	CAL-B	3	57	>99	37	>200
3	PSL-IM	3	92	>99	48	>200
4	PSL-SD	3	3	>99	3	>200

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Conversión, $c = [ee_s / (ee_s + ee_p)]$.

Se puede observar que las cuatro lipasas utilizadas catalizan la reacción de acilación, aunque la conversión en la reacción catalizada por la PSL-SD es muy baja. Con CAL-A tanto la enantioselectividad como la conversión son bajas. Los mejores resultados se obtienen con las lipasas CAL-B y PSL-IM, ya que catalizan la reacción con excelentes enantioselectividades. Cabe destacar que tras tres días de reacción la conversión alcanzada en el proceso catalizado por la lipasa PSL-IM es mas alta que con CAL-B. En la reacción catalizada por PSL-IM es posible

Resultados y discusión

obtener el producto de acilación enzimática (3*R*,4*R*)-4-acetoxi-1-benciloxicarbonil-3-dialilaminopirrolidina (3*R*,4*R*)-**45**, con un 99% de exceso enantiomérico y con una conversión cercana al 50% (entrada 3 de la tabla IV.6).

Siguiendo la misma metodología que con los sustratos anteriores, se estudió el efecto del disolvente en las reacciones catalizadas por la CAL-B y PSL-IM. Los resultados de dichas pruebas se recogen en la tabla IV.7.

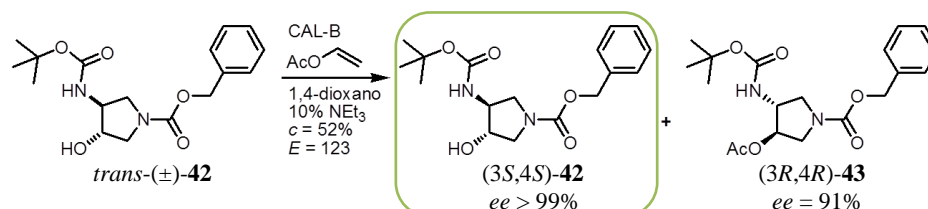
Tabla IV.7: Acilación enzimática de *trans*-(±)-**44** a 30°C, 5 equivalentes de acetato de vinilo.

Entrada	disolvente	enzima	<i>t</i> reacción (días)	%ee ^a		<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i>
				<i>trans</i> - 44	<i>trans</i> - 45		
1	tolueno	CAL-B	5	18	91	17	26
2	THF	CAL-B	5	5	90	5	19
3	1,4-dioxano	CAL-B	5	4	>99	4	>200
4	tolueno	PSL-IM	5	42	>99	29	>200
5	THF	PSL-IM	5	5	>99	5	>200
6	1,4-dioxano	PSL-IM	5	4	>99	4	>200

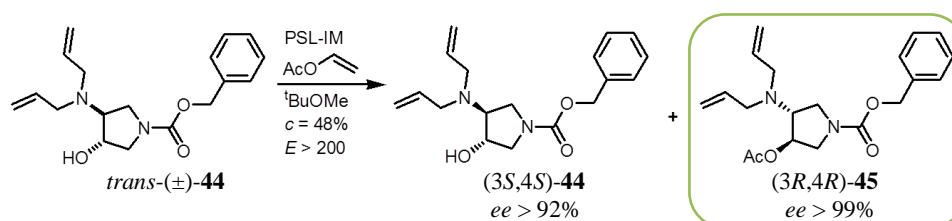
^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Conversión, $c = [ee_s / (ee_s + ee_p)]$.

Los disolventes probados fueron tolueno, tetrahydrofurano y 1,4-dioxano. Se observa que las reacciones con CAL-B y PSL-IM son mucho mas lentas que en *tert*-butil metil éter. En los procesos catalizados por CAL-B en tolueno o en tetrahydrofurano el enzima muestra baja enantioselectividad (entradas 1 y 2 de la tabla IV.7). En el caso de las reacciones catalizadas por PSL-IM el disolvente no afecta a la enantioselectividad siendo esta muy elevada en todos los procesos, aunque si afecta a la velocidad de la reacción ya que tras cinco días de reacción solo en el mejor de los casos, con tolueno, se alcanza una conversión moderada del 29%. Como ocurría en las reacciones llevadas a cabo con el sustrato (±)-**42**, ambas enzimas catalizan preferentemente la acilación del enantiómero (3*R*,4*R*).

A modo de resumen, en los esquemas IV.16 y IV.17 se pueden visualizar las mejores condiciones para los procesos biocatalíticos estudiados.



Esquema IV.16: Acilación enzimática de *trans*-(±)-**42**.



Esquema IV.17: Acilación enzimática de *trans*-(±)-**44**.

Finalmente, cabe destacar que el método descrito en este apartado no solo muestra una alta enantioselectividad permitiendo la preparación de ambos enantiómeros ópticamente puros y con buen rendimiento, sino que la (3*R*,4*R*)-4-acetoxi-1-benciloxycarbonil-3-dialilaminopirrolidina (3*R*,4*R*)-**45** se encuentra ortogonalmente protegida, lo que la convierte en un sintón muy versátil para su posterior acoplamiento en las estructuras de fármacos y otras moléculas de interés como las mostradas en la introducción de este capítulo. Algunas reacciones de desprotección selectiva se han descrito en el apartado IV.4, ya que han sido necesarias para confirmar la configuración absoluta de los productos obtenidos.

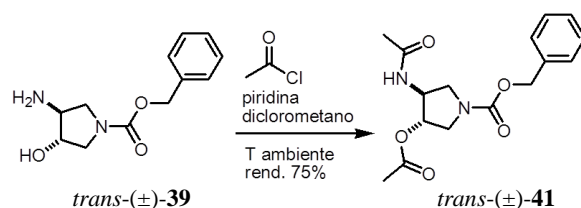
Por otra parte, la preparación quimioenzimática de los compuestos (3*S*,4*S*)-1-benciloxycarbonil-3-dialilamino-4-hidroxipirrolidina (3*S*,4*S*)-**44** y (3*R*,4*R*)-4-acetoxi-1-benciloxycarbonil-3-dialilaminopirrolidina (3*R*,4*R*)-**45** que se describe en este apartado aporta una interesante alternativa a otras rutas descritas al evitar la utilización de azida para la introducción del grupo amino como sustituyente del anillo.

IV.2. HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE LOS DERIVADOS DE TRANS-(±)-4-ACETOXI-3-AMINO-1-BENCILOXICARBONIL-PIRROLIDINA

Tal como se resume al inicio de esta sección se realizó el estudio de los procesos de hidrólisis enzimática de distintos derivados acetilados.

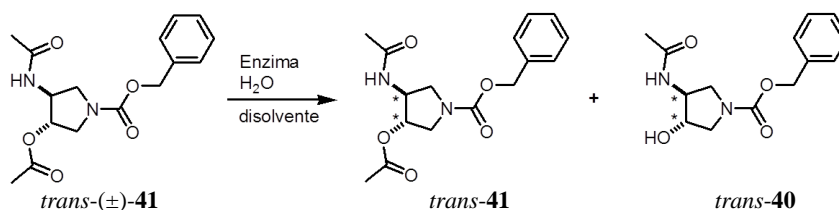
Resultados y discusión

En primer lugar se preparó el derivado *trans*-(±)-3-acetamido-4-acetoxi-1-benciloxycarbonilpirrolidina *trans*-(±)-**41**. El esquema IV.18 muestra las condiciones para la síntesis de dicho producto.



Esquema IV.18: Síntesis de la con cloruro de acetilo *trans*-(±)-**41**.

A continuación se realizaron distintos ensayos con el objeto de encontrar el biocatalizador mas adecuado para la reacción de hidrólisis. Se probaron las mismas lipasas que en los procesos de acilación.



Esquema IV.19: Hidrólisis enzimática de *trans*-(±)-**7**.

Tabla IV.8: Hidrólisis enzimática de *trans*-(±)-**41** en 1,4-dioxano, a 30°C, 5 equivalentes de agua destilada y distintas lipasas.

Entrada	enzima	<i>t</i> reacción (días)	% <i>ee</i> ^a <i>trans</i> - 41	% <i>ee</i> ^a <i>trans</i> - 40	<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i>
1	CAL-A	9	5	>99	5	>200
2	CAL-B	2	80	84	49	28
3	PSL-IM	6	-	-	-	-
4	PSL-SD	6	-	-	-	-

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Conversión, $c = [ee_s / (ee_s + ee_p)]$.

