

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA E INORGÁNICA

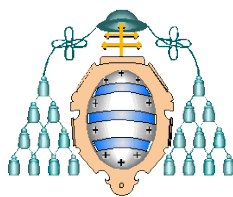
PROGRAMA DE DOCTORADO DE QUÍMICA ORGANOMETÁLICA

**APLICACIONES SINTÉTICAS DE HIDROLASAS Y
OXIDORREDUCTASAS PARA LA PREPARACIÓN DE
COMPUESTOS ORGÁNICOS ÓPTICAMENTE
ACTIVOS. DESARROLLO DE PROCESOS DE
RESOLUCIÓN Y ASIMETRIZACIÓN ENZIMÁTICA**

TESIS DOCTORAL

JUAN MANGAS SÁNCHEZ

MARZO 2013



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA E INORGÁNICA

PROGRAMA DE DOCTORADO DE QUÍMICA ORGANOMETÁLICA

**APLICACIONES SINTÉTICAS DE HIDROLASAS Y
OXIDORREDUCTASAS PARA LA PREPARACIÓN DE
COMPUESTOS ORGÁNICOS ÓPTICAMENTE
ACTIVOS. DESARROLLO DE PROCESOS DE
RESOLUCIÓN Y ASIMETRIZACIÓN ENZIMÁTICA**

Memoria presentada por Juan Mangas Sánchez para optar al grado de Doctor
por la Universidad de Oviedo

*A mis padres
A mi hermana*

“La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante”.
Miguel de Unamuno.

Tras casi 5 años de trabajo en el grupo de Bioorgánica de la Universidad de Oviedo que culminan con esta Tesis Doctoral, muchas han sido las personas a las que me gustaría mostrar mi agradecimiento. Todo este trabajo hubiera sido imposible sin la aportación de muchas personas y entidades que han facilitado el poder llegar hasta aquí.

En primer lugar, a los profesores Vicente Gotor y Vicente Gotor Fernández por haberme dado la oportunidad de pertenecer a este grupo, su excelente dirección y sus consejos tanto a nivel personal como profesional.

A Eduardo Busto. Su ayuda y aporte de ideas han sido cruciales para poder desarrollar los proyectos de investigación aquí expuestos. Muchas gracias.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por la financiación recibida a través de la beca FPU y durante la estancia en el Reino Unido.

I would like to thank as well Gideon Grogan and his group for the warm welcome I received during my internship in York.

A mis compañeros del grupo de Bioorgánica, tanto a los que están como a los que ya se han ido, con los que he compartido estos años, muchas gracias por haber mantenido un gran ambiente de trabajo. Me llevo el mejor recuerdo de cada uno de ellos.

A mis compañeros y amigos del “grupillo”, por tantos momentos de apoyo y consejo tanto dentro como fuera de la facultad.

A los chavales, por estar siempre ahí, a quienes no sé si algún día encontraré la forma de agradecer el cariño, el apoyo y la comprensión recibida tanto en los buenos como en los malos momentos.

Finalmente a mi familia, en especial a mis padres y a mi hermana, porque os debo todo y por ser siempre fuente de apoyo e inspiración. Muchas gracias por los esfuerzos realizados para poder regalarme la mejor herencia que se puede tener. Este libro no es lo suficientemente largo para expresar toda mi gratitud.

Muchas gracias a todos.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

(±)	Mezcla racémica
[α]	Rotación óptica específica
Ac₂O	Anhídrido acético
AcOEt	Acetato de etilo
AcOvin	Acetato de vinilo
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADH-A	Alcohol deshidrogenasa de <i>Rhodococcus ruber</i> DSM 44541
ADH-CP	Alcohol deshidrogenasa de <i>Candida parapsilosis</i>
ADH-LB	Alcohol deshidrogenasa de <i>Lactobacillus brevis</i>
ADH-LK	Alcohol deshidrogenasa de <i>Lactobacillus kefir</i>
ADH-PR2	Alcohol deshidrogenasa de origen desconocido
ADH-RS1	Alcohol deshidrogenasa de <i>Rhodococcus species</i>
ADH-T	Alcohol deshidrogenasa de <i>Thermoanaerobacter species</i>
ADHs	Alcohol deshidrogenasas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADPR	Adenosina 5'-difosforibosa
ADP-Rib	Adenosina 5'-difosforibosa
AK	Lipasa de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Ala	Alanina
Ar	Arilo
Asp	Ácido aspártico
ATP	Adenosina trifosfato
ATPasas	Adenosina trifosfatasa
Bn	Bencilo
Boc₂O	Pirocarbonato de <i>tert</i> -butilo
ⁿBuLi	<i>n</i> -Butil litio
^tBuOK	<i>tert</i> -Butóxido de Potasio
BVMO	Baeyer Villiger monoxigenasas
c	Concentración
c	Grado de conversión
° C	Grado Celsius
CAL-A	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> de tipo A
CAL-B	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> de tipo B
CCL	Lipasa de <i>Candida cylindracea</i>

CG	Cromatografía de gases
CLEA	Agregado enzimático entrecruzado (Cross linked enzyme aggregates)
Cod	1,5-ciclooctadieno
CRL	Lipasa de <i>Candida rugosa</i>
CVL	Lipasa de <i>Chromobacterium viscosum</i>
Cys	Cisteína
DEAD	Azocarboxilato de dietilo
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DIAD	Azocarboxilato de diisopropilo
DIPE	Diisopropil éter
DKR	Resolución cinética dinámica (Dynamic kinetic resolution)
DMAP	4-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)piridina
DME	Dimetoxietano
DMF	(<i>N,N</i>)-Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dvte	Disolvente
DYRKR	Resolución cinética dinámica reductiva (Dynamic reductive kinetic resolution)
<i>E</i>	Razón enantiomérica ó Enantioselectividad
EC	Comisión Enzimática (Enzyme Commission)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>ee</i>	Exceso enantiomérico
<i>ees</i>	Exceso enantiomérico de sustrato
<i>ee_p</i>	Exceso enantiomérico de producto
EI⁺	Ionización por impacto electrónico en modo positivo
ESI⁺	Ionización por electrospray en modo positivo
ESI⁻	Ionización por electrospray en modo negativo
Enz	Enzima
EPA	Agencia de Protección Medioambiental (Environment Protection Agency)
Et	Etilo
EtOH	Etanol
g	Gramos
GDH	Glucosa deshidrogenasa
Gln	Glutamina

Glu	Ácido Glutámico
Gly	Glicina
h	Horas
Hal	Halógeno
¹H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
His	Histidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
Hz	Hertzio
IPA	2-Propanol
IR	Espectroscopía de infrarrojo
KR	Resolución cinética (Kinetic resolution)
KRED	Cetorreductasa
<i>k_{rel}</i>	Constante de velocidad relativa
<i>k_{cat}/K_M</i>	Constante de especificidad
LB	Caldo de Lisogenia (Lysogeny Broth)
LDH	Lactato deshidrogenasa
Leu	Leucina
Lys	Lisina
M	Molaridad
Me	Metilo
MeOH	Metanol
Met	Metionina
MIC	Concentración mínima de inhibición
min	Minutos
mL	Mililitros
MOM	Metoximetiléter
MsCl	Cloruro de Mesilo
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido en forma reducida
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en forma reducida
NEt₃	Trietilamina
NHC	Carbeno <i>N</i> -Heterocíclico
nm	Nanómetros

Nu	Nucleófilo
PAMO	Fenilacetona monoxigenasa
Ph	Fenilo
Phe	Fenilalanina
PLP	Piridoxal fosfato
PPL	Lipasa de páncreas porcino
ppm	Partes por millón
ⁱPr	Isopropilo
PSL	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i>
PSL-C	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> inmovilizada en un soporte cerámico
RML	Lipasa de <i>Rhizormucor miehei</i>
<i>rd</i>	Relación diastereomérica
rpm	Revoluciones por minuto
Sav	Estreptavidina
Ser	Serina
<i>t</i>	Tiempo
T	Temperatura
TA	Transaminasa
t.a.	Temperatura ambiente
TBME	<i>tert</i> -Butilmetil éter (^t BuOMe)
TFA	Ácido Trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
Thr	Treonina
TLC	Cromatografía en capa fina
TLL	Lipasa de <i>Thermomyces lanuginosa</i>
TRIS	Tris-(hidroximetil)aminometano
Tyr	Tirosina
Val	Valina
v/v	Proporción en volumen
U	Unidades enzimáticas

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
0.1 Tipos de enzimas	6
0.1.1. Lipasas	7
0.1.1.1. Lipasa de <i>Candida antarctica</i> de tipo B	9
0.1.1.2. Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i>	10
0.1.1.3. Lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i>	11
0.1.2. Alcohol deshidrogenasas	12
0.1.2.1. Levadura de panadería	15
0.1.2.2. ADH-A de <i>Rhodococcus ruber</i>	16
0.2. Procesos enzimáticos asimétricos en síntesis orgánica	16
0.2.1. Resolución cinética	17
0.2.2. Resolución cinética dinámica	18
0.2.3. Desimetrización	20
0.2.4. Resolución cinética dinámica reductiva	21
0.3. Objetivos generales	22
PARTE I. PREPARACIÓN ESTEREOSELECTIVA DE PRODUCTOS DE INTERÉS FARMACOLÓGICO MEDIANTE PROCESOS BIOCATALÍTICOS	23
I.1. Biocatálisis en la industria	25
I.2. Quiralidad	26
I.3. Ejemplos de síntesis de fármacos mediante métodos biocatalíticos ...	28
I.3.1. Duloxetina	28
I.3.2. Montelukast	29
I.3.3. Sitagliptina	30

ARTÍCULO I. SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA ESTEREOSELECTIVA DEL FÁRMACO RIVASTIGMINA ... 33

I.I.1. Antecedentes	36
I.I.2. Resultados y discusión	37
I.I.1.1. Síntesis de los compuestos racémicos involucrados en la resolución cinética	38
I.I.1.2. Estudio de la resolución cinética	38
I.I.1.3. Estudio de la aplicabilidad industrial del proceso	40
I.I.1.3.1. Estudio del reciclaje del enzima	40
I.I.1.3.2. Escalado de la reacción enzimática	41
I.I.1.3.3. Proceso de resolución cinética dinámica	41
I.I.1.4. Síntesis de la (<i>S</i>)-Rivastigmina a partir de sus precursores	43
I.I.3. Conclusiones	45
I.I.4. “ <i>Chemoenzymatic Synthesis of Rivastigmine Based on Lipase-Catalyzed Processes</i> ”	47

ARTÍCULO II. SÍNTESIS ASIMÉTRICA QUIMIOENZIMÁTICA DE LOS ENANTIÓMEROS DE MICONAZOL Y ECONAZOL. ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA FRENTE A HONGOS Y LEVADURAS..... 55

I.II.1. Antecedentes.....	58
I.II.2. Resultados y discusión.....	59
I.II.2.1. Estudios preliminares y optimización del proceso biocatalítico	59
I.II.2.2. Preparación del (<i>R</i>)-Miconazol y (<i>R</i>)-Econazol.....	62
I.II.2.3. Preparación del (<i>S</i>)-Miconazol y (<i>S</i>)-Econazol	63
I.II.3. Ensayos de actividad biológica.....	65
I.II.4. Conclusiones.....	66
I.II.5. “ <i>Asymmetric synthesis of Miconazole and Econazole enantiomers by using chemoenzymatic methods and their biological evaluation</i> ”	67

PARTE II. PREPARACIÓN ESTEREOSELECTIVA DE DIFERENTES FAMILIAS DE HETEROCICLOS PRESENTES EN PRODUCTOS DE INTERÉS MEDIANTE RUTAS QUIMIOENZIMÁTICAS	75
II.1. 2,3-Dihidrobencofuranos	78
II.2. 3 <i>H</i> -Isobenzofuranonas	80
II.3. 3,4-Dihidroisocumarinas.....	81
II.4. 1,2,3,4-Tetrahidroisoquinolinas.....	82
ARTÍCULO III. SÍNTESIS ESTEREOSELECTIVA DE 2,3-DIHIDROBENZOFURANOS MEDIANTE UN PROCESO DE BIOTRANSFORMACIÓN SEGUIDO DE CICLACIÓN INTRAMOLECULAR	85
II.III.1. Resultados y discusión.....	88
II.III.1.1. Preparación de los compuestos racémicos	88
II.III.1.2. Estudio de resolución cinética y biorreducción	88
II.III.1.3. Preparación del (<i>S</i>)-2-metil-2,3-dihidrobencofurano	90
II.III.1.4. Desarrollo de una síntesis alternativa para la preparación del 2-metil-2,3-dihidrobencofurano	91
II.III.1.5. Ampliación de la metodología al resto de sustratos.....	92
II.III.2. Conclusiones.....	95
II.III.3. “ <i>Straighforward synthesis of enantiopure 2,3-dihydrobenzofurans by a sequential stereoselective biotransformation and chemical intramolecular cyclization</i> ”	97
ARTÍCULO IV. SÍNTESIS ESTEREOSELECTIVA DE 3-METIL ISOBENZOFURAN-1(3 <i>H</i>)-ONAS MEDIANTE MÉTODOS BIOCATALÍTICOS	103
II.IV.1. Resultados y discusión.....	106
II.IV.1.1. Preparación de los productos de partida y finales en forma racémica.....	106

II.IV.1.2. Estudio de biorreducción	107
II.IV.1.3. Estudio de la generalidad del método	109
II.IV.2. Conclusiones.....	111
II.IV.3. <i>“Highly stereoselective chemoenzymatic synthesis of the 3H-Isobenzofuran skeleton. Access to enantiopure 3-Methylphthalides”</i>	113
ARTÍCULO V. PREPARACIÓN DIVERGENTE QUIMIOENZIMÁTICA DE 3-METIL-1,2,3,4- TETRAHIDROISOQUINOLINAS Y 3,4- DIHIDROISOCUMARINAS EN FORMA ENANTIOPURA	117
II.V.1. Resultados y discusión	120
II.V.1.1. Preparación de los compuestos racémicos	120
II.V.1.2. Estudio de resolución cinética del sustrato modelo 2a	121
II.V.1.3. Estudio de biorreducción y preparación de las dihidroisocumarinas en forma enantiopura	122
II.V.1.4. Preparación de las 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolinas en forma enantiopura.....	124
II.V.2. Conclusiones	126
II.V.3. <i>“Enantiopure 3-methyl-3,4-dihydroisocoumarins and 3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines via chemoenzymatic asymmetric transformations”</i>	127
ARTICULO VI. DESARROLLO DE PROCESOS DE RESOLUCIÓN CINÉTICA REDUCTIVA. SÍNTESIS ESTEREOSELECTIVA DE 4-ALQUIL-3-METIL-3,4- DIHIDROISOCUMARINAS	133
II.VI.1. Resultados y discusión.....	136
II.VI.1.1. Síntesis de 4-alkyl-3-methyl-3,4-dihydroisocoumarins. Preparación de los productos racémicos	136
II.V.1.2. Estudio de Resolución Cinética de la cetona (\pm)- 2a	137

Índice

II.V.1.3. Estudio de Resolución Cinética Dinámica Reductiva de la cetona (±)- 2a	138
II.V.1.4. Ampliación de la metodología al resto de sustratos	140
II.V.1.5. Desarrollo del proceso de síntesis “one-pot” de las 3,4- dihidroisocumarinas	142
II.V.1.6. Determinación de la configuración relativa y absoluta de los productos finales	142
II.V.2. Conclusiones	143
II.V.3. “ <i>One-pot synthesis of enantiopure 3,4-dihydroisocumarines through dynamic reductive kinetic resolution processes</i> ”	145
CONCLUSIONES	149
PARTE EXPERIMENTAL	153
REFERENCIAS	159

INTRODUCCIÓN

La Biocatálisis estudia el uso de enzimas (bien sea en forma aislada o células enteras) como catalizadores en reacciones químicas. En esta Tesis Doctoral, se abordará la preparación de diversas familias de compuestos, mediante el empleo de biocatalizadores tanto en medios acuosos como en disolventes orgánicos. La Agencia de Protección Ambiental (EPA) define la “Química Sostenible” como “el diseño de productos químicos que reducen o eliminan el uso de sustancias nocivas”.¹ De este modo, se establecieron 12 principios que cualquier proceso sostenible debe cumplir. Los procesos biocatalíticos satisfacen varios de ellos, como puede ser el uso de cantidades catalíticas de reactivo, condiciones de presión y temperatura ambiente o el uso de materiales biodegradables y reciclables.²

¹ P. J. Dunn. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1452-1461.

² R. A. Sheldon. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1437-1451.

Introducción

El empleo de enzimas para el desarrollo de nuevos procesos se remonta al Antiguo Egipto. Se han encontrado papiros en donde se muestra el uso de microorganismos para preparar cerveza y productos lácteos.³ Sin embargo, es a partir del siglo XIX cuando el empleo de enzimas se comienza a desarrollar desde un punto de vista científico.

En 1833, Payen y Pesoz aislaron un complejo enzimático de la malta y lo nombraron “diastasa”, el cual fue usado dos años más tarde por Berzelius para llevar a cabo la hidrólisis del almidón. A partir de mediados del siglo XIX se comenzaron a estudiar este tipo de procesos en profundidad. De este modo, Louis Pasteur llegó a la conclusión de que la fermentación alcohólica estaba catalizada por “los fermentos” contenidos en las células de la levadura y, en un principio, se pensó que solo funcionaban con organismos vivos. En 1878, William Kühner acuñó el término “enzima”, que viene del griego “en levadura”.

En 1897, Eduard Buchner descubrió que un extracto de células de *Saccharomyces cerevisiae* también era capaz de llevar a cabo la fermentación alcohólica, lo que significa que son sustancias extraídas de la levadura las que realmente catalizan el proceso. Por este hallazgo recibió el premio Nobel de Química en 1907. El uso de enzimas desde un punto de vista industrial comenzó a desarrollarse a principios de siglo XX cuando, en 1913, Röhm desarrolló el primer detergente con enzimas. En 1926, James B. Sumner demostró que los enzimas son proteínas, logrando cristalizar una ureasa.

En 1985, Zaks y Klibanov descubrieron que algunos enzimas eran capaces de llevar a cabo transformaciones en medios no acuosos.⁴ Este hallazgo supuso una auténtica revolución desde un punto de vista sintético, ya que hasta el momento sólo se había podido trabajar en medios acuosos. El hecho de poder trabajar en disolventes orgánicos presenta grandes ventajas ya que permite, entre otras, una mejor solubilidad de los compuestos orgánicos, una sencilla recuperación de los productos finales de reacción, así como favorecer los procesos de deshidratación o esterificación evitando procesos indeseados de hidrólisis o racemización. Se ha demostrado que la desnaturalización de las proteínas en medios orgánicos anhidros apenas ocurre. Como resultado, varias estructuras de proteínas han sido elucidadas en medios orgánicos anhidros. De hecho, la estabilidad de la proteína es menor en disolventes miscibles

³ A. Ghanem. *Tetrahedron* **2007**, 63, 1721-1754.

⁴ A. Zaks, A. M. Klibanov. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 3192-3196.

con el agua ($-2.5 < \log P < 0$), como la acetona, que en disolventes hidrofóbicos ($2 < \log P < 4$), como los alcanos. Las proteínas necesitan una microcapa de agua para mantener su actividad catalítica. En disolventes miscibles con el agua esa capa esencial se disuelve, mientras que en disolventes hidrofóbicos permanece inalterada.⁵

Por otro lado, el medio natural de un enzima es el agua, lo que representa una serie de ventajas a la hora de desarrollar un proceso químico. El agua es un disolvente barato, no inflamable y los residuos generados son menores si los comparamos con los que generan otros disolventes. Sin embargo, su uso en reacciones químicas lleva consigo una serie de inconvenientes como se ha comentado anteriormente.

Los enzimas son unos catalizadores muy selectivos, pudiendo actuar de manera quimioselectiva (preferencia por uno de los grupos funcionales de distinta naturaleza orgánica presentes en una molécula), regioselectiva (capacidad que tienen de reaccionar con un grupo funcional cuando existen varios de éstos en distintas zonas del compuesto) y enantioselectiva (capacidad para discriminar entre los dos enantiómeros de una mezcla racémica).⁶ Además, trabajan en condiciones suaves de reacción (pH, temperatura y presión), siendo biodegradables y reutilizables cuando se encuentran en sus formas inmovilizadas, por lo que son muy atractivos desde el punto de vista económico y ambiental. No obstante, también presentan una serie de desventajas ya que, suelen mostrar una gran especificidad de sustrato, algunas clases de enzimas necesitan un cofactor y/o cosustrato para su correcto funcionamiento, actúan en un determinado intervalo de pH y temperatura fuera del cual no son activos y, por último, pueden presentar problemas de inhibición por sustrato o producto en algunos casos.⁷

Además del descubrimiento de la actividad enzimática en disolventes orgánicos, otro hito que ha propiciado un gran avance en la Biocatálisis es la aplicación de técnicas de ADN recombinante, cuyo desarrollo ha permitido modificar la cadena de aminoácidos de los

⁵ (a) G. Carrea, S. Riva. *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Medium*. Wiley-VCH. Weinheim, **2008**; (b) S. Hazarika, P. Goswami, N. N. Dutta, A. K. Hazarika. *Chem. Eng. J.* **2002**, *85*, 61-68; (c) A. M. Azevedo, D. M. F. Prazeres, J. M. S. Cabral, L. P. Fonseca, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *15*, 147-153; (d) H. Sztajer, H. Lunsdorf, H. Erdmann, U. Menge, R. Schmid. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1124*, 253-261; (e) A. Zaks, A. M. Klibanov. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 3194-3201.

⁶ V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales. *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*. Wiley-VCH. Weinheim, **2008**.

⁷ S. E. Hilner, A. R. Maguire. *Arkivoc* **2012** (*i*), 321-382.

Introducción

enzimas, haciendo que los procesos que catalicen sean más eficientes y se puedan minimizar las limitaciones que presentan.⁸

Una de estas técnicas es la evolución dirigida, que consiste en generar de forma aleatoria una librería de mutantes a partir de un enzima natural. Estos mutantes se expresan en un determinado huésped, realizando a continuación un test enzimático. Aquel biocatalizador que mejores propiedades haya mostrado, vuelve a comenzar el ciclo de mutagénesis, expresión y ensayo, el cual se repite las veces necesarias hasta obtener un biocatalizador con las actividades óptimas. Lo que se pretende mediante esta técnica es generar mutantes ejerciendo una presión evolutiva sobre el sistema. A partir de esta técnica se han generado otras variantes más efectivas, como la mutagénesis de saturación iterativa (ISM), que se centra en mutaciones tan sólo en los aminoácidos que se encuentran más cercanos al centro activo del enzima.⁹

Además de la evolución dirigida, existen otras técnicas de diseño racional. Éstas requieren de un conocimiento profundo tanto de la estructura del enzima como del mecanismo de la biotransformación, por lo que generalmente van acompañados de estudios de modelización molecular. No obstante, pese a su complejidad, se ha llegado incluso a cambiar la estereopreferencia de un enzima con una simple mutación de la secuencia de aminoácidos.¹⁰

0.1. Tipos de enzimas

Tradicionalmente, los enzimas se pueden ordenar según la reacción convencional que catalizan (Tabla 0.1).¹¹ Esto ha permitido clasificar los biocatalizadores en familias, cada uno de los cuales posee un código de cuatro números precedido de EC (Enzyme Commission).

⁸ Algunas revisiones recientes: (a) U. T. Bornscheuer. *Synlett* **2013**, *24*, 150-156; (b) M. B. Quin, C. Schmidt-Dannert. *ACS Catal.* **2011**, *1*, 1017-1021; (c) G. A. Behrens, A. Hummel, S. K. Padhi, S. Schätzle, U. T. Bornscheuer. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2191-2215; (d) S. Lutz. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 734-743; (e) C. Jäckl, D. Hilvert. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 753-759.

⁹ M. T. Reetz. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7530-7548.

¹⁰ (a) M. Svedendahl, C. Brannenby, L. Lindberg, P. Berglund. *ChemCatChem* **2010**, *2*, 976-980; (b) K. Engström, J. Nyhlén, A. G. Sandström, J.-E. Bäckvall. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7038-7042.

¹¹ K. Faber. *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6ª Ed. Springer, Berlin, **2011**.

Tabla 0.1. Clasificación de los enzimas según la reacción que catalizan

Tipo de enzima	Reacción que catalizan
Hidrolasas	Hidrólisis
Oxidorreductasas	Oxidación y reducción
Transferasas	Transferencia de grupos
Liasas	Formación y ruptura de enlaces de forma no hidrolítica
Isomerasas	Isomerización
Ligasas	Formación de enlaces

No obstante, se ha descubierto la capacidad que poseen algunos de ellos para catalizar procesos distintos a su reacción natural (promiscuidad catalítica).¹² Por ejemplo, se ha demostrado la capacidad que poseen algunas lipasas para catalizar la formación de enlaces carbono-carbono, enlaces carbono-heteroátomo, procesos oxidativos o determinadas reacciones hidrolíticas como la hidrólisis de amidas, para lo cual originariamente no habían sido diseñados por la naturaleza.¹³

A lo largo de esta Tesis Doctoral, se han diseñado y optimizado diferentes procesos quimioenzimáticos para la preparación de productos de interés. Por tanto, en este momento se comentará brevemente y de manera general las características de los biocatalizadores utilizados que son, principalmente, las lipasas dentro de la clase de las hidrolasas, y las alcohol deshidrogenasas en el grupo de las oxidorreductasas.

0.1.1. Lipasas

Las lipasas son triacilglicerol hidrolasas y su función natural es catalizar la digestión hidrolítica de los lípidos. Se encuentran en bacterias, hongos, plantas y animales, diferenciándose del resto de hidrolasas por el gran incremento en la actividad catalítica cuando están en una interfase agua/lípido. Este fenómeno es conocido como activación

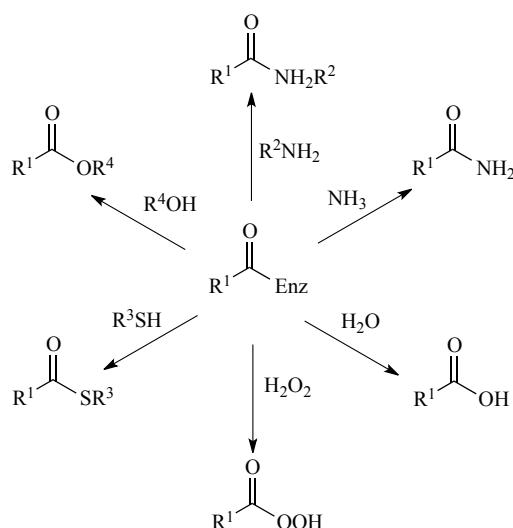
¹² (a) M. S. Humble, P. Berglund. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3391-3401; (b) Q. Wu, B.-K. Liu, X.-F. Lin. *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 1966-1988; (c) K. Hult, P. Berglund. *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 232-238.

¹³ E. Busto, V. Gotor-Fernández. V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504-4523.

Introducción

interfacial.¹⁴ Su interés para la química orgánica reside, fundamentalmente, en la capacidad que tiene el centro activo de estos biocatalizadores para adoptar diferentes conformaciones y aceptar distintos sustratos.

Los enzimas hidrolíticos son los biocatalizadores que mayor versatilidad han mostrado en síntesis orgánica¹⁵ debido a que la mayor parte de ellos muestra una gran actividad en disolventes no acuosos. De esta manera, han sido aplicadas con éxito en la preparación de detergentes, alimentos y productos de alto valor añadido.¹⁶ Esto se debe, principalmente, a que cuando se utilizan en medios orgánicos, su nucleófilo natural (el agua) puede ser reemplazado por otros como alcoholes, peróxidos, amoníaco, aminas, hidracinas o tioles (Esquema 0.1).¹⁷ Estos nucleófilos atacan al complejo acil-enzima formado, mostrando una gran regio- ó estereoselectividad, lo que permite llevar a cabo con éxito una gran cantidad de transformaciones sintéticas.^{1,18}



Esquema 0.1. Reacciones catalizadas por lipasas utilizando distintos nucleófilos.

Las lipasas de *Candida antarctica* de tipo A y B (CAL-A y CAL-B) y de *Pseudomonas cepacia* (PSL) son, con diferencia, las más ampliamente utilizadas como biocatalizadores en procesos de síntesis orgánica. Así, presentan las siguientes ventajas:

1. Disponibilidad comercial a bajo coste.

¹⁴ R. Verger. *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 32-38.

¹⁵ U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas. *Hydrolases in Organic Synthesis*, 2ª Ed. Wiley-VCH, Weinheim **2005**.

¹⁶ V. Gotor- Fernández, R. Brieva, V. Gotor. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *40*, 111-120.

¹⁷ (a) V. Gotor-Fernández, V. Gotor. *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*. (Eds. V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales). Wiley-VCH. Weinheim, **2008**, Capítulo 7. pp. 171-192; (b) V. Gotor. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2189-2197.

¹⁸ A. Ghanem, H. Y. Aboul-Eneim. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3331-3351.

2. No necesitan cofactor para su correcto funcionamiento.
3. Muestran altos valores de actividad en disolventes orgánicos.

Las lipasas que mejores resultados han proporcionado dentro de los proyectos de investigación desarrollados a lo largo de esta Tesis Doctoral han sido, la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B), la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PSL) y la lipasa de *Rhizomucor miehei* (RML), por lo que a continuación se hará una breve reseña sobre cada una de ellas.

0.1.1.1. Lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B)¹⁹

La CAL-B es una proteína globular pequeña cuya cadena polipeptídica está compuesta de 317 aminoácidos, los cuales adoptan una configuración tridimensional conocida como pliegue de la hidrolasa (Figura 0.1). Este enzima proviene de la levadura *Candida antarctica*, originariamente aislada en la Antártida, que fue descubierta cuando se buscaban enzimas que fueran activos en condiciones extremas. Su estructura presenta, en su centro activo, dos canales casi paralelos que se extienden desde la serina del centro activo hasta la superficie. Éstos se encuentran parcialmente separados por dos cadenas hidrofóbicas de isoleucina y, en ellos, se alojan los fragmentos del alcohol y del acilo de los reactivos. Además, se ha identificado un fragmento de hélice α que posee cierta movilidad, pero que no impide el acceso del disolvente al centro activo como ocurre con otras lipasas.

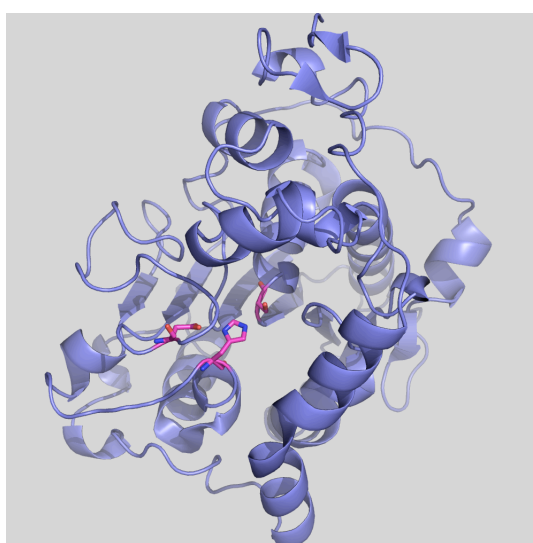


Figura 0.1. Estructura tridimensional de la CAL-B.

¹⁹ S. Lutz. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2743-2748.

Introducción

La enantioselectividad de este enzima sobre alcoholes secundarios sigue, al igual que la mayoría de las lipasas, la regla semiempírica conocida como *Regla de Kazlauskas*.²⁰ Con ella se predice, con gran fiabilidad, la preferencia estereogénica de las lipasas en la reacción de acilación de alcoholes secundarios e hidrólisis de ésteres, basándose en el tamaño de los sustituyentes unidos al estereocentro. En la Figura 0.2 se muestra la configuración del enantiómero favorecido en una resolución cinética enzimática de alcoholes secundarios. Así, cuando el enantiómero del alcohol que reacciona más rápido (enantiómero favorecido) se une a la lipasa, el sustituyente más voluminoso (G) es alojado en el hueco de mayor tamaño, mientras que el hueco más pequeño es el que acomoda al grupo mediano (M). La situación para el enantiómero desfavorecido sería la contraria, de esta manera, cuanto mayor es la diferencia entre los tamaños de los sustituyentes la reacción transcurre con una mayor selectividad, siempre que éstos se puedan acomodar correctamente en los huecos del centro activo de la lipasa. De un modo similar, la CAL-B es capaz de catalizar procesos asimétricos a partir de aminas rracémicas, siendo en la actualidad el catalizador más versátil en procesos de aminólisis y amonólisis entre ésteres y aminas o amoniaco respectivamente.²¹

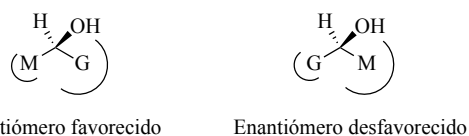


Figura 0.2. Enantiómero favorecido según la regla semiempírica de Kazlauskas.

0.1.1.2. Lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PSL)

La lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PSL), también nombrada recientemente como lipasa de *Burkholderia cepacia*, es una α/β hidrolasa en la que los aminoácidos Ser87, His286 y Asp264 forman la triada catalítica (Figura 0.3).²² 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

²⁰ (a) Q. Jing, R. J. Kazlauskas. *Chirality* **2008**, *20*, 724-735; (b) M. Cygler, P. Grochulski, R. J. Kazlauskas, J. D. Schrag, F. Bouthillier, B. Rubin, A. N. Serrequei, A. K. Gupta. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3180-3186; (c) R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665.

²¹ V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 797-812.

²² (a) T. Schulz, J. Pleiss, R. D. Schmid. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 1053-1062; (b) K. Lemke, M. Lemke, F. Theil. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6266-6273; (c) K. K. Kim, H. K. Song, D. H. Shin, K. Y. Hwang, S. W. Suh. *Structure* **1997**, *5*, 173-185.

forma durante el proceso catalítico. El centro activo de la PSL está constituido por tres huecos enlazantes, siendo los dos hidrofóbicos los causantes de la enantiodiscriminación.

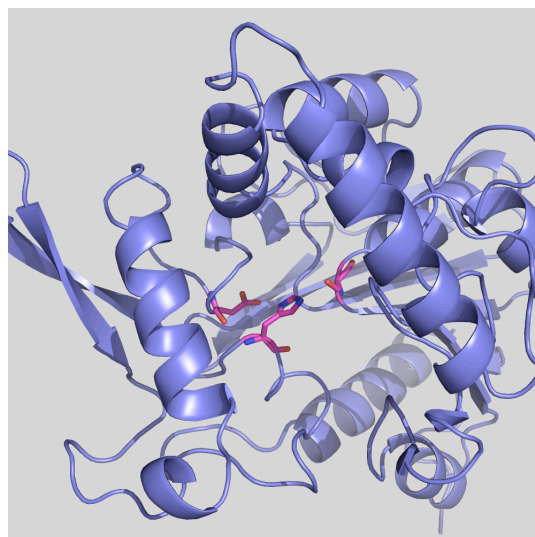


Figura 0.3. Estructura tridimensional de la PSL.

El pH óptimo de trabajo de esta lipasa es 7.0, habiendo sido demostrada extensamente su eficacia en procesos de hidrólisis pero también de síntesis orgánica, tanto de un modo regio- como estereoselectivo.

0.1.1.3. Lipasa de *Rhizomucor miehei* (RML)²³

La lipasa de *Rhizomucor miehei* (RML) fue descrita por primera vez en 1975,²⁴ y tiene un tamaño de 31.6 kDa y un punto isoeléctrico (pI, pH al cual tiene carga neta de cero) de 3.8.²⁵ Pese a no ser tan habitual en procesos industriales como la CAL-B o la PSL, se emplea en la preparación de biodiesel y de diversos ésteres de interés.²⁶ También, se ha utilizado para la preparación de productos ópticamente activos mediante resolución cinética de mezclas racémicas.²⁷

²³ R. C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *64*, 1-22.

²⁴ K. Nagaoka, Y. Yamada. *Agric. Biol. Chem.* **1973**, *37*, 2791-2796.

²⁵ X.Y. Wu, S. Jaaskelainen, Y.-Y. Linko. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1996**, *59*, 145-158.

²⁶ (a) A. Salis, M. Pinna, M. Monduzzi, V. Solinas. *J. Biotechnol.* **2005**, *119*, 291-299; (b) L. A. Nelson, T. A. Foglia, W. N. Marmer. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73*, 1191-1195.

²⁷ (a) A. R. Moen, R. Karstad, T. Anthonsen. *Biocatal. Biotransform.* **2005**, *23*, 45-51; (b) R. P. C. Cousins, M. Mahmoudian, P. M. Youds. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 393-396.

Introducción

0.1.2. Alcohol deshidrogenasas (ADHs)

Las ADHs son enzimas que catalizan la reducción de grupos carbonilo a alcoholes, por tanto, son biocatalizadores que se engloban dentro del grupo de las oxidorreductasas. Pertenecen, principalmente, a dos tipos de familias: las ADHs de cadena media (*medium chain ADHs*, Figura 0.4a) y las ADHs de cadena corta (*short chain ADHs*, Figura 0.4c), y catalizan tanto procesos de oxidación como de reducción. Para ambas clases de enzimas es necesaria la presencia de un cofactor pirimidínico [NAD(P)H o NAD(P)⁺] para llevar a cabo la transferencia del hidruro. Las ADHs de cadena media poseen en el centro activo un ión Zn²⁺ tetracoordinado por dos residuos de cisteína y uno de histidina junto con una molécula de agua (Figura 0.4b). Esta última es sustituida por el ión alcóxido, resultante de la reducción del grupo carbonilo, y facilita la ruptura del enlace O-H del alcohol cuando es oxidado.²⁸ El átomo de Zn²⁺ se encuentra fuertemente coordinado a los aminoácidos del centro activo del enzima. El uso de agentes quelantes no inactiva el biocatalizador, lo que da una idea de la fuerza de la unión.²⁹

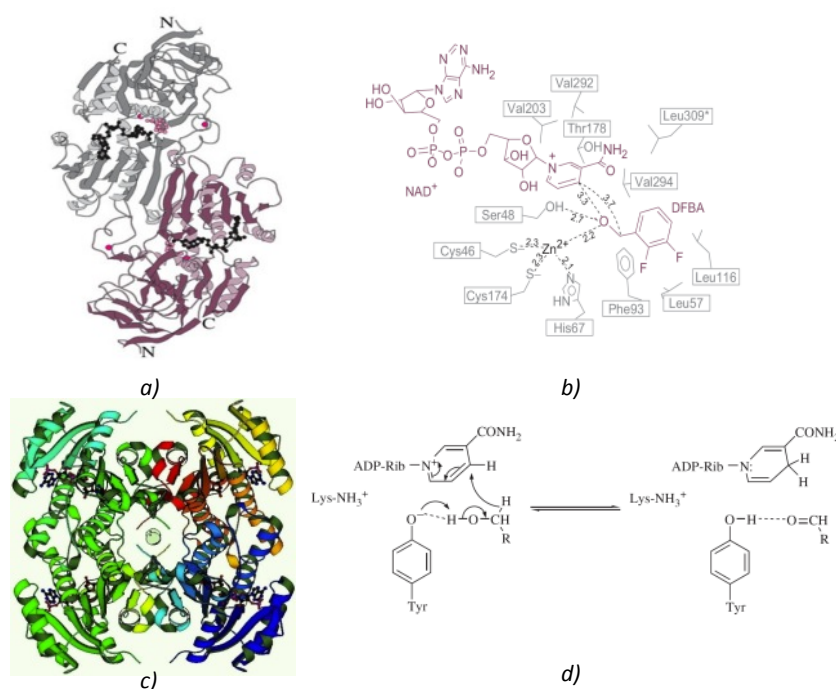


Figura 0.4. a) Representación de una ADH de cadena media (ADH de hígado de caballo): en negro se destaca el cofactor, en rosa el sustrato y en magenta los átomos de Zn²⁺. b) Representación del centro

²⁸ P. A. Frey, A. D. Hegeman. *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Oxford University Press. New York, 2007.

²⁹ (a) B. Kosjek, W. Stampfer, M. Pogorevc, W. Goessler, K. Faber, W. Kroutil. *Biotechnol. Bioeng.* 2004, 86, 55-62; (b) O. Danielsson, S. Atrian, T. Luque, L. Hjelmquist, R. González-Duarte, H. Jörnvall. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994, 91, 4980-4984.

activo de la ADH de cadena media, donde puede apreciarse la ubicación del cofactor, del Zn^{2+} y su esfera de coordinación, además de un alcohol como sustrato (2',3'-difluorofenilmetanol). *c)* Representación de una ADH de cadena corta (ADH de *Lactobacillus brevis*). Puede apreciarse el homotetrámero con los dos iones Mg^{2+} en la zona central (gris) y las cuatro moléculas de cofactor (negro). *d)* Papel de la tirosina en el mecanismo de acción de una ADH de cadena corta en un proceso de oxidación.²⁶

Las ADHs de cadena corta poseen un mecanismo de acción en el que no participan metales, aunque suelen estar presentes iones Mg^{2+} que estabilizan la estructura cuaternaria del enzima y le confieren una mayor resistencia frente a las temperaturas altas y los disolventes orgánicos. En ocasiones, estos iones se encuentran coordinados a los extremos carboxilato terminales de dos homodímeros de la proteína. La importancia de estos cationes es vital para el correcto funcionamiento del biocatalizador ya que su eliminación, mediante el uso de agentes quelantes, da lugar a la inactivación del biocatalizador aunque la estructura cuaternaria no se vea drásticamente modificada.³⁰ Las ADHs de cadena corta, en lugar de emplear Zn^{2+} para activar el grupo carbonilo y favorecer la transferencia del hidruro, utilizan un residuo de tirosina que debe encontrarse en su forma desprotonada para abstraer el protón del alcohol cuando éste es oxidado, o bien en su forma protonada para ceder el protón al alcóxido y generar el enlace O-H en el proceso de reducción (Figura 1.4d).

Una de las características más importantes de las ADHs es su capacidad de catalizar:

- la cesión de un hidruro a una de las caras de una cetona proquiral cuando es reducida.
- la abstracción del hidruro exclusivamente de uno de los dos enantiómeros del alcohol racémico secundario cuando es oxidado.

De esta manera actúan con altas selectividades, resultando ser biocatalizadores muy útiles aplicados a la obtención de alcoholes enantiopuros.³¹ La estereoselectividad de estos enzimas en la entrada del hidruro por una de las caras de la cetona suele estar de acuerdo con la *Regla de Prelog*,³² según la cual se establece que las deshidrogenasas transfieren normalmente el

³⁰ N. H. Schlieben, K. Niefind, J. Müller, B. Riebel, W. Hummel, D. Schomburg. *J. Mol. Biol.* **2005**, *349*, 801-813.

³¹ Revisiones recientes: (a) K. Robins, A. Osorio-Lozada. *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2*, 1524-1530; (b) M. M. Musa, R. S. Phillips. *Catal. Sci. Technol.* **2011**, *1*, 1311-1323; (c) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, D. Holtmann. *Green Chem.* **2011**, *13*, 2285-2313.

³² V. Prelog. *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*, 119-130.

Introducción

hidruro por la cara *re* de una cetona proquiral, dando lugar al alcohol de configuración *S* (Figura 0.5). No obstante, existen numerosos ejemplos de ADHs que no se comportan de esta forma y la adición del hidruro se realiza por la cara *si*, generando el alcohol de configuración *R*. A los biocatalizadores que siguen la regla de Prelog se les denomina “*Prelog*”, mientras que los que no la siguen se les define como “*anti-Prelog*”, teniendo en cuenta que la asignación de la configuración absoluta del alcohol resultante se hace considerando que el sustituyente de mayor tamaño (G) es prioritario frente al de menor tamaño (M).

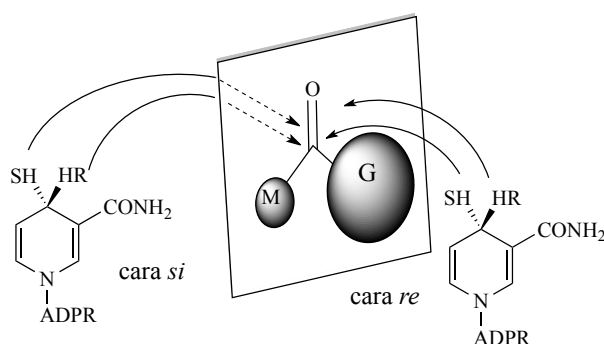
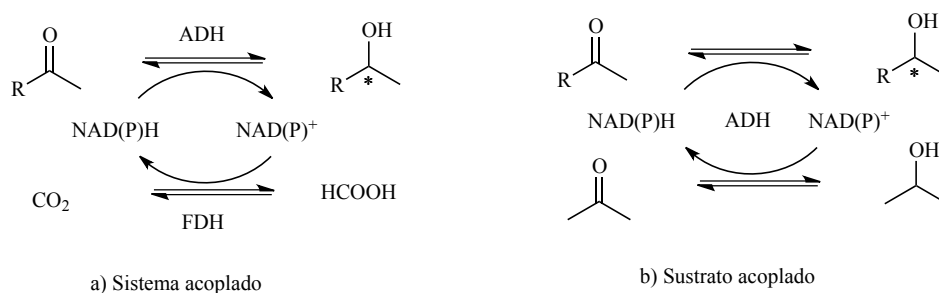


Figura 0.5. Transferencia estereoselectiva del hidruro del NAD(P)H al carbono carbonílico de una cetona (M: sustituyente de menor tamaño; G: sustituyente de mayor tamaño).

Al trabajar de forma aislada o sobreexpresada, es necesario regenerar el cofactor. Puesto que los cofactores de tipo pirimidínico necesarios para realizar las biorreducciones con las ADHs son muy caros, se han descrito diversas metodologías enzimáticas y (foto)químicas para reciclarlos en los procesos enzimáticos y, de este modo, utilizarlos en cantidades catalíticas.³³ Las dos técnicas más empleadas para la regeneración del cofactor son las denominadas de “sistema acoplado” y la del “sustrato acoplado” (Esquema 0.2).³⁴



Esquema 0.2. a) Sistema de regeneración del cofactor utilizando una reacción enzimática acoplada. b) Sistema de regeneración del “sustrato acoplado”.

³³(a) K. Goldberg, K. Schroer, S. Lütz, A. Liese. *Appl. Microb. Biotechnol.* **2007**, 76, 237-248; (b) S. M. A. de Wildeman, T. Sonke, H. E. Schoemaker, O. May. *Acc. Chem. Res.* **2007**, 40, 1260-1266; (c) W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber. *Adv. Synth. Catal.* **2004**, 346, 125-142.

³⁴(a) M. Eckstein, T. Daußmann, U. Kragl. *Biocatal. Biotransform.* **2004**, 22, 89-96; (b) J. Grunwald, B. Wirz, M. P. Scollar, A. M. Klivanov. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 6732-6734.

En el “sistema acoplado” se emplea una reacción enzimática paralela que trabaja de manera inversa. De este modo, el cofactor en su forma oxidada proveniente de la reacción de reducción catalizada por la ADH, es usado por el enzima “acoplado” (por ejemplo una formiato deshidrogenasa FDH, Esquema 0.2a) en la reacción de oxidación, reduciendo el cofactor y cerrando el ciclo. En la metodología del “sustrato acoplado”, se utiliza un gran exceso de un alcohol barato y fácilmente accesible, como por ejemplo el etanol o el 2-propanol, para desplazar el equilibrio hacia la reducción de la cetona de interés, ya que tanto la oxidación como la reducción presentan un carácter reversible (Esquema 0.2b). Esta metodología presenta la ventaja de utilizar un solo biocatalizador para llevar a cabo ambos procesos, además de utilizar un alcohol de bajo coste para reciclar el cofactor. Hay que tener en cuenta que no todas las ADHs son capaces de trabajar bajo estas condiciones de reacción, ya que pueden no aceptar el cosustrato, o bien se desnaturalizan al precisar concentraciones relativamente altas (>2-3% v/v) del mismo.

En esta Tesis Doctoral se han utilizado principalmente dos alcohol deshidrogenasas. La levadura de panadería (Baker’s yeast), como células enteras, y la ADH-A de *Rhodococcus ruber* DSM 44541, tanto en su forma pura como sobreexpresada en *E. coli*, por tanto, parece necesario realizar una breve introducción acerca de ambos biocatalizadores para conocer sus características principales.

0.1.2.1. Levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*)

La actividad reductora de *Saccharomyces cerevisiae* fue descrita por primera vez por Dumas³⁵ y se aplicó industrialmente en 1997 en la preparación de Trimegestona.³⁶ La levadura de panadería ha sido ampliamente usada para la reducción de compuestos carbonílicos y dicarbonílicos, siguiendo en todos los casos la regla de Prelog.²⁸ Posee una serie de ventajas desde un punto de vista industrial, ya que es un biocatalizador comercialmente asequible y, al trabajar con células enteras, no es necesario un sistema de regeneración del cofactor. La recuperación de éste la lleva a cabo la glucosa deshidrogenasa que se encuentra presente en la célula. Sin embargo, presenta como desventajas que, al tratar con células enteras, es necesario utilizar una gran cantidad de biocatalizador y trabajar a

³⁵ J. B. Dumas. *Ann. Chim. Phys.* **1874**, 5.

³⁶ V. Crocq, C. Masson, J. Winter, C. Richard, G. Lemaitre, J. Lenay, M. Vivat, J. Buendia, D. Prat. *Org. Proc. Res. Dev.* **1997**, 1, 2-13.

Introducción

concentraciones muy bajas de sustrato, por lo que la productividad es muy baja. Además, los procesos de extracción de los productos finales suelen ser dificultosos.

Además de la actividad reductora que presenta la levadura de panadería, se ha descrito su actividad en otros procesos enzimáticos como la reducción de olefinas, formación de enlaces carbono-carbono, hidrólisis de ésteres, reducción de grupos nitro y adición de agua a aldehídos α - β insaturados.³⁷

0.1.2.2. ADH-A de *Rhodococcus ruber* DSM 44541

Este enzima fue descubierto en 2002,³⁸ siendo considerada de cadena media y dependiente de NADH como cofactor. Ha sido sobreexpresado en *Escherichia coli*,³⁹ presentando la particularidad de ser muy estable frente a diversos disolventes orgánicos, pudiendo ser utilizado incluso a concentraciones del 99% de hexano.⁴⁰

Con el fin de facilitar su empleo en síntesis orgánica, recientemente nuestro grupo de investigación ha sido capaz de inmovilizar esta alcohol deshidrogenasa con éxito utilizando un polifosfaceno como soporte y glutaraldehído como *linker*.⁴¹

0.2. Procesos enzimáticos asimétricos en síntesis orgánica

Dentro de las estrategias asimétricas catalizadas por enzimas para la obtención de alcoholes ópticamente activos usados en síntesis orgánica, a lo largo de esta Tesis Doctoral se han utilizado las siguientes: resolución cinética, resolución cinética dinámica, desimetrización y resolución cinética dinámica reductiva. Las características generales de cada uno de estos procesos se detallan a continuación.

³⁷ S. Servi. *Synthesis* **1990**, 1-25.

³⁸ W. Stampfer, B. Kosjek, C. Moitzi, W. Kroutil, K. Faber. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1014-1017.

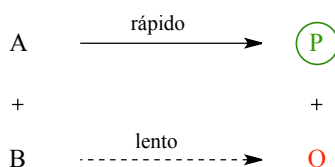
³⁹ K. Edegger, C. C. Gruber, T. M. Poessl, S. R. Wallner, I. Lavandera, K. Faber, F. Niehaus, J. Eck, R. Oehrlein, A. Hafner, W. Kroutil. *Chem. Commun.* **2006**, 2402-2404.

⁴⁰ G. de Gonzalo, I. Lavandera, K. Faber, W. Kroutil. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2163-2166.

⁴¹ A. Cuetos, M. L. Valenzuela, I. Lavandera, V. Gotor, G. A. Carriedo. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1291-1297.

0.2.1. Resolución cinética (KR)

Las resoluciones cinéticas se basan en las diferentes velocidades de reacción que presentan los enantiómeros en una mezcla racémica (Esquema 0.3).



Esquema 0.3. Resolución cinética en donde A y B son enantiómeros y el enzima reacciona preferentemente con uno de ellos (A) para formar un solo producto (P) de los dos posibles.

En una resolución cinética la pureza enantiomérica de sustrato y producto varía con el avance de la reacción. La propiedad que regula el cambio en los excesos enantioméricos de sustrato (ee_s) y producto (ee_p) es la constante de especificidad (k_{rel}), que representa la velocidad aparente de segundo orden de la reacción enzimática global a concentraciones bajas de sustrato. Esta k_{rel} se denomina enantioselectividad o razón enantiomérica (E) en una resolución enzimática cinética irreversible (ecuación 0.1),⁴² y mide la capacidad de un enzima para distinguir entre los dos enantiómeros de una mezcla racémica bajo determinadas condiciones de reacción (temperatura, disolvente, actividad en agua, etc).

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

Ecuación 0.1

Como regla general, se considera que las reacciones con valores de E por debajo de 15 no tienen utilidad para fines prácticos, y sólo si la E es superior a 100 se pueden obtener tanto el producto como el sustrato con altos excesos enantioméricos.

Existen varios métodos para el cálculo de valores de E ,⁴³ siendo el grado de conversión (c), los excesos enantioméricos de sustrato y producto, y el tiempo de reacción (t), variables experimentales que pueden ser útiles para conocer el valor de esta magnitud. Para reacciones irreversibles que siguen una cinética de Michaelis-Menten, y en las que no existe inhibición por producto, E puede ser determinada con las ecuaciones 0.2, 0.3 y 0.4.

⁴² C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. Sih. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294-7299.

⁴³ A. J. J. Straathof, J. A. Jongejan. *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *21*, 559-571.

Introducción

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

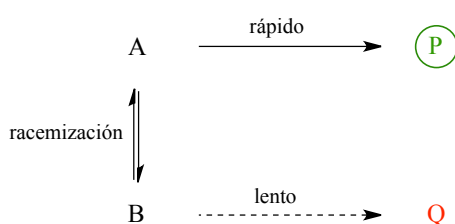
Ecuaciones 0.2-0.4

En general, el cálculo se lleva a cabo con las variables que proporcionan una mayor exactitud de E . Así, siempre que sea posible se utiliza la ecuación 4.

A lo largo de esta Memoria, concretamente en los capítulos 1, 3 y 5 se usarán resoluciones cinéticas para la obtención de alcoholes y ésteres en forma enantiopura mediante procesos de transesterificación enzimática catalizados por lipasas.

0.2.2. Resolución cinética dinámica (DKR)

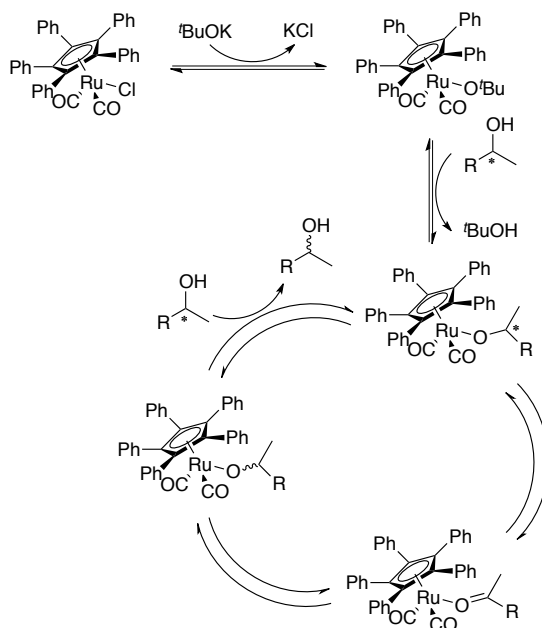
Uno de los inconvenientes que poseen las resoluciones cinéticas es que tan solo se puede obtener un rendimiento teórico máximo del 50%. Para superar esta limitación, se puede introducir un sistema que racemice el enantiómero desfavorecido en la biotransformación (Esquema 0.4), pudiéndose alcanzar un rendimiento máximo del 100%. Este proceso se denomina resolución cinética dinámica (DKR, Dynamic Kinetic Resolution).⁴⁴



Esquema 0.4. Resolución cinética dinámica. El enzima reacciona preferentemente con uno de los enantiómeros (A) para formar un solo producto (P). El enantiómero que no reacciona (B) se racemiza, llevando el proceso hacia la formación de un solo producto (P) que se obtiene con un 100% de rendimiento máximo teórico.

⁴⁴ Revisiones recientes: (a) P. Hoyos, V. Pace, A. R. Alcántara. *Adv. Synth. Catal.* **2012**, 354, 2585-2611; (b) H. Pellisier. *Tetrahedron* **2011**, 67, 3769-3802; (c) H. Pellisier. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 659-676 (d) J. H. Lee, K. Han, M.-J. Kim, J. Park. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 999-1015.

Para que una *DKR* sea efectiva se tienen que cumplir una serie de requisitos. Tanto la enantioselectividad del proceso como la velocidad de racemización han de ser altas ($E > 20$ en cuanto a la enantioselectividad y la velocidad de racemización al menos 10 veces mayor que la velocidad de transformación del enantiómero desfavorecido), en caso de utilizar un catalizador para la racemización, no debe de reaccionar con el producto de la reacción, y tanto la racemización como la biotransformación han de ser compatibles en las condiciones de reacción.⁴⁵ Existen varios métodos de racemización y, en el caso de los alcoholes secundarios, el uso de catalizadores metálicos suele ser la metodología más empleada. De este modo, Williams y Bäckvall han desarrollado una serie de catalizadores metálicos que racemizan alcoholes secundarios mediante transferencia de hidrógeno.⁴⁶ El catalizador que mejores resultados ha mostrado hasta el momento en la resolución cinética dinámica de alcoholes secundarios catalizada por lipasas, ha sido el complejo halocarbonil(1,2,3,4,5-pentafenilciclopentadienil) rutenio (II) (Esquema 0.5), desarrollado por Bäckvall y colaboradores en 2004.⁴⁷ Este catalizador es el que se usará en el capítulo 1 de esta Tesis Doctoral para la resolución cinética dinámica del alcohol precursor del fármaco Rivastigmina.



Esquema 0.5. Mecanismo de racemización química de un alcohol secundario catalizada por el complejo organometálico clorocarbonil(1,2,3,4,5-pentafenilciclopentadienil) rutenio (II).

⁴⁵ K. Drauz, H. Gröger, O. May. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. Wiley-VCH. Weinheim, **2012**.

⁴⁶ (a) J. H. Choi, Y. K. Choi, Y. H. Kim, E. S. Park, M. J. Kim, J. Park. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1972-1977; (b) J. H. Choi, Y. H. Kim, S. H. Nam, S. T. Shin, M. J. Kim, J. Park. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2373-2376; (c) B. A. Persson, A. L. E. Larsson, M. Le Ray, J. E. Bäckvall. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1645-1650; (d) A. L. E. Larsson, B. A. Persson, J. E. Bäckvall. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1211-1212; (e) P. M. Dinh, J. A. Howarth, A. R. Hudnott, J. M. J. Williams, W. Harris. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7623-7626.

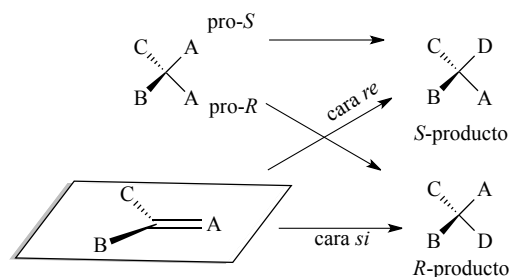
⁴⁷ (a) B. Martín-Matute, K. Bogar, M. Edin, F. B. Kaynak, J. E. Bäckvall. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 5832-5842.; (b) B. Martín-Matute, M. Edin, K. Bogar, J. E. Bäckvall. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6535-6539.

Introducción

Pese a que el uso de metales de transición es, hasta el momento, la estrategia más usada para llevar a cabo la racemización de alcoholes secundarios y de aminas, existen otras metodologías dependiendo de la naturaleza del sustrato. De este modo, se han descrito procesos de racemización de aminas mediante procesos radicalarios,⁴⁸ o, también en el caso de aminas y de aminoácidos, podemos encontrar en la bibliografía procesos de racemización catalizados por enzimas.⁴⁹ Para sustratos con hidrógenos ácidos, como β -cetoésteres y 2-arilacetonas, el uso de pH básicos en la biotransformación, o de resinas de intercambio aniónico, son métodos de racemización adecuados y compatibles con el empleo de biocatalizadores.⁵⁰

0.2.3. Desimetrización

Otro proceso en el cual no existe la limitación *per se* de obtener un 50% de rendimiento es la desimetrización, proceso basado en la eliminación de uno de los elementos de simetría del sustrato (Esquema 0.6).⁵¹ Si ese elemento de simetría es el que impide que tengamos quiralidad en la molécula, al eliminarlo, ésta se puede inducir. Dentro de los grupos funcionales que pueden presentar elementos de simetría se encuentran moléculas proquirales como cetonas o compuestos *meso* como dioles y diaminas.



Esquema 0.6. Desimetrización de moléculas proquirales

La biorreducción de cetonas será objeto de estudio dentro de los capítulos 2, 3, 4, 5 y 6, para la preparación de alcoholes precursores, bien sea de fármacos o de heterociclos de interés, en forma enantiopura. Cuando los dos grupos unidos al carbonilo son diferentes, la cetona

⁴⁸ S. Gastaldi, S. Escoubet, N. Vanthuyne, G. Gil, M. P. Bertrand. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 837-839.

⁴⁹ (a) P. D'Arrigo, L. Cerioli, A. Fiorati, S. Servi, F. Viani, D. Tessaro. *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 938-944; (b) L. El Blidi, M. Nechab, N. Vanthuyne, S. Gastaldi, M. P. Bertrand, G. Gil. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2902-2904; (c) B. Schnell, K. Faber, W. Kroutil. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 653-666; (d) O. May, S. Verseck, A. Bommarious, K. Drauz. *Org. Proc. Res. Dev.* **2002**, *6*, 452-457.

⁵⁰ C. Rodríguez, G. de Gonzalo, A. Rioz-Martínez, D. E. Torres-Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1121-1125.

⁵¹ E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, PR110-PR180 (Actualización de la revisión bibliográfica anterior: E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 313-354).

presenta dos caras enantiotópicas, por lo que dependiendo de la cara por la que se adicione el hidruro tendremos un enantiómero u otro. En los trabajos de investigación desarrollados en esta Tesis Doctoral, los mejores resultados se obtuvieron con la ADH-A de *Rhodococcus ruber*, que preferentemente adiciona el hidruro por la cara *re* del grupo carbonilo, generándose de esta forma los alcoholes de configuración *S*.⁵²

0.2.4. Resolución cinética dinámica reductiva (DYRKR)

En una resolución cinética reductiva (Esquema 0.7), tienen lugar dos procesos simultáneamente: una resolución cinética dinámica y una desimetrización (reducción). Uno de los dos enantiómeros de una mezcla racémica se reduce mientras el otro permanece inalterado. El enantiómero no favorecido racemiza en el medio, pudiéndose obtener el producto reducido con un 100% de rendimiento máximo teórico y un diastereómero de los cuatro posibles.⁵³ El proceso consiste en dos etapas simultáneas, una reducción junto con una resolución cinética dinámica, de ahí que exista cierta controversia en la denominación de este tipo de transformaciones, ya que muchos autores lo consideran una *DKR* formal. En la bibliografía existen pocos ejemplos, y la mayoría están relacionados con la reducción de β -cetoésteres, en donde la racemización ocurre en el propio medio de reacción debido a la acidez del hidrógeno en α .⁵⁴ Otros ejemplos de *DYRKR* son la reducción de 2-arilpropionaldehídos para obtener derivados de profenos. En este caso, al tratarse de un aldehído, sólo se obtiene un enantiómero de los dos posibles.⁵⁵

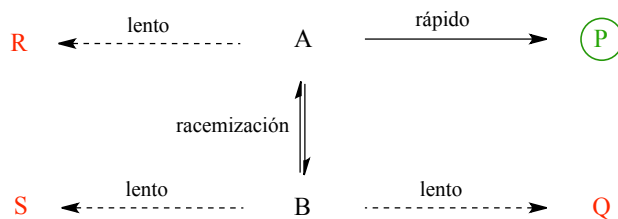
⁵² El alcohol obtenido será de configuración *S* siempre que el grupo grande unido a la cetona presente tenga también la prioridad siguiendo las reglas de nomenclatura de Cahn-Ingold-Prelog (CIP).

⁵³ T. Matsuda, R. Yamanaka and K. Nakamura. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 513-517.

⁵⁴ (a) A. Cuetos, A. Rioz-Martínez, F. R. Bisogno, B. Grischek, I. Lavandera, G. de Gonzalo, W. Kroutil, V. Gotor. *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 1743-1749; (b) D. Kalaitzakis, S. Kambourakis, J. D. Rozzell, I. Smonou. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2418-2426 (c) S. K. Padhi, I. A. Kaluzna, D. Buisson, R. Azerad, J. D. Stewart. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2133-2138; (d) D. Zhu, C. Mukherjee, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, L. Hua. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 901-905; (e) D. Kalaitzakis, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, I. Smonou. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4799-4801; (f) I. A. Kaluzna, T. Matsuda, A. K. Sewell, J. D. Stewart. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12827-12832; (g) K. Nakamura, Y. Kawai, T. Miyai, S. Honda, N. Nakayima, A. Ohno. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 1467-1470; (h) N. Nakamura, T. Miyai, K. Ushio, S. Oka, A. Ohno. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*, 2089-2093.

⁵⁵ (a) J. A. Friest, Y. Maezato, S. Broussy, P. Blum, D. B. Berkowitz. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5930-5931; (b) D. Giacomini, P. Galletti, A. Quintavalla, G. Gucciardo, F. Paradisi. *Chem. Comm.* **2007**, *43*, 4038-4040.

Introducción



Esquema 0.7. Resolución cinética dinámica reductiva. El enzima reduce estereoselectivamente uno de los enantiómeros (A) de la mezcla racémica (A,B), mientras que el enantiómero no favorecido (B) se racemiza, formándose tan solo un producto de los cuatro posibles (P).

0.3. Objetivos generales

Como se ha destacado en esta introducción, los métodos biocatalíticos son una herramienta muy útil para la preparación de productos de alto valor añadido. Los proyectos de investigación aquí desarrollados, tienen como denominador común el uso de biotransformaciones para inducir quiralidad en los procesos de síntesis de un modo sencillo y eficaz, obteniéndose en todos los casos los productos con excesos enantioméricos excelentes.

En la primera parte, dividida en dos capítulos, se describen rutas quimioenzimáticas sencillas para la preparación de tres fármacos en forma enantiopura, la (S)-Rivastigmina y los enantiómeros de los antifúngicos Miconazol y Econazol. Además, en este último capítulo se llevarán a cabo estudios de inhibición del crecimiento de distintas levaduras y hongos con el objetivo de comprobar el diferente comportamiento que presentan los enantiómeros de cada uno de ellos.