Inicialmente las reacciones se llevan a cabo a 30°C y con 5 equivalentes de agua.

Se puede observar en las entradas 3 y 4 de la tabla IV.8 que tras seis días de reacción no se observa conversión cuando se utilizan como biocatalizadores las lipasas PSL-IM y PSL-SD. La reacción catalizada por CAL-A parece catalizar el proceso de forma enantioselectiva, aunque el

valor de enantioselectividad obtenido puede no ser muy exacto dada la baja conversión del proceso. Finalmente, con CAL-B (entrada 2) la conversión es cercana a 50% transcurridos dos días de reacción, sin embargo la enantioselectividad es baja. Teniendo en cuenta el resultado de estas pruebas solo se estudió el efecto del disolvente para los biocatalizadores CAL-A y CAL-B.

Comenzando con el estudio de los procesos catalizados por CAL-B, (tabla IV.9), cuando se utiliza tolueno, tetrahidrofurano y *tert*-butil metil éter los resultados obtenidos son peores que cuando se usa el 1,4-dioxano.

Tabla IV.9: Hidrólisis enzimática de *trans*-(±)-**41** con CAL-B, a 30°C, 5 equivalentes de agua destilada.

Entrada	disolvente	enzima	<i>t</i> reacción (días)	% <i>ee</i> ^a	% <i>ee</i> ^b	<i>c</i> ^c (%)	<i>E</i>
				<i>trans</i> - 41	<i>trans</i> - 40		
1	tolueno	CAL-B	2	4	11	26	1
2	THF	CAL-B	2	24	76	24	9
3	^t BuOMe	CAL-B	2	2	9	21	1

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Conversión, $c=[ee_s/(ee_s+ee_p)]$.

En las reacciones de hidrólisis la concentración de agua es uno de los parámetros que suelen influir en el resultado del procesos por ello se estudió este efecto utilizando las mejores condiciones encontradas hasta el momento. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.10.

Tabla IV.10: Hidrólisis enzimática de *trans*-(±)-**41** con CAL-B, a 30°C, en 1,4-dioxano.

Entrada	equivalentes	<i>t</i> reacción (días)	% <i>ee</i> ^a	% <i>ee</i> ^b	<i>c</i> ^c (%)	<i>E</i>
	agua destilada		<i>trans</i> - 42	<i>trans</i> - 40		
1	5	2	80	84	49	28
2	2,5	2	85	84	50	31
3	1	1	79	86	48	33
4	0,5	1	64	87	42	28

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Conversión, $c=[ee_s/(ee_s+ee_p)]$.

Aunque no se aprecian grandes diferencias en lo que a enantioselectividad se refiere, al disminuir la cantidad de agua en el medio de reacción aumenta sensiblemente la velocidad del proceso (entradas 3 y 4). La enantioselectividad es moderada en todos los casos.

El proceso de hidrólisis catalizado por CAL-A (tabla IV.11) es aparentemente mucho más enantioselectivo, aunque como se comentó anteriormente la conversión es muy baja. Con el objetivo principal de

Resultados y discusión

aumentar la velocidad del proceso se analizaron los distintos parámetros que influyen en el mismo: concentración de agua, concentración de enzima, disolvente y temperatura.

En la tabla IV.11, se resumen los resultados obtenidos. La entrada 1, que se ha incluido para hacer más fácil la comparación, es el resultado ya mencionado en la reacción preliminar. En todos los demás procesos se utilizó una proporción en peso enzima-sustrato 2:1, a diferencia de los demás procesos descritos hasta el momento en este capítulo, donde la proporción es 1:1.

Tabla IV.11: Hidrólisis enzimática de *trans*-(±)-**41** con CAL-A utilizando una proporción de enzima 2:1 respecto al peso de sustrato.

Entrada	equivalentes agua destilada	disolvente	T (°C)	t reacción (días)	%ee ^a <i>trans</i> - 41	%ee ^a <i>trans</i> - 40	c ^b (%)	E
1 ^c	5	1,4-dioxano	30	9	5	>99	5	>200
2	5	1,4-dioxano	30	7	8	>99	8	>200
3	2,5	tolueno	30	2	62	94	40	63
4	2,5	^t BuOMe	30	1	21	90	19	23
5	2,5	1,4-dioxano	45	6	38	92	29	35
6	2,5	tolueno	45	1	96	69	58	21
7	2,5	^t BuOMe	45	1	98	38	72	9

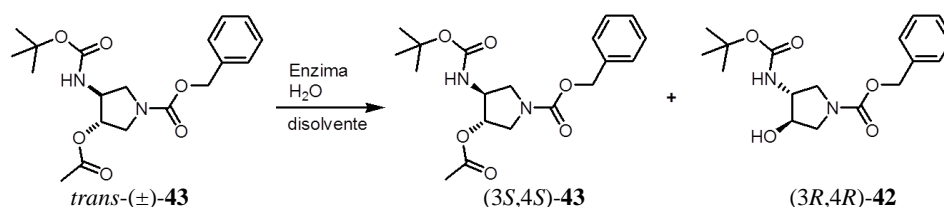
^a Determinados por HPLC. ^b Conversión, $c = [ee_s / (ee_s + ee_p)]$. ^c Proporción enzima sustrato 1:1.

Al incrementar la proporción de enzima, solo se consigue aumentar ligeramente la velocidad de reacción.

El efecto del disolvente en la velocidad de reacción es mucho más significativo, la reacción en tolueno alcanza un 40 % de conversión tras 2 días de reacción y un 19% en un solo día cuando se lleva a cabo el proceso en *tert*-butil metil éter. Sin embargo, en el primer caso la enantioselectividad de la reacción es moderada y en el segundo baja.

El aumento de la temperatura a 45°C incrementó, como era de esperar, la velocidad del proceso; pero en los tres disolventes probados la enantioselectividad disminuyó considerablemente.

A continuación se procedió a realizar el estudio de las reacciones de hidrólisis enzimática del sustrato *trans*-(±)-**43** con las lipasas CAL-A, CAL-B, PSL-IM y PSL-SD. En el esquema IV.20 se muestra el proceso de hidrólisis enzimática que se realizó para el sustrato *trans*-(±)-**43**. Estas reacciones se realizaron a 30°C, en 1,4-dioxano y 5 equivalentes de agua; recogiendo los resultados obtenidos en la tabla IV.12.



Esquema IV.20: Hidrólisis enzimáticas de *trans*-(±)-43.

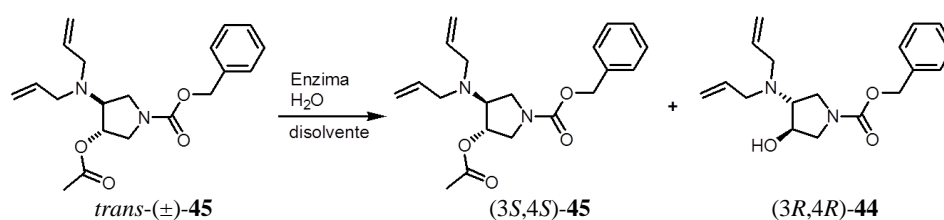
Tabla IV.12: Hidrólisis enzimática de *trans*-(±)-43 en 1,4-dioxano, a 30°C, 5 equivalentes de agua destilada.

Entrada	enzima	<i>t</i> reacción (días)	% <i>ee</i> ^a <i>trans</i> -43	% <i>ee</i> ^a <i>trans</i> -42	<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i>
1	CAL-A	5	2	38	5	2
2	CAL-B	5	36	81	31	14
3	PSL-IM	5	-	-	-	-
4	PSL-SD	5	-	-	-	-

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Conversión, $c = [ee_s / (ee_s + ee_p)]$.

Solo el proceso catalizado por al CAL-B presenta una conversión moderada del 31% después de cinco días de reacción, aunque con una enantioselectividad muy baja. Con CAL-A apenas se aprecia conversión y el producto de la reacción muestra un bajo exceso enantiomérico

Análogamente se estudió la hidrólisis del sustrato *trans*-(±)-45, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla IV.13.



Esquema IV.21: Hidrólisis enzimáticas de *trans*-(±)-45.

Resultados y discusión

Tabla IV.13: Hidrólisis enzimática de *trans*-(±)-**45** en 1,4-dioxano, a 30°C, 5 equivalentes de agua destilada.