La segunda parte consta de cuatro capítulos y está enfocada a la preparación estereoselectiva de diferentes familias de heterociclos cuyo esqueleto se encuentra presente en numerosos productos naturales y compuestos con actividad biológica. Para ello, se desarrollarán diferentes estrategias sintéticas en donde el paso clave es, o bien una resolución cinética de alcoholes secundarios catalizada por lipasas o un proceso de reducción asimétrica de cetonas usando alcohol deshidrogenasas.

PARTE I. PREPARACIÓN ESTEREOSELECTIVA DE
PRODUCTOS DE INTERÉS FARMACOLÓGICO MEDIANTE
PROCESOS BIOCATALÍTICOS.

Como se ha comentado en la introducción, los enzimas son unos catalizadores muy atractivos desde el punto de vista sintético. La capacidad que tienen de trabajar bajo condiciones suaves de reacción, unido a la alta selectividad que muestran en los procesos que catalizan, hacen que cada vez sean más usados para la preparación de productos de alto valor añadido. A lo largo de la primera parte de esta Tesis Doctoral, se abordarán dos procesos quimioenzimáticos para la preparación de fármacos en forma enantioméricamente pura, por lo que, a continuación, se hará una breve introducción acerca del papel actual y las perspectivas futuras de la Biocatálisis en la preparación de productos farmacológicos ópticamente activos.

1.1. Biocatálisis en la industria

El uso de catalizadores en la química sintética ha despertado un creciente interés en las últimas décadas.⁵⁶ La necesidad de desarrollar procesos más eficientes, menos contaminantes y, por tanto, económicamente más rentables, ha hecho que la Biocatálisis tenga cada vez un papel más importante en el sector industrial.⁵⁷

⁵⁶ (a) C. M. Chouthier, J. N. Pelletier, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585-1605; (b) T. Hudlicky, J. W. Reed, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3117-3132.; (c) A. Mitchinson, J. Finkelstein. *Nature* **2008**, *455*, 303.

⁵⁷ (a) W. J. W. Watson. *Green Chem.* **2012**, *14*, 251-259; (b) R. Singh. *Org. Proc. Res. Dev.* **2011**, *15*, 175-179; (c) H.-P. Meyer, E. Eichhorn, S. Hanlon, S. Lütz, M. Schürmann, R. Wohlgemuth, R. Coppolecchia, *Catal. Sci. Technol.* **2013**, *3*, 29-40.

Alrededor de 500 productos comerciales se preparan hoy en día mediante procesos enzimáticos.⁵⁸ En 2003, el mercado alcanzó los 2.300 millones de dólares. De ellos, 789 millones correspondieron a la industria de los detergentes y 630 millones al sector alimentario. En 2009, las ganancias aumentaron hasta los 5.100 millones de dólares. A pesar de que el uso principal de la Biocatálisis se centra en la preparación de productos con bajo valor añadido, es en la industria farmacéutica en donde tiene un mayor potencial.⁵⁹

Los métodos biocatalíticos presentan, generalmente, una regioselectividad y una estereoselectividad mayor que otros métodos químicos convencionales, permitiendo, por ejemplo, evitar tediosos pasos de protección y desprotección tan habituales en síntesis total. Además, la posibilidad de combinar diferentes enzimas en un proceso *one-pot*, hace que la eficiencia de estos procesos sea muy alta.⁶⁰ Todos estos procesos se llevan a cabo bajo condiciones suaves de presión, temperatura y pH. Estas características, unidas al carácter biodegradable de las proteínas y al desarrollo de las técnicas de inmovilización, que permiten el reciclaje de enzimas, y de ADN recombinante aplicadas a la mejora de los procesos biocatalíticos, han hecho que las biotransformaciones jueguen un papel cada vez más importante en la preparación de productos de alto valor añadido.⁶¹

I.2. Quiralidad

La quiralidad juega un papel esencial en la Naturaleza, pero también en la industria farmacéutica, agroalimentaria y química. Todas las proteínas y carbohidratos son quirales. Más de la mitad de los medicamentos en uso lo son, y, sin embargo, la mayoría de ellos son comercializados como racematos.⁶²

Los enantiómeros de un fármaco poseen las mismas propiedades fisicoquímicas, a excepción de su actividad óptica ya que tienen diferente respuesta frente a la luz polarizada. Sin embargo, en muchos casos presentan diferente comportamiento en sus respuestas biológicas.⁶³

⁵⁸ T. W. Johannes, H. Zhao. *Curr. Opin. Microbiol.* **2006**, *9*, 261-267.

⁵⁹ (a) S. Sánchez, A. L. Demain. *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 224-230; (b) D. J. Pollard, J. M. Woodley. *Trends Biotech* **2007**, *25*, 66-72.

⁶⁰ R. C. Simon, F. G. Mutti, W. Kroutil, *Drug. Discov. Today: Technol.* **2012**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddtec.2012.08.002>.

⁶¹ R. N. Patel. *ACS Catal.* **2011**, *1*, 1056-1074.

⁶² B. Kasprzyk-Hordern. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4466-4503.

⁶³ A. Nguyen, H. He, C. Pham-Huy. *Int. J. Biomed. Sci.* **2006**, *2*, 85-100

La distribución, el metabolismo y la excreción en el cuerpo, suele favorecer más a un enantiómero que a otro. De hecho, puede darse el caso de que los enantiómeros de un fármaco quiral posean diferente toxicidad. Sin embargo, muchos productos farmacológicos se siguen produciendo hoy en día como racematos, siempre y cuando uno de los enantiómeros no sea nocivo. Esto se debe a que, generalmente, la separación de enantiómeros o la síntesis estereoselectiva de uno de ellos suele ser muy costosa. Pese a ello, la administración de fármacos en forma enantiopura conlleva una serie de ventajas frente a la administración del fármaco racémico, como pueden ser la ingesta exacta de la dosis o la disminución de la toxicidad y de las interacciones con otros medicamentos. De hecho, desde 1992, la FDA (US Food and Drug Administration) y el Comité Europeo de Productos Medicinales estipularon que las acciones fisiológicas de cada uno de los enantiómeros se deben de estudiar por separado.⁶⁴ Por ello, el desarrollo de nuevas metodologías asimétricas sigue siendo en la actualidad un reto para los químicos sintéticos.⁶⁵

Así, hay que señalar que la producción de medicamentos como un solo enantiómero ha aumentado notablemente en los últimos años (Tabla I.1).^{63b, 66}

Tabla I.1. Variación porcentual en la forma de comercialización de productos farmacéuticos.

Año	Racemato (%)	Enantiopuro (%)	Aquiral (%)
1983	37	26	37
1986	26	26	48
1992	21	44	35
1996	9	41	50
2002	6	55	39

⁶⁴ M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788-824.

⁶⁵ (a) E. Francotte, W. Lindner. *Chirality in Drug Research*. Wiley VCH, **2006**; (b) H. Caner, E. Groner, L. Levy, I. Agranat. *Drug Discov. Today* **2004**, *9*, 105-110. (c) P. Baumann, D. F. Zullino, C. B. Eap. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2002**, *12*, 433-444.

⁶⁶ H. Murakami. *Top. Curr. Chem.* **2007**, *269*, 273-299.

I.3. Ejemplos de síntesis de fármacos mediante métodos biocatalíticos

A lo largo de esta Tesis Doctoral se describen procesos quimioenzimáticos asimétricos para la preparación de fármacos en forma enantiopura por lo que, a continuación, se muestran una serie de síntesis quimioenzimáticas publicadas recientemente y que son representativas del potencial que distintos tipos de biocatalizadores pueden presentar.

I.3.1. Duloxetina

En el primer capítulo de esta Tesis Doctoral se prepara el fármaco (*S*)-Rivastigmina mediante un proceso de resolución cinética y cinética dinámica, catalizada por lipasas, donde se emplea un catalizador de rutenio para llevar a cabo el proceso de racemización. Recientemente, Bäckvall y colaboradores han descrito una aproximación muy parecida para la preparación estereoselectiva de la Duloxetina (Figura I.1) mediante una resolución cinética dinámica de un β -hidroxinitrilo racémico catalizada por la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B). La Duloxetina es un fármaco antidepresivo que actúa como inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina y noradrenalina. Se comercializa bajo el nombre de Cymbalta[®] por la empresa Eli Lilly, aunque actualmente en España también lo comercializa la empresa Esteve (Xeristar[®]). Además de usarse en el tratamiento de la depresión, también ha sido aprobado para el tratamiento de la incontinencia urinaria y desorden obsesivo compulsivo.

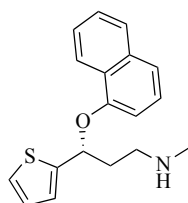


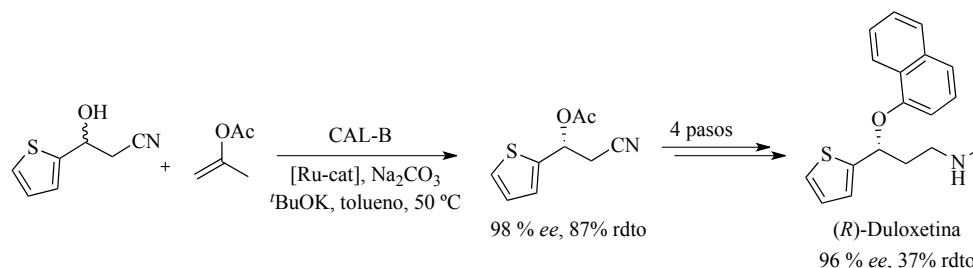
Figura I.1. Estructura de la (*R*)-Duloxetina.

Con anterioridad, ya se había descrito la resolución cinética utilizando la lipasa de *Pseudomonas cepacia*, obteniéndose tanto el (*S*)-alcohol como el (*R*)-acetato correspondiente en forma enantiopura y con buenos rendimientos.⁶⁷

Para el estudio del proceso de resolución cinética dinámica, se describió en primer lugar la

⁶⁷ A. Kamal, G. B. Ramesh-Khanna, R. Ramu, T. Krishnaji, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4783-4787.

preparación del β -hidroxinitrilo en forma racémica, y, tras realizar un estudio de las condiciones de racemización con un catalizador de rutenio y de resolución cinética con varias lipasas, se llevó a cabo el proceso dinámico empleando la CAL-B como biocatalizador a 50 °C, acetato de isopropenilo como dador de acilo y tolueno como disolvente (Esquema I.1).⁶⁸



Esquema I.1. Preparación de la (*R*)-Duloxetina mediante un proceso de resolución cinética dinámica catalizado por CAL-B.

De este modo, se obtuvo el éster precursor con un 87% de rendimiento y con un 98% de *ee*. A partir de éste, se preparó la (*R*)-Duloxetina tras 4 pasos de reacción, obteniendo el fármaco con un rendimiento global aislado del 37% tras 6 pasos y con un *ee* del 96%.

I.3.2. Montelukast

En el capítulo 2 de esta Tesis Doctoral se lleva a cabo la preparación estereoselectiva de los enantiómeros de Miconazol y Econazol mediante un proceso quimioenzimático, en donde el paso clave consiste en la reducción estereoselectiva de una α -clorocetona precursora empleando una alcohol deshidrogenasa como biocatalizador. En la industria farmacéutica, la reacción de reducción de grupos carbonilo se suele llevar a cabo a través de procesos de hidrogenación asimétrico mediada por catalizadores metálicos. La búsqueda de procesos más seguros y que utilicen reactivos menos tóxicos, ha hecho que las alcohol deshidrogenasas hayan emergido como una alternativa eficaz.⁶⁹ Un ejemplo es la preparación del Montelukast (Figura I.2) desarrollada por la empresa norteamericana Codexis. El Montelukast pertenece a una serie de fármacos antagonistas de los leucotrienos, receptores relacionados con la función respiratoria.

⁶⁸ A. Träff, R. Lihammar, J.-E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 3917-3921.

⁶⁹ (a) J. Magano, J. R. Dunetz. *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16*, 1156-1184; (b) D. Muñoz-Solano, P. Hoyos, M. J. Hernáiz, A. R. Alcántara, J. M. Sánchez-Montero. *Bioresource Technol.* **2012**, *115*, 196-207.

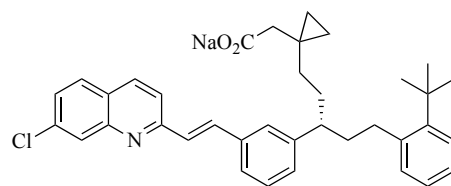
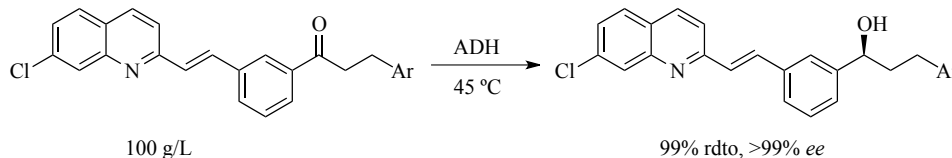


Figura I.2. Estructura del Montelukast.

En el proceso de síntesis original, desarrollado por Merck & Co,⁷⁰ el paso clave es la reducción estereoselectiva de una cetona para dar el correspondiente alcohol en forma enantiopura. Tras la reducción, y la sustitución nucleófila con un tiol, se llega al producto final de configuración *R*. El paso de reducción estereoselectiva se lleva a cabo utilizando un agente quirál [(-)-B-clorodiisopinocampheilborano] en cantidades estequiométricas. Este agente es selectivo y trabaja a temperatura ambiente, pero es muy corrosivo y puede provocar quemaduras en contacto con la piel.

Por ello, Codexis ha desarrollado un proceso de biorreducción (Esquema I.2) en donde se utiliza una alcohol deshidrogenasa modificada genéticamente mediante evolución dirigida. El proceso final se lleva a cabo a 45 °C y a una concentración de 100 g/L, obteniéndose el producto enantiopuro con un rendimiento del 99%.⁷¹



Esquema I.2. Obtención del alcohol precursor en forma enantiopura mediante biorreducción.

I.3.3. Sitagliptina

La preparación de la Sitagliptina (Figura I.3), es el ejemplo más claro del potencial que tiene la Biocatálisis en la preparación de productos farmacéuticos y de alto valor añadido. La Sitagliptina es un fármaco utilizado en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, y ha sido desarrollada y comercializada bajo el nombre de Januvia por Merck & Co. La síntesis actual esta basada en la hidrogenación asimétrica de una enamina a alta presión utilizando un

⁷⁰ A. O. King, E. G. Corley, R. K. Anderson, R. D. Larsen, T. R. Verhoevem, P. J. Reider, Y. B. Xiang, M. Belley, Y. Leblanc, M. Labelle, P. Prasit, R. J. Zamboni. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 3731-3735.

⁷¹ D. Rozell, J. Liang. *Speciality Chemicals Magazine* **2008**, 36-38.

catalizador de rodio quirál.⁷² Ya que se trata de un producto farmacéutico, es necesario realizar una serie de pasos posteriores de purificación para eliminar las trazas de rodio.

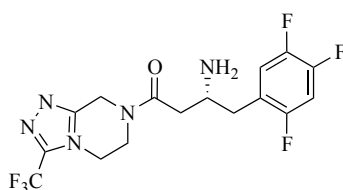
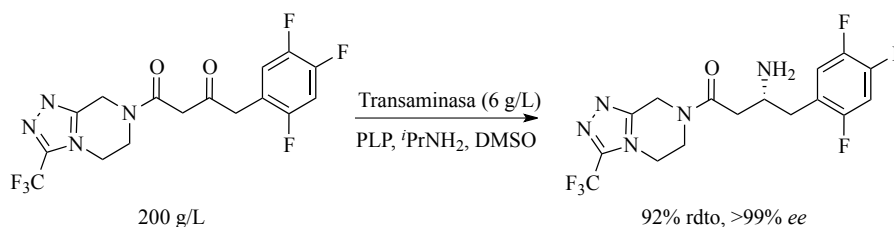


Figura I.3. Estructura de la Sitagliptina

Partiendo de una transaminasa de origen y secuencia de aminoácidos conocida que mostraba una baja actividad en la reacción de aminación reductiva de la cetona precursora (Esquema I.3), se llevó a cabo el desarrollo de un catalizador adecuado a través de la combinación de técnicas *in silico* y mutagénesis directa.⁷³ Bajo las condiciones óptimas, la mejor mutante convirtió la cetona de estudio en Sitagliptina con un rendimiento del 92% y en forma enantiopura, trabajando a una concentración de 200 g/L de sustrato, usando 6 g/L de enzima en 50% DMSO, todo ello bajo condiciones de reacción suaves y evitando el uso de hidrogenadores de alta presión (Esquema I.3). Cabe destacar que la mutante posee 27 mutaciones con respecto a la proteína natural.



Esquema I.3. Preparación de Sitagliptina mediante transaminación enzimática.

Varias ventajas pueden destacarse en comparación con el método de hidrogenación asimétrica con el catalizador de rodio tradicionalmente empleado. El rendimiento se mejoró en un 1013%, se aumentó la productividad un 53%, se redujeron en un 19% los residuos, con el consecuente ahorro económico y disminución del impacto medioambiental. Recientemente, se ha descrito la inmovilización de esta transaminasa sobre una resina de polimetacrilato, lo cual ha permitido aumentar la estabilidad de la proteína en disolventes orgánicos y pudiendo

⁷² K. B. Hansen, Y. Hsiao, F. Xu, N. Rivera, A. Clausen, M. Kubryk, S. Krska, T. Rosner, B. Simmons, J. Balsells, N. Ikemoto, Y. Sun, F. Spindler, C. Malan, E. J. J. Grabowski, J. D. Armstrong. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8798-8804.

⁷³ C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes. *Science* **2010**, *16*, 305-309.

reciclar el enzima durante varios ciclos.⁷⁴

Como ha quedado patente, la Biocatálisis se muestra como una herramienta alternativa muy eficaz en la producción de fármacos enantioméricamente puros. En esta introducción, se han mostrado diferentes procesos catalizados por lipasas, alcohol deshidrogenasas y transaminasas. Además de los enzimas mostrados, existen otros capaces de llevar a cabo con gran selectividad multitud de reacciones de interés en el campo farmacéutico como pueden ser oxidaciones selectivas sobre carbonos no activados catalizados por oxigenasas, formaciones de enlaces carbono-carbono mediadas por liasas y otros procesos como hidroxilaciones, descarboxilaciones, sulfoxidaciones o epoxidaciones.^{49, 75}

⁷⁴ M. D. Truppo, H. Strotman, G. Hughes. *ChemCatChem* **2012**, *4*, 1071-1074.

⁷⁵ R. Wohlgemuth. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 713-724.

ARTICULO I. SÍNTESIS QUIOENZIMÁTICA
ESTEREOSELECTIVA DEL FÁRMACO RIVASTIGMINA

La Rivastigmina, carbamato de *N*-Etil-*N*-metil-3-[1(dimetilamino)etil]fenilo (Figura I.I.1), es un agente colinérgico usado para el tratamiento de la demencia en enfermos de Alzheimer, perteneciente a la familia de los inhibidores del enzima colinesterasa.⁷⁶

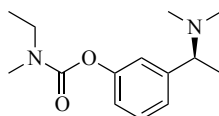


Figura I.I.1. Estructura de la (*S*)-Rivastigmina.

A continuación, se describe una ruta quimioenzimática para la preparación estereoselectiva de este fármaco en donde el paso clave es la resolución cinética y cinética dinámica de un alcohol racémico precursor. Los resultados de este trabajo se encuentran recogidos en "*Chemoenzymatic Synthesis of Rivastigmine Based on Lipase-Catalyzed Processes*". J. Mangas-Sánchez, M. Rodríguez-Mata, E. Busto, V. Gotor-Fernández y V. Gotor. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5304-5310.

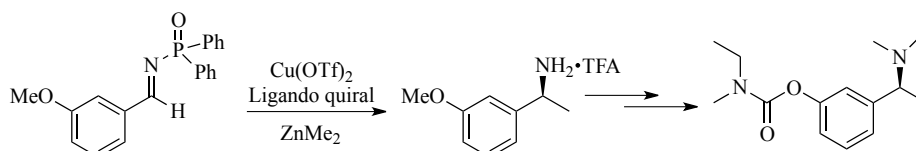
⁷⁶ (a) A. L. F. Chan, Y. W. Chien, S. I. Lin. *Drugs Aging* **2008**, *25*, 761-775; (b) G. T. Grossberg, *Drugs Aging* **2008**, *25*, 573-584.

La (*S*)-Rivastigmina provoca el aumento de la cantidad del neurotransmisor acetilcolina en diversas regiones cerebrales, permitiendo la mejora de la función mental. La actividad de este fármaco, reside principalmente en su enantiómero de configuración (*S*), siendo en la actualidad comercializado por la empresa Novartis Pharma AG bajo el nombre de Exelon[®] y en su forma de (*S*)-tartrato.⁷⁷

I.1.1. Antecedentes

En la bibliografía se han descrito diversos procesos para su obtención empleando metodologías químicas convencionales que, generalmente, implican la utilización de ácidos quirales, como el ácido L-tartárico, para la resolución cinética del racemato y así separar las correspondientes sales ópticamente activas.⁷⁸

También, Charette y colaboradores han descrito la preparación de la sal trifluoroacética de (1*S*)-1-(3-metoxifenil)etanamina por la adición estereoselectiva de dimetilzinc ($ZnMe_2$) a una imina catalizada por bistriflato de cobre (II) y un ligando quiral de fósforo, obteniéndose un precursor que ha permitido la preparación final de (*S*)-Rivastigmina con un buen rendimiento global (Esquema I.1.1).⁷⁹



Esquema I.1.1. Síntesis de (*S*)-Rivastigmina basada en un proceso estereoselectivo catalizado por un complejo de fósforo.

Posteriormente a la publicación de nuestro trabajo de investigación, Faber y colaboradores desarrollaron una ruta quimioenzimática en donde el paso clave de la síntesis consiste en la transaminación asimétrica de un derivado de la acetofenona utilizando una ω -transaminasa de *V. fluvialis* (Esquema I.1.2). La (*S*)-Rivastigmina se obtiene de esta forma en 4 pasos con un rendimiento global del 71%. Además, se accede al enantiómero contrario utilizando la transaminasa ATA-117, enzima comercializado por Codexis.⁸⁰ Recientemente, esta síntesis ha

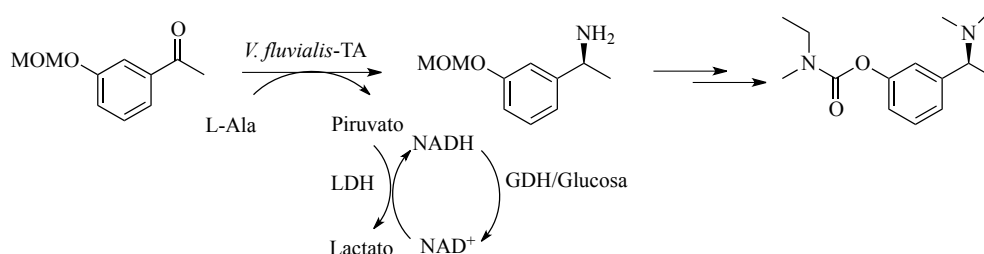
⁷⁷ C. M. Spencer, S. Noble. *Drugs Aging* **1998**, *13*, 391-411.

⁷⁸ (a) J. Henar, A. Overeem, T. Lambertus. *WO 2008/037433 A1*; (b) Z-H. Wang, S. E. Horne, K. S. K. Murthy, *WO 2007/098573T*.

⁷⁹ A. A. Boezio, J. Pytkowicz, A. Côté, A. B. Charette. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14260-14261.

⁸⁰ M. Fuchs, D. Koszelewski, K. Tauber, W. Kroutil, K. Faber. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5500-5502.

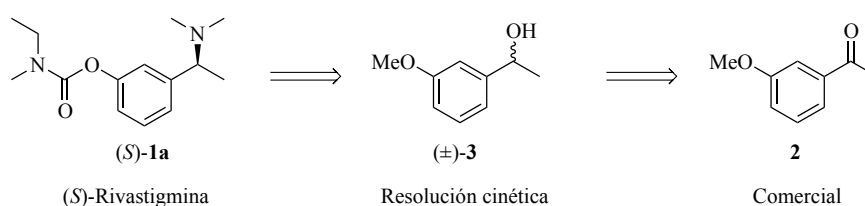
sido mejorada en el mismo grupo de investigación utilizando una ω -transaminasa de *Paracoccus denitrificans*,⁸¹ Con este nuevo biocatalizador se puede llevar a cabo la transaminación del carbamato, evitando el uso de grupos protectores.



Esquema I.I.2. Preparación quimioenzimática de (*S*)-Rivastigmina mediante transaminación asimétrica.

I.I.2. Resultados y discusión

Nuestro trabajo de investigación está basado en la síntesis estereoselectiva del fármaco (*S*)-Rivastigmina [(*S*)-**1a**], empleando una metodología quimioenzimática sencilla, en la que el paso clave de la síntesis consiste en la preparación de un precursor enantiopuro empleando una lipasa como biocatalizador. Tras llevar a cabo un análisis retrosintético (Esquema I.I.3), identificamos el alcohol racémico 3-metoxi-1-feniletanol [(±)-**3**] como sustrato ideal para llevar a cabo el estudio de su resolución cinética enzimática, pudiendo obtenerse éste fácilmente por reducción química de la 3-metoxiacetofenona (**2**), compuesto accesible comercialmente a bajo coste.

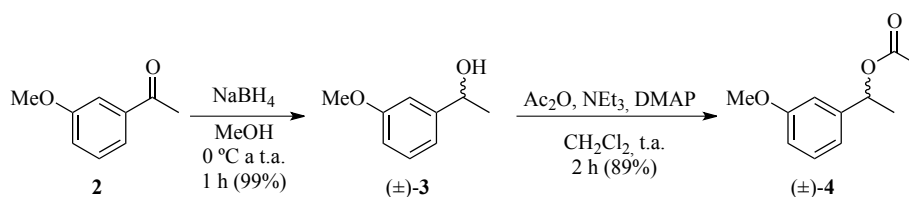


Esquema I.I.3. Análisis retrosintético de la (*S*)-Rivastigmina.

⁸¹ M. Fuchs, D. Koszelewski, K. Tauber, J. Sattler, W. Banko, A. K. Holzer, M. Pickl, W. Kroutil, K. Faber. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7691-7694.

I.I.2.1. Síntesis de los compuestos racémicos involucrados en la resolución cinética

Inicialmente, se llevó a cabo la reducción del grupo carbonilo de la 3-metoxiacetofenona (**2**), empleando un ligero exceso de borohidruro sódico (NaBH_4) en metanol (MeOH) y a temperatura ambiente (Esquema I.I.4), aislándose tras cromatografía de columna el correspondiente alcohol racémico **3** con un rendimiento cuantitativo.



Esquema I.I.4. Síntesis química del alcohol racémico **3** y el acetato racémico **4**.

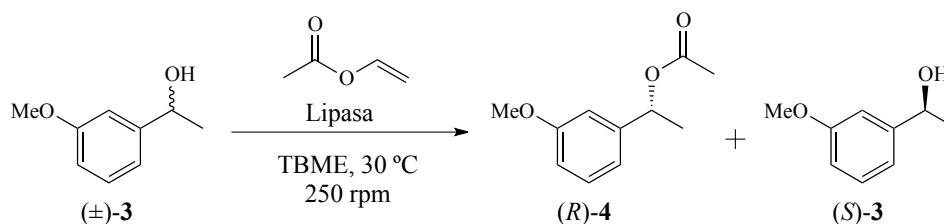
Con el fin de poder visualizar el curso estereoquímico de las reacciones enzimáticas de transesterificación, se llevó a cabo la síntesis del acetato **4** en su forma racémica, empleando para ello el alcohol (\pm)-**3** y anhídrido acético (Ac_2O) en presencia de trietilamina (NEt_3), 4-(*N,N*-dimetilaminopiridina) (DMAP) y diclorometano (CH_2Cl_2) como disolvente. Tras 2 horas a temperatura ambiente, se pudo obtener el acetato de 3-(metoxifenil)etilo (**4**) con un 89% de rendimiento tras purificación por cromatografía de columna. El seguimiento de las reacciones enzimáticas se llevó a cabo mediante cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) con columnas de relleno quiral.

I.I.2.2 Estudio de la resolución cinética.

Inicialmente se decidió emplear la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B) y la lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre un soporte cerámico (PSL-C), enzimas que han demostrado un gran potencial para la resolución de alcoholes secundarios.⁸² Se seleccionó como agente de acilación el acetato de vinilo (AcOvin), éster activado que permite la acetilación estereoselectiva de alcoholes secundarios en procesos catalizados por lipasas. Los ésteres de vinilo hacen que el proceso sea irreversible al desprenderse como subproducto acetaldehído, que se encuentra en estado gaseoso a temperatura ambiente. Finalmente, el *terc-*

⁸² (a) A. Ghanem. H. Y. Aboul-Eneim, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3331-3351; (b) A. Ghanem. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 1721-1754.

butilmetil éter (TBME), disolvente poco polar y por tanto ideal para ser utilizado en combinación con una lipasa, fue elegido como medio de reacción (Esquema I.I.5).



Esquema I.I.5. Resolución enzimática del alcohol racémico **3** empleando acetato de vinilo y distintas lipasas en TBME como disolvente.

De esta manera, se llevó a cabo la reacción de resolución enzimática del 3-metoxi-1-feniletanol, empleando 2 equivalentes de acetato de vinilo a 30 °C y 250 rpm. en una concentración 0.1 M de sustrato en TBME, mostrando tanto la CAL-B como la PSL-C una excelente enantioselectividad en la formación estereoselectiva del acetato **4** de configuración (*R*) (Tabla I.I.1, entradas 1 y 2), Tras hora y media de reacción se obtuvo el sustrato (*S*)-**3** enantiopuro y el acetato (*R*)-**4** con un exceso enantiomérico muy alto (92-98.5%). Debido a la excelente enantioselectividad mostrada y a los tiempos cortos de reacción, se decidió rebajar a la mitad la cantidad de enzima con el fin de abaratar los costes del mismo, observándose que en tiempos ligeramente superiores (4 horas), se obtienen producto y sustrato de manera enantiopura en el caso de la CAL-B (entradas 3 y 4). Tras un proceso de purificación por cromatografía de columna se aislaron el alcohol y el acetato enantiopuros, con rendimientos muy altos considerando que la aproximación está basada en una resolución cinética clásica, la cual tiene la inherente limitación de que los rendimientos no pueden ser superiores al 50%.

Tabla I.I.1. Resolución cinética enzimática de (\pm)-**3** usando 2 equivalentes de acetato de vinilo en TBME a 30 °C y 250 rpm.

Entrada	Enzima	Relación ^a	t (h)	ee_p (%) ^b	ee_s (%) ^b	c (%) ^c	E^d
1	CAL-B	1:1	1.5	98.5	>99	50	>200
2	PSL-C	1:1	1.5	92	>99	52	>200
3	CAL-B	1:0.5	4	>99 (43)	>99 (49)	50	>200
4	PSL-C	1:0.5	4	96.5	>99	51	>200

^a Relación sustrato vs enzima en peso. ^b Determinado mediante HPLC. Rendimientos aislados entre paréntesis. ^c $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$. ^d $E = \ln[(1-c) \times (1-ee_s)] / \ln[(1-c) \times (1+ee_p)]$.

A continuación, y con el objetivo de estudiar la aplicabilidad de éste método en la industria, se decidieron explorar tres factores importantes en el coste económico de una biotransformación, como son el reciclaje del enzima, el escalado de la reacción y la

posibilidad de llevar a cabo una resolución cinética dinámica que permita acceder al éster enantiopuro con un 100% de rendimiento.

I.I.2.3. Estudio de la aplicabilidad industrial del proceso

Para este fin se empleó la CAL-B como biocatalizador ya que muestra mejores valores de enantioselectividad que la PSL-C, si bien ambos son excelentes biocatalizadores para la resolución del 3-metoxi-1-feniletanol (**3**).

I.I.2.3.1. Estudio del reciclaje del enzima

Se llevó a cabo la resolución enzimática del alcohol (\pm)-**3** empleando una relación en peso sustrato:enzima de 1:0.5, 2 equivalentes de acetato de vinilo y TBME como disolvente. La reacción enzimática se agitó durante 3 horas a 30 °C y 250 rpm, tiempo tras el cual se filtró el enzima en placa, recuperándolo para llevar a cabo un nuevo proceso enzimático. Este proceso se repitió un total de 5 veces mostrándose los resultados obtenidos en la Tabla I.I.2. El enzima es fácilmente reciclable ya que se encuentra soportado sobre un polímero cerámico que permite la recuperación del biocatalizador por simple filtración, y puede ser usado de nuevo sin llevar a cabo ningún tratamiento adicional.

Tabla I.I.2. Estudio del reciclaje del enzima: resolución cinética enzimática de (\pm)-**3** durante 3 horas usando CAL-B, 2 equivalentes de acetato de vinilo en TBME a 30 °C y 250 rpm.

Número de ciclo	ee_P (%) ^a	ee_S (%) ^a	c (%) ^b	E ^c
1	>99	98.6	49.7	>200
2	>99	98.2	49.6	>200
3	>99	98.0	49.5	>200
4	>99	97.9	49.5	>200
5	>99	97.7	49.5	>200
6	>99	96.0	49.0	>200

^a Determinado por HPLC. ^b $c = ee_S / (ee_S + ee_P)$. ^c $E = \ln[(1-c) \times (1-ee_S)] / \ln[(1-c) \times (1+ee_P)]$.

I.I.2.3.2. Escalado de la reacción enzimática

A continuación se llevó a cabo el escalado del proceso enzimático, pasando de emplear 50 mg de sustrato racémico a usar 1.5 g. Con el fin de abaratar el proceso, se disminuyó 10 veces la cantidad de CAL-B, empleando una relación sustrato:enzima de 1:0.05 en peso (en lugar de 1:0.5), y se mantuvieron inalteradas las cantidades de acetato de vinilo (2 equivalentes con respecto al producto de partida), TBME, 30 °C y 250 rpm. De esta manera, y como era de esperar, la velocidad de reacción descendió considerablemente al reducir la carga de biocatalizador, si bien el acetato (*R*)-**4** y el alcohol (*S*)-**3** fueron recuperados en forma enantioméricamente pura tras 24 h, obteniéndose ambos con buenos rendimientos (43% para el acetato y 49% el alcohol).

I.I.2.3.3. Proceso de resolución cinética dinámica

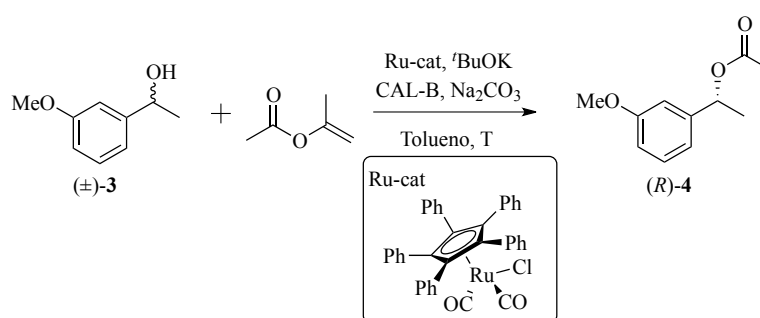
Como ya se ha comentado, la desventaja que posee una resolución cinética clásica es que el rendimiento teórico máximo que se puede alcanzar de un producto enantiopuro es del 50%, lo que hace que a veces estos procesos no sean económicamente viables. La resolución cinética dinámica (DKR) es una solución a este problema, ya que, en el medio de reacción se introduce un sistema que racemiza el enantiómero que no reacciona, de manera que finalmente se puede obtener un 100% de rendimiento en el compuesto acilado enantiopuro.

En vista de los excepcionales resultados mostrados por la CAL-B en la acetilación del alcohol **3**, tanto en términos de estereoselectividad como de velocidad de reacción, se decidió estudiar la posibilidad de llevar a cabo un proceso de resolución cinética dinámica con el objetivo de alcanzar altos rendimientos aislados del acetato (*R*)-**4** enantiopuro.

Para ello, se utilizó el complejo organometálico comercial **7**, clorocarbonil(1,2,3,4,5-pentafenilciclopentadienil) rutenio (II), el cual ha demostrado ser un catalizador eficiente en la racemización de alcoholes secundarios pudiendo ser empleado con lipasas (Esquema 1.5).⁸³

⁸³ (a) Q. Chen, C. Yuan. *Chem. Commun.* **2008**, 5333-5335; (b) B. Martín-Matute, J.-E. Bäckvall. *Curr. Op. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 226-232; (c) M. Edin, B. Martín-Matute, J.-E. Bäckvall. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 708-715; (d) G. K. M. Verzijl, J. G. de Vries, Q. B. Broxterman. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 1603-1610; (e) B. Martín-Matute, M. Edin, K. Bógar, F. Betül Kainak, J.-E. Bäckvall. *J. Am Chem. Soc.* **2005**, *127*,

Así, en presencia de carbonato potásico (Na_2CO_3) y *tert*-butóxido potásico ($^t\text{BuOK}$) se forma el correspondiente complejo con el alcóxido, responsable del proceso de racemización. Para la reacción enzimática se usó acetato de isopropenilo en lugar de acetato de vinilo, debido a que el primero presenta un mejor reactividad en los procesos de DKR al no reaccionar químicamente con el metal, como sucede con el acetato de vinilo al desprenderse acetaldehído. Se empleó tolueno como disolvente en vez de TBME para evitar problemas de solubilidad del catalizador. Además, debido a su alto punto de ebullición, este disolvente permite trabajar a temperaturas más altas que el TBME, favoreciendo de este modo el proceso de racemización (Esquema I.I.6).



Esquema I.I.6. Resolución cinética dinámica del alcohol racémico **3** empleando CAL-B y el complejo organometálico de rutenio.

Debido a las suaves condiciones de reacción necesarias para la resolución cinética de (\pm) -**3**, el proceso de resolución cinética dinámica se llevó a cabo inicialmente a 30 °C, obteniéndose el acetato (*R*)-**4** con una conversión del 85% y en forma enantiopura tras 24 h (Tabla I.I.3, entrada 1). La temperatura se aumentó hasta 50 °C para facilitar el proceso de racemización, alcanzando de esta manera una conversión total en el acetato (*R*)-**4** aislado con un 98% *ee* (entrada 2). Otro factor a estudiar es la carga de enzima. Los mejores resultados se alcanzaron cuando la cantidad de enzima disminuye de 25 a 15 mg/mmol (entrada 3). En este caso se obtiene el acetato enantiopuro con un 91% de rendimiento aislado. Si la carga del catalizador se aumenta a 50 mg/mmol (entrada 4), se obtiene una conversión total, sin embargo el *ee* del acetato es menor. A 50 °C el proceso enzimático no es tan selectivo y, al aumentar la carga de enzima, baja levemente la selectividad.

8817-8825; (f) G. Csornyik, K. Bógar, J.-E. Bäckvall. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 6799-6802; (g) O. Pàmies, J.-E. Bäckvall. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3247-3261.

Tabla I.I.3. Resolución cinética dinámica del alcohol racémico **3** con CAL-B y un complejo de rutenio usando 1.5 equivalentes de acetato de isopropenilo como dador de acilo y tolueno como disolvente tras 24 h.

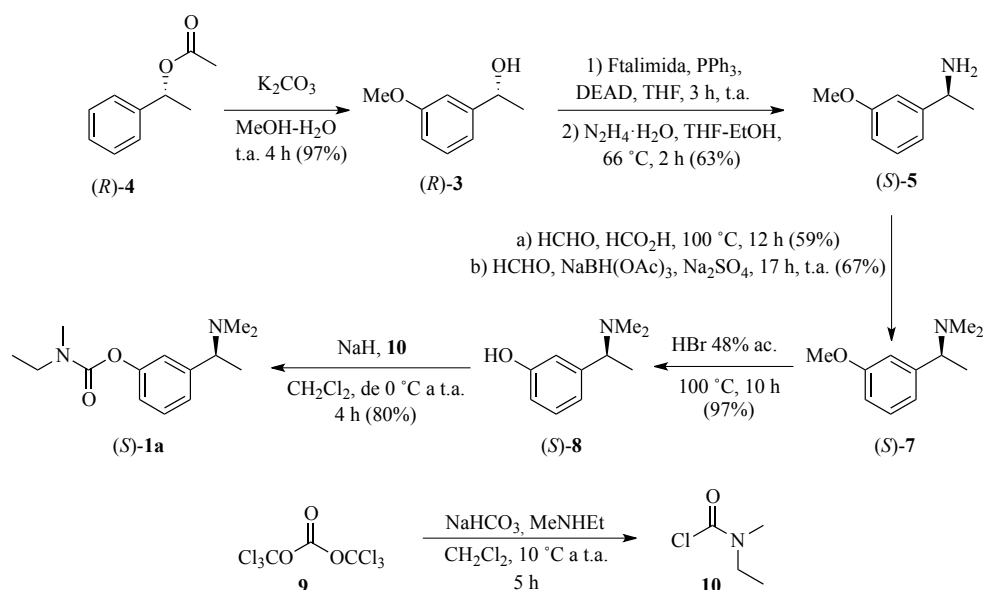
Entrada	T (°C)	CAL-B (mg/mmol) ^a	<i>c</i> (%) ^b	<i>ee_p</i> (%) ^c
1	30	25	85	>99
2	50	25	>97	98
3	50	15	95 (91)	>99
4	50	50	>97	97

^a Relación respecto a los mg de CAL-B vs mmol de alcohol (±)-**3**. ^b Determinado por ¹H-RMN directamente del crudo de reacción. Rendimientos aislados entre paréntesis tras cromatografía de columna con gel de sílice. ^c Determinado por CG.

I.I.2.4. Síntesis de la (*S*)-Rivastigmina a partir de los precursores

Una vez obtenido el acetato (*R*)-**4** enantiopuro como precursor adecuado para la preparación de la (*S*)-Rivastigmina, se llevó a cabo la síntesis de ésta mediante una ruta sintética sencilla basada en 4 etapas (Esquema I.I.7). En primer lugar, se procedió a la desprotección del grupo acetilo empleando un proceso de hidrólisis alcalina con carbonato de potasio (K₂CO₃) en una mezcla MeOH-H₂O y a temperatura ambiente. Este proceso transcurre con un rendimiento casi cuantitativo tras 4 horas de reacción. Una vez obtenido el alcohol enantiopuro (*R*)-**3**, se llevó a cabo la inversión de su centro estereogénico en condiciones de Mitsunobu,⁸⁴ empleando ftalimida, trifenilfosfina (PPh₃) y azocarboxilato de dietilo (DEAD) en tetrahidrofurano (THF) seco, de este modo se obtuvo la amina protegida correspondiente, la cual se desprotege posteriormente con hidrazina monohidratada (N₂H₄·H₂O) en una mezcla de THF y etanol (EtOH) a 66 °C, obteniéndose la amina **7** de configuración *S* en forma enantiopura con un rendimiento global de los dos pasos de un 63%.

⁸⁴ (a) T. Y. S. But, P. H. Toyi. *Chem. Asian J.* **2007**, 2, 1340-1355; (b) O. Mitsunobu. *Synthesis* **1981**, 1-28.



Esquema I.I.7. Síntesis química de la (*S*)-Rivastigmina a partir del acetato (*R*)-4.

Una vez obtenida la amina libre se llevó a cabo su dimetilación, proceso que se alcanzó satisfactoriamente por dos métodos diferentes:

a) Reacción de la amina (*S*)-5 con una disolución acuosa al 37% de formaldehído (HCHO) y ácido fórmico (HCOOH) a 100 °C, obteniendo la (*S*)-1-(3-metoxifenil)-*N,N*-dimetiletanamina [(*S*)-9] con un rendimiento aislado del 59%.

b) Alternativamente este rendimiento se ve incrementado a un 67% en si la amina (*S*)-5 se trata con la disolución de formaldehído en presencia de triacetoxiborohidruro sódico [NaBH(OAc)₃] y pequeñas cantidades de sulfato sódico (Na₂SO₄) como agente deshidratante.

Con el objeto de introducir el grupo carbamato que aparece en la (*S*)-Rivastigmina, se llevó a cabo la ruptura del enlace O-C del grupo metoxi en la posición 3 del anillo aromático, empleando la amina (*S*)-7 y una disolución acuosa de ácido bromhídrico (HBr) al 48%, aislándose (*S*)-8 con un rendimiento del 97%. Finalmente, la (*S*)-Rivastigmina enantiopura se sintetizó mediante reacción a temperatura ambiente del fenol (*S*)-8 con el cloruro de carbamoilo **10**, que se genera *in situ* haciendo reaccionar trifosgeno **9** con *N*-etilmetilamina. Así, en presencia de hidruro de sodio (NaH) y CH₂Cl₂ se obtiene la Rivastigmina (*S*)-1a con un rendimiento aislado del 80% tras cromatografía de columna.

I.I.3. Conclusiones

Se ha desarrollado la primera síntesis quimioenzimática de la (S)-Rivastigmina a partir de la 3-metoxiacetofenona, sustrato comercialmente accesible, en donde el paso clave del proceso es la resolución cinética de 3-metoxi-1-feniletanol (**3**) catalizada por la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B. Aprovechando los excelentes resultados obtenidos en la resolución cinética de **3**, se han estudiado con éxito el reciclaje del enzima y escalado, optimizando un proceso de resolución cinética dinámica en presencia de un catalizador de rutenio. Finalmente, se ha llegado a fármaco final sin pérdida de la pureza óptica con un rendimiento global del 29% tras 5 pasos de reacción empleando métodos de síntesis convencionales.

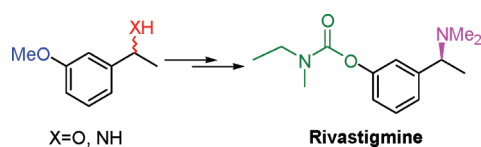
Chemoenzymatic Synthesis of Rivastigmine Based on Lipase-Catalyzed Processes

Juan Mangas-Sánchez, María Rodríguez-Mata, Eduardo Busto, Vicente Gotor-Fernández,* and Vicente Gotor*

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, Universidad de Oviedo, c/ Julián Clavería s/n, Oviedo 33071, Spain

vgs@fq.uniovi.es

Received April 15, 2009



A straightforward chemoenzymatic synthesis of enantiomerically pure rivastigmine has been efficiently carried out under mild reaction conditions, with *Candida antarctica* lipase B responsible for the stereoselective acetylation of the corresponding (*R*)-alcohol or amine. An exhaustive enzymatic study has been developed exploring the possibilities of carry out enzyme recycling, scaling up the enzymatic process and development of a dynamic kinetic resolution procedure for the production of adequate enantiomerically pure precursors of rivastigmine. Total chemoenzymatic synthesis of this pharmaceutical has been performed in good overall yield from commercially available 3-methoxyacetophenone.

Introduction

The development of stereoselective synthetic methods for the production of chiral organic compounds in nonracemic form has dramatically increased in recent years due to the necessity of producing enantiomerically pure compounds for the fine chemical industry.¹ This fact occurs because chirality has a pivotal role in both efficiency and safety of many drugs. Moved by the high demand for environmentally friendly synthetic routes, biocatalysis has emerged in the last decades as a powerful and recognized tool for the development of chemo-, regio-, and stereoselective processes. In this manner, many biocatalytic reactions have already been implemented for industrial development, being the preparation of single enantiomers a great challenge for organic chemists using

mainly lipases, oxidoreductases, transaminases, lyases, and oxygenases in combination with chemical catalysis.²

In particular, lipases show high enantioselectivities toward a wide range of secondary alcohols and primary amines, which are interesting intermediates for the preparation of pharmaceuticals.³ This type of biocatalyst works under mild reaction conditions (room temperature, atmospheric pressure, etc.), and their immobilized forms are highly stable in organic solvents, allowing an easy isolation of enantiomerically enriched compounds and the possibility of enzyme reuse that is always interesting in economical terms.⁴

In our ongoing project toward the synthesis of interesting high added value compounds in optically pure form, we have focused our research attention in the chemoenzymatic stereoselective synthesis of adequate building blocks for the total synthesis of rivastigmine [3-[1-(dimethylamino)-ethyl]phenyl ethyl(methyl)carbamate, **1a**] or miotine (**1b**, Figure 1). The activity of these drugs mostly resides in their (*S*)-enantiomers. Thus, (*S*)-rivastigmine is described for the

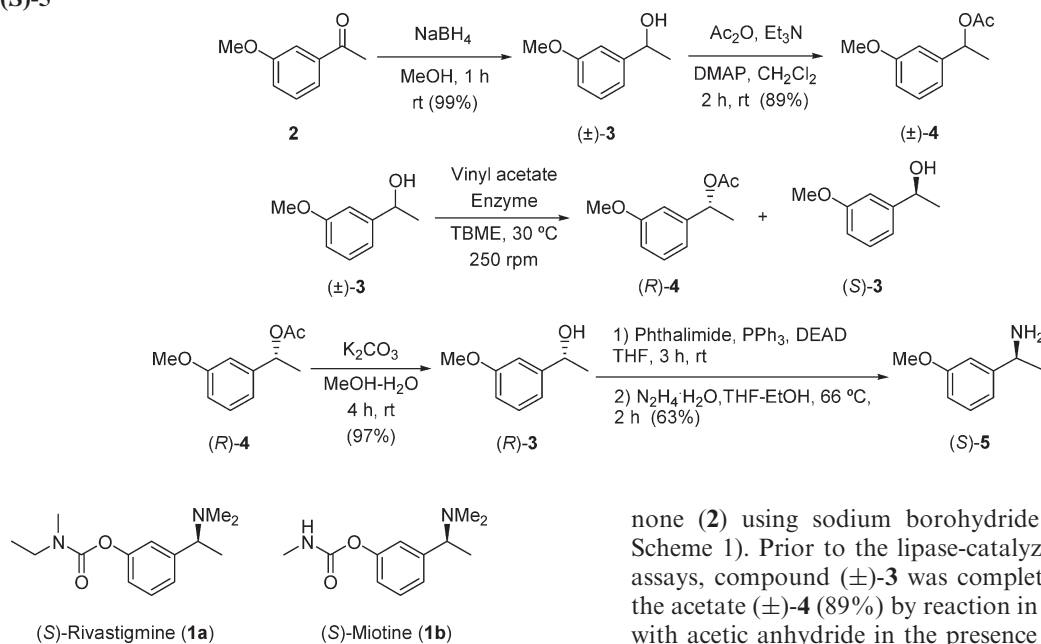
*Corresponding author. Phone: +34 98 5103448. Fax: +34 98 5103448.

(1) Carey, J. S.; Laffan, D.; Thomson, C.; Williams, M. T. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2337–2347.

(2) (a) Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolts, M.; Witholt, B. *Nature* **2001**, *409*, 258–268. (b) Zaks, A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 130–136. (c) Patel, R. N. *Enzym. Microb. Technol.* **2002**, *31*, 804–826. (d) Straathof, A. J. J.; Panke, S.; Schmid, A. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 548–556. (e) Panke, S.; Held, M.; Wubbolts, M. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 272–279. (f) Gotor-Fernández, V.; Gotor, V. In *Industrial enzymes: Structure, function and applications*; Polaina, J., MacCabe, A. P., Eds.; Springer: Dordrecht, 2007; Chapter 18, pp 301–315. (g) Tao, J. *Green Chem.* **2008**, *10*, 361–372. (h) Woodley, J. M. *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 321–327.

(3) (a) Gotor-Fernández, V.; Rebolledo, F.; Gotor, V. In *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*; Patel, R. N., Ed.; CRC Press: Boca Raton, 2006; Chapter 7, pp 203–248. (b) Gotor-Fernández, V.; Brieva, R.; Gotor, V. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *40*, 111–120. (c) Patel, R. N. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 659–701.

(4) (a) Ghanem, A.; Aboul-Enen, H. Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *14*, 3331–3351. (b) Ghanem, A. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1721–1754.

SCHEME 1. Chemical Synthesis and Lipase-Catalyzed Acetylation of (±)-3 Using Vinyl Acetate As Acyl Donor for the Production of Amine (S)-5

FIGURE 1. Rivastigmine and miotine structures.

treatment of mild to moderate dementia of the Alzheimer's type, and its tartrate salt is marketed under brand name Exelon.⁵ Rivastigmine tartrate is included in the cholinesterase inhibitor group, improving mental function by increasing the amount of acetylcholine in brain, allowing better responses for memory, attention, and learning skills. Meanwhile, miotine is a cholinesterase inhibitor which has been used in therapy only as a miotic and which is relatively unstable at physiologic pH.⁶

Previous synthetic procedures have been developed for the production of racemic or optically active rivastigmine, but as far as we know, none of them imply the use of biocatalysts,⁷ although some biotransformations have been used for the preparation of some intermediates using alcohol dehydrogenases⁸ or feruloyl esterase from *Humicola insolens*.⁹ Herein, we report a practical chemoenzymatic approach for the synthesis of adequate intermediates in the preparation of optically active rivastigmine or miotine to later carry out the total synthesis of (S)-rivastigmine.

Results and Discussion

First, we looked for possible chiral compounds which are susceptible to the introduction of chirality in the moiety. In this manner, (±)-1-(3-methoxyphenyl)ethanol (**3**) was selected and successfully prepared as a racemate by chemical reduction of commercially available 3-methoxyacetophe-

none (**2**) using sodium borohydride in methanol (99%, Scheme 1). Prior to the lipase-catalyzed transesterification assays, compound (±)-**3** was completely transformed into the acetate (±)-**4** (89%) by reaction in dry dichloromethane with acetic anhydride in the presence of triethylamine and 4-(*N,N*-dimethylaminopyridine) (DMAP), in order to establish robust analytical methods for the HPLC separation of the two enantiomers and the measurement of the enantiomeric excesses in the biocatalyzed reactions. Then enzymatic processes were carried out and the reaction courses regularly followed by chiral HPLC.¹⁰

The enzymatic kinetic resolution of (±)-**3** was initially attempted using *Candida antarctica* lipase type B (CAL-B) and *Pseudomonas cepacia* lipase (PS-C I) using 2 equiv of vinyl acetate as acyl donor and *tert*-butyl methyl ether (TBME) as solvent at 30 °C. Reactions were carried out at 0.1 M substrate concentration, showing both biocatalysts excellent enantioselectivities in the acetylation of (R)-**3** (Table 1). In addition, short reaction times (less than 2 h, entries 1–2) were necessary to reach 50% conversion values. Absolute configurations of substrate and product were in accordance with the empirical Kazlauskas rule (see the Experimental Section for further details regarding optical rotation values).¹¹ As expected, when a lower amount of lipase was used, slower reactions were observed (entries 3–4), and both substrate and product in enantiopure form were recovered if CAL-B was employed in the enzymatic kinetic resolution process.

In order to extend the applicability of this enzymatic approach, we decided to explore three important factors for the application of this protocol in the industrial sector: enzyme recycling, reaction scale up, and dynamic kinetic resolution possibility. As shown in Table 2, the reuse of the immobilized CAL-B led to almost the same enantioselectivity and enzyme activity after five reaction cycles, when racemic alcohol was treated with CAL-B (1:0.5 ratio in weight) and 2 equiv of vinyl acetate during 3.5 h in TBME

(5) Spencer, C. M.; Noble, S. *Drugs Aging* **1998**, *13*, 391–411.

(6) Main, A. R. *Pharmacol. Ther.* **1979**, *6*, 579–628.

(7) See, for example: (a) Boezio, A. A.; Pytkowicz, C. A.; Charette, A. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14260–14261. (b) Feng, J.; Chen, W.-m.; Sun, P.-h. *Nanfang Yike Daxue Xuebao* **2007**, *27*, 177–180.

(8) (a) Stampfer, W.; Kosjek, B.; Faber, K.; Kroutil, W. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 402–406. (b) Inoue, K.; Makino, Y.; Itoh, N. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 2539–2549. (c) Machado, L. L.; Lemos, T. L. G.; de Mattos, M. C.; de Oliveira, M. C. F.; de Gonzalo, G.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1419–1424.

(9) Hatzakis, N. S.; Smonou, I. *Bioorg. Chem.* **2005**, *33*, 325–337.

(10) Chen, C.-S.; Fujimoto, Y.; Girdeuskas, G.; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294–7299.

(11) (a) Kazlauskas, R. J.; Weissfloh, A. N. E.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656–2665. (b) Cygler, M.; Grochulski, P.; Kazlauskas, R. J.; Schrag, J. D.; Bouthillier, F.; Rubin, B.; Serreque, A. N.; Gupta, A. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3180–3186. (c) Jing, Q.; Kazlauskas, R. J. *Chirality* **2008**, *20*, 724–735.

TABLE 1. Enzymatic Kinetic Resolution of (\pm)-3 using 2 equiv of Vinyl Acetate in TBME at 30 °C and 250 rpm

entry	enzyme	ratio ^a	time (h)	ee _P (%) ^b	ee _S (%) ^b	c (%) ^c	E ^d
1	CAL-B	1:1	1.5	98.5	>99	50	>200
2	PS-C I	1:1	1.5	92	>99	52	179
3	CAL-B	1:0.5	4	>99 (43)	>99 (49)	50	>200
4	PS-C I	1:0.5	4	96.5	>99	51	>200

^aRatio substrate vs enzyme in weight. ^bDetermined by HPLC. Isolated yields in parentheses. ^cc = ee_S/(ee_S + ee_P). ^dE = ln[(1 - c)(1 - ee_S)]/ln[(1 - c)(1 + ee_P)].

TABLE 2. Study of Enzyme Recycling for the Enzymatic Kinetic Resolution of (\pm)-3 with CAL-B

cycle no.	ee _P ^a (%)	ee _S ^a (%)	c ^b (%)	E ^c
1	>99	98.6	49.7	>200
2	>99	98.2	49.6	>200
3	>99	98.0	49.5	>200
4	>99	97.9	49.5	>200
5	>99	97.7	49.5	>200
6	>99	96.0	49.0	>200

^aDetermined by HPLC. ^bc = ee_S/(ee_S + ee_P). ^cE = ln[(1 - c)(1 - ee_S)]/ln[(1 - c)(1 + ee_P)].

at 30 °C. These data highlight the utilization of a well-known biocatalyst as CAL-B for the synthesis of the desired optically active intermediate in the synthesis of rivastigmine.

At the same time, the reaction was scaled up using 1.5 g of starting material and only 75 mg of enzyme (1:0.05 ratio in weight), isolating both acetate (*R*)-4 and alcohol (*S*)-3 in enantiopure form after 24 h at 30 °C and 250 rpm. This issue is critical for the development of a highly economic process at industrial scale.

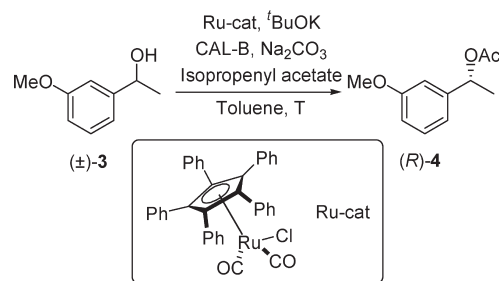
Dynamic kinetic resolution (DKR) is a powerful tool for the production of optically active compounds. The DKR approach, based on the combination of resolution mediated by a lipase and in situ racemization operated by a metal catalyst, allows a theoretical 100% conversion value, overcoming the limitation of the maximum 50% yield in a kinetic resolution process.¹² In this manner, we tested the possibilities of combining the best biocatalyst found in the lipase-mediated kinetic resolution of 1-(3-methoxyphenyl)ethanol (CAL-B) with the use of a well-known metal complex catalyst such as chlorodicarbonyl(1,2,3,4,5-pentaphenylcyclopentadienyl)ruthenium(II), which in the presence of sodium carbonate and potassium *tert*-butoxide form the corresponding alkoxide complex responsible of the racemization process (Scheme 2).¹³ Results are described in Table 3.

Because of the short reaction time and mild conditions required for the kinetic resolution of racemic alcohol 3, dynamic kinetic resolution processes were initially run at 30 °C using isopropenyl acetate as acyl donor, yielding the (*R*)-acetate 4 in enantiopure form at a 85% conversion after 24 h (entry 1). Isopropenyl acetate was selected instead of vinyl acetate because side reactions occur when using vinyl acetate due to the formation of acetaldehyde. The temperature was increased to 50 °C in order to facilitate the racemi-

TABLE 3. Dynamic Kinetic Resolution of Racemic 3 with CAL-B and a Ruthenium Complex Using 1.5 equiv of Isopropenyl Acetate As Acyl Donor and Toluene as Solvent after 24 h

entry	T (°C)	CAL-B ^a	c ^b (%)	ee _P ^c (%)
1	30	25	85	>99
2	50	25	>97	98
3	50	15	95 (91)	>99
4	50	50	>97	97

^aRatio referred to mg of CAL-B vs mmol of (\pm)-alcohol 3. ^bDetermined by ¹H NMR of the reaction crude. Isolated yields in parentheses after flash chromatography on silica gel. ^cDetermined by GC.

SCHEME 2. Dynamic Kinetic Resolution of Alcohol (\pm)-3 Catalyzed by CAL-B and a Ruthenium Complex Using Isopropenyl Acetate As Acyl Donor and Toluene as Solvent

zation step reaching an excellent conversion and the acetate in nearly enantiopure form (98% ee, entry 2). The influence of the enzyme loading was analyzed by trying to recover the product as a single enantiomer and observing the best results when the amount of CAL-B decreased from 25 to 15 mg of enzyme/mmol of alcohol 3 (entry 3). In this manner, acetate (*R*)-4 was obtained in 91% isolated yield and >99% ee. However, an increase in the amount of biocatalyst to 50 mg/mmol of substrate had little influence on the process (entry 4). Therefore, the efficiency of biotransformations, which have made possible access to an enantiomerically pure compound in excellent yield from the corresponding racemate in just one reaction step, has been proven.

Because targeted rivastigmine possesses an (*S*)-configuration, it was mandatory to perform a stereoinversion in the chiral center of the (*R*)-acetate 4 to prepare the amino precursor (*S*)-5, an adequate building block for the total synthesis of rivastigmine. At this point, we first carried out the deprotection of the ester (*R*)-4 by using potassium carbonate in a mixture of methanol and water at room temperature. This process occurred in nearly quantitative yield (97% isolated yield). Then the configuration of alcohol (*R*)-3 was inverted after reaction with phthalimide, triphenylphosphine, and diethyl azodicarboxylate (DEAD) in dry tetrahydrofuran (THF), obtaining the corresponding protected amine that was subsequently deprotected employing hydrazine in a mixture of ethanol and THF at 66 °C. This chemical route led to the amine (*S*)-5 in a combined 63% yield of the last two steps.

(12) (a) Huerta, F. F.; Minidis, A. B. E.; Bäckvall, J.-E. *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 321–331. (b) Kim, M.-J.; Ahn, Y.; Park, J. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 578–587. (c) Pàmies, O.; Bäckvall, J.-E. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3247–3261. (d) Martín-Matute, B.; Bäckvall, J.-E. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 226–232. (e) Martín-Matute, B.; Bäckvall, J.-E. In *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*; Gotor, V., Alfonso, I., Garcia-Urdiales, E., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2008; Chapter 4, pp 89–114.

(13) (a) Martín-Matute, B.; Edin, M.; Bogar, K.; Bäckvall, J.-E. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 6535–6539. (b) Martín-Matute, B.; Edin, M.; Bogar, K.; Kaynak, F. B.; Bäckvall, J.-E. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8817–8825.

SCHEME 3. Chemical Synthesis of Racemic Amine 5 and Later Enzymatic Kinetic Resolution

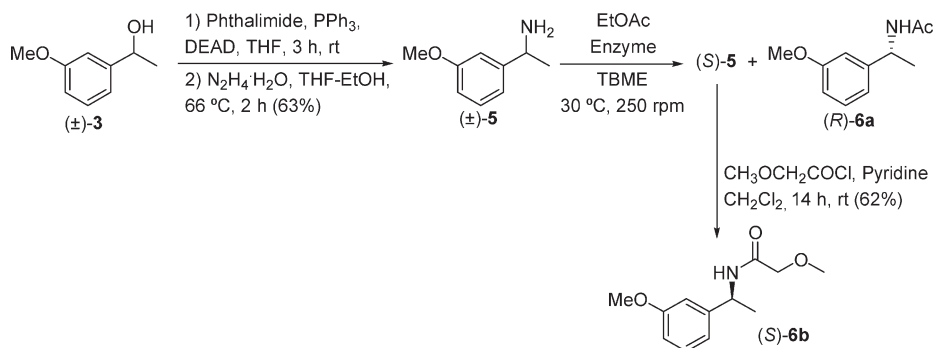


TABLE 4. Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of (±)-5 Using EtOAc as Acyl Donor and TBME as Solvent at 250 rpm

entry	enzyme	T (°C)	time (h)	ee_p^a (%)	ee_s^a (%)	c^b (%)	E^c
1	CAL-B	30	27	> 99	93.5	48.5	> 200
2	PS-C I	30	120	90	7.5	8	21
3	CAL-B	45	19	> 99 (43)	97.5 (34)	49.5	> 200

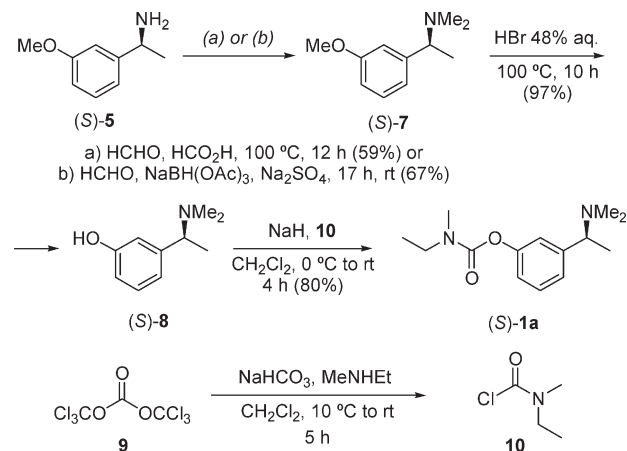
^aDetermined by HPLC. Isolated yields in parentheses. ^b $c = ee_s/(ee_s + ee_p)$. ^c $E = \ln[(1 - c)(1 - ee_s)]/\ln[(1 - c)(1 + ee_p)]$.

Alternative methods were considered at this time, such as the synthesis and later enzymatic resolution of racemic amine 5. Enzymatic aminolysis processes are less studied than the analogous transesterification procedures, but lipases have shown excellent potential in this class of biotransformations.¹⁴ In fact, CAL-B is considered an ideal catalyst for the production of nitrogenated organic compounds.¹⁵ Thus, 1-(3-methoxyphenyl)ethanamine was prepared under conditions analogous to those previously used for the isolation of enantiomerically pure (S)-5 using Mitsunobu reaction conditions and a deprotection step from racemic alcohol 3 (Scheme 3).