Entrada	enzima	<i>t</i> reacción (días)	% <i>ee</i> ^a <i>trans</i> - 45	% <i>ee</i> ^a <i>trans</i> - 44	<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i>
1	CAL-A	5	-	-	-	-
2	CAL-B	5	5	>99	5	>200
3	PSL-IM	5	-	-	-	-
4	PSL-SD	5	-	-	-	-

^a Exceso enantiomérico, determinados por HPLC. ^b Conversión, $c=[ee_s/(ee_s+ee_p)]$.

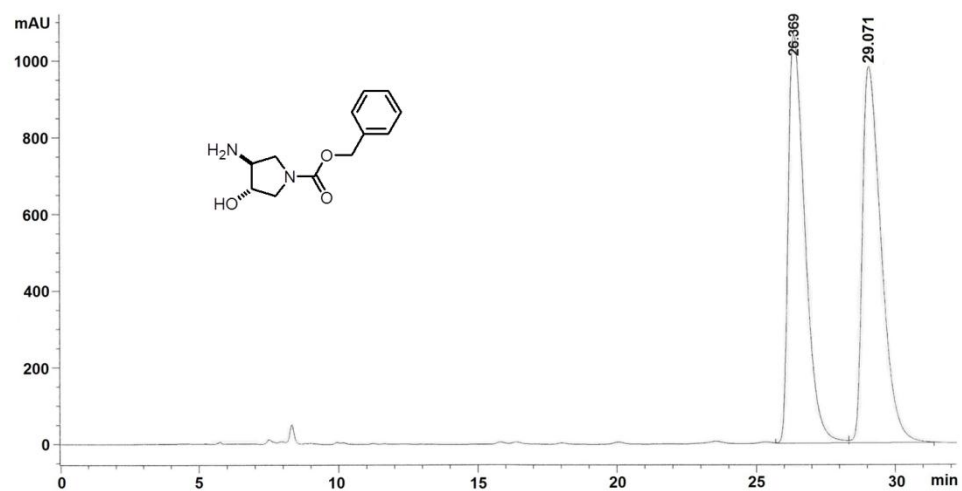
Solo la lipasa CAL-B catalizó el proceso de hidrólisis y aunque aparentemente la enantioselectividad es muy elevada, la conversión alcanzada no supera el 5%, tras cinco días de reacción.

En conjunto, puede concluirse, que los procesos de hidrólisis enzimática de estos sustratos con cualquiera de los biocatalizadores probados son menos adecuados para la preparación de las 3,4-aminopirrolidinas ópticamente puras que los procesos de acilación descritos en la sección anterior.

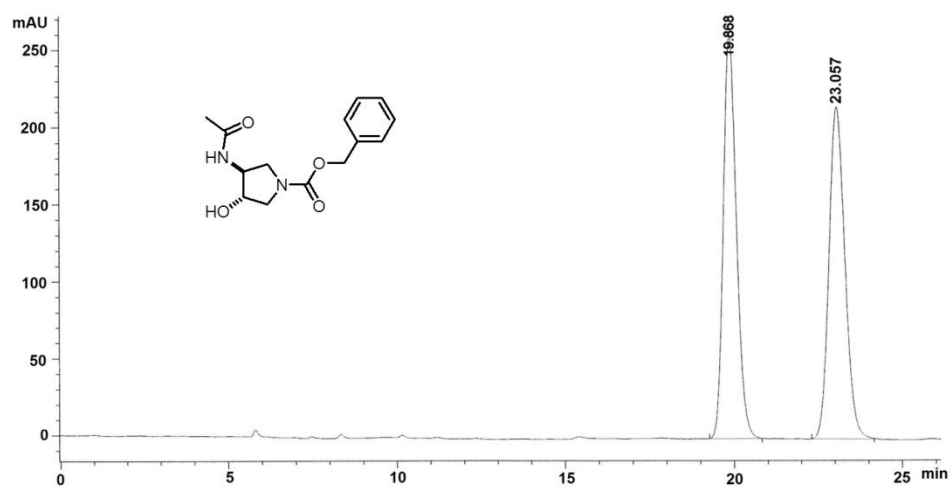
IV.3 DETERMINACIÓN DE LOS EXCESOS ENANTIOMÉRICOS

El exceso enantiomérico se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) utilizando varias columnas de relleno quiral, a una longitud de onda de 210 nanómetros, a temperatura de la columna constante, como fase móvil mezclas *n*-hexano/isopropanol o *n*-hexano/etanol en diferentes proporciones y un flujo de 0,8 mL/min. En todos los casos, la inyección de la muestra se realizó con 20 µL de una disolución de sustrato a medir en la misma mezcla de elución. Las columnas utilizadas, la mezcla de eluyentes empleados y las diferentes temperaturas usadas dependen de los sustratos y de los productos que se analizan. Estas condiciones se describen a continuación para los distintos sustratos y productos.

Las mezclas racémicas de los compuestos *trans*-(±)-3-amino-1-benciloxicarbonil-4-hidroxipirrolidina *trans*-(±)-**39**, *trans*-(±)-3-acetamido-4-acetoxi-1-benciloxicarbonilpirrolidina *trans*-(±)-**41** y *trans*-(±)-3-acetamido-1-benciloxicarbonil-4-hidroxipirrolidina *trans*-(±)-**40** se pueden separar utilizando una columna de relleno quiral Chiralpak OJ-H (0.46 cm de diámetro y 25 cm de longitud), a una temperatura de la columna de 40°C y como eluyente una mezcla *n*-hexano/etanol 93:7.

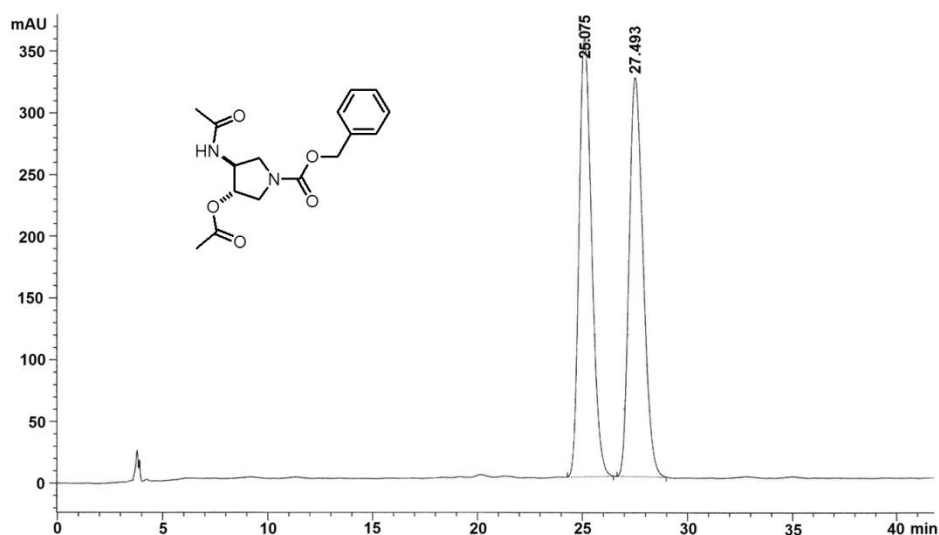


Cromatograma IV.1: HPLC para la mezcla racémica *trans*-(±)-39.



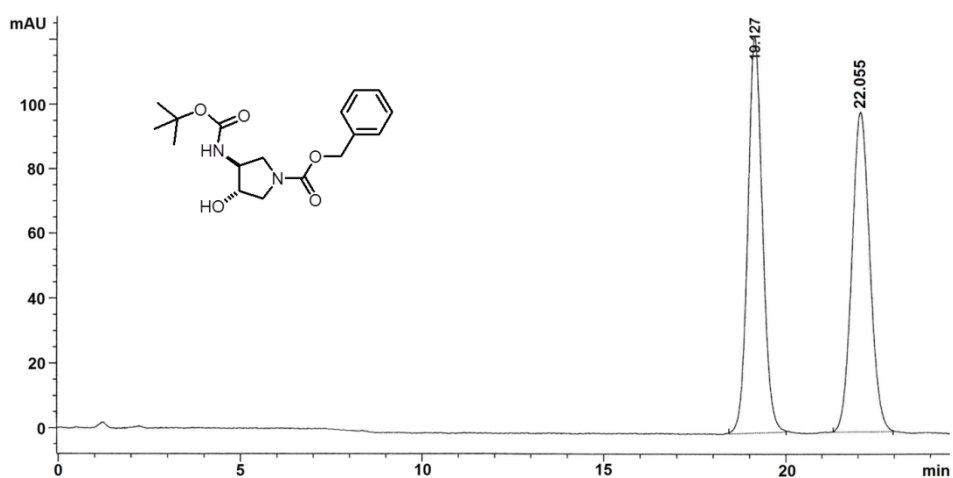
Cromatograma IV.2: HPLC para la mezcla racémica *trans*-(±)-40.