Then, different reaction parameters that have an influence on the lipase-catalyzed aminolysis processes were assayed as type of biocatalyst, reaction time, or temperature. The results have been collected in Table 4. Again, CAL-B and PS-C I were chosen as enzymes, using a double amount of enzyme vs starting material (weight ratio); meanwhile, TBME was used as solvent and EtOAc as acyl donor. Aliquots were regularly taken, converting in situ the non-reacting optically active amine of the lipase-mediated process in the corresponding methoxyacetamide 6b, which was previously prepared in racemic form in order to find reliable techniques for the separation of its two enantiomers (see the Supporting Information for analytical data).

Conversely to the reaction that occurred with the alcohol derivative, remarkable differences were observed for CAL-B and PS-C I at 30 °C (entries 1 and 2). CAL-B stereoselectively acetylated the (R)-enantiomer, yielding the acetamide in enantiomerically pure form and the remaining (S)-amine 5 in very high optical purity after 27 h of reaction. Best values were achieved by increasing the temperature to 45 °C (entry 3) and obtaining both product and substrate in almost enantiopure form after 19 h. In addition, longer reaction

SCHEME 4. Chemical Synthesis of (S)-Rivastigmine from (S)-5



times led to a decrease in the enzyme enantioselectivity (data not shown).

Finally, our attention was focused on the chemical preparation of rivastigmine from enantiopure amine (S)-5 following a straightforward chemical route consisting of three steps (Scheme 4). First, the dimethylation of the amino group was carried out using formic acid and formaldehyde at 100 °C obtaining (S)-7 in 59% isolated yield. Alternatively, a slightly better result was obtained when the amine was treated with the 37% aqueous solution of formaldehyde in water followed by a small amount of sodium sulfate and sodium triacetoxyborohydride [NaBH(OAc)₃], as this route led to (S)-7 in 67% yield.

Next, the cleavage of the *O*-methyl bond occurred in nearly quantitative yield using a 48% solution of HBr in water.¹⁶ Finally, *N*-ethyl-*N*-methylcarbamoyl chloride (10) was generated in situ from triphosgene (9) and *N*-ethyl-*N*-methylamine in the presence of sodium bicarbonate in CH₂Cl₂, and the mentioned compound allowed the

(14) (a) Gotor-Fernández, V.; Gotor, V. *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 1125–1143. (b) Ditrich, K. *Synthesis* **2008**, 2283–2287. (c) Gotor-Fernández, V.; Gotor, V. In *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*; Gotor, V., Alfonso, I., García-Urdiales, E., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2008; Chapter 7, pp 171–192.

(15) Gotor-Fernández, V.; Busto, E.; Gotor, V. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 797–812.

(16) Sheng, R.; Lin, X.; Li, J.; Jiang, Y.; Shang, Z.; Hu, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3834–3837.

carbamoylation of alcohol (*S*)-**8** in the presence of sodium hydride using CH_2Cl_2 as solvent at room temperature, isolating enantiomerically pure (*S*)-rivastigmine in 80% yield.

Conclusions

In summary, a novel practical chemoenzymatic strategy has been developed for the preparation of enantiopure (*S*)-rivastigmine, where the stereoselective synthetic step has been performed by using a lipase as catalyst in contrast with traditional synthetic routes that usually employ diastereomeric salts. Lipase-catalyzed acetylation processes of 1-(3-methoxyphenyl)ethanol have been carried out and parameters that have influence in the enzymatic processes optimized, focusing attention on the lipase recycling and scale-up of the kinetic resolution process. In addition, performing a dynamic kinetic resolution reaction using a complementary metal complex has been successfully achieved for the production of (*R*)-1-(3-methoxyphenyl)ethyl acetate. An alternative synthetic route involving the preparation and enzymatic kinetic resolution of racemic 1-(3-methoxyphenyl)ethanamine has been also considered observing lower kinetics for this amino compound in comparison with the alcohol analogue. Finally, we have completed the total synthesis of (*S*)-rivastigmine in a practical and efficient chemical way from 3-methoxyacetophenone in seven steps and a global 29% isolated yield.

Experimental Section

Synthesis of 1-(3-Methoxyphenyl)ethanol (3). To a solution of ketone **2** (3.0 g, 20 mmol) in dry MeOH (77 mL) under nitrogen atmosphere was added NaBH_4 (1.14 g, 30 mmol) at 0 °C. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 1 h. Unreacted excess hydride was destroyed by careful addition of water (5 mL), and MeOH was then evaporated. The mixture was basified with NaOH 3 N (15 mL) and extracted with CH_2Cl_2 (3 × 15 mL). The organic layers were combined and dried over Na_2SO_4 , and the solvent was evaporated under reduced pressure. The reaction crude was purified by flash chromatography on silica gel (40% EtOAc/hexane) to afford racemic alcohol **3** as a colorless oil (99% isolated yield): R_f (40% EtOAc/hexane) 0.37; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300.13 MHz) δ 1.48 (d, 3H, $^3J_{\text{HH}} = 6.5$ Hz, H_1), 1.87 (s, 1H, H_{10}), 3.82 (s, 3H, H_9), 4.86 (q, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, H_2), 6.81 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2.6$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 1.1$ Hz, H_6), 6.94 (m, 2H, $\text{H}_4 + \text{H}_8$) and 7.26 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, H_7); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz) δ 25.6 (C_1), 55.7 (C_9), 70.7 (C_2), 111.4 (C_4), 113.3 (C_5), 118.2 (C_8), 130.0 (C_7), 148.1 (C_3), 160.2 (C_3).

Synthesis of 1-(3-Methoxyphenyl)ethyl Acetate (4). To a solution of alcohol **3** (100 mg, 0.66 mmol) in dry CH_2Cl_2 (10 mL) were successively added Et_3N (280 μL , 2.0 mmol), DMAP (25.6 mg, 0.20 mmol), and Ac_2O (128 μL , 1.32 mmol) under nitrogen atmosphere. The reaction was stirred at room temperature for 2 h and stopped by addition of water (30 mL). The mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3 × 15 mL), and the organic layers were combined and dried over Na_2SO_4 . The solvent was evaporated under reduced pressure and the reaction crude purified by flash chromatography on silica gel (20% EtOAc/hexane), affording acetate **4** as a clear yellow oil (89% isolated yield): R_f (20% EtOAc/hexane) 0.30; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 300.13 MHz) δ 1.52 (d, 3H, $J_{\text{HH}} = 6.6$, H_1), 2.07 (s, 3H, H_9), 3.81 (s, 3H, H_7), 5.85 (q, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 6.6$, H_2), 6.81 (ddd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, $^4J_{\text{HH}} = 2.3$ Hz, $^2J_{\text{HH}} = 0.8$ Hz, H_6), 6.91 (m, 2H, $\text{H}_4 + \text{H}_8$), 7.26 (t, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, H_7); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz) δ 21.2 (C_1), 22.1 (C_{11}), 55.0 (C_9), 72.0 (C_2), 111.7 (C_4), 112.9 (C_6), 118.2 (C_8), 129.4 (C_7), 143.2 (C_3), 159.6 (C_5), 170.3 (C_{10}).

Typical Procedure for the Enzymatic Kinetic Resolution of 1-(3-Methoxyphenyl)Ethanol. To a suspension of racemic alcohol **3** (50 mg, 0.33 mmol) and CAL-B (25 mg) in dry TBME (3.3 mL) was added vinyl acetate (60.6 μL , 0.66 mmol) under nitrogen atmosphere. The reaction was shaken at 30 °C and 250 rpm, and regular aliquots were taken and analyzed by HPLC until around 50% conversion was reached (4 h). The reaction was then stopped and the enzyme filtered with CH_2Cl_2 (3 × 5 mL). The solvent was evaporated and the crude of the reaction purified by flash chromatography on silica gel (10–30% EtOAc/hexane), affording (*R*)-(+)-**4** [43% isolated yield and >99% ee, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +93.6$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2)] and (*S*)-(–)-**3** [49% isolated yield and >99% ee, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -29.5$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2)].¹⁷ See Tables 1 and 2.

Dynamic Kinetic Resolution of 1-(3-Methoxyphenyl)ethanol. Over a solution of chlorodicarbonyl(1,2,3,4,5-pentaphenylcyclopentadienyl)ruthenium(II) (0.020 mmol, 13 mg) in dry toluene (0.4 mL) under N_2 atmosphere was added a 0.5 M solution of KO^tBu in THF (48 μL , 0.024 mmol). The mixture was stirred for 6 min at room temperature, and after this time, racemic 3-methoxy-1-phenylethanol (60 mg, 0.40 mmol) in toluene (0.4 mL) was added. The solution was stirred at room temperature for an additional 4 min, and after this time, Na_2CO_3 (42 mg, 0.4 mmol), CAL-B (10 mg), and isopropenyl acetate (72 μL , 0.60 mmol) were added, and the mixture was at 50 °C for 24 h. The reaction was filtered and the solvent evaporated under reduced pressure. Purification by column chromatography on silica gel (15% EtOAc/hexane) afforded 70 mg of (*R*)-3-methoxy-1-phenylethanol as a colorless oil (91% isolated yield and >99% ee). See Table 3.

Chemical Hydrolysis of 1-(3-Methoxyphenyl)ethyl Acetate (4). To a solution of (*R*)-**4** (750 mg, 3.86 mmol) in MeOH (18.8 mL) were added K_2CO_3 (1.07 g, 7.72 mmol) and H_2O (18.8 mL). The mixture was stirred at room temperature for 4 h until complete consumption of the starting material. Then MeOH was evaporated under reduced pressure, and the resulting aqueous solution was extracted with EtOAc (3 × 15 mL). The organic layers were combined and dried over Na_2SO_4 , and the solvent was evaporated. The reaction crude was later purified by flash chromatography on silica gel (30% EtOAc/hexane), affording alcohol (*R*)-**3** (97% isolated yield).

Synthesis of 1-(3-Methoxyphenyl)ethanamine (5). To a solution of **3** (568 mg, 3.73 mmol) in dry THF (19 mL) were successively added PPh_3 (1.15 g, 4.37 mmol) and phthalimide (550 mg, 3.73 mmol) under a nitrogen atmosphere. The resulting solution was cooled to 0 °C, and DEAD (687 μL , 4.37 mmol) was added. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for 3 h until no starting material was detected by TLC analysis. The organic solvent was evaporated under reduced pressure, and the deprotection reaction was carried out without further purification. The mixture was dissolved in THF (50 mL) and EtOH (8.7 mL), and then hydrazine monohydrate (1.36 mL, 28.01 mmol) was added dropwise. The mixture was stirred at 66 °C under reflux for 2 h. The white suspension formed after this time was filtered and washed with THF, and then the organic solvent was evaporated under reduced pressure. At this point, HCl 3 N was added to the mixture, and the solution was extracted with CH_2Cl_2 (3 × 15 mL), discarding the organic layer. Then, the aqueous phase was basified with NaOH 3 N and extracted with CH_2Cl_2 . The organic layers were combined and dried over Na_2SO_4 , and the solvent was evaporated under reduced pressure. Finally, the crude was purified by flash chromatography on silica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 96/4/0.4), affording the amine **5** as a clear oil (63% isolated

(17) (a) Pastor, I. M.; Vastila, P.; Adolfsson, H. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 4031–4045; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -30.9$ ($c = 0.85$, MeOH). (b) Morris, D. J.; Hayes, A. M.; Wills, M. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 7035–7044; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -30.9$ ($c = 1.0$, MeOH).

yield): R_f (CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 96/4/0.4) 0.17; ¹H NMR (MeOD, 300.13 MHz) δ 1.41 (d, 3H, ³ J_{HH} = 6.8 Hz, H₁), 3.81 (s, 3H, H₉), 4.04 (q, 1H, ³ J_{HH} = 6.8 Hz, H₂), 6.82 (ddd, ³ J_{HH} = 8.3 Hz, ⁴ J_{HH} = 2.3 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.0 Hz, H₆), 6.94–6.97 (m, 2H, H₄+H₈), 7.26 (t, 1H, ³ J_{HH} = 8.3 Hz, H₇); ¹³C NMR (MeOD, 75.5 MHz) δ 25.6 (C₁), 52.7 (C₂), 56.1 (C₉), 113.0 (C₄), 113.9 (C₆), 119.6 (C₈), 131.1 (C₇), 150.0 (C₃), 161.8 (C₅); $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = –13.6 (c = 0.74, MeOH) for >99% ee.

Synthesis of *N*-[1-(3-Methoxyphenyl)ethyl]acetamide (6a). To a solution of racemic amine **5** (37.2 mg, 0.25 mmol) in dry CH₂Cl₂ (1.6 mL) was added pyridine (24.8 μ L, 0.31 mmol) under nitrogen atmosphere. The resulting solution was cooled to 0 °C, and acetyl chloride (43.8 μ L, 0.62 mmol) was carefully added. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for an additional 14 h until no starting material was detected by TLC analysis. The organic solvent was evaporated under reduced pressure and the reaction crude purified by flash chromatography on silica gel (80% EtOAc/hexane), isolating the amide (\pm)-**6a** as an orange oil (85% isolated yield): R_f (80% EtOAc/hexane) 0.26; ¹H NMR (MeOD, 300.13 MHz) δ 1.45 (d, ³ J_{HH} = 7.1 Hz, 3H, H₁), 1.99 (s, 3H, H₁₁), 3.82 (s, 3H, H₉), 5.00 (q, ³ J_{HH} = 7.1 Hz, 1H, H₂), 6.82 (ddd, ³ J_{HH} = 8.2 Hz, ⁴ J_{HH} = 2.6 Hz, ⁴ J_{HH} = 1.0 Hz, 1H, H₆), 6.93–6.91 (m, 2H, H₄ + H₈), 7.26 (t, ³ J_{HH} = 8.2 Hz, 1H, H₇); ¹³C NMR (MeOD, 75.5 MHz) δ 22.9 (C₁), 23.1 (C₁₁), 50.6 (C₂), 56.1 (C₉), 113.5 (C₄), 113.8 (C₆), 119.8 (C₈), 131.0 (C₇), 147.3 (C₃), 161.8 (C₅), 172.0 (C₁₀).

Synthesis of 2-Methoxy-*N*-[1-(3-methoxyphenyl)ethyl]acetamide (6b). To a solution of racemic amine **5** (37.2 mg, 0.25 mmol) in dry CH₂Cl₂ (1.6 mL) was added pyridine (24.8 μ L, 0.31 mmol) under nitrogen atmosphere. The resulting solution was cooled to 0 °C, and methoxyacetyl chloride (56.3 μ L, 0.62 mmol) was carefully added. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred for an additional 4 h until no starting material was detected by TLC analysis. The organic solvent was evaporated under reduced pressure and the reaction crude purified by flash chromatography (80% EtOAc/hexane), isolating the corresponding amide (\pm)-**6b** as a pale yellow solid (62% isolated yield): R_f (80% EtOAc/hexane) 0.29; ¹H NMR (MeOD, 300.13 MHz) δ 1.51 (d, ³ J_{HH} = 7.1 Hz, 3H, H₁), 3.44 (s, 3H, H₁₂), 3.82 (s, 3H, H₉), 3.93 (d, ² J_{HH} = 2.0 Hz, 2H, H₁₁), 5.09 (q, ³ J_{HH} = 7.1 Hz, 1H, H₂), 6.83 (ddd, ³ J_{HH} = 8.1 Hz, ⁴ J_{HH} = 2.5 Hz, ⁴ J_{HH} = 0.8 Hz, 1H, H₆), 6.96–6.93 (m, 2H, H₄+H₈), 7.26 (t, ³ J_{HH} = 8.1 Hz, 1H, H₇); ¹³C NMR (MeOD, 75.5 MHz) δ 22.6 (C₁), 50.2 (C₂), 56.1 (C₉), 60.0 (C₁₂), 73.2 (C₁₁), 113.5 (C₄), 114.0 (C₆), 119.9 (C₈), 131.1 (C₇), 147.0 (C₃), 161.9 (C₅), 172.0 (C₁₀).

Typical Procedure for the Enzymatic Kinetic Resolution of 1-(3-Methoxyphenyl)Ethanamine (\pm)-5**.** To a suspension of racemic amine **6** (50 mg, 0.33 mmol) and CAL-B (100 mg) in dry TBME (3.3 mL) was added ethyl acetate (97 μ L, 0.99 mmol) under nitrogen atmosphere. The reaction was shaken at 30 or 45 °C and 250 rpm, taking regularly aliquots that were analyzed by HPLC until around 50% conversion was reached (19 h for 45 °C or 27 h for 30 °C). Then the reaction was stopped and the enzyme filtered with CH₂Cl₂ (5 \times 1 mL). The solvent was evaporated and the crude of the reaction purified by flash chromatography (CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 96/4/0.4) affording (*S*)-(-)-**5** [34% isolated yield and 97.5% ee, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = –13.6 (c = 0.74, MeOH)]¹⁸ and (*R*)-(+)-**6a** [43% isolated yield and >99% ee, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = +166.13 (c = 1, CHCl₃)]. See Table 3.

Synthesis of (*S*)-1-(3-Methoxyphenyl)-*N,N*-dimethylethanamine (7**).** **Route A.** To a solution of (*S*)-**5** (240 mg, 1.58 mmol) in formic acid (2.4 mL) was added a 37% solution of formaldehyde in water (1.84 mL, 22.22 mmol), and then the mixture was

heated to 100 °C for 12 h. NaOH 3 N was added until basic pH and the mixture extracted with CH₂Cl₂ (3 \times 15 mL). The organic layers were combined and dried under Na₂SO₄, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The reaction crude was purified by flash chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 96/4/0.4), affording (*S*)-**8** as a yellow oil (59% isolated yield): R_f (CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 96/4/0.4) 0.38; ¹H NMR (CDCl₃, 300.13 MHz) δ 1.38 (d, 3H, ³ J_{HH} = 6.6 Hz, H₁), 2.22 (s, 6H, H₁₀), 3.24 (q, 1H, ³ J_{HH} = 6.6 Hz, H₂), 3.80 (s, 3H, H₉), 6.78 (ddd, 1H, ³ J_{HH} = 8.1 Hz, ³ J_{HH} = 2.4 Hz, ³ J_{HH} = 0.9 Hz, H₆), 6.89–6.87 (m, 2H, H₄ + H₈), 7.22 (t, 1H, ³ J_{HH} = 8.1 Hz, H₇); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ 20.2 (C₁), 43.1 (C₁₀), 55.1 (C₉), 66.1 (C₂), 112.4 (C₄), 112.9 (C₆), 119.9 (C₈), 129.1 (C₇), 145.2 (C₃), 159.5 (C₅); $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = –43.6 (c = 1, MeOH) for >99% ee.

Route B. To a solution of (*S*)-**5** (95.3 mg, 0.63 mmol) in CH₂Cl₂ (7.9 mL) were successively added a 37% aqueous solution of formaldehyde in water (142 μ L, 1.89 mmol), Na₂SO₄ (30 mg), and sodium triacetoxyborohydride (802 mg, 3.78 mmol). The mixture was stirred during 17 h at room temperature until no starting material was detected by TLC analysis (CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 96/4/0.4), a saturated aqueous solution of sodium bicarbonate was added until pH 8–9, and the mixture was extracted with CH₂Cl₂ (5 \times 10 mL). The organic phases were combined and dried over Na₂SO₄, the desiccant agent was filtered off, and the solvent was evaporated under reduced pressure, obtaining a crude that was purified by flash chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 96/4/0.4), affording (*S*)-**7** as a yellow oil (67% isolated yield).

Synthesis of (*S*)-3-[1-(Dimethylamino)ethyl]phenol (8**).** A 48% solution of HBr in water was added over (*S*)-**7** (135 mg, 0.75 mmol) in a sealed tube. The reaction was heated at 100 °C for 10 h. After this time, HBr was evaporated, and an aqueous K₂CO₃ saturated solution was added until basic pH. The resulting mixture was extracted with EtOAc (3 \times 15 mL), the organic layers were combined, filtered, and dried over Na₂SO₄, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The crude was finally purified by flash chromatography on silica gel (CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 96/4/0.4), affording (*S*)-**8** (69% isolated yield): R_f (CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 96/4/0.4) 0.15; ¹H NMR (CDCl₃, 300.13 MHz) δ 1.40 (d, 3H, ³ J_{HH} = 6.8 Hz, H₁), 2.23 (s, 6H, H₁₀), 3.34 (c, 1H, ³ J_{HH} = 6.8, H₂), 6.74 (m, 3H, H₄ + H₆ + H₈), 7.12 (t, 1H, ³ J_{HH} = 7.9, H₇), 8.47 (s, 1H, H₉); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ 21.5 (C₁), 45.0 (C₁₀), 68.1 (C₂), 117.6 (C₄), 117.8 (C₆), 121.8 (C₈), 131.8 (C₇), 145.4 (C₃), 159.6 (C₅); $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = –36.1 (c = 1, EtOH) for >99% ee.

Synthesis of (*S*)-3-[1-(Dimethylamino)ethyl]phenyl Ethyl-(methyl)carbamate (Rivastigmine, **1a).** To a suspension of NaHCO₃ (1.31 g, 13.5 mmol) in dry CH₂Cl₂ (6 mL) under N₂ atmosphere was added triphosgene (1.33 g, 4.50 mmol), and the mixture was cooled to 10 °C under stirring. Then *N*-ethylmethylamine (580 μ L, 6.80 mmol) was added at 10 °C over 2 h. The reaction was allowed to reach room temperature and was stirred for an additional 3 h. After this time, the reaction mixture was filtered to remove NaCl and the solvent of the reaction filtrate removed by distillation at reduced pressure to give 800 mg of *N*-ethyl-*N*-methylcarbamoyl chloride as a crude that was employed for the next step without further purification. Over a solution of (*S*)-(-)-3-[1-(dimethylamino)ethyl]phenol (33 mg, 0.20 mmol) in dry CH₂Cl₂ under N₂ atmosphere and at 0 °C were added sodium hydride (20 mg, 0.40 mmol) and *N*-ethyl-*N*-methylcarbamoyl chloride (49 mg, 0.40 mmol). The suspension was allowed to reach room temperature and was stirred for 4 h. After this time, the reaction was carefully stopped with H₂O (1 mL) and extracted with CH₂Cl₂ (3 \times 5 mL), the organic phases were combined and dried over Na₂SO₄, and the solvent was removed under reduced pressure to afford a crude that was purified by flash chromatography

(18) (a) Mereyala, H. B.; Koduru, S. R.; Cheemalapati, V. N. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 259–267; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = –18.1 (c = 2, MeOH). (b) Hu, M.; Zhang, F.-L.; Xie, M.-H. *Lett. Org. Chem.* **2007**, *4*, 126–128; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = –18.8 (c = 1, EtOH).

(CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 96/4/0.4), affording 40 mg of (*S*)-(-)-rivastigmine as a colorless oil (80% isolated yield): *R*_f (CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 96/4/0.4) 0.30; ¹H NMR (CDCl₃, 300.13 MHz) δ 1.17–1.27 (m, 3H, H₁₂, 2 rotamers), 1.37 (t, ³*J*_{HH} = 6.6 Hz, 3H, H₁), 2.21 (s, 6H, H₉), 2.99–3.07 (m, 3H, H₁₀, 2 rotamers), 3.25 (q, ³*J*_{HH} = 6.6 Hz, 1H, H₂), 3.38–3.51 (m, 2H, H₁₁, 2 rotamers), 7.00–7.14 (m, 3H, H₄ + H₆ + H₈), 7.29 (apparent t, ³*J*_{HH} = 8.1 Hz, 1H, H₇); ¹³C NMR (CDCl₃, 75.5 MHz) δ 12.9 (C₁₂, rotamer 1), 13.6 (C₁₂ rotamer 2), 20.3 (C₁), 34.2 (C₁₀, rotamer 1), 34.6 (C₁₀, rotamer 2), 43.4 (C₉), 44.4 (C₁₁), 66.0 (C₂), 120.8 (CH), 121.2 (CH), 124.7 (CH), 129.3 (CH), 145.4 (C), 151.9 (C), 155.0 (C); [α]_D²⁰ = -28.5 (*c* = 1, CH₂Cl₂) for > 99% ee.

Acknowledgment. We thank Novo Nordisk Co. for the generous gift of CAL-B (Novozyme 435). This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (Project CTQ 2007-61126). V.G.-F. thanks the MICINN for a personal grant (Ramón y Cajal Program). M.R.-M. also thanks MICINN for a predoctoral fellowship.

Supporting Information Available: Experimental procedures, chiral HPLC and GC conditions, characterization data for new compounds, and copies of ¹H NMR, ¹³C NMR, and DEPT spectra. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

ARTÍCULO II. SÍNTESIS ASIMÉTRICA QUIMIOENZIMÁTICA
DE LOS ENANTIÓMEROS DE MICONAZOL Y ECONAZOL.
ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA FRENTE A HONGOS
Y LEVADURAS

El Miconazol y el Econazol pertenecen a la familia de los antifúngicos imidazólicos, diferenciándose estructuralmente en la presencia adicional de un átomo de cloro en el caso del Miconazol (figura I.II.1). Su mecanismo de acción es muy parecido al de otros derivados imidazólicos, bloqueando la síntesis del ergosterol por interacción con el complejo enzimático del citocromo P-450. También actúan inhibiendo las enzimas ATPasas de la membrana celular fúngica, colapsando rápidamente el gradiente de electrolitos y disminuyendo la cantidad de ATP intracelular. Tienen espectros de aplicación bastante amplios y se usan principalmente para tratar candidiasis cutáneas y vaginales, comercializándose en la actualidad en su forma racémica y en múltiples formatos debido al gran espectro de acción que poseen.

En el siguiente trabajo, se describe la preparación quimioenzimática de estos fármacos en donde el paso clave es la biorreducción de una α -clorocetona precursora de ambos productos. Los resultados se encuentran recogidos en “*Asymmetric synthesis of Miconazole and Econazole enantiomers by using chemoenzymatic methods and their biological evaluation*”. J. Mangas-Sánchez, E. Busto, V. Gotor-Fernández, F. Malpartida y V. Gotor. *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 2115-2122.

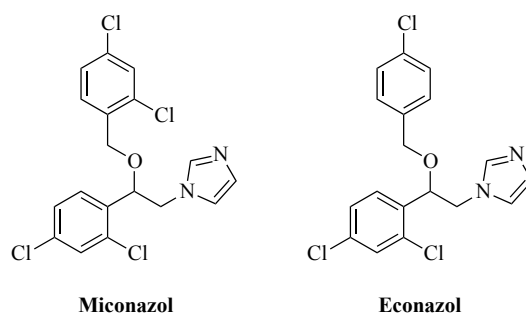


Figura I.II.1. Estructura del Miconazol y del Econazol.

I.II.1 Antecedentes

Hasta el momento no se conocen síntesis quimioenzimáticas del Miconazol y Econazol en forma enantiopura, si bien se ha descrito la obtención de estos compuestos ópticamente activos empleando diversas metodologías tanto de síntesis orgánica como por separaciones analíticas.

En cuanto a los métodos analíticos, se ha descrito el empleo la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) usando columnas de relleno quiral y fluidos supercríticos para el caso del Miconazol y el Econazol,⁸⁵ o bien mediante la técnica de electroforesis capilar solamente para el caso del Econazol.⁸⁶

En el caso de las resoluciones de racematos mediante el empleo de sales diasteroméricas, se ha publicado la resolución del nitrato de Econazol que ha sido llevada cabo mediante una resolución química empleando ácido (*R, R*)- y (*S, S*)- tartárico como agentes de resolución.⁸⁷

Por último, han aparecido en la bibliografía dos procesos de síntesis asimétrica para la preparación de los fármacos en forma ópticamente activa. Tanto para el Miconazol como para el Econazol se ha descrito la reducción asimétrica de la 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etanona utilizando como reductor una oxazaborolidina quiral.⁸⁸ Por otro lado, Pedro y colaboradores han desarrollado una metodología para la preparación del (*S*)-Miconazol a través de una reacción de Henry asimétrica (esquema I.II.1), en donde se prepara el (*S*)-1-(2,4-diclorofenil)-2-nitroetanol con un 98% de exceso enantiomérico y un rendimiento aislado del 86% utilizando como auxiliar quiral un ligando tipo aminopiridina. Posteriormente, tras tres pasos de reacción se llega al producto final sin que haya pérdida de la pureza óptica.⁸⁹

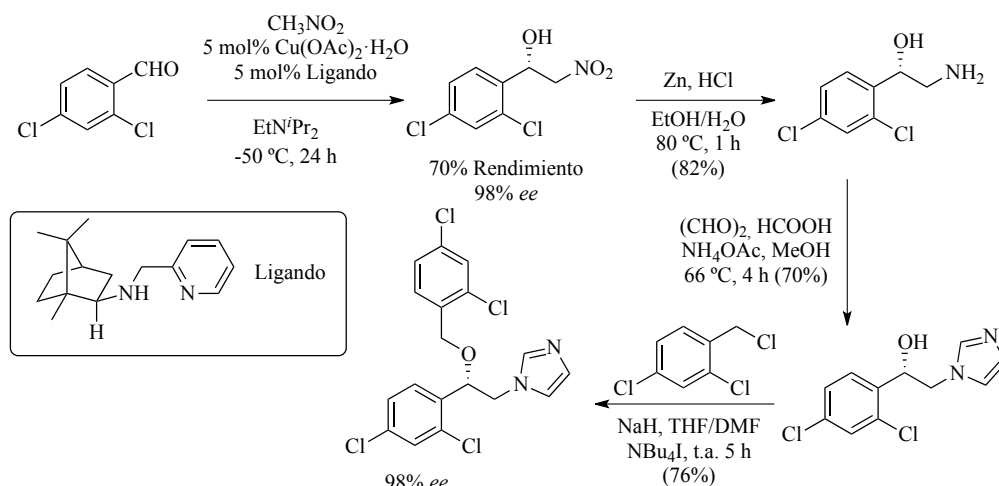
⁸⁵ L. Toribio, M. J. del Nozal, J. L. Bernal, C. Alonso, J. J. Jiménez, *J. Chromatogr., A* **2007**, *1144*, 255-261.

⁸⁶ Y. Y. Yang, X. Q. Ren, A. J. Huang, Y. L. Sun, Z. P. Sun, *J. High Resolut. Chromat.* **1998**, *21*, 421-423.

⁸⁷ A. J. Aasen, P. Groth, *Acta Chem. Scand. Phys. Inorg. Chem.* **1987**, *A41*, 496-450.

⁸⁸ Y. W. Liao, H. X. Li, *Yaoxue Xuebao* **1993**, *28*, 22-27.

⁸⁹ G. Blay, L. R. Domingo, V. Hernández-Olmos, J. R. Pedro, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 4725-4730.



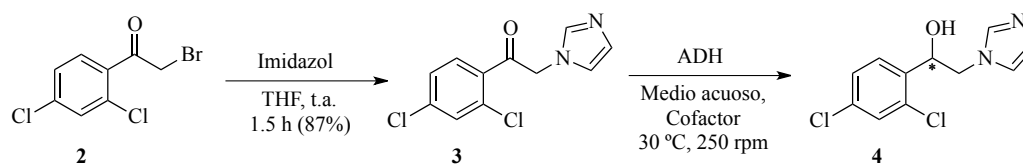
Esquema I.II.1. Preparación de (*S*)-Miconazol mediante la obtención de un precursor adecuado a través de una reacción de Henry asimétrica.

I.II.2. Resultados y discusión

Este trabajo de investigación está basado en la preparación del Miconazol y del Econazol, empleando por primera vez una metodología quimioenzimática, en la que el paso clave de la síntesis para introducir asimetría en un precursor adecuado, está basado en un proceso enzimático. Para ello, se han utilizado biotransformaciones catalizadas por lipasas o alcohol deshidrogenasas, habiendo desarrollado un método sintético efectivo para la preparación de los enantiómeros de Econazol y Miconazol por separado.

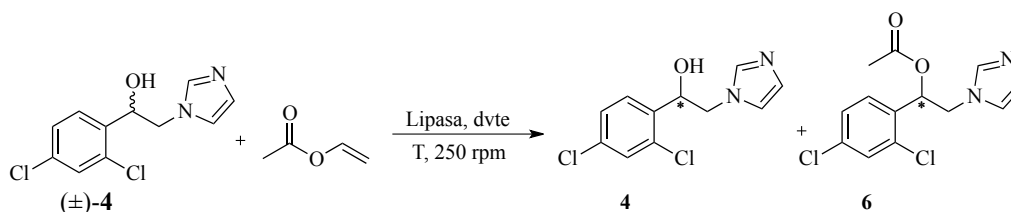
I.II.2.1. Estudios preliminares y optimización del proceso biocatalítico

Inicialmente se llevaron a cabo diferentes estudios ya que las posibilidades que ofrecen los biocatalizadores permiten que la síntesis se pueda abordar desde distintas estrategias enzimáticas. En primer lugar, se procedió al estudio de biorreducción de la cetona **3** que se prepara a partir de la α -bromocetona **2** comercial mediante sustitución nucleófila del Br por imidazol en THF (esquema I.II.2, 87% rendimiento). Se estudiaron diferentes ADHs comerciales (T, CP, LB, PR2, RS1 y A) pero ninguna de ellas mostró una mínima actividad frente a la biorreducción de este sustrato.



Esquema I.II.2. Síntesis y biorreducción catalizada por ADHs de la cetona **3**.

A continuación, se estudió la resolución cinética mediante transesterificación catalizada por lipasas del alcohol comercial (\pm)-**4** (esquema I.II.3). Se probaron diferentes disolventes (THF, 1,4-Dioxano, o el propio acetato de vinilo), diferentes temperaturas (30 y 60 °C), y una gran variedad de lipasas (Lipasas de *Candida antarctica* de tipo A y B, lipasa de *Pseudomonas cepacia*, lipasa de páncreas porcino, lipasa de *Candida cylindracea* o la de *Chromobacterium viscosum*). Desafortunadamente, en ninguna de las condiciones se observó actividad alguna. Tanto en este caso como en el anterior, la gran voluminosidad que presentan los restos que sustituyen al carbono estereogénico hace que los sustratos no sean capaces de acomodarse de manera correcta en el centro activo ni de las alcohol deshidrogenasas ni de las lipasas estudiadas.



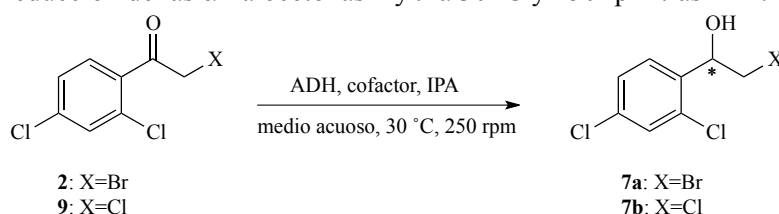
Esquema I.II.3. Resolución cinética mediada por lipasas de (\pm)-**4**.

Llegados a este punto, se decidió ir un paso atrás en la retrosíntesis y tratar de obtener las halohidrinas **7a** y **7b** en forma ópticamente activa. Para ello, en un primer lugar se llevó a cabo la reducción de las halocetonas comerciales **2** y **9** con borohidruro de sodio en metanol anhidro a 0 °C para evitar la formación del epóxido correspondiente. Tras preparar los ésteres de las halohidrinas en forma racémica y una vez desarrollado un método para la determinación de los excesos enantioméricos, se procedió al estudio de su resolución cinética catalizada por lipasas. En el caso de la bromhidrina **7a**, la CAL-B no mostró actividad alguna mientras que con la PSL-C se obtuvieron conversiones muy bajas (2-3%) pero excelentes enantioselectividades (>99%) cuando se usa TBME como disolvente y acetato de vinilo como dador de acilo a 30 °C. En el caso de la clorhidrina **7b**, a pesar de estar menos impedida

estéricamente, se obtuvieron resultados muy parecidos, por lo que no se le encontró utilidad sintética a esta vía.

Posteriormente, se procedió al estudio de biorreducción de las α -halocetonas **2** y **9**. Para ello se probaron diferentes alcohol deshidrogenasas usando isopropanol como cosustrato para regenerar el cofactor, NADH o NADPH como cofactores según la fuente enzimática y una disolución tampón TRIS-HBr o TRIS-HCl a pH 7.5 como medio de reacción. Los mejores resultados se muestran en la tabla I.II.1.

Tabla I.II.1. Biorreducción de las α -halocetonas **2** y **9** a 30 °C y 250 rpm tras 24 h.



Entrada	Cetona	ADH	U	<i>c</i> (%) ^a	<i>ee_p</i> (%) ^b	<i>Conf.</i> ^c
1	2	T	3	>99	>99	<i>R</i>
2	2	PR2	3	37	72	<i>R</i>
3	9	T	3	>99	>99	<i>R</i>
4	9	LB	3	53	90	<i>S</i>
5	9	PR2	3	51	54	<i>S</i>
6	9	CP	3	<3	>99	<i>R</i>
7	9	RS1	3	44	>99	<i>R</i>
8	9	A	3	74	>99	<i>R</i>
9	9	T	1.5	65	>99	<i>R</i>
10	9	A	4.5	95	>99	<i>R</i>

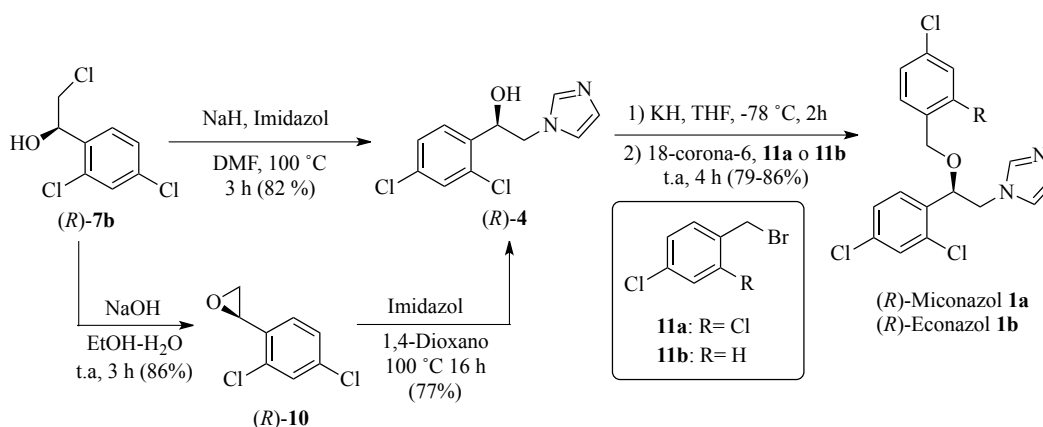
^a Calculada mediante CG. ^b Determinado por HPLC con columna de relleno quiral. ^c Según regla de prioridad CIP (Cahn-Ingold-Prelog).

Inicialmente, en el caso de la α -bromocetona **2** se estudio el comportamiento de las ADH T y ADH PR2. Así, mientras la PR2 mostro una moderada reactividad y estereopreferencia en la reducción del grupo carbonilo (entrada 2), la ADH T permitió reducir completamente la cetona inicial tras 24 h de reacción, aislando el (*R*)-alcohol **7a** en forma enantiopura (entrada 1). En el caso de la α -clorocetona **9**, de las seis enzimas probadas (entradas 3-8), dos de ellas condujeron a la obtención del (*S*)-alcohol (ADH LB y PR2, entradas 4 y 5) con conversiones cercanas al 50% y excesos enantioméricos entre moderados y altos, mientras que los otro cuatro biocatalizadores (T, CP, RS1 y A) permitieron obtener (*R*)-**7b** en forma enantiopura, siendo la ADH T (>99%, entrada 3) y la ADH A (74%, entrada 8) las que permitieron obtener valores más altos de conversión tras 24 h.

Con el fin de optimizar el proceso de biorreducción, se llevó a cabo la transformación con la ADH T empleando solo 1.5 unidades de enzima, observando un descenso considerable en el valor de la conversión (65%, entrada 9). En el caso de la reacción con la ADH A con el fin de desarrollar la reducción completa de la cetona de partida, se decidió emplear mayor cantidad de biocatalizador (4.5 unidades, entrada 10) alcanzando tras 24 h un 95% de conversión en el alcohol (*R*)-**7b** enantiopuro.

I.II.2.2. Preparación del (*R*)-Miconazol y (*R*)-Econazol

Una vez preparado el alcohol precursor del Miconazol y Econazol, se procedió a la síntesis final de los antifúngicos de configuración (*R*). Para ello, se partió de la clorhidrina (*R*)-**7b** obtenida previamente a través del proceso de biorreducción (esquema I.II.4).



Esquema I.II.4. Preparación de (*R*)-Miconazol y (*R*)-Econazol a partir de la clorhidrina (*R*)-**7b**.

El primer paso de la síntesis consiste en la sustitución del átomo de cloro de la clorhidrina (*R*)-**7b** por el imidazol, habiéndose desarrollado dos formas alternativas de llevar a cabo esta transformación, en una sola etapa o en dos. En un principio, y debido a que la formación del epóxido (*R*)-**10** está muy favorecida, se preparó éste mediante reacción con hidróxido sódico (NaOH) en una mezcla de EtOH y H₂O a temperatura ambiente. El epóxido (*R*)-**10** se obtiene con un rendimiento del 86% sin pérdida de la pureza óptica tras 3 h. Una vez preparado el oxirano, éste se abre de forma regioselectiva por ataque del imidazol sobre el carbono menos sustituido empleando 1,4-dioxano como disolvente y altas temperaturas, obteniéndose, tras 16 h, el alcohol (*R*)-**4** de forma enantiopura. Debido a los problemas de volatilidad que presenta (*R*)-**10**, se diseñó una vía alternativa para la preparación de (*R*)-**4**. De este modo, se hizo reaccionar el alcohol (*R*)-**7b** con hidruro de sodio (NaH) e imidazol en (*N,N*)-

dimetilformamida (DMF) a 100 °C durante 3 h. pudiendo aislar el alcohol (*R*)-**4** enantioméricamente puro con un 82% de rendimiento.

Una vez obtenido el alcohol (*R*)-**4**, se accedió a los productos finales mediante reacción de alquilación del alcohol con diferentes halogenuros de bencilo. En el caso del (*R*)-Miconazol (**1a**), la alquilación se lleva a cabo utilizando hidruro de potasio, éter 18-corona-6 y bromuro de 2,4-diclorobencilo, previamente preparado a partir de cloruro de 2,4-diclorobencilo comercial mediante una sustitución nucleófila con bromuro de potasio en DMF.⁹⁰ Así, se obtuvo el (*R*)-Miconazol (**1a**) en forma enantiopura tras 6 h de reacción a temperatura ambiente con un rendimiento aislado de 79%. Empleando la misma estrategia sintética, fue posible obtener el (*R*)-Econazol (**1b**) con un 86% de rendimiento, utilizando en este caso el bromuro de 4-clorobencilo que es comercialmente accesible.

En resumen, el (*R*)-Miconazol se obtiene con un rendimiento global del 65% tras 3 pasos de reacción desde la 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etanona comercial, mientras que el (*R*)-Econazol se obtiene con un rendimiento global del 71%.

La preparación de ambos fármacos en forma racémica se ha desarrollado mediante un procedimiento análogo a partir del alcohol racémico (\pm)-**7b**, comercialmente accesible.

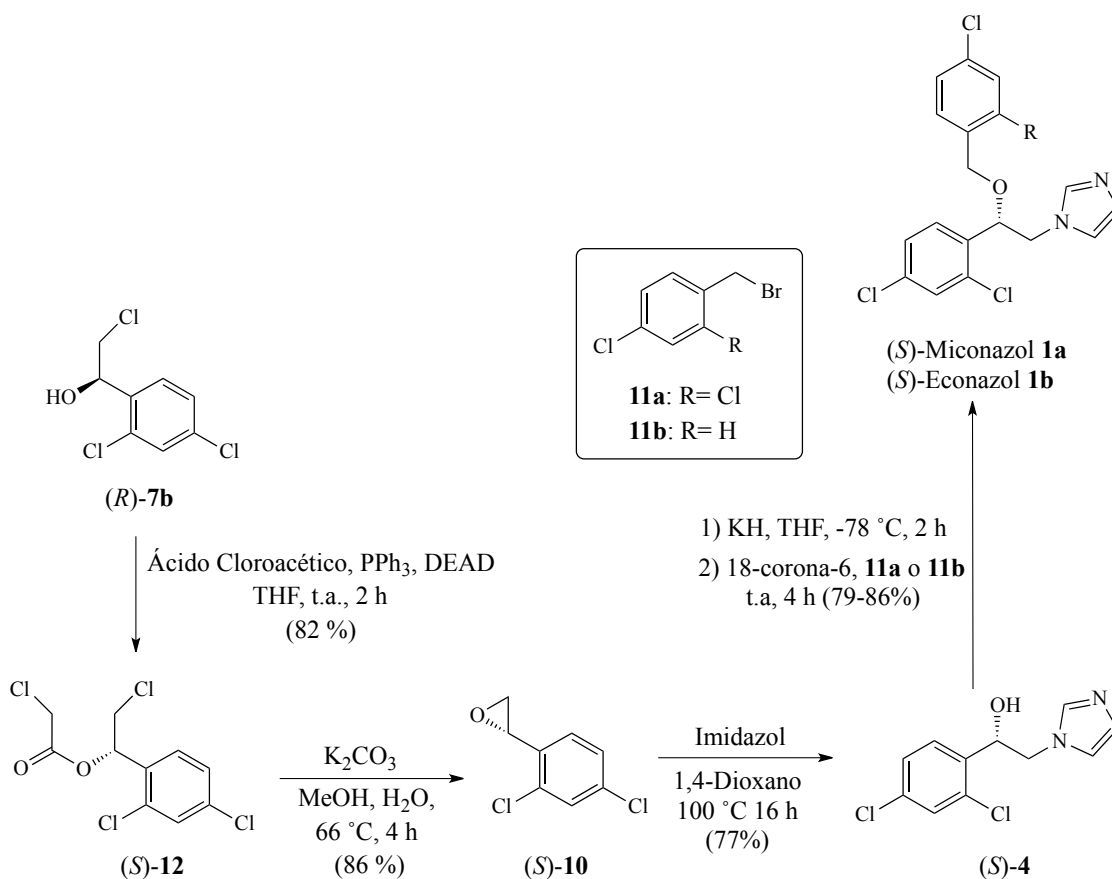
I.II.2.3. Preparación del (*S*)-Miconazol y (*S*)-Econazol

Una vez preparado con éxito los enantiómeros (*R*) de ambos fármacos, se llevó a cabo la preparación de sus enantiómeros (*S*)-Miconazol y (*S*)-Econazol. En la biorreducción, sólo dos de las ADHs estudiadas mostraron buenas actividades y selectividades, la ADH-A y ADH-T. Sin embargo, ninguno de los enzimas “*anti-Prelog*” ha mostrado buenos resultados. Por tanto, se decidió sintetizar los enantiómeros de configuración (*S*) a partir de los obtenidos de configuración (*R*), mediante procesos químicos convencionales que permiten la inversión de la estereoquímica de centros estereogénicos.

En este caso se ha combinado la biorreducción de la α -clorocetona **9** con una inversión de Mitsunobu (esquema I.II.5), utilizando el ácido cloroacético en presencia de trifenilfosfona

⁹⁰ B. P. Bangar, S. V. Bettigeri. *Monatsh. Chem.* **2004**, *135*, 1251-1255.

(PPh₃) y azodicarboxilato de dietilo (DEAD), obteniéndose el éster de configuración invertida (*S*)-**10** tras 2 h de reacción con un 82% de rendimiento. Posteriormente se llevó a cabo la formación del epóxido (*S*)-**10** por desprotección del éster formado favoreciéndose *in situ* la ciclación intramolecular de la correspondiente (*S*)-clorhidrina. El proceso transcurre en presencia de K₂CO₃ en una mezcla MeOH y H₂O a reflujo de MeOH, aislando el epóxido (*S*)-**10** en forma enantiopura. Una vez obtenido el epóxido, este se hace reaccionar en un tubo sellado con imidazol a 100 °C usando 1,4-dioxano como disolvente, así, tras 16 h se obtiene el alcohol (*S*)-**4**. Finalmente, como en el caso de los compuestos de configuración contraria, se llega a los productos de configuración (*S*) con buenos rendimientos y sin pérdida de la pureza óptica tras una etapa de alquilación de (*S*)-**4** con los correspondientes bromuros de bencilo **11a** y **11b** en presencia de hidruro de potasio y éter corona con rendimientos altos (79-86%).



Esquema I.II.5. Preparación del (*S*)-Miconazol y del (*S*)-Econazol a partir de la clorhidrina (*R*)-**7b**.

En resumen, tras 5 pasos de reacción desde la 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etanona comercial, se ha obtenido el (*S*)-Miconazol de forma enantiopura con un rendimiento global del 43% y el (*S*)-Econazol con un rendimiento del 47%.

I.II.3. Ensayos de actividad biológica

Una vez sintetizados ambos enantiómeros del Miconazol y Econazol, se procedió a su estudio como agentes antifúngicos frente a diferentes hongos y levaduras. De esta manera en el grupo del Dr. Francisco Malpartida del Centro Nacional de Biotecnología (Centro Superior de Investigaciones Científicas, Madrid) se estudió la capacidad de inhibición que presentaban tanto los compuestos racémicos como cada uno de los enantiómeros del Econazol y del Miconazol por separado, en el crecimiento de las levaduras *Candida crusei* y *Cryptococcus neoformans*, y los hongos *Penicillium chrysogenum* y *Aspergillus niger*.

Para el caso del Miconazol (**1a**, tabla I.II.2), se observa que tanto para las levaduras, como para los hongos estudiados, la actividad del enantiómero (*R*)-**1a** es significativamente superior que la del enantiómero (*S*)-**1a**, mostrando unos valores de MIC (concentración mínima de inhibición) inferiores. Se observa que la actividad mostrada por el fármaco racémico proviene totalmente del enantiómero (*R*)-**1a**, ya que se necesita el doble de cantidad de fármaco racémico para provocar el mismo grado de inhibición que con la misma concentración que el enantiómero (*R*)-**1a**. Estos resultados confirman la importancia que tiene la síntesis asimétrica en la preparación de fármacos debido a la diferente actividad que pueden presentar sus enantiómeros.

Tabla I.II.2. Medida de la susceptibilidad in vitro de los microorganismos de estudio frente al Miconazol racémico (\pm)-**1a** y cada uno de sus enantiómeros por separado.

Microorganismo	(\pm)- 1a ^a	(<i>R</i>)- 1a ^a	(<i>S</i>)- 1a ^a
<i>Candida Krusei</i>	3,845-1,922	1,922-0,961	48,062-24,031
<i>Cryptococcus neoformans</i>	3,364-1,682	1,682-0,841	24,031-12,016
<i>Penicillium chrysogenum</i>	7,029-3,605	3,605-1,874	21,027-16,341
<i>Aspergillus niger</i>	12,016-6,088	6,088-3,044	>48,062

^a Los valores de los MIC₁₀₀ están dados en un rango de concentraciones (μ M) en el cual no hay crecimiento del microorganismo.

Para el caso del Econazol (**1b**, tabla I.II.3), los datos obtenidos muestran que al contrario que en el caso del Miconazol en donde el enantiómero (*S*)-**1a** no es activo, ambos enantiómeros muestran actividad antifúngica. Los resultados obtenidos para el (*S*)-Econazol muestran que su actividad es aparentemente mayor en comparación con el (*R*)-Econazol salvo para el caso de *Candida krusei*. Las mayores diferencias se observan para *Aspergillus niger* en donde el compuesto (*S*)-**1b** es tres veces más activo que su enantiómero. Pese a ello, los resultados muestran que el enantiómero más activo en cada caso posee un poder de inhibición similar al

fármaco racémico lo que implica una sinergia de los dos enantiómeros en la mezcla racémica aunque sus efectos no son cooperativos ya que no se observa un aumento de la actividad frente al racemato.

Tabla I.II.3. Medida de la susceptibilidad in vitro de los microorganismos de estudio frente al Econazol racémico (\pm)-**1b** y cada uno de los enantiómeros por separado.

Microorganismo	(\pm)- 1b ^a	(<i>R</i>)- 1b ^a	(<i>S</i>)- 1b ^a
<i>Candida Krusei</i>	3,144-1,572	3,144-1,572	6,550-3,275
<i>Cryptococcus neoformans</i>	2,096-1,048	4,192-2,096	2,096-1,048
<i>Penicillium chrysogenum</i>	0,996-0,498	2,358-1,179	1,048-0,524
<i>Aspergillus niger</i>	2,096-1,074	8,725-4,362	2,096-1,048

^a Los valores de los MIC₁₀₀ están dados en un rango de concentraciones (μ M) en el cual no hay crecimiento del microorganismo.

Por último, los resultados muestran el diferente comportamiento que presentan ambos fármacos con los diferentes microorganismos. En el caso de las levaduras, el Miconazol es el fármaco que muestra mejores actividades de inhibición, con valores que, en el caso del enantiómero (*R*)-**1a**, duplican los valores de actividad mostrados por el Econazol racémico. Por otro lado, en el caso de los hongos, el fármaco que presenta mejores valores de actividad es el Econazol racémico, siendo tres veces más activo frente a las cepas estudiadas que el (*R*)-Miconazol.

I.II.4. Conclusiones

Se ha desarrollado una síntesis quimioenzimática asimétrica y eficaz para la preparación de ambos enantiómeros de Miconazol y Econazol en forma enantiopura. Las ADH A y T han mostrado ser los biocatalizadores más adecuados para llevar a cabo la biorreducción de la 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etanona (**9**), intermedio clave en la preparación de estos fármacos. Los enantiómeros (*R*) de Miconazol y Econazol se obtuvieron con un rendimiento global del 65 y 71% respectivamente, mientras que los (*S*) con rendimientos del 43 y 47%. Una vez preparados todos los enantiómeros, se llevó a cabo un estudio de su actividad biológica frente al crecimiento de diferentes hongos y levaduras. En el caso del Miconazol, el enantiómero (*R*) ha mostrado ser mucho más activo que el (*S*), reforzando la importancia de la síntesis asimétrica. En cuanto al Econazol, ambos enantiómeros son activos sin que, en ninguno de los casos, esta actividad sea superior a la del fármaco racémico, mostrando por tanto una sinergia no aditiva.

Asymmetric Chemoenzymatic Synthesis of Miconazole and Econazole Enantiomers. The Importance of Chirality in Their Biological Evaluation

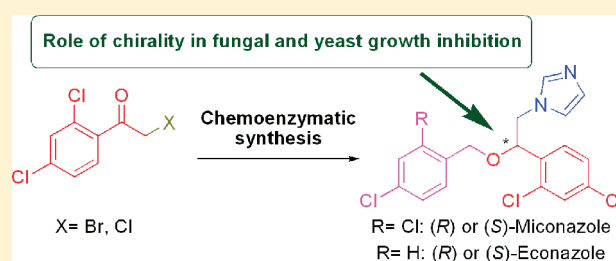
Juan Mangas-Sánchez,[†] Eduardo Busto,[†] Vicente Gotor-Fernández,^{*,†} Francisco Malpartida,[‡] and Vicente Gotor^{*,†}

[†]Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, Universidad de Oviedo, 33006 Oviedo, Spain

[‡]Centro Nacional de Biotecnología del CSIC, Darwin 3, 28049 Cantoblanco, Madrid, Spain

S Supporting Information

ABSTRACT: A simple and novel chemoenzymatic route has been applied for the first time in the synthesis of miconazole and econazole single enantiomers. Lipases and oxidoreductases have been tested in stereoselective processes; the best results were attained with oxidoreductases for the introduction of chirality in an adequate intermediate. The behaviors of a series of ketones and racemic alcohols in bioreductions and acetylation procedures, respectively, have been investigated; the best results were found with alcohol dehydrogenases A and T, which allowed the production of (*R*)-2-chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)ethanol in enantiopure form under very mild reaction conditions. Final chemical modifications have been performed in order to isolate the target fungicides miconazole and econazole both as racemates and as single enantiomers. Biological evaluation of the racemates and single enantiomers has shown remarkable differences against the growth of several microorganisms; while (*R*)-miconazole seemed to account for most of the biological activity of racemic miconazole on all the strains tested, both enantiomers of econazole showed considerable biological activities. In this manner, (*R*)-econazole showed higher values against *Candida krusei*, while higher values were observed for (*S*)-econazole against *Cryptococcus neoformans*, *Penicillium chrysogenum*, and *Aspergillus niger*.



INTRODUCTION

The preparation of enantiomerically pure compounds is a highly demanding task for the industrial sector because of the different activities of drug enantiomers in pharmaceutical and agrochemical applications.¹ As a result of advances in asymmetric organic synthesis and analytical separation technologies, efficient access to both single enantiomers of a racemate has been possible in many cases, allowing the study of their pharmacodynamic and pharmacokinetic properties. In fact, current requirements from regulatory authorities have largely increased the number of enantiomerically pure drugs rather than racemates presented for approval.²

Miconazole (**1a**) and econazole (**1b**) are antifungal agents which damage fungal organisms by interfering with ergosterol biosynthesis. These compounds are usually employed in the treatment of vaginal diseases and several fungal infections in the skin of both human and animals (Figure 1), being well tolerated in clinical practice and showing biological activity shortly after application.³ These two compounds correspond to the family of imidazole derivatives that also includes isoconazole, ketoconazole, sertaconazole, and sulconazole; all are well-known due to their potent activities against a variety of fungi. The therapeutic

properties of their enantiomers and also of azole drugs⁴ such as fluconazole, genaconazole, itraconazole, posaconazole, ravuconazole, and voriconazole usually differ, as occurs with sertaconazole⁵ (**1c**), where the *R* enantiomer is 2 times more active than the racemic form against both fungi and yeasts.⁶ This fact allows the administration of (*R*)-sertaconazole at doses half of those used for the racemic drug, suppressing minor risks of side effects and unspecific toxicities derived from the administration of the nonactive *S* enantiomer.

Asymmetric chemical transformations for access to this class of drugs or related chiral building blocks are generally based on stereoselective catalytic Henry reactions,⁷ reductions of imidazole ketones⁸ or α -halo ketones,⁹ and also catalytic hydrosilylation reactions.¹⁰ In this manner, the syntheses of miconazole and econazole single enantiomers have been scarcely reported, the synthesis of adequate chiral intermediates being made possible by the copper-catalyzed addition of nitromethane to 2,4-dichlorobenzaldehyde using a C_1 -symmetric chiral aminopyridine ligand⁶ or the enantioselective reduction of 2-chloro-1-(2,4-

Received: December 15, 2010

Published: March 08, 2011

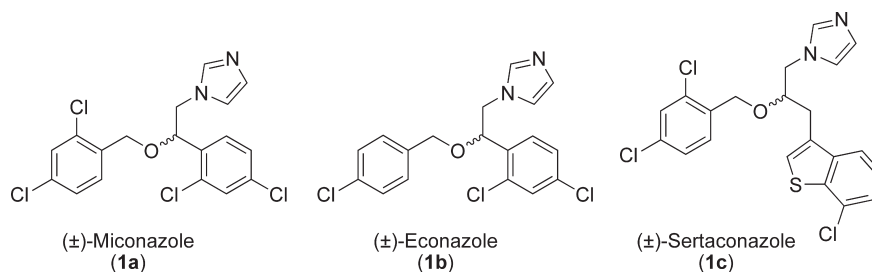


Figure 1. Structures of known antifungal agents such as miconazole, econazole, and sertaconazole.

dichlorophenyl)ethanone using a chiral oxazaborolidine.^{9a} Alternatively, enantiomeric chromatographic separations of the corresponding racemates have been also successfully achieved.¹¹

In our ongoing search toward the development of new stereoselective routes for the production of single-enantiomer drugs, herein we present an original chemoenzymatic approach for the production of enantiopure miconazole and econazole isomers. Initially the synthesis of adequate chiral building blocks will be described, and later two independent enzymatic approaches will be exhaustively investigated: (a) lipase-catalyzed kinetic resolution of racemic alcohols and (b) bioreduction of prochiral ketones using alcohol dehydrogenases. All efforts have been focused toward the production of enantiomerically pure precursors, which subsequently would be chemically modified in order to produce the desired drugs. The so-obtained chiral drugs as single enantiomers or racemic mixtures will both be tested in growth inhibition studies against different yeasts and fungi.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemistry. Biocatalytic processes are challenging tools for organic chemists, offering new possibilities for the manufacture of pharmaceuticals under environmentally friendly conditions.¹² One of the main advantages of biocatalysis in comparison with conventional processes is based on the remarkable properties of the biological catalysts from a chemo-, regio-, and stereoselective point of view.¹³ Additionally, enzymatic reactions can be carried out at ambient temperature and atmospheric pressure, avoiding the use of hazardous organic reagents and unwanted side reactions such as racemization and epimerization that frequently occur in base-mediated processes.¹⁴ Without a doubt, the possibility of carrying out biocatalyzed stereoselective processes not only in water but also in media different from organic solvents, such as ionic liquids and supercritical fluids, has opened a window of opportunities for these “green” catalysts.¹⁵ In addition, new possibilities have also recently arisen because of the production of new active and stable biocatalysts by using directed evolution methods,¹⁶ improving protein expression systems and high-throughput screening methods.¹⁷

The use of lipases and alcohol dehydrogenases as responsible for the stereoselective catalytic step in a multistep synthetic route has been largely investigated.¹⁸ Thus, lipases are the most common enzymes for the production of optically active alcohols and amines in organic solvents mainly by acylation reactions, while isolated alcohol dehydrogenases or microbial cells are the most useful biocatalysts for the bioreduction of ketones.

In this manner, we initially focused our attention on the development of asymmetric reactions for the stereoselective production of the alcohol **4**, the precursor of the antifungal imidazolium compounds targeted in this research (Scheme 1).

With this in mind, the commercially available 2-bromo-1-(2,4-dichlorophenyl)ethanone (**2**) was transformed into the ketone **3** in 87% yield by reaction with imidazole in tetrahydrofuran (THF) as solvent and at room temperature. At this point the bioreduction of ketone **3** was undertaken using isolated alcohol dehydrogenases (ADHs), which have led to optimal results in the synthesis of a wide number of pharmaceuticals in aqueous medium.¹⁹ We initially screened a number of already known oxidoreductases such as ADH T,²⁰ ADH LB,²¹ ADH CP,²² ADH PR2,²³ ADH RS1,¹⁹ and ADH A,²⁴ but none of them showed even minimal activity toward the reduction of **3**.

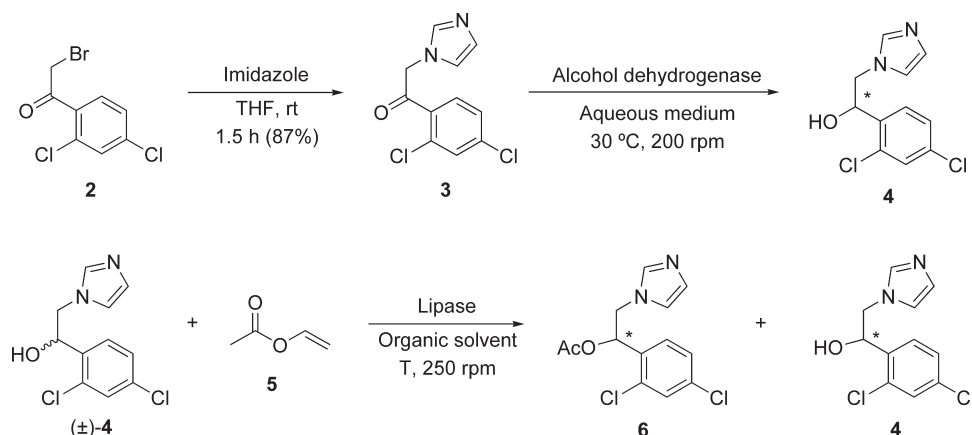
In view of this lack of activity we decided to turn our attention to the use of different enzymes, such as lipases, hydrolases active in both aqueous and organic medium. Then, the enzymatic acetylation of racemate **4** was studied, but unfortunately no reaction was observed at either 30 or 60 °C using vinyl acetate (VinOAc, **5**) as acyl donor, different organic solvents (THF, 1,4-dioxane, or the vinyl acetate itself), and a representative set of biocatalysts such as *Candida antarctica* lipase B (CAL-B), *Pseudomonas cepacia* lipase (PSL-C I), *Candida antarctica* lipase A (CAL-A), pancreas porcine lipase (PPL), *Candida cylindracea* lipase (CCL) or *Chromobacterium viscosum* lipase (CVL).

The negligible reactivity of all tested enzymes toward prochiral ketone **3** and racemic alcohol **4** caused us to look for an alternative and easily accessible chiral building block for the production of miconazole (**1a**) and econazole (**1b**). In this manner, taking advantage of the commercial availability of α -bromoacetophenone **2**, the ketone was first reduced using NaBH₄ affording the alcohol (\pm)-**7a** after 1 h in very high isolated yield (Scheme 2). Then we decided to study the lipase-mediated kinetic resolution of **7a** and commercially available 2-chloro-1-(2,4-dichlorophenyl) ethanol (**7b**).

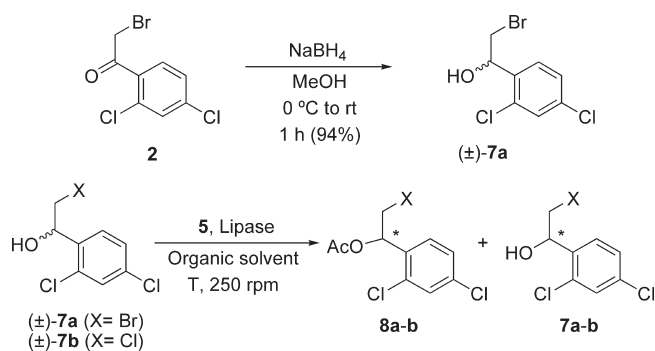
CAL-B did not show any activity toward the acetylation of alcohol **7a**; however, PSL catalyzed the kinetic resolution with a low conversion (2–3%) and excellent enantioselectivity (>99% ee_p) when *tert*-butyl methyl ether (TBME) and vinyl acetate itself were used as solvents at 30 °C. Unfortunately, we have also observed very low reactivity with a less bulky substrate such as the racemic chlorinated derivative **7b**, obtaining optically active alcohol and acetate with similar conversion values and the alcohol (S)-**7b** in virtually racemic form; thus, no synthetically useful applications were attained.