Resultados y discusión

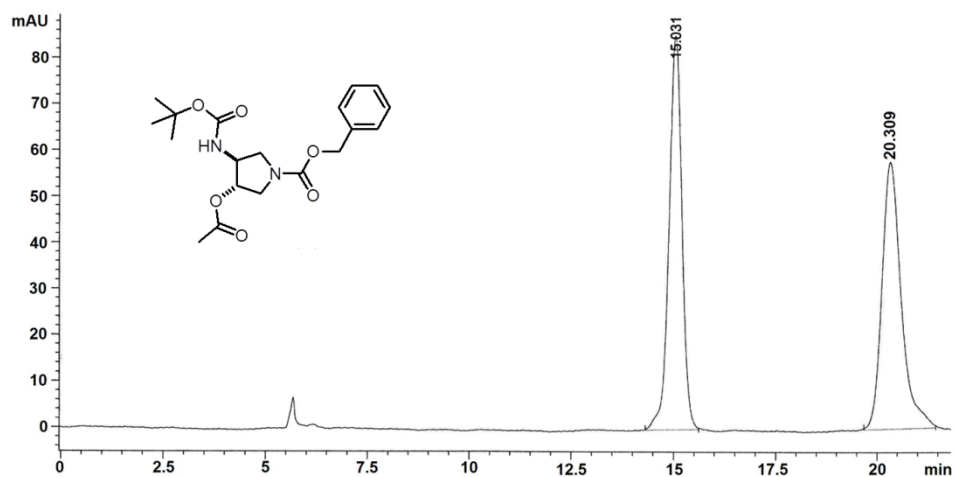


Cromatograma IV.3: HPLC para la mezcla racémica *trans*-(±)-41.

Las mezclas racémicas de los compuestos *trans*-(±)-4-acetoxi-1-benciloxicarbonil-3-*tert*-butoxicarbonioaminopirrolidina, *trans*-(±)-43 y *trans*-(±)-1-benciloxicarbonil-3-*tert*-butiloxicarbonilamino-4-hidroxi-pirrolidina, *trans*-(±)-42 se pueden separar utilizando una columna de relleno quiral Chiralpak IA (0.46 cm de diámetro y 25 cm de longitud), a una temperatura de la columna de 30°C y como eluyente una mezcla *n*-hexano/etanol 91:9.

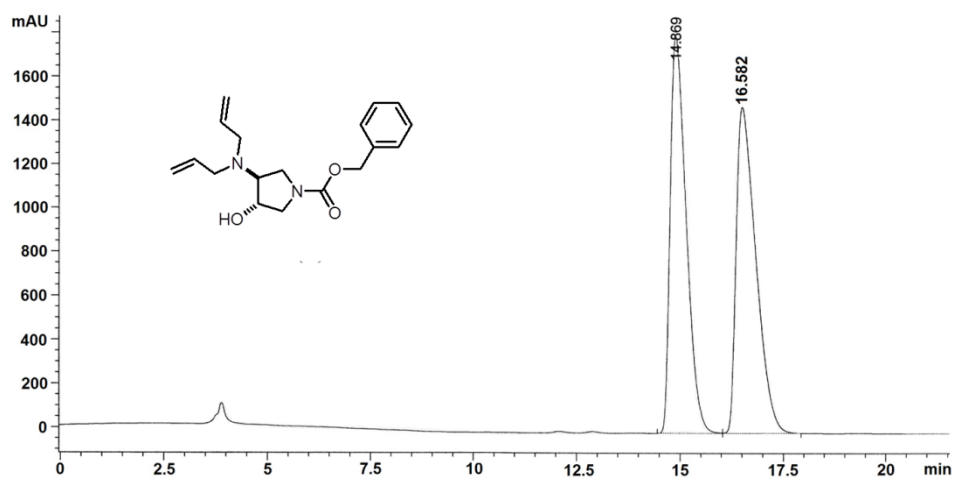


Cromatograma IV.4: HPLC para la mezcla racémica *trans*-(±)-42.



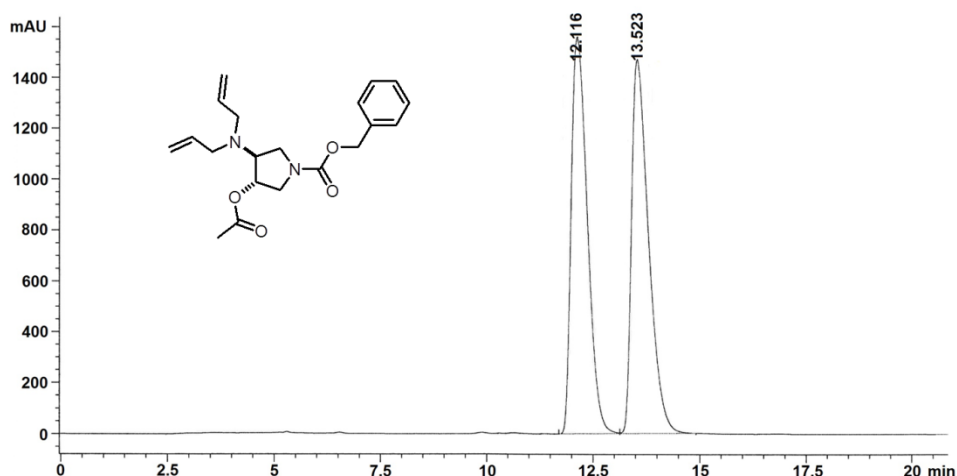
Cromatograma IV.5: HPLC para la mezcla racémica *trans*-(±)-**43**.

Las mezclas racémicas de los compuestos *trans*-(±)-1-benciloxicarbonil-3-dialilamino-4-hidroxipirrolidina *trans*-(±)-**44** y *trans*-(±)-4-acetoxi-1-benciloxicarbonil-3-dialilaminopirrolidina *trans*-(±)-**45** se pueden separar utilizando una columna de relleno quiral Chiralpak OJ-H (0.46 cm de diámetro y 25 cm de longitud), a una temperatura de la columna de 30°C y como eluyente una mezcla n-hexano/isopropanol 94:6.



Cromatograma IV.6: HPLC para la mezcla racémica *trans*-(±)-**44**.

Resultados y discusión

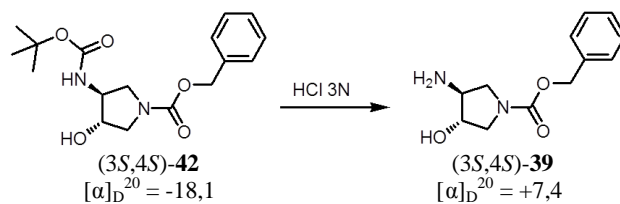


Cromatograma IV.7: HPLC para la mezcla racémica *trans*-(±)-45.

IV.4 ASIGNACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA

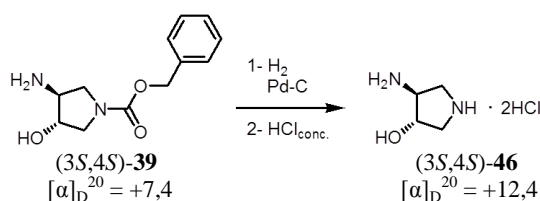
El dihidrocloruro del compuesto (3*R*,4*R*)-4-amino-3-hidroxipirrolidina, (3*R*,4*R*)-46, se encuentra descrito en la bibliografía¹⁵⁹ y su rotación específica es $[\alpha]_D^{20} = -14,6$ ($c = 1,08$; H₂O), esto permitió determinar la configuración absoluta de los productos obtenidos por procesos de acilación enzimática mediante una serie de desprotecciones para llegar al producto descrito.

El sustrato remanente *trans*-42, enantiopuro y con un $[\alpha]_D^{20} = -18,1$ ($c = 1$, CH₂Cl₂), obtenido en la reacción de acilación enzimática (esquema IV.16) se trató con una disolución de ácido clorhídrico durante un día para obtener así el aminoalcohol *trans*-39 enantiopuro al que se le midió un $[\alpha]_D^{20} = +7,4$ ($c = 1$, CH₂Cl₂), tal y como se muestra en el esquema IV.15 de reacción.



Esquema IV.22: Desprotección de (3*S*,4*S*)-8.

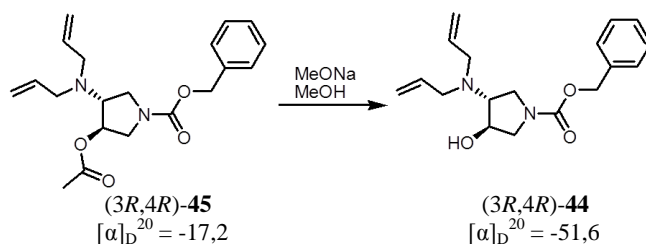
La posterior desprotección del aminoalcohol *trans*-**39**, obtenido anteriormente, mediante hidrogenación con paladio sobre carbono seguida de la formación del clorhidrato mediante la adición de $\text{HCl}_{\text{conc.}}$, permite obtener el producto *trans*-**46** cuya rotación específica es $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +12,4$ ($c = 0,5$; H_2O), por lo que se puede determinar que su configuración absoluta es (3*S*,4*S*), y por lo tanto la de los sustratos precusores en cada uno de los pasos de desprotección.



Esquema IV.23: Desprotección de (3*S*,4*S*)-5.

De esta manera se puede concluir que el sustrato remanente *trans*-**42** tiene configuración absoluta (3*S*,4*S*) y por lo tanto el producto de la acilación enzimática *trans*-**43** posee configuración absoluta (3*R*,4*R*).

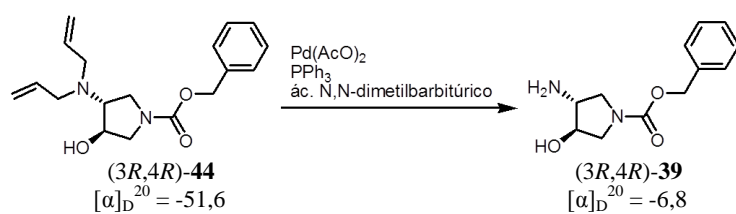
En lo que se refiere al producto de la reacción de acilación enzimática (esquema IV.17) *trans*-**45**, enantiopuro y con un $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -17,2$ ($c = 1$, CH_2Cl_2), se trató con una disolución de metóxido de sodio en metanol con el objetivo de hidrolizar el grupo acetilo para obtener el compuesto *trans*-**44**, enantiopuro y cuya rotación específica es $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -51,6$ ($c = 1$, CH_2Cl_2).



Esquema IV.24: Hidrólisis no enzimática de (3*R*,4*R*)-45.

La posterior eliminación de los dos grupos alilo en el dialilaminoalcohol *trans*-**44**, obtenido anteriormente, se realizó con acetato de paladio, trifenilfosfina y ácido *N,N*-dimetilbarbitúrico. El producto obtenido *trans*-**39** muestra una rotación específica $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -6,8$ ($c = 0,5$; CH_2Cl_2), por lo que su configuración absoluta es (3*R*,4*R*).

Resultados y discusión



Esquema IV.25: Desprotección de $(3R,4R)$ -**44**.

Por lo tanto el producto *trans*-**45** tiene configuración absoluta $(3R,4R)$. Esto indica que tanto la CAL-B como la PSL-IM cataliza sus correspondientes reacción de acilación preferentemente sobre el enantiómero $(3R,4R)$, mostrando la misma enantioselectividad.

CONCLUSIONES

En este capítulo se ha estudiado la síntesis y resolución de trans-3,4-aminohidroxipirrolidinas mediante acilación e hidrólisis enzimática. El proceso de acilación es mucho más eficaz para la obtención de estas pirrolidinas de forma enantiopura.

*Por un lado, la lipasa de candida antarctica tipo B permite la acilación enzimática enantioselectiva de la trans-(±)-1-benciloxycarbonil-3-terc-butiloxycarbonilamino-4-hidroxipirrolidina, trans-(±)-**42**, para obtener el derivado acilado (3R,4R)-4-acetoxi-1-benciloxycarbonil-3-terc-butiloxycarbonilaminopirrolidina, (3R,4R)-**43** con elevada enantioselectividad.*

*De la misma manera, la acetilación con la lipasa de pseudomonas cepacia IM de la trans-(±)-1-benciloxycarbonil-3-dialilamino-4-hidroxipirrolidina, trans-(±)-**44**, permite obtener el producto (3R,4R)-4-acetoxi-1-benciloxycarbonil-3-dialilaminopirrolidina (3R,4R)-**45**, con excelente enantioselectividad.*

Por otra parte, las desprotecciones selectivas que se han realizado con el fin de asignar la configuración absoluta en las reacciones enzimáticas muestra la versatilidad de estos productos para su posterior acoplamiento en distintas estructuras de fármacos u otras moléculas de interés.

PARTE EXPERIMENTAL

IV.5 REACTIVOS Y DISOLVENTES

Los reactivos utilizados fueron suministrados por Aldrich o Alfa, sin ser necesarios tratamientos previos de purificación.

Los disolventes empleados fueron sometidos previamente a un tratamiento de secado y almacenamiento en atmosfera de nitrógeno. En el caso del diclorometano y del acetonitrilo el agente desecante fue el hidruro cálcico, la piridina se destiló sobre hidróxido sódico y el 1,4-dioxano, tetrahidrofurano, tolueno y *terc*-butilmetileter fueron tratados con sodio en presencia de benzofenona como indicador. Los disolventes para HPLC fueron adquiridos a Romil y a J. T. Baker.

La lipasa tipo A de *Candida antarctica* (Immobilized Lipase NZL-101; CAL-A; 6,2U/g utilizando etillaureato, 1-butanol, isoctano a 30°C) fue suministrada por Codexis. La lipasa de tipo B de *Candida antárctica* (Novozym 435, CAL-B, 7300PLU/g) fue donada por Novo Nordisk Co. La lipasa *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre tierras de diatomita (PSL-IM, 783 U/g) fue adquirida a Amano Pharmaceutical Co. La lipasa de *Pseudomonas cepacia* en forma de polvo fijada sobre diatomita (PSL-SD, 24700 U/g) fue suministrada por Amano Pharmaceutical Co.

IV.6 TECNICAS DE ANÁLISIS

Las cromatografías en capa fina (CCF) se realizan sobre un soporte de cromatofolios de gel de sílice 60 de 0.25 mm de espesor que incorporan un revelador de ultravioleta comercializado por Merck.

Las cromatografías en columna fueron realizadas sobre gel de sílice 60 (230-400 mesh) adquirido a Merck. Como eluyente se utiliza mezclas de disolventes, en las proporciones que se indican en los apartados correspondientes a los datos experimentales de cada compuesto.

Los análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se llevaron a cabo en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 1100, LC/MSD con detector UV a 210 nm. Se han empleado las columnas con relleno quiral CHIRALPAK IA y OJ-H, y mezclas de eluyentes hexano/isopropanol y hexano/etanol.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) y carbono (^{13}C -RMN) así como las secuencias de pulsos adecuadas para realizar experimentos DEPT se realizaron en los espectrómetros Bruker AC-300 DPX (^1H 300.13 MHz y ^{13}C 75.5 MHz). Se usan como disolventes cloroformo deuterado o metanol deuterado. Los desplazamientos químicos (δ) se dan en valores de partes por millón (ppm) relativas al disolvente utilizado y las constantes de acoplamiento (J) en hertzios (Hz). En la descripción de los espectros utilizaremos las siguientes abreviaturas: s = singulete, sa = singulete ancho, d = doblete, dd = doble doblete, t = triplete, m = multiplete y ma = multiplete ancho.

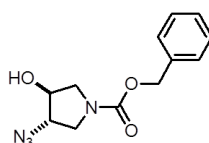
Los puntos de fusión se han medido con un aparato Gallenkamp en capilar abierto y no están corregidos.

Para la medida de la rotación específica se utilizó un polarímetro Perkin-Elmer 343.

Los espectros de infrarrojo se registran en un espectrómetro UNICAM Mattson 3000 FT, preparando las muestras como pastillas en KBr para los productos sólidos, o puros en ventanas de NaCl. Las bandas de tensión se indican en valores de $\nu_{\text{máx}}$ en cm^{-1} .