At this point, the bioreduction of available α -halo ketones **2** and **9** were investigated using a set of commercially available purified alcohol dehydrogenases (Scheme 3). The most representative results are shown in Table 1. From the seven ADH species tested with the ketone **2**, only ADH T and ADH PR2 showed any activity; with ADH-T the (*R*)-alcohol was recovered in >99% yield and >99% ee (entry 1), and on the other hand (S)-**2a** was obtained in 37% yield and 72% ee using ADH PR2 as

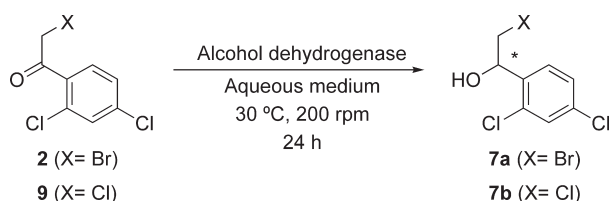
Scheme 1. Chemoenzymatic Synthesis of Alcohol 4 through Bioreduction of the Ketone 3 in Aqueous Medium or Lipase-Mediated Acetylation of the Racemate in Organic Solvents



Scheme 2. Chemical Synthesis and Lipase-Catalyzed Acetylation of Racemic Alcohols 7a,b Using Vinyl Acetate As Acyl Donor



Scheme 3. Bioreduction of α -Haloketones 2 and 9 in Aqueous Medium Using Different Alcohol Dehydrogenases



biocatalyst (entry 2). ADH T displayed a similar reactivity toward the ketone 9, giving the alcohol (*R*)-7b in enantiomerically pure form without any traces of the initial ketone (entry 3). Other ADH species such as LB (entry 4) and PR2 (entry 5) led to the opposite enantiomer (*S*)-alcohol 7b with a different grade of asymmetric induction; meanwhile ADH CP (entry 6), RS1 (entry 7), and A (entry 8) stereoselectively produced the *R* enantiomer, although from a synthetic point of view ADH A gave the most promising result, giving the alcohol in 74% yield.

Before the development of scalable processes, we wanted to investigate further improvements in the search for optimal

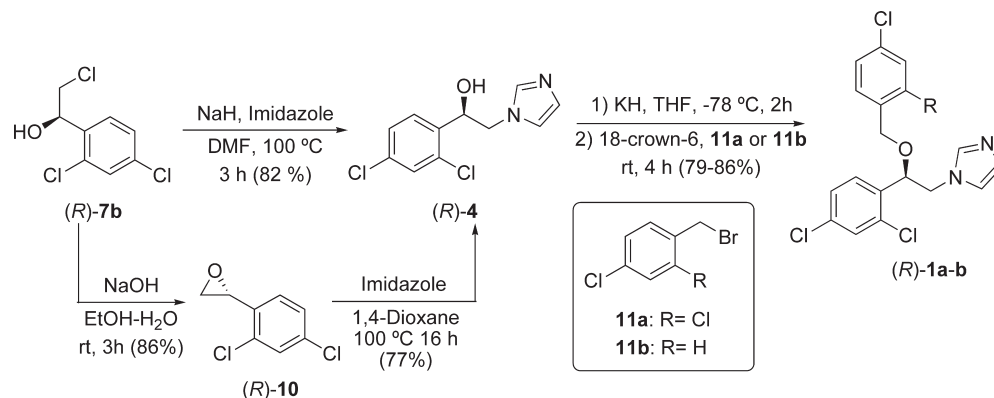
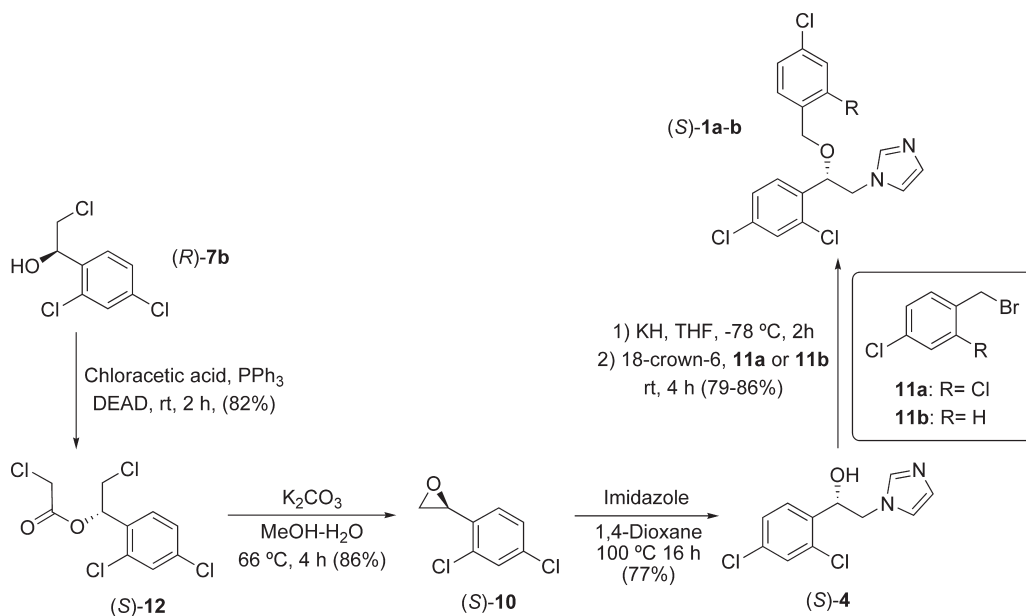
Table 1. Bioreduction of α -Halo Ketones 2 and 9 in Aqueous Systems at 30 °C and 250 rpm after 24 h

entry	ketone	ADH	ADH units ^a	<i>c</i> (%) ^b	ee _p (%) ^c	alcohol confign
1	2	T	3	>99	>99	R
2	2	PR2	3	37	72	S
3	9	T	3	>99	>99	R
4	9	LB	3	53	90	S
5	9	PR2	3	51	54	S
6	9	CP	3	<3	>99	R
7	9	RS1	3	44	>99	R
8	9	A	3	74	>99	R
9	9	T	1.5	65	>99	R
10	9	A	4.5	95	>99	R

^a 1 unit (U) of ADH reduces 1.0 mM of acetophenone to 1-phenylethanol per minute at pH 7.5 and 30 °C in the presence of NAD(P)H. ^b Calculated by GC. ^c Determined by HPLC.

conditions in the bioreduction of ketone 9. Thus, in the case of ADH T a lower amount of enzyme was employed, which led to a decrease in the conversion value to 65% after 1 day (1.5 units/3 mg of substrate, entry 9). On the other hand, 95% conversion was reached when a greater amount of ADH A was used (4.5 units, entry 10). Because of the fact that ADH A uses NADH as cofactor instead of the more expensive NADPH employed in ADH T catalyzed processes, the synthetic application was demonstrated when this process was scaled up with ADH A using a 20-fold amount of ketone, giving the same conversion and enantiomeric excess values as in the model reaction (see the Experimental Section). The absolute configuration of the so-obtained alcohol 7b was demonstrated by comparison of its optical rotation value with that already described in the literature: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -57.0$ (*c* 1, CHCl₃) (lit.²⁵ $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -59.1$ (*c* 1.2, CHCl₃)).

To emphasize the importance of this synthetic methodology, (*R*)-7b was transformed into enantiopure miconazole and econazole in a straightforward manner (Scheme 4). Therefore, the transformation of enantiopure alcohol (*R*)-7b into the corresponding imidazolium derivative (*R*)-4 was initially carried out in a two-step sequence: first, basic cyclization of the halohydrin using sodium hydroxide (NaOH) gave the epoxide (*R*)-10 in

Scheme 4. Stereoselective Synthesis of (*R*)-Miconazole and (*R*)-Econazole from Enantiopure Alcohol (*R*)-7bScheme 5. Stereoselective Synthesis of (*S*)-Miconazole and (*S*)-Econazole from Enantiomerically Pure Alcohol (*R*)-7b

86% yield after 3 h at room temperature, and this compound was subsequently opened in a regioselective manner with imidazole in refluxing 1,4-dioxane to afford (*R*)-4 in 77% yield without any loss of optical purity. Alternatively, because of the low boiling point detected for the epoxide intermediate that led to significant problems in its isolation, we successfully performed the nucleophile substitution of (*R*)-7b with imidazole using sodium hydride (NaH) and (*N,N*)-dimethylformamide (DMF) as solvent at 100 °C, giving the enantiopure alcohol (*R*)-4 in 82% yield after just 3 h and purification through flash chromatography.

In both cases only the *R* enantiomer was detected by HPLC chiral analysis of the so-obtained products (see the Supporting Information). Additionally, the optical rotation values of the enantioenriched oxirane intermediate **10** and the alcohol **4** have been compared with previous data reported in the literature: oxirane (*R*)-**10**, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -56.3$ (*c* 1, CHCl_3) (lit.^{9b} $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -55.0$ (*c* 0.86, CHCl_3)); alcohol (*R*)-**4**, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 77.5$ (*c* 1, CHCl_3) (lit.^{9b} $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -79.0$ (*c* 0.51, CHCl_3) for (*R*)-**4** in 99% ee). Finally the alkylation of the free hydroxyl group was achieved

by using potassium hydride (KH) as base, 18-crown-6, and the benzyl bromides **11a,b** to mediate the formation of both (*R*)-miconazole (**1a**) and (*R*)-econazole (**1b**) in 86% and 79% isolated yields, respectively, depending on the benzyl bromide derivative **11a** or **11b** used in the process.

Once we had efficiently performed the synthesis of (*R*)-**1a,b**, we decided to focus our efforts toward the synthesis of (*S*)-**1a,b** (Scheme 5). Unfortunately, none of the anti-Prelog ADHs tested allowed us to recover the alcohol (*S*)-7b in enantiopure form. In light of these results a different synthetic strategy starting from (*R*)-7b, prepared by enzymatic bioreduction with ADH A, and involving Mitsunobu inversion with chloroacetic acid, triphenylphosphine, and diethyl azodicarboxylate (DEAD) gave the ester (*S*)-**12** in 82% isolated yield.

Next (*S*)-**12** was deprotected with potassium carbonate, giving the epoxide (*S*)-**10** in 86% yield without any loss of the optical purity, and this compound was subsequently opened in a regioselective manner with imidazole in refluxing 1,4-dioxane to afford (*S*)-**4** in 77% yield without any loss of optical purity. In

Table 2. In Vitro Susceptibilities of Target Microorganisms against Racemates and Enantiomers of Miconazole (1a) and Econazole (1b)^a

microorganism	(±)-1a	(R)-1a	(S)-1a	(±)-1b	(R)-1b	(S)-1b
<i>Candida krusei</i>	3.84–1.92	1.92–0.96	48.06–24.03	3.14–1.57	3.14–1.57	6.55–3.28
<i>Cryptococcus neoformans</i>	3.36–1.68	1.68–0.84	24.03–12.02	2.10–1.05	4.19–2.10	2.10–1.05
<i>Penicillium chrysogenum</i>	7.21–3.60	3.60–1.87	21.03–16.34	1.00–0.50	2.36–1.18	1.05–0.52
<i>Aspergillus niger</i>	12.02–6.01	6.09–3.04	>48.06	2.10–1.08	8.73–4.36	2.10–1.05

^aThe MIC₁₀₀ values (μM) are given as the concentration ranges for which no apparent growth is detected (higher values) and low growth is detected (lower values).

both cases only the *R* enantiomer was detected by HPLC chiral analysis of the so-obtained products (see the Supporting Information). Additionally the optical rotation values of the enantioenriched oxirane intermediate **10** and the alcohol **4** have been compared with previous data reported in the literature: oxirane (*S*)-**10**, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +54.2^\circ$ (*c* 1, CHCl_3) (lit.^{9b} $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +56.0^\circ$ (*c* 0.63, CHCl_3)); alcohol (*S*)-**4**, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +78.4^\circ$ (*c* 1, MeOH) (lit.²⁶ $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +83.8^\circ$ (*c* 1, MeOH) for (*S*)-**4** in 91% ee). Finally, the alkylation of the free hydroxyl group was performed in a manner analogous to that previously used with the *R* enantiomers, giving (*S*)-miconazole (**1a**) and (*S*)-econazole (**1b**) in 86% and 79% isolated yields, respectively.

Biological Evaluation. Once miconazole and econazole were prepared as racemates and single enantiomers, they were all tested as inhibitors in the growth of a series of yeasts (*Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans*) and filamentous fungi (*Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus niger*), to determine their MIC values (see Table 2). On comparison of data from both racemates, miconazole (**1a**) showed a high activity toward the growth of yeasts and fungi, requiring lower fungicide concentration. The susceptibility for these drugs showed that both enantiomers of econazole (**1b**) seemed to be active against the target strains, while a very different behavior was observed for miconazole: the enantiomer (*S*)-**1a** showed almost no antifungal activity. The fact that most of the activity for (±)-miconazole resides in the enantiomer (*R*)-**1a** highlights the achievement obtained through the asymmetric synthetic route previously described. Thus, these experimental results, which are in accordance with previous inhibition studies toward other pathogenic fungi^{9a} or the enzyme complex 17 α -hydrolase/17.20-lyase (P-450_{17 α}),²⁷ encourage the use of asymmetrical synthesis for increasing the therapeutic suitability for this well-known antifungal drug. In the case of econazole the activity of (*S*)-**1b** was apparently higher (except for *C. krusei*) in comparison with (*R*)-**1b**. The main differences were observed for *Aspergillus niger*, the *S* enantiomer being around 3 times more active than the racemic mixture and the *R* enantiomer. Both enantiomers displayed good activities toward the growth of the corresponding microorganisms, leading to a synergy in the action of the racemic mixture, although the observed inhibition did not follow a completely additive rule.

CONCLUSIONS

In summary, a viable approach for the production of enantiopure single enantiomers of miconazole and econazole has been described: alcohol dehydrogenases A and T have shown excellent activities and stereodiscrimination values for the production of adequate chiral building blocks. Thus, (*R*)-2-chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)ethanol was obtained and later chemically modified for the global synthesis of the desired *R* enantiomer drugs in

enantiopure form. The aforementioned alcohol has been efficiently used for the production of the *S* enantiomers on the basis of the stereoinversion of the chiral center using Mitsunobu reaction conditions. This novel chemoenzymatic route offers clear advantages to those already described, without requiring the use of hazardous or toxic catalysts for the introduction of chirality. The biological activity of the synthesized racemates and single enantiomers have been studied toward the growth of *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*, *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus niger*, resulting in very different MIC values for each enantiomer of miconazole and econazole. Thus, while the activity of the racemic miconazole mostly resides in the *R* enantiomer, the *S* enantiomer of econazole has shown higher inhibition values toward *Cryptococcus neoformans*, *Penicillium chrysogenum*, and specially *Aspergillus niger*. The experimental results highlight the importance of developing methods for asymmetric drug synthesis, presenting enzymes as ideal tools for the introduction of chirality.

EXPERIMENTAL SECTION²⁸

Bioreduction of 2-Bromo-1-(2,4-dichlorophenyl)ethanone (2) and 2-Chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)ethanone (9) with ADHs. Analytical separations and experimental protocols are given for the measurement of conversion values and enantiomeric excess. Analytical separation in HPLC: Chiralcel OJ-H *n*-hexane/2-propanol (95:5), 0.8 mL/min, 20 °C; t_{R} (ketone **2**) = 15.5 min; alcohol **7a**, t_{R} (*R*) = 12.2 min, t_{R} (*S*) = 10.2 min. Analytical separation in HPLC: Chiralpak IA column in *n*-hexane/2-propanol (95:5), 0.8 mL/min, 20 °C; t_{R} (ketone **9**) = 7.8 min; alcohol **7b**, t_{R} (*R*) = 12.8 min, t_{R} (*S*) = 11.0 min.

ADH T. In an Eppendorf tube were added the ketone **2** (5 mg, 0.0186 mmol) or **9** (5 mg, 0.0179 mmol), 37.5 μL of 2-propanol as cofactor regenerator, and 630 μL of TRIS-HBr 50 mM buffer of pH 7.5 for ketone **2** and TRIS-HCl 50 mM buffer of pH 7.5 for ketone **9**. Then NADPH (75 μL of a NADPH 10 mM solution in TRIS-HCl 50 mM pH 7.5) as cofactor and 3.85 μL of ADH T (3U) were added. The reaction mixture was shaken at 250 rpm and 30 °C for 24 h and extracted with EtOAc (2 \times 500 μL), and the extracts were dried over Na_2SO_4 .

ADH LB. In an Eppendorf tube were added the ketone **2** (5 mg, 0.0186 mmol) or **9** (5 mg, 0.0179 mmol), 37.5 μL of 2-propanol as cofactor regenerator, 75 μL of a 10 mM solution of MgBr_2 in TRIS-HBr 50 mM buffer of pH 7.5 for ketone **2** or 75 μL of a 10 mM solution of MgCl_2 in TRIS-HCl 50 mM buffer of pH 7.5 for ketone **9**, 560 μL of TRIS-HBr 50 mM buffer of pH 7.5 for ketone **2**, and TRIS-HCl 50 mM buffer of pH 7.5 for ketone **9**. Then NADPH (75 μL of a NADPH 10 mM solution in TRIS-HCl 50 mM pH 7.5) as cofactor and 1.3 μL of ADH LB (3U) were added. The reaction mixture was shaken at 250 rpm and 30 °C for 24 h and extracted with EtOAc (2 \times 500 μL), and the extracts were dried over Na_2SO_4 .

ADH PR2. In an Eppendorf tube were added the ketone **2** (5 mg, 0.0186 mmol) or **9** (5 mg, 0.0179 mmol), 37.5 μL of 2-propanol as

cofactor regenerator, 638 μL of TRIS-HBr 50 mM buffer of pH 7.5 for ketone **2**, and TRIS-HCl 50 mM buffer of pH 7.5 for ketone **9**. Then NADPH (75 μL of a NADPH 10 mM solution in TRIS-HCl 50 mM pH 7.5) as cofactor and 23 mg of ADH PR2 (3U) were successively added. The reaction mixture was shaken at 250 rpm and 30 °C for 24 h and extracted with EtOAc ($2 \times 500 \mu\text{L}$), and the extracts were dried over Na_2SO_4 .

ADH CP. In an Eppendorf tube were added the ketone **2** (5 mg, 0.0186 mmol) or **9** (5 mg, 0.0179 mmol), 37.5 μL of 2-propanol as cofactor regenerator, 628 μL of TRIS-HBr 50 mM buffer of pH 7.5 for ketone **2**, and TRIS-HCl 50 mM buffer of pH 7.5 for ketone **9**. Then NADH (75 μL of a NADH 10 mM solution in TRIS-HCl 50 mM pH 7.5) as cofactor and 7.5 μL of ADH CP (3U) were added. The reaction mixture was shaken at 250 rpm and 30 °C for 24 h and extracted with EtOAc ($2 \times 500 \mu\text{L}$), and the extracts were dried over Na_2SO_4 .

ADH RS1. In an Eppendorf tube were added the ketone **2** (5 mg, 0.0186 mmol) or **9** (5 mg, 0.0179 mmol), 6 μL of glucose dehydrogenase (3U) as cofactor regenerator, 10 mg of glucose, 658 μL of TRIS-HBr 50 mM buffer of pH 7.5 for ketone **2**, and TRIS-HCl 50 mM buffer of pH 7.5 for ketone **9**. Then NADH (75 μL of a NADH 10 mM solution in TRIS-HCl 50 mM pH 7.5) as cofactor and 10.9 μL of ADH RS1 (3U) were added. The reaction mixture was shaken at 250 rpm and 30 °C for 24 h and extracted with EtOAc ($2 \times 500 \mu\text{L}$), and the extracts were dried over Na_2SO_4 .

ADH A. In an Eppendorf tube were added the ketone **2** (5 mg, 0.0186 mmol) or **9** (5 mg, 0.0179 mmol), 112.5 μL of 2-propanol as cofactor regenerator, 462 μL of TRIS-HBr 50 mM buffer of pH 7.5 for ketone **2**, and TRIS-HCl 50 mM buffer of pH 7.5 for ketone **9**. Then NADH (75 μL of a NADH 10 mM solution in TRIS-HCl 50 mM pH 7.5) as cofactor and 100 μL of ADH A (100 μL of a solution of a 1 mg of pure ADH A in 0.6 mL of buffer, 3U) were successively added. The reaction mixture was shaken at 250 rpm and 30 °C for 24 h and extracted with EtOAc ($2 \times 500 \mu\text{L}$), and the extracts were dried over Na_2SO_4 .

Scale-Up of the Bioreduction of 2-Chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)ethanone (9) with ADH-A. To a solution of 2-chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)ethanone (**9**; 100 mg, 0.45 mmol) in a mixture of 2-propanol (2.68 mL) and TRIS-HCl 50 mM buffer of pH 7.5 (9.68 mL) were successively added NADH (1.79 mL of a NADH 10 mM solution in TRIS-HCl pH 7.5 buffer) and ADH A (3.75 mL of an ADH A solution (1.75 mg/mL) in TRIS-HCl pH 7.5 buffer). The reaction mixture was shaken at 250 rpm and 30 °C for 24 h and monitored by GC analysis. After this time the mixture was extracted with EtOAc ($3 \times 20 \text{ mL}$), the organic layers were combined, dried over Na_2SO_4 , and filtered, and the solvent was removed by distillation under reduced pressure, affording 100 mg of (*R*)-**7b** as a white solid (99%) with enough purity to perform the next synthetic step without further purification.

2-Chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)ethanol (7b). Yield: 89%. R_f (5% EtOAc/hexane): 0.31. Mp: 46–47 °C. IR (KBr): ν 3410, 3094, 2957, 1591, 1563, 1471, 1384, 1078, 1049, 869, 823, 782 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , 300.13 MHz): δ 2.77 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.48 \text{ Hz}$), 3.52 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 11.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 8.4 \text{ Hz}$), 3.89 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 11.4 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 2.9 \text{ Hz}$), 5.26 (m, 1H), 7.31 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.4 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 2.0 \text{ Hz}$), 7.38 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 2.0 \text{ Hz}$), 7.58 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.3 \text{ Hz}$). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.5 MHz): δ 49.2, 70.3, 127.6, 128.6, 129.3, 132.5, 134.6, 135.9. MS (EI^+ , m/z): 226 ($^{37}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^+$, 48%), 224 ($^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^+$, 50%), 177 ($^{37}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^+$, 70%), 175 ($^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^+$, 100%). HRMS (EI^+ , m/z): calcd for $\text{C}_8\text{H}_7\text{Cl}_3\text{O}$ (M^+) 223.9562, found 223.9559. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -57^\circ$ (c 1, CHCl_3) for the *R* enantiomer. Analytical separation (HPLC): Chiralcel OB-H *n*-hexane/2-propanol (97:3), 0.8 mL/min, 20 °C, $t_{\text{R}}(\text{S}) = 9.8 \text{ min}$, $t_{\text{R}}(\text{R}) = 13.4 \text{ min}$ for lipase-mediated resolution and Chiralpak IA *n*-hexane/2-propanol (95:5), 0.8 mL/min, 20 °C, $t_{\text{R}}(\text{R}) = 11.3 \text{ min}$, $t_{\text{R}}(\text{S}) = 13.7 \text{ min}$, $t_{\text{R}}(\text{ketone}) = 7.8 \text{ min}$ for bioreduction.

Synthesis of (S)-2-Chloro-1-(2,4-dichlorophenyl)ethyl Chloroacetate (12). To a solution of (*R*)-**7b** (100 mg, 0.44 mmol) in dry THF (10 mL) were successively added chloroacetic acid (84 mg, 0.89 mmol) and triphenylphosphine (233 mg, 0.89 mmol). The solution was cooled to 0 °C, and DEAD (162 mL, 0.89 mmol) was added. The mixture was stirred at room temperature for 3 h. After this time THF was removed by distillation at reduced pressure, giving a crude reaction mixture that was purified by flash chromatography (10% EtOAc/90% hexane), affording 110 mg of (*S*)-**12** as a colorless oil (82%). R_f (10% EtOAc/hexane): 0.42. IR (NaCl): ν 3095, 2959, 1748, 1592, 1475, 1372, 1225, 1076, 1056, 1032, 866, 823, 787 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , 300.13 MHz): δ 3.76 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 12.1 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 7.2 \text{ Hz}$), 3.86 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 12.1 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 3.7 \text{ Hz}$), 4.18 (s, 2H), 6.38 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.2 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 3.7 \text{ Hz}$), 7.30 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.4 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 2.0 \text{ Hz}$), 7.38–7.43 (m, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 5.1 \text{ Hz}$). ^{13}C NMR (75.5 MHz): δ 40.5, 44.6, 72.8, 127.5, 128.5, 129.6, 132.4, 132.9, 135.4, 165.8. MS (EI^+ , m/z): 304 ($^{37}\text{Cl}^{37}\text{Cl}^{37}\text{Cl}^+$, 10%), 302 ($^{37}\text{Cl}^{37}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^+$, 20%), 300 ($^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^+$, 17%), 177 ($^{37}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^+$, 70%), 175 ($^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^+$, 100%). HRMS (EI^+ , m/z): calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{Cl}_4\text{O}_2$ (M^+) 299.9278, found 299.9281. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +32.6^\circ$ (c 1, CHCl_3). Analytical separation (HPLC): Chiralcel OJ-H *n*-hexane/2-propanol (90:10), 0.8 mL/min, 30 °C, $t_{\text{R}}(\text{S}) = 10.7 \text{ min}$, $t_{\text{R}}(\text{R}) = 11.9 \text{ min}$.

Synthesis of (R)-2-(2,4-Dichlorophenyl)oxirane (10). To a solution of (*R*)-**7b** (50 mg, 0.22 mmol) in EtOH (400 μL) were successively added H_2O (250 μL) and NaOH (18 mg, 0.45 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 3 h. After this time EtOH was removed by distillation at reduced pressure. The aqueous residue was extracted with Et_2O ($3 \times 5 \text{ mL}$), the organic phases were combined and dried over Na_2SO_4 , and the solvent was removed by distillation under reduced pressure, giving a crude reaction mixture that was purified by flash chromatography (100% hexane), affording 36 mg of (*R*)-**10** as a colorless oil (86%). R_f (100% hexane): 0.24. IR (NaCl): ν 3091, 3059, 2992, 2916, 1595, 1563, 1479, 1379, 1247, 1100, 1052, 988, 880, 824 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , 300.13 MHz): δ 2.62 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 5.6 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 2.5 \text{ Hz}$), 3.18 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 5.5 \text{ Hz}$, $^3J_{\text{HH}} = 4.1 \text{ Hz}$), 4.14 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 3.9 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 2.4 \text{ Hz}$), 7.18 (d, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 8.4 \text{ Hz}$), 7.25 (dd, 2H, $^3J_{\text{HH}} = 8.4 \text{ Hz}$, $^4J_{\text{HH}} = 1.9 \text{ Hz}$), 7.38 (d, 1H, $^4J_{\text{HH}} = 1.9 \text{ Hz}$). ^{13}C NMR (75.5 MHz): δ 49.6, 50.6, 126.6, 127.4, 128.9, 133.8, 134.0, 134.3. MS (EI^+ , m/z): 190 ($^{37}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^+$, 18%), 188 ($^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^+$, 30%), 159 ($\text{C}_7\text{H}_5^{35}\text{Cl}_2^+$, 42%), 153 ($^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^+$, 100%). HRMS (EI^+ , m/z): calcd for $\text{C}_8\text{H}_6\text{Cl}_2\text{O}$ (M^+) 187.9796, found 187.9802. Analytical separation (GC): Chiralcel Rt- β -dexe, temperature program 110 °C then 2 °C/min until 160 °C, $t_{\text{R}}(\text{R}) = 18.5 \text{ min}$, $t_{\text{R}}(\text{S}) = 19.2 \text{ min}$.

Synthesis of (S)-2-(2,4-Dichlorophenyl)oxirane (10). To a solution of (*S*)-**12** (150 mg, 0.22 mmol) in MeOH (1.5 mL) were successively added H_2O (1.5 mL) and K_2CO_3 (137 mg, 0.99 mmol). The mixture was stirred at reflux for 3 h. After this time MeOH was removed by distillation at reduced pressure. The aqueous residue was extracted with CH_2Cl_2 ($3 \times 5 \text{ mL}$), the organic phases were combined and dried over Na_2SO_4 , and the solvent was removed by distillation under reduced pressure, giving a crude reaction mixture that was purified by flash chromatography (100% hexane), affording 80 mg of (*S*)-**10** as a colorless oil (86%). $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +54.2^\circ$ (c 1, CHCl_3).

Synthesis of (R)-1-(2,4-Dichlorophenyl)-2-(1H-imidazol-1-yl)ethanol (4). To a solution of (*R*)-**10** (288 mg, 1.52 mmol) in 1,4-dioxane (663 μL) was added imidazole (125 mg, 1.83 mmol), and the mixture was stirred at 100 °C for 16 h. After this time the solvent was removed by distillation under reduced pressure, giving a crude reaction mixture that was purified by flash chromatography (5% MeOH/95% CH_2Cl_2), affording 300 mg of (*R*)- or (*S*)-**4** as a yellow solid (77%). R_f (5% MeOH/ CH_2Cl_2): 0.26. Mp: 131–133 °C. IR (NaCl): ν 3320, 2956, 1590, 1325 cm^{-1} . ^1H NMR (CD_3OD , 300.13 MHz): δ 4.28–4.51 (m, 2H), 5.42–5.47 (m, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.49–7.73

(m, 4H). ^{13}C NMR (CD_3OD , 75.5 MHz): δ 53.5, 70.7, 121.8, 128.8 (2C), 130.2, 130.4, 133.7, 135.4, 139.3, 139.6. MS (ESI^+ , m/z): 259 ($(^{35}\text{Cl}^{37}\text{ClM} + \text{H})^+$, 64%), 257 ($(^{35}\text{Cl}^{35}\text{ClM} + \text{H})^+$, 100%). HRMS (ESI^+ , m/z): calcd for $(\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O})^+ (\text{M} + \text{H})^+$ 257.0243, found 257.0242. (*R*)-**4** [α] $_{\text{D}}^{20} = -77.5^\circ$ (*c* 1, CHCl_3). (*S*)-**4** [α] $_{\text{D}}^{20} = +78.4^\circ$ (*c* 1, MeOH). Analytical separation (HPLC): Chiralcel IA *n*-hexane/2-propanol (85:15), 0.8 mL/min, 20 °C, $t_{\text{R}}(\text{R}) = 9.4$ min, $t_{\text{R}}(\text{S}) = 11.9$ min.

Synthesis of (*R*)-1-(2-(2,4-Dichlorobenzoyloxy)-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl)-1*H*-imidazole (Miconazole, **1a**).²³

To a solution of (*R*)-**4** (100 mg, 0.39 mmol) in dry THF (5.5 mL) at -78°C under a nitrogen atmosphere was added a 30% dispersion of KH in mineral oil (71 mg, 0.53 mmol). The resulting suspension was stirred for 2 h at -78°C . After this time, 18-crown-6 (103 mg, 0.39 mmol) and 1-(bromomethyl)-2,4-dichlorobenzene (**11a**; 187 mg, 0.78 mmol) were successively added. Then, the mixture was stirred for 4 h at room temperature, and after this time the reaction was quenched with H_2O (10 mL), the aqueous solution was extracted with CH_2Cl_2 (3×15 mL), the organic phases were combined, dried over Na_2SO_4 , and filtered, and the solvent was removed by distillation under reduced pressure, giving a crude reaction mixture that was purified by flash chromatography (eluent gradient 100% CH_2Cl_2 to 5% MeOH/95% CH_2Cl_2), affording 127 mg of (*R*)-**1a** as a viscous oil (79%). R_{f} (5% MeOH/ CH_2Cl_2): 0.31. IR (NaCl): ν 3194, 3113, 2932, 2883, 1590, 1563, 1506, 1471, 1383, 1232, 1094, 1043, 866, 820 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , 300.13 MHz): δ 4.08 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz), 4.24 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 2.7$ Hz), 4.35 (d, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 12.6$ Hz), 4.50 (d, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 12.6$ Hz), 5.03 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 2.7$ Hz), 6.91 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 7.15–7.46 (m, 7H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75.5 MHz): δ 51.1, 68.1, 77.4, 119.6, 127.2, 127.8, 128.2, 129.1 (2C), 129.5, 129.8, 133.1, 133.2, 133.6 (2C), 134.2, 134.9, 137.7. MS (EI^+ , m/z): 418 ($^{37}\text{Cl}^{37}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^{35}\text{ClM}^+$, 14%), 416 ($^{37}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^{35}\text{ClM}^+$, 28%), 414 ($^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^{35}\text{ClM}^+$, 23%), 335 ($^{37}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^{35}\text{ClM} - \text{CH}_2\text{C}_3\text{H}_7\text{N}_2^+$, 37%), 161 ($\text{C}_7\text{H}_5^{37}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^+$, 65%), 159 ($\text{C}_7\text{H}_5^{35}\text{Cl}_2^+$, 100%). HRMS (ESI^+ , m/z): calcd for $(\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{Cl}_4\text{N}_2\text{O})^+ (\text{M} + \text{H})^+$ 414.9933, found 414.9949. (*R*)-**1a** [α] $_{\text{D}}^{20} = -65.0^\circ$ (*c* 1, CH_2Cl_2). (*S*)-**1a** [α] $_{\text{D}}^{20} = +68.7^\circ$ (*c* 1, CH_2Cl_2). Analytical separation (HPLC): Chiralcel OJ-H *n*-hexane/2-propanol (85:15), 0.8 mL/min, 40 °C, $t_{\text{R}}(\text{R}) = 21.6$ min, $t_{\text{R}}(\text{S}) = 28.8$ min.