Los espectros de masas se realizan en un equipo LC-MS HP 1100 series, utilizando electrospray (ESI) como fuente de ionización. Los valores están referidos a unidades de masa atómica (uma).

IV.7 PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS

IV.7.1 Síntesis de trans-(±)-3-azido-1-benciloxycarbonil-4-hidroxipirrolidina, trans-(±)-38

A una disolución del oxido de 1-benciloxycarbonil-3-pirrolina **34** (1,2 g; 6,5 mmol) en 22,5 mL de dioxano se le añaden 4,5 mL de agua destilada. A continuación se adicionan 1335 mg (20,5 mmol) de azida de sodio y la mezcla resultante se agita durante 24 h a 100°C en un tubo sellado. Transcurrido este tiempo se adicionan 20mL de agua y se extrae tres veces con 20 mL de acetato de etilo. Se lava la fase orgánica resultante con 20 mL de una disolución saturada de cloruro sódico. Se seca la fase orgánica con sulfato sódico anhidro, se filtra y se lleva a sequedad. El crudo resultante se purifica por cromatografía de columna en sílica gel utilizando como eluyente hexano/acetato de etilo 7:3 para obtener trans-(±)-**38** como aceite incoloro con un rendimiento del 80%.

Fórmula empírica: C₁₂H₁₄N₄O₃

Peso molecular: 262.26 g/mol

IR: 3407, 2104, 1683 cm⁻¹

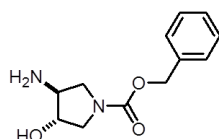
¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.40-7.30 (m, 5H, Ph), 5.13 (s, 2H, CH₂), 4.21 (sa, 1H, OH) 3.96-3.92 (m, 1H, CH), 3.77-3.72 (m, 1H, CH), 3.66-3.60 (m, 1H, CH₂), 3.53-3.41 (m, 3H, CH₂)

¹³C-RMN:(CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm), la señal con asterisco pertenece al conformero menos abundante: 154.96 (CO), 136.20 (C), 128.42 (CH), 128.04 (CH), 127.73 (CH), 73.83*/72.99 (CH), 67.17 (CH₂), 65.23/64.64* (CH), 51.96/51.91* (CH₂), 48.68*/48.49 (CH₂)

HRMS-ESI⁺: calculado para C₁₂H₁₄N₄NaO₃ (M+Na)⁺ m/z 285.0958 encontrado 285.0962

Parte experimental

IV.7.2 Síntesis de trans-(±)-3-amino-1-benciloxycarbonil-4-hidroxipirrolidina, trans-(±)-39



A una disolución de *trans*-(±)-**38** (1 g; 3,48 mmol) en 38 mL de metanol se le añade 2g (7,6 mmol) de trifenilfosfina. Una vez disuelta la trifenilfosfina se le adicionan 137 μ L (7,6 mmol) de agua destilada. La mezcla se agita a 70°C durante 24 h. A continuación, se lleva la reacción a sequedad y el residuo se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice usando acetato de etilo/metanol 4:1 como eluyente para obtener el producto *trans*-(±)-**39** como un aceite viscoso incoloro con un rendimiento del 84%.

Fórmula empírica: C₁₂H₁₆N₂O₃

Peso molecular: 236.27 g/mol

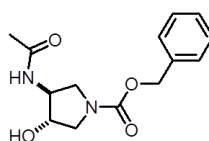
IR: 3351, 3292, 1696 cm⁻¹

¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.35-7.29 (m, 5H, Ph), 5.11 (s, 2H, CH₂), 3.94-3.91 (m, 1H, CH), 3.75-3.69 (m, 2H, CH₂), 3.36-3.30 (m, 2H, CH₂), 3.18-3.11 (m, 1H, CH), 2.29 (sa, 3H, NH₂, OH)

¹³C-RMN:(CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm), la señal con asterisco pertenece al conformero menos abundante: 155.19 (CO), 136.69 (C), 128.49 (CH), 128.03 (CH), 127.88 (CH), 76.26*/65.61 (CH), 66.95 (CH₂), 57.50/56.89* (CH), 51.85 (CH₂), 51.49 (CH₂)

HRMS-ESI⁺: calculado para C₁₂H₁₆N₂NaO₃ (M+Na)⁺ m/z 259.1053 encontrado 259.1043

IV.7.3 Síntesis de trans-(±)-3-acetamido-1-benciloxycarbonil-4-hidroxipirrolidina, trans-(±)-40



Se disuelve el *trans*-(±)-**39** (227 mg; 0,96 mmol) en 5 mL de acetato de vinilo y se agita durante 24h a 30°C. A continuación, se lleva a sequedad y el residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice usando como eluyente acetato de etilo para obtener el producto *trans*-(±)-**40** como un sólido blanco, con un rendimiento del 69%.

Fórmula empírica: C₁₄H₁₈N₂O₄

Peso molecular: 278.30 g/mol

IR: 3244, 1702, 1647 cm⁻¹

¹H-RMN: (MeOD, 300.13MHz), δ (ppm): 7.41-7.30 (m, 5H, Ph), 5.15 (s, 2H, CH₂), 4.15 (s, 2H, CH, OH), 3.80-3.72 (m, 1H, CH₂), 3.65-3.58 (m, 1H, CH₂), 3.41-3.32 (m, 3H, CH y CH₂), 1.94 (s, 3H, CH₃)

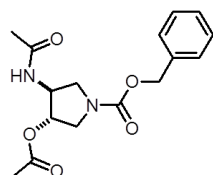
¹³C-RMN:(MeOD, 75.5MHz), δ (ppm), la señal con asterisco pertenece al conformero menos abundante: 171.88 (CO), 155.42 (CO), 136.70 (C), 128.13 (CH), 127.73 (CH), 127.57 (CH), 73.34*/72.43 (CH), 66.76 (CH₂), 55.87/55.09* (CH), 51.60 (CH₂), 48.83 (CH₂), 21.05 (CH₃)

HRMS-ESI⁺: calculado para C₁₄H₁₈N₂NaO₄ (M+Na)⁺ m/z 301.1159 encontrado 301.1176

Punto de fusión: 158,6-160,1°C

Parte experimental

IV.7.4 Síntesis de trans-(±)-3-acetamido-4-acetoxi-1-benciloxycarbonilpirrolidina, trans-(±)-41



A una disolución de *trans*-(±)-**39** (1 g; 4,23 mmol) en 50 mL de diclorometano seco se le añaden 1,7 mL (21,15 mmol) de piridina seca; 1,5 mL (21,15 mmol) de cloruro de acetilo y se agita durante 12h a temperatura ambiente. A continuación, la reacción se lava tres veces con 50 mL de una disolución de ácido clorhídrico 1N, la fase orgánica se seca con sulfato sódico anhidro, se filtra y se lleva a sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice usando acetato de etilo como eluyente para obtener el producto *trans*-(±)-**41** como un sólido blanco con un rendimiento del 75%.

Fórmula empírica: C₁₆H₂₀N₂O₅

Peso molecular: 320.34 g/mol

IR: 1743, 1707, 1683 cm⁻¹

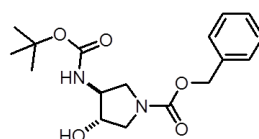
¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.37-7.30 (m, 5H, Ph), 6.61 (sa, 1H, NH), 5.15-5.01 (m, 3H, CH, CH₂), 4.37 (sa, 1H, CH), 3.84-3.70 (m, 2H, CH₂), 3.48-3.35 (m, 2H, CH₂), 2.05 (s, 3H, CH₃), 1.95 (s, 3H, CH₃)

¹³C-RMN: (CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm), la señal con asterisco pertenece al conformero menos abundante: 169.18 (CO), 153.70 (CO), 135.11 (C), 127.48 (CH), 127.16 (CH), 126.85 (CH), 74.48/73.52* (CH), 66.14 (CH₂), 52.47/51.69* (CH), 48.67 (CH₂), 21.89 (CH₃), 19.85 (CH₃)

HRMS-ESI⁺: calculado para C₁₆H₂₀N₂NaO₅ (M+Na)⁺ m/z 343.1264 encontrado 343.1271

Punto de fusión: 119.1-121.3°C

IV.7.5 Síntesis de *trans*-(±)-1-benciloxicarbonil-3-*tert*-butoxicarbonilamino-4-hidroxipirrolidina, *trans*-(±)-42



A una disolución de *trans*-(±)-**39** (300 mg; 0,89 mmol) en 12 mL de diclorometano seco se le añaden 360 mg (1,64 mmol) de di-*tert*-butoxidicarbonato y se agita durante 24h a temperatura ambiente. A continuación, la reacción se lleva a sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice usando hexano/acetato de etilo 1:1 como eluyente para obtener el producto *trans*-(±)-**42** como un sólido blanco con un rendimiento del 87%.

Fórmula empírica: C₁₇H₂₄N₂O₅

Peso molecular: 336.38 g/mol

IR: 3323, 1682 cm⁻¹

¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.36-7.30 (m, 5H, Ph), 5.12 (s, 2H, CH₂), 4.21 (sa, 1H, CH), 3.93-3.80 (m, 2H, CH, CH₂), 3.71-3.66 (m, 1H, CH₂), 3.44-3.27 (m, 2H, CH₂), 1.43 (s, 9H, CH₃)

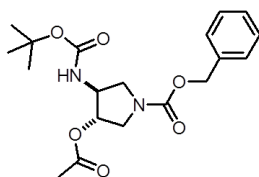
¹³C-RMN:(CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm), la señal con asterisco pertenece al conformero menos abundante: 156.09 (CO), 154.84 (CO), 136.43 (C), 128.38 (CH), 127.95 (CH), 126.80 (CH), 80.37 (C) 74.80*/73.68 (CH), 66.94 (CH₂), 57.06*/56.54 (CH), 51.16 (CH₂), 49.14 (CH₂), 28.21 (CH₃)

HRMS-ESI⁺: calculado para C₁₇H₂₄N₂NaO₅ (M+Na)⁺ m/z 359.1577 encontrado 359.1589

Punto de fusión: 139.9-141.6°C

Parte experimental

IV.7.6 Síntesis de *trans*-(±)-4-acetoxi-1-benciloxycarbonil-3-*tert*-butoxicarbonilaminopirrolidina, *trans*-(±)-**43**



A una disolución de *trans*-(±)-**42** (200 mg; 0,59 mmol) en 6 mL de diclorometano seco se le añaden 410 μ L (2,95 mmol) de trietilamina seca, 210 μ L (2,95 mmol) de cloruro de acetilo y se agita durante 12h a temperatura ambiente. A continuación, la reacción se lleva a sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice usando hexano/acetato de etilo 4:1 como eluyente para obtener el producto *trans*-(±)-**43** como un sólido blanco con un rendimiento del 60%.

Fórmula empírica: C₁₉H₂₆N₂O₆

Peso molecular: 378.42 g/mol

IR: 1744, 1719, 1706 cm⁻¹

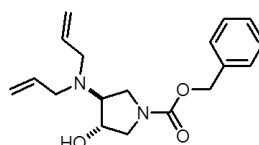
¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.36-7.31 (m, 5H, Ph), 5.12 (s, 3H, CH, CH₂), 4.90 (sa, 1H, NH), 4.15-4.08 (m, 1H, CH), 3.80-3.73 (m, 2H, CH₂), 3.50-3.35 (m, 2H, CH₂), 2.06 (s, 3H, CH₃), 1.43 (s, 9H, CH₃)

¹³C-RMN:(CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm): 170.01 (CO), 154.83 (CO), 154.60 (CO), 136.31 (C), 128.40 (CH), 128.02 (CH), 127.90 (CH), 85.05 (C) 75.79 (CH), 67.02 (CH₂), 60.27 (CH₂), 49.84 (CH₂), 28.16 (CH₃), 27.29 (CH), 20.80 (CH₃)

HRMS-ESI⁺: calculado para C₁₉H₂₆N₂NaO₆ (M+Na)⁺ m/z 401.1683 encontrado 401.1684

Punto de fusión: 105.8-109.9°C

IV.7.7 Síntesis de *trans*-(±)-1-benciloxycarbonil-3-dialilamino-4-hidroxi-pirrolidina, *trans*-(±)-**44**



A una disolución de **34** (3,2 g; 14,6 mmol) en 35 mL de metanol se le añaden 3,0 g (30,6 mmol) de dialilamina. Se agita durante 48h a 90°C en un tubo sellado. A continuación, la reacción se lleva a sequedad. El residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice usando como eluyente hexano/acetato de etilo 1:1 para obtener el producto *trans*-(±)-**44** como un aceite amarillento con un rendimiento del 71%.

Fórmula empírica: C₁₈H₂₄N₂O₃

Peso molecular: 316.39 g/mol

IR: 3422, 1703 cm⁻¹

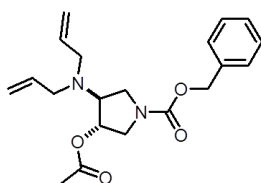
¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.35 (sa, 5H, Ph), 5.89-5.76 (m, 2H, CH), 5.23-5.12 (m, 6H, CH₂), 4.29-4.22 (m, 1H, CH), 3.91-3.61 (m, 3H, CH, CH₂), 3.42-3.09 (m, 6H, CH₂), 2.58 (sa, 1H, OH)

¹³C-RMN:(CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm), la señal con asterisco pertenece al conformero menos abundante: 154.83 (CO), 136.60 (C), 135.43 (CH), 128.37 (CH), 127.89 (CH), 127.74 (CH), 117.67 (CH₂), 71.27/70.66* (CH), 68.81 (CH₂), 66.65*/66.07 (CH), 55.40 (CH), 54.84 (CH), 53.54 (CH₂), 51.15 (CH₂), 50.71 (CH₂), 47.33 (CH₂), 44.81 (CH₂)

HRMS-ESI⁺: calculado para C₁₈H₂₅N₂O₃ (M+H)⁺ m/z 317.1860 encontrado 317.1868

Parte experimental

IV.7.8 Síntesis de trans-(±)-4-acetoxi-3-dialilamino-1-benciloxycarbonilpirrolidina, trans-(±)-45



A una disolución de *trans*-(±)-**44** (300 mg; 0,95 mmol) en 10 mL de diclorometano seco se le añaden 660 μ L (4,75 mmol) de trietilamina seca, 338 μ L (4,75 mmol) de cloruro de acetilo y se agita durante 12h a temperatura ambiente. A continuación, la reacción se lleva a sequedad y el residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice usando hexano/acetato de etilo 4:1 como eluyente para obtener el producto *trans*-(±)-**45** como un aceite incoloro con un rendimiento del 70%.

Fórmula empírica: C₂₀H₂₆N₂O₄

Peso molecular: 358.43 g/mol

IR: 1742, 1711 cm⁻¹

¹H-RMN: (CDCl₃, 300.13MHz), δ (ppm): 7.42-7.33 (m, 5H, Ph), 5.79-5.74 (m, 2H, CH), 5.21-5.12 (m, 6H, CH₂), 3.90-3.84 (m, 1H, CH), 3.66-3.17 (m, 9H, CH, CH₂), 2.06 (s, 3H, CH₃)

¹³C-RMN:(CDCl₃, 75.5MHz), δ (ppm), la señal con asterisco pertenece al conformero menos abundante: 170.22 (CO), 154.53 (CO), 136.52 (C), 135.33 (CH), 128.38 (CH), 127.94 (CH), 127.85 (CH), 117.50 (CH₂), 74.11/73.15* (CH), 66.88 (CH₂), 64.29*/63.35 (CH), 53.26 (CH₂), 50.01 (CH₂), 46.54 (CH₂), 20.89 (CH₃)

HRMS-ESI⁺: calculado para C₂₀H₂₇N₂O₄ (M+H)⁺ m/z 359.1965 encontrado 359.1990

IV.7.9 Procedimiento general para la acilación enzimática

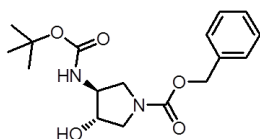
A una disolución de 25 mg de sustrato en 1 mL del disolvente utilizado en cada caso (0,8 mL para las reacciones con *trans*-(±)-**42** o *trans*-(±)-**44**,) y en presencia de la lipasa se le añade el agente de acilación (por lo general 5 equivalentes respecto al sustrato). La reacción se incuba a 30°C con agitación orbital a 250 rpm y se sigue por HPLC usando las condiciones indicadas en la sección IV.3 “Resultados y discusión” (páginas de la 242 a la 246) hasta conseguir la conversión deseada. Una vez finalizada la reacción, el enzima se separa por filtración y se lava con el correspondiente disolvente orgánico. Se evapora el disolvente y posteriormente se separa el sustrato remanente y el producto de acilación mediante cromatografía de columna de gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla de acetato de etilo/metanol 4:1 para la acilación de *trans*-(±)-**5**, acetato de etilo para la acilación de *trans*-(±)-**6** y una mezcla de hexano/acetato de etilo 1:1 en la acilación de *trans*-(±)-**8** o de *trans*-(±)-**10**.

IV.7.10 Procedimiento general para la hidrólisis enzimática

A una disolución de *trans*-(±)-**41**, de *trans*-(±)-**43** o de *trans*-(±)-**45** (25 mg) en 0,8 mL del disolvente correspondiente y en presencia de la lipasa (25 ó 50 mg) se le añade la cantidad de agua indicada en cada caso y se incuba (por lo general a 30°C) con agitación orbital a 250 rpm. La reacción se sigue por HPLC usando las condiciones indicadas en la sección IV.3 “Resultados y discusión” (páginas de la 242 a la 246) hasta conseguir la conversión deseada. Una vez finalizada, se separa el enzima por filtración y se lava con el correspondiente disolvente orgánico. Se evapora el disolvente y se separa el sustrato remanente del producto hidrolizado mediante cromatografía de columna de gel de sílice utilizando como eluyente acetato de etilo para la hidrólisis de *trans*-(±)-**41** y una mezcla de hexano/acetato de etilo 1:1 en la hidrólisis de *trans*-(±)-**43** o de *trans*-(±)-**45**.

Parte experimental

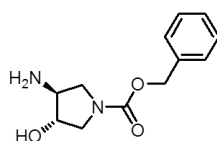
IV.7.11 Preparación de (3*S*,4*S*)-1-benciloxycarbonil-3-*tert*-butoxicarbonilamino-4-hidroxipirrolidina, (3*S*,4*S*)-42



A una disolución de *trans*-(±)-**42** (189 mg; 0,56) en 6 mL de 1,4-dioxano en presencia de 190 mg CAL-B se le añade la 258 μ L (2,8 mmol) acetato de vinilo y se incuba a la temperatura de 30°C con agitación orbital a 250 rpm. La reacción se sigue por HPLC utilizando columna de relleno quiral (Chiralpak IA, 0,46 cm de diámetro y 25 cm de longitud), a una longitud de onda de 210 nanómetros, a 30°C y como fase móvil una mezcla *n*-hexano/etanol 91:9 a un flujo de 0,8 mL/min. Se detiene la reacción al conseguir una conversión del 52%. A continuación, se separa el enzima por filtración y se lava con 1,4-dioxano. Se evapora el disolvente y posteriormente se purifica por cromatografía de columna de gel de sílice utilizando como eluyente hexano/acetato de etilo 1:1.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = - 18.1 \text{ (c = 1, CH}_2\text{Cl}_2, ee > 99\%)$$

IV.7.12 Preparación de (3*S*,4*S*)-3-amino-1-benciloxycarbonil-4-hidroxipirrolidina, (3*S*,4*S*)-39

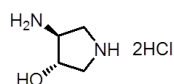


Una disolución de (3*S*,4*S*)-**42** (100 mg; 0,30 mmol) en 4 mL de una disolución de HCl 3N se agita a temperatura ambiente durante 24h. Transcurrido este tiempo la reacción se extrae dos veces con 4mL de diclorometano, la fase acuosa resultante se lleva a pH básico utilizando una disolución de NaOH 4N y se extrae tres veces con 10 mL de diclorometano. La fase orgánica resultante se seca con sulfato sódico anhidro, se filtra y se lleva a sequedad, obteniéndose el producto (3*S*,4*S*)-**5** con un rendimiento del 70%.

$$[\alpha]_D^{20} = + 7.4 \text{ (c = 1, CH}_2\text{Cl}_2, ee > 99\%)$$

Parte experimental

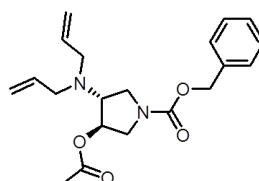
IV.7.13 Preparación de dihidrocloruro de (3*S*,4*S*)-3-amino-4-hidroxipirrolidina, (3*S*,4*S*)-46****



A una disolución de (3*S*,4*S*)-**39** (50 mg; 0,21 mmol) en 2 mL de metanol (que previamente se ha desoxigenado) se le adicionan 10 mg (0,04 mmol) de paladio sobre carbono bajo atmosfera de hidrogeno y se agita a temperatura ambiente durante 7h. Transcurrido este tiempo la reacción se filtra, se la adiciona HCl concentrado y se lleva a sequedad obteniéndose el producto (3*S*,4*S*)-**46** con un rendimiento del 40%.

$$[\alpha]_D^{20} = + 12.4 \text{ (c = 0.5, H}_2\text{O, ee} > 99\%)$$

IV.7.14 Obtención de (3R,4R)-4-acetoxi-3-dialilamino-1-benciloxicarbonilpirrolidina, (3R,4R)-45

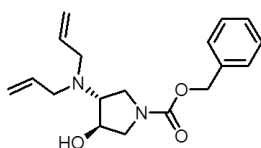


A una disolución de *trans*-(±)-**44** (300 mg; 0,94 mmol) en 10 mL de *tert*-butil metil éter en presencia de 300 mg PSL-IM se le añaden 433 μ L de acetato de vinilo y se incuba a la temperatura de 30°C con agitación orbital a 250 rpm. La reacción se sigue por HPLC utilizando columna de relleno quiral (Chiralpak OJ-H, 0,46 cm de diámetro y 25 cm de longitud), a una longitud de onda de 210 nanómetros, a 30°C y como fase móvil una mezcla *n*-hexano/isopropanol 94:6 a un flujo de 0,8 mL/min. Se detiene la reacción al conseguir una conversión del 48%. Seguidamente, se separa el enzima por filtración y se lava con *tert*-butil metil éter. Se evapora el disolvente y posteriormente se purifica por cromatografía de columna de gel de sílice utilizando como eluyente hexano/acetato de etilo 1:1.

$$[\alpha]_D^{20} = -17.2 \text{ (c = 1, CH}_2\text{Cl}_2, \text{ ee} > 98\%)$$

Parte experimental

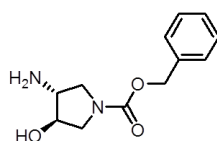
IV.7.15 Preparación de (3*R*,4*R*)-3-dialilamino-1-benciloxycarbonil-4-hidroxipirrolidina, (3*R*,4*R*)-**44**



Se disuelven 46 mg de sodio en 4 mL de metanol y se adicionan sobre el compuesto (3*R*,4*R*)-**45** (145 mg; 0,40 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 4h. Se evapora el disolvente y posteriormente se purifica por cromatografía de columna de gel de sílice utilizando como eluyente hexano/acetato de etilo 1:1 obteniéndose el producto (3*R*,4*R*)-**10** con un rendimiento del 93%.

$$[\alpha]_D^{20} = - 51.6 \text{ (c = 1, CH}_2\text{Cl}_2, \text{ ee} > 98\%)$$

IV.7.16 Preparación de (3*R*,4*R*)-3-amino-1-benciloxycarbonil-4-hidroxi-pirrolidina, *trans*-(3*R*,4*R*)-**39**



Se disuelven (3*R*,4*R*)-**44** (119 mg; 0,38 mmol) en 2 mL de diclorometano bajo atmosfera de nitrógeno y con ayuda de un embudo de adición compensada se adiciona una disolución de acetato de paladio (4 mg; 0,02 mmol) y trifenilfosfina (16 mg; 0,06 mmol) en 2 mL de diclorometano. Se retira el embudo de adición compensada y se adiciona el ácido N,N-dimetilbarbitúrico (178 mg; 1,14 mmol). La mezcla se agita a reflujo durante 48h. Transcurrido este tiempo se lava dos veces con 5 mL de NaOH 3N y una vez mas con 5 mL de una disolución saturada de NaCl. La fase orgánica se seca con sulfato sódico anhidro, se filtra y se lleva a sequedad. Posteriormente se purifica por cromatografía de columna de gel de sílice utilizando como eluyente acetato de etilo/metanol 4:1 obteniéndose el producto (3*R*,4*R*)-**39** con un rendimiento del 80%.

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = - 6.8 \text{ (c = 0.5, CH}_2\text{Cl}_2, \text{ ee} > 98\%)$$