Synthesis of (*R*)-1-[2-(4-Chlorobenzoyloxy)-2-(2,4-dichlorophenyl)ethyl]-1*H*-imidazole (Econazole, **1b**). To a solution of (*R*)-**4** (49 mg, 0.19 mmol) in dry THF (2.2 mL) at -78°C under a nitrogen atmosphere was added a 30% dispersion of KH in mineral oil (33 mg, 0.26 mmol). The resulting suspension was stirred for 2 h at -78°C . After this time 18-crown-6 (51 mg, 0.19 mmol) and 1-(bromomethyl)-4-chlorobenzene (**11b**; 117 mg, 0.57 mmol) were successively added. Then the mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched with H_2O (5 mL), the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (3×10 mL), the organic phases were combined, dried over Na_2SO_4 , and filtered, and the solvent was removed by distillation under reduced pressure, giving a crude reaction mixture that was purified by flash chromatography (eluent gradient 100% CH_2Cl_2 to 5% MeOH/95% CH_2Cl_2), affording 62 mg of (*R*)-**1b** as a viscous oil (86%). R_{f} (2% MeOH/ CH_2Cl_2): 0.29. IR (NaCl): ν 3111, 3066, 2935, 2869, 1590, 1561, 1492, 1470, 1090, 1044, 821 cm^{-1} . ^1H NMR (CDCl_3 , 300.13 MHz): δ 4.01 (dd, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 14.5$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 7.7$ Hz), 4.17 (m, 2H), 4.41 (d, 1H, $^2J_{\text{HH}} = 11.8$ Hz), 4.94 (dd, 1H, $^3J_{\text{HH}} = 7.6$ Hz, $^3J_{\text{HH}} = 2.7$ Hz), 6.87 (s, 1H), 6.98–7.07 (m, 3H), 7.23–7.35 (m, 4H), 7.40–7.47 (m, 2H). ^{13}C NMR (75.5 MHz): δ 51.3, 70.7, 76.8, 119.7, 127.9, 128.4, 128.6 (2C), 128.9 (2C), 129.2, 129.6, 133.3, 133.8, 133.9, 134.9, 135.3, 137.8. MS (EI^+ , m/z): 384 ($^{37}\text{Cl}^{37}\text{Cl}^{35}\text{ClM}^+$, 10%), 382 ($^{37}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^{35}\text{ClM}^+$, 32%), 380 ($^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^{35}\text{ClM}^+$, 33%), 257 ($\text{C}_{11}\text{H}_9^{37}\text{Cl}^{35}\text{ClN}_2\text{O}^+$, 65%), 255 ($\text{C}_{11}\text{H}_9^{35}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}^+$, 100%). HRMS (ESI^+ , m/z): calcd for $(\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{Cl}_3\text{N}_2\text{O})^+ (\text{M} + \text{H})^+$ 381.0323, found 381.0333. (*R*)-**1b** [α] $_{\text{D}}^{20} = -88.5^\circ$ (*c* 1, CH_2Cl_2). (*S*)-**1b** [α] $_{\text{D}}^{20} = +87.1^\circ$

(*c* 1, CH_2Cl_2). Analytical separation (HPLC): Chiralcel OJ-H *n*-hexane/2-propanol (85:15), 0.8 mL/min, 40 °C, $t_{\text{R}}(\text{R}) = 20.5$ min, $t_{\text{R}}(\text{S}) = 34.3$ min.

Biological Evaluation. The antimicrobial activities of the corresponding racemic mixtures and single enantiomers were performed using the microdilution method, as recommended in documents M27-A for yeast²⁹ and M38-P for filamentous fungi,³⁰ using 96-well microtiter plates. The sensitivities to the antimicrobial compounds were checked by visual inspection of the microbial growth on each well, after 24 h of incubation for *C. krusei* or 48 h for *C. neoformans*, *P. chrysogenum*, and *A. niger*. The given values were the average from six independent experiments, with 20% standard deviation between them (see Table 2).

■ ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information. Text and figures giving details of the HPLC and GC methods and full characterization data for all novel organic compounds. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: vgs@uniovi.es (V.G.); vicgotfer@uniovi.es (V.G.-F.). Tel: +34 98 5103448. Fax: +34 98 5103448.

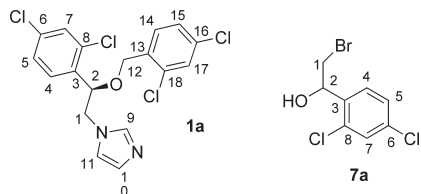
■ ACKNOWLEDGMENT

We thank Novo Nordisk Co. for the generous gift of CAL-B (Novozyme 435). Financial support of this work by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) through projects CTQ 2007-61126 and BIO 2008-03683 is gratefully acknowledged. V.G.-F. thanks the MICINN for a postdoctoral grant (Ramón y Cajal Program). J.M.-S. thanks the MICINN for a predoctoral fellowship (FPU Program).

■ REFERENCES

- (1) (a) Carey, J. S.; Laffan, D.; Thomson, C.; Williams, M. T. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2337–2347. (b) Mentel, M.; Blankenfeldt, W.; Breinbauer, R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 9084–9087. (c) Kasprzyk-Hordern, B. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4466–4503.
- (2) Beck, G. *Synlett* **2002**, 837–850.
- (3) (a) Stevens, D. A. *Drugs* **1983**, *26*, 347–354. (b) Barasch, A.; Voinea-Griffin, A. *Future Microbiol.* **2008**, *3*, 265–269.
- (4) (a) Chevreuil, F.; Landreau, A.; Seraphin, D.; Larcher, G.; Bouchara, J.-P.; Richomme, P. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2006**, *21*, 293–303. (b) Giraud, F.; Logé, C.; Pagniez, F.; Crepin, D.; Le Pape, P.; Le Borgne, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1820–1824. (c) La Regina, G.; D' Auria, F. D.; Tafi, A.; Piscitelli, F.; Olla, S.; Caporuscio, F.; Nencioni, L.; Cirilli, R.; La Torre, F.; De Melo, R. D.; Kelly, S. L.; Lamb, D. C.; Artico, M.; Botta, M.; Palamara, A. T.; Silvestri, R. *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3841–3855. (d) Castagnolo, D.; Radi, M.; Dessi, F.; Mmanetti, F.; Saggi, M.; Meleddu, R.; De Logu, A.; Botta, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2203–2205.
- (5) Croxtall, J. D.; Plosker, G. L. *Drugs* **2009**, *69*, 339–359.
- (6) Foguet, R.; Ramentol, J.; Anglada, L.; Palacin, C.; Guglietta, A. U.S. WO 2003-EP1089, 20,030,204, 2008; CAN 148:183389.
- (7) Blay, G.; Domingo, L. R.; Hernández-Olmos, V.; Pedro, J. R. *Chem Eur. J.* **2008**, *14*, 4725–4730.
- (8) Oh, K.; Shimura, Y.; Ishikawa, K.; Ito, Y.; Asami, T.; Murofushi, N.; Yoshizawa, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1090–1095.
- (9) (a) Liao, Y. W.; Li, H. X. *Yaoxue Xuebao* **1993**, *28*, 22–27. (b) Bisaha, S. N.; Malley, M. F.; Pudzianowski, A.; Monshizadegan, H.; Wang, P.; Madsen, C. S.; Gougoutas, J. Z.; Stein, P. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2749–2751.

- (10) Lipshutz, B. H.; Lower, A.; Kucejko, R. J.; Noson, K. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2969–2972.
- (11) Toribio, L.; del Nozal, M. J.; Bernal, J. L.; Alonso, C.; Jiménez, J. J. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1144*, 255–261.
- (12) (a) Ran, N.; Zhao, L.; Chen, Z.; Tao, J. *Green Chem.* **2008**, *10*, 361–372. (b) Patel, R. N. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 659–701. (c) Tao, J.; Xu, J.-H. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 43–50.
- (13) Gotor, V., Alfonso, I., García-Urdiales, E., Eds. *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2008.
- (14) Woodley, J. M. *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 321–327.
- (15) Carrea, G., Riva, S., Eds. *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2008.
- (16) (a) Tracewell, C. A.; Arnold, F. H. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 3–9. (b) Reetz, M. T. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5767–5778.
- (17) Reymond, J.-L.; Fluxà, V. S.; Maillard, N. *Chem. Commun.* **2009**, 39–46.
- (18) García-Junceda, E., Ed. *Multi-Step Enzyme Catalysis*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2008.
- (19) Broussy, S.; Cheloha, R. W.; Berkowitz, D. B. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 305–308.
- (20) Findrik, Z.; Vasić-Racki, D.; Lütz, S.; Dausmann, T.; Wandrey, C. *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27*, 1087–1095.
- (21) Wolberg, M.; Hummel, W.; Wandrey, C.; Müller, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 4306–4308.
- (22) Pollard, D.; Truppo, M.; Pollard, J.; Chen, C.-Y.; Moore, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 554–559.
- (23) Voss, C. V.; Gruber, C. C.; Faber, K.; Knaus, T.; Macheroux, P.; Kroutil, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13969–13972.
- (24) Stampfer, W.; Kosjek, B.; Moitzl, C.; Kroutil, W.; Faber, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, *41*, 1014–1017.
- (25) Huang, X.; Jing, J. Y. *Chem. Commun.* **2007**, 1825–1827.
- (26) Lennon, J. C.; Ramsden, J. A. *Org. Process Res. Dev.* **2005**, *9*, 110–112.
- (27) Ahmed, S. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1487–1496.
- (28) (*R*)-**1a** Miconazole (**1a**) and 2-bromo-1-(2,4-dichlorophenyl) ethanol (**7a**) are given as examples for the assignments of numerical locants used for NMR assignment:



- (29) National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standard M27-A*; National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 1997.
- (30) National Committee for Clinic Laboratory Standards. *Reference Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P*; National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 1998.

PARTE II. PREPARACIÓN ESTEREOSELECTIVA DE
DIFERENTES FAMILIAS DE HETEROCICLOS PRESENTES EN
PRODUCTOS DE INTERÉS MEDIANTE RUTAS
QUIMIOENZIMÁTICAS

Los heterociclos son compuestos orgánicos formados por un ciclo en donde, al menos, uno o más átomos no es un carbono. Forman la familia de compuestos más abundante en la Naturaleza y se encuentran presentes en la mayor parte de compuestos bioactivos. Las bases nitrogenadas que componen el ADN, las vitaminas, los alcaloides y la hemoglobina son ejemplos de compuestos heterocíclicos fundamentales para la vida. Además, la mayoría de los fármacos poseen como principio activo un compuesto heterocíclico. Por estas razones, el desarrollo de nuevas metodologías que permitan acceder a estos compuestos es un desafío para los químicos sintéticos.

En los proyectos de investigación desarrollados en esta Memoria se han preparado, mediante métodos biocatalíticos, diferentes familias de heterociclos que forman parte de estructuras de productos naturales y/o de interés biológico. Por ello, se hará a continuación una breve introducción sobre las características generales de las familias de compuestos estudiados en cada capítulo.

II.1. 2,3-Dihidrobencofuranos

El esqueleto de 2,3-dihidrobencofurano está compuesto por un anillo saturado de 5 miembros fusionado con un benceno en donde el átomo unido directamente al anillo aromático es un oxígeno. La estructura del 2,3-dihidrobencofurano se encuentra presente en numerosos productos naturales,⁹¹ como el Cedralin A (Figura II.1) y otros con actividad terapéutica.⁹² De hecho, una búsqueda realizada en la base de datos Reaxys[®], muestra que 562 compuestos naturales poseen este esqueleto en su estructura.⁹³

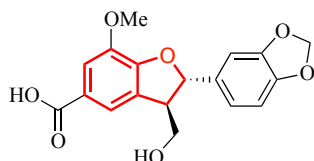


Figura II.1. Estructura de el Cedralin A, producto natural que posee el esqueleto de 2,3-dihidrobencofurano.

Debido a su importancia, existen descritas en la bibliografía numerosas metodologías para su preparación. Muchas de ellas se basan en acoplamientos de Sonogashira catalizados por metales de transición⁹⁴ y reacciones de arilación C-C o C-O.⁹⁵ Otras metodologías incluyen ciclaciones oxidativas de vinilfenoles,⁹⁶ deshidratación de α -fenoxicetonas⁹⁷ y reacciones de McMurry o Wittig intramoleculares.⁹⁸

Dentro de las metodologías asimétricas, la hidrogenación estereoselectiva es uno de los procedimientos más habituales. Recientemente, Ortega y colaboradores han descrito una ruta

⁹¹ (a) C.-Y. Chen, M. Weisel. *Synlett* **2013**, 24, 189-192; (b) D. S. Mortensen, A. L. Rodriguez, K. E. Carlson, J. Sun, B. S. Katzenellenbogen, J. A. Katzenellenbogen. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 3838-3848; (c) G. D. McCallion. *Curr. Org. Chem.* **1999**, 3, 67-76; (d) N. Durani, R. Jain, A. Saeed, D. K. Dikshit, S. Durani, R. S. Kapil. *J. Med. Chem.* **1989**, 32, 1700-1707; (e) B. H. Lipshutz. *Chem. Rev.* **1986**, 86, 795-819.

⁹² (a) I. S. Lee, H.-J. Kim, U.-J. Youn, Q.-C. Chen, J.-P. Kim, D. T. Ha, T. M. Ngoc, B.-S. Min, S.-M. Lee, H.-J. Jung, M.-K. Na, K.-H. Bae. *Helv. Chim. Acta* **2010**, 93, 272-276; (b) W.-S. Feng, X.-Y. Zang, X.-K. Zheng, Y.-Z. Wang, H. Chen, Z. Li. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2010**, 12, 557-561; (c) H. Adams, N. J. Gilmore, S. Jones, M. P. Muldowney, S. H. von Reuss, R. Vemula. *Org. Lett* **2008**, 10, 1457-1460.

⁹³ T. D. Sheppard. *J. Chem. Res.* **2011**, 377-385.

⁹⁴ X. Wang, Y. Lu, H.-X. Dai, J.-Q. Yu. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 12203-12205.

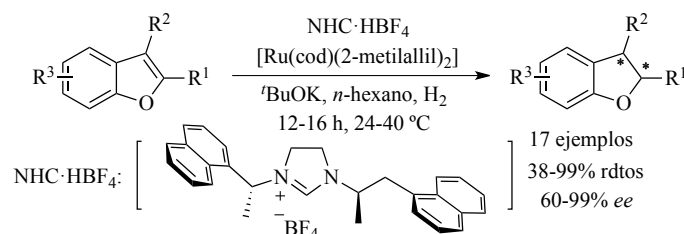
⁹⁵ (a) M.-W. Chen, L.-L. Cao, Z.-S. Ye, G.-F. Jiang, Y.-G. Zhou. *Chem Commun.* **2013**, 49, 1660-1662; (b) H. Sundén, R. Olsson. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 4831-4833; (c) F. A. Siqueira, J. G. Taylor, C. R. D. Correia. *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 2102-2105; (d) C. Körner, P. Starkov, T. D. Sheppard. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 5968-5969; (e) M. Szlosek-Pinaud, P. Diaz, J. Martinez, F. Lamaty. *Tetrahedron* **2007**, 63, 3340-3349.

⁹⁶ (a) C.-F. Pan, J. Yu, Y.-Q. Zhou, Z.-Y. Wang, M.-M. Zhou. *Synlett* **2006**, 1657-1662; (b) K. Takeshi, I. Koji. *Heterocycles* **2005**, 65, 1641-1654.

⁹⁷ (a) Q. Shen, Q. Peng, J.-L. Shao, X.-L. Liu, Z.-H. Huang, X.-Z. Pu, L. Ma, Y.-M. Li, A. S. C. Chan, L.-Q. Gu. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, 40, 1307-1315; (b) M. Jørgensen, F. C. Krebs, K. Bechgaard. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 8783-8785.

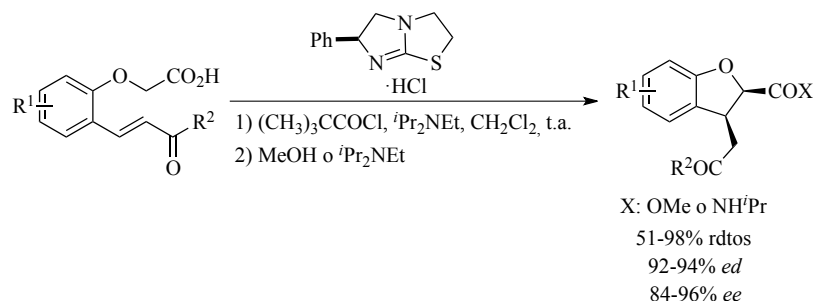
⁹⁸ (a) S. Rele, S. Talukdar, A. Banerji, S. Chattopadhyay. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 2990-2994; (b) A. Furstner, A. Hupperts. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 4468-4475.

para la preparación de 2,3-dihidrobencofuranos ópticamente activos (Esquema II.1), utilizando un complejo de rutenio y un carbeno *N*-heterocíclico quiral como ligando. De esta forma, se ha obtenido una familia de 2,3-dihidrobencofuranos con buenos rendimientos y *ee* de hasta >99 %.⁹⁹



Esquema II.1. Preparación estereoselectiva de 2,3-dihidrobencofuranos mediante hidrogenación asimétrica a partir de los correspondientes benzofuranos.

Una estrategia estereoselectiva alternativa consiste en la ciclación asimétrica de carboxienonas (Esquema II.2) en donde, en primer lugar, se genera un anhídrido a partir del correspondiente ácido carboxílico, para dar el enolato intermedio tras reaccionar con el catalizador tipo tiourea. Finalmente, tras atacar al aceptor de Michael, se generan los 2,3-dihidrobencofuranos correspondientes con altas diastereo- y enantioselectividades.¹⁰⁰



Esquema II.2. Formación estereoselectiva de 2,3-dihidrobencofuranos mediante ciclación asimétrica de carboxienonas.

Como se puede observar, existen una gran variedad de metodologías para la preparación asimétrica de esta familia de compuestos. Sin embargo, hasta la fecha no se han descrito estrategias biocatalíticas que permitan el acceso a 2,3-dihidrobencofuranos en forma ópticamente activa.

⁹⁹ N. Ortega, S. Urban, B. Beiring, F. Glorius. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1710-1713.

¹⁰⁰ D. Belmessieri, L. C. Morrill, C. Simal, A. M. Z. Slawin, A.D. Smith. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2714-2720.

II.2. 3H-Isobenzofuranonas

El esqueleto de isobenzofuranona se encuentra presente en numerosos productos naturales que presentan actividad biológica y que tradicionalmente se han usado como fármacos, tintes y fragancias. Cabe destacar la 3-butilisobenzofuran-1-(3H)-ona (Figura II.2), un compuesto con esqueleto de isobenzofuranona que posee propiedades anti-hipertensivas¹⁰¹ y efectos neuroprotectores.¹⁰² Además, este tipo de compuestos son intermedios importantes en la preparación de productos naturales tri y tetracíclicos con propiedades antibióticas.¹⁰³

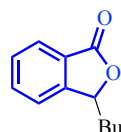
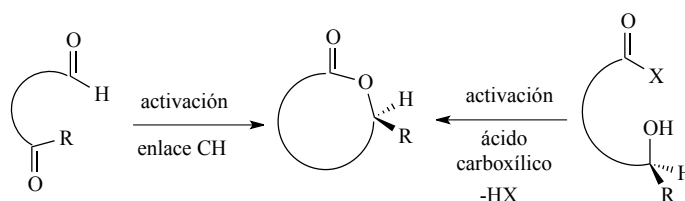


Figura II.2. 3-Butilisobenzofuran-1-(3H)-ona, producto de interés que posee en su estructura el esqueleto de isobenzofuran-1-(3H)-ona.

Tradicionalmente, se ha llevado a cabo la preparación de este tipo de compuestos a través de procesos de lactonización basados en la activación de un ácido carboxílico y la posterior ciclación intramolecular por ataque de un alcohol enantioenriquecido (Esquema II.3).¹⁰⁴



Esquema II.3. Aproximaciones para la lactonización intramolecular asimétrica.

En los últimos años, el desarrollo de nuevos procesos de activación C-H de aldehídos, promovidos por catalizadores de rutenio (I) y ligandos quirales, han permitido que se puedan obtener esqueletos de isobenzofuranona con altos excesos enantioméricos (Esquema II.4).¹⁰⁵

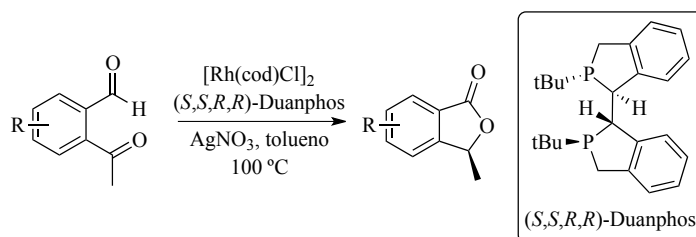
¹⁰¹ D. Tsi, B.K.H. Tan. *Phytother. Res.* **1997**, *11*, 576-582.

¹⁰² T. Zhang, W. Yan, Q. Li, J. Fu, K. Liu, W. Jia, X. Sun, X. Liu. *Neurol. Res.* **2011**, *33*, 396-404.

¹⁰³ (a) Vanessa Gonnot, S. Tisserand, M. Nicolas, R. Baatia, C. Mioskowsk. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7117-7119; (b) M. L. Patil, H. B. Borate, D. E. Ponde, V. H. Deshpande. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 6615-6620.

¹⁰⁴ Z. Shen, H. A. Khan, V. M. Dong, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2916-2917

¹⁰⁵ (a) M. C. Willis *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2-4; (b) D. H. T. Phan, B. Kim, V. M. Dong, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15608-15609.



Esquema II.4. Formación de 3*H*-isobenzofuranonas mediante activación de aldehídos.

II.3. 3,4-Dihidroisocumarinas

Al igual que el resto de los compuestos heterocíclicos descritos a lo largo de esta Tesis Doctoral, el esqueleto de 3,4-dihidroisocumarina se encuentra presente en una gran variedad de productos naturales de interés biológico, como el hidrangenol o un inhibidor de la aldosterona sintasa (Figura II.3). Debido a esto, se han descrito en la bibliografía numerosas metodologías para la preparación de estos compuestos en forma ópticamente activa, o su obtención a partir de extractos naturales.¹⁰⁶

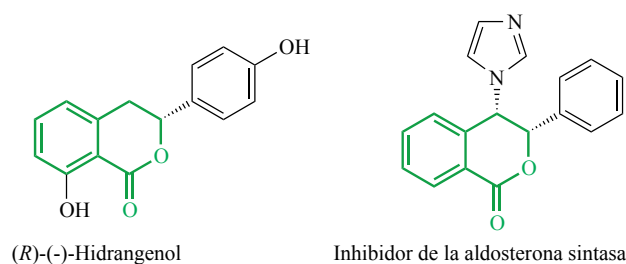
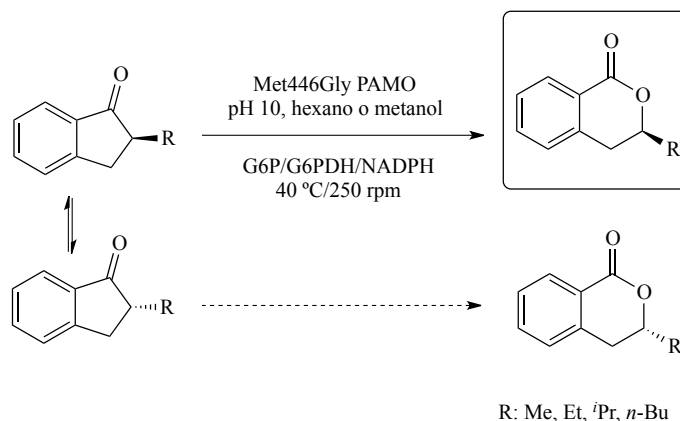


Figura II.3. Estructura química de compuestos de interés que poseen el esqueleto de 3,4-dihidroisocumarina.

Dentro de las síntesis de 3,4-dihidroisocumarinas mediante métodos biocatalíticos cabe destacar la preparación de 3-alkil-3,4-dihidroisocumarinas, desarrollada por nuestro grupo de investigación, mediante un proceso de oxidación catalizado por Baeyer-Villiger monooxigenasas (BVMOs, Esquema II.5). El proceso transcurre a través de una resolución cinética dinámica de diferentes 2-alkilindanonas, que son transformadas en las correspondientes lactonas, utilizando la mutante Met446Gly de la fenilacetona monooxigenasa (PAMO). El proceso tiene lugar a pH 10 en donde la racemización de las

¹⁰⁶ (a) J. Chen, L. Zhou, C. K. Tan, Y-Y. Yeung. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 999-1009; (b) C. Zidorn, B. O. Petersen, V. Sareedenchai, E. P. Ellmerer, J. Duus. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1390-1393; (c) Y. Li, I. Plitzko, J. Zaugg, S. Hering, M. Hamburger. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 768-770; (d) R. Haritakun, M. Sappan, R. Suvannakad, K. Tasanathai, M. Isaka. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 75-78; (e) S. A. Shahzad, C. Venin, T. Wirth. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3465-3472; (f) A. Kumar Sharma, Y. Maheshwary, P. Singh, K. N. Singh. *Arkivoc* **2010**, *ix*, 54-62; (g) B. Cramer, H. Harrer, K. Nakamura, D. Uemura, H.-U. Humpf. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 343-347; (h) A. Habel, W. Boland. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1601-1604.

ce-tonas de partida ocurre en el propio medio de reacción sin la necesidad de añadir otros reactivos. De esta forma, la monooxigenasa reacciona preferentemente con uno de los enantiómeros de la mezcla racémica, mientras que el otro se va racemizando. Así, es posible obtener las correspondientes 3-alkylisocumarinas con conversiones entre moderadas y buenas (53-89%) y *ee* entre buenos y excelentes (88->97%).¹⁰⁷



Esquema II.5. Preparación quimioenzimática de 3,4-dihidroisocumarinas mediante DKR de 2-alkilindanonas catalizada por BVMOs.

II.4. 1,2,3,4-Tetrahidroisoquinolinas

Las 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolinas forman parte de la estructura de muchos alcaloides naturales que poseen interesantes propiedades biológicas, como la emetina o la berberina (Figura II.4).¹⁰⁸ Además del interés biológico, este tipo de compuestos se usan también como ligandos quirales en procesos de catálisis asimétrica.¹⁰⁹ Debido a su creciente importancia, la preparación de estos compuestos ha sido ampliamente estudiada en los últimos años,¹¹⁰ encontrándose varias metodologías descritas para la preparación quimioenzimática de este esqueleto en forma ópticamente activa.

¹⁰⁷ A. Rioz-Martínez, G. de Gonzalo, D. E. Torres-Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2073-2076.

¹⁰⁸ (a) J. D. Scott, R. M. Williams. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1669-1730; (b) K. W. Bentley. *Nat. Prod. Rep.* **1992**, *9*, 365-391; (c) G. L. Grunewald, D. J. Sall, J. A. Monn. *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 824-830; (d) M. D. Menachery, G. L. Lavanier, M. L. Wetherly, H. Guinaudeau, M. Shamma. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 745-788; (e) *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*, ed. J. D. Philipson, M. F. Roberts, M. H. Zenk, Springer-Verlag. Berlin, **1985**.

¹⁰⁹ B. K. Peters, S. K. Chakka, T. Naicker, G. E. M. Maguire, H. G. Kruger, P. G. Andersson, T. Govender. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 679-687.

¹¹⁰ (a) P. Siengalewicz, U. Rinner, J. Mulzer. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 2676-2690; (b) Z. Czarnocki, A. Siwicka, J. Szawkalo. *Curr. Org. Synth.* **2005**, *2*, 301-331; (c) A. B. J. Bracca, T. S. Kaufman. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 10575-10610; (d) J. L. Vicario, D. Badía, L. Carrillo, J. Etxeberria. *Curr. Org. Chem.* **2003**, *7*, 1775-1792; (e) A. Yokoyama, T. Ohwada, K. Shudo. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 611-617.

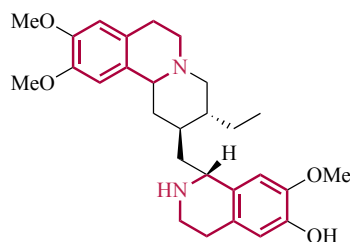
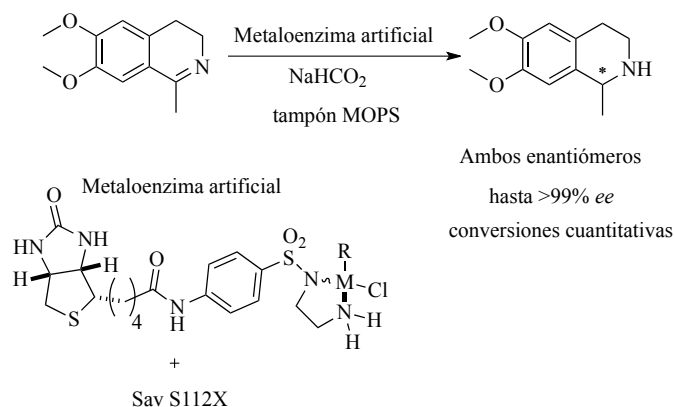


Figura II.4. Estructura de la Emetina, producto natural que posee dos 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolinas en su estructura.

Por ejemplo, Ward y colaboradores han descrito un proceso de hidrogenación estereoselectiva de iminas cíclicas para preparar salsolidina, utilizando un metaloenzima artificial compuesto por un catalizador de iridio y el sistema streptavidina/biotina (Esquema II.6).¹¹¹ Así, fue posible obtener ambos enantiómeros de la amina utilizando dos mutantes diferentes, ambas con una modificación de su secuencia de aminoácidos en la misma posición (Ser112Lys para preparar el enantiómero *S* y Ser112Ala para el *R*). Estas aminas con buenos excesos enantioméricos (96% para el *R* y 71% para el *S*) y conversiones totales.

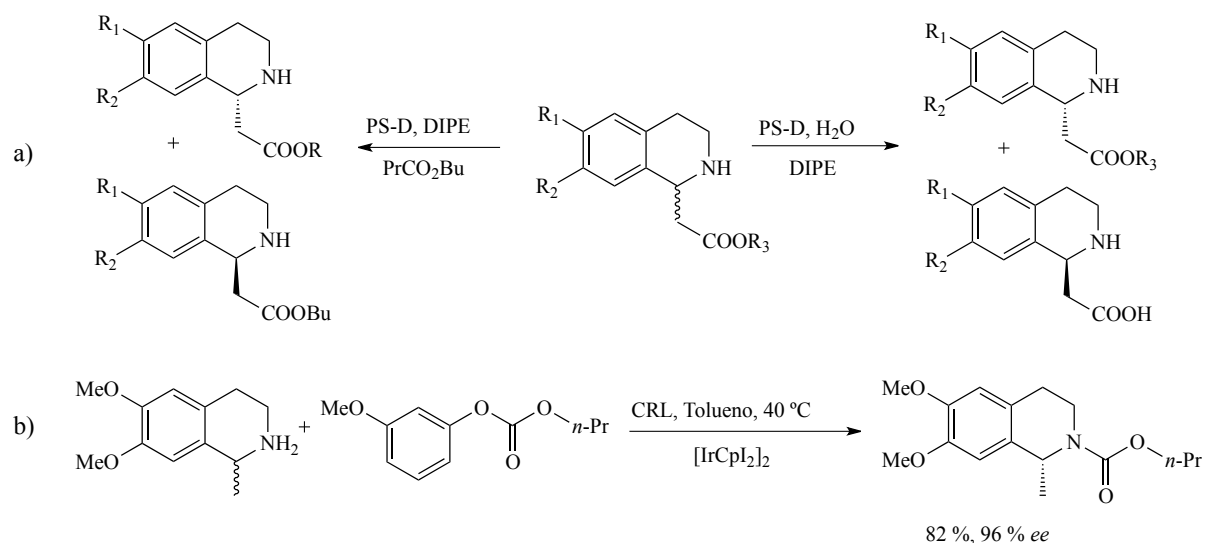


Esquema II.6. Preparación de 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolinas quirales mediante hidrogenación estereoselectiva de la correspondiente imina con metaloenzimas artificiales.

En 2008, el grupo de Kanerva llevó a cabo un proceso de resolución cinética clásica catalizado por la lipasa de *Burkholderia cepacia* soportada sobre Celite[®] de tetrahidroisoquinolinas racémicas a través de un proceso de hidrólisis y, alternativamente, de transesterificación del éster unido al carbono contiguo al centro estereogénico (Esquema II.7a). Los mejores resultados se obtuvieron en el proceso de hidrólisis, usando DIPE (diisopropiléter) como disolvente y cuatro equivalentes de agua. De este modo, fue posible

¹¹¹ M. Dürrenberger, T. Heinisch, Y. M. Wilson, T. Rossel, E. Nogueira, L. Knörr, A. Mutschler, K. Kersten, M. J. Zimbron, J. Pierron, T. Schirmer, T. R. Ward. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3026-3029.

aislar tanto el sustrato como el producto en forma enantiopura.¹¹² Otro método de preparación quimioenzimática de tetrahydroisoquinolinas ópticamente activas consiste en la resolución cinética mediada por la lipasa de *Candida rugosa* (CRL), utilizando un catalizador de iridio como agente de racemización y carbonato de 3-metoxifenilpropilo como agente de alcoxycarbonilación en tolueno y a 40 °C (Esquema II.7b). El proceso se lleva a una escala de 3 g y, tras 23 h de reacción, es posible aislar, con un 82% de rendimiento y 96% de *ee*, la amina de configuración (*R*).¹¹³



Esquema II.7. Diferentes procesos quimioenzimáticos catalizados por lipasas para la obtención de 1,2,3,4-tetraisoquinolinas quirales.

¹¹² T. A. Paál, E. Forró, F. Fülöp, A. Liljebblad, L. T. Kanerva. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2784-2788.

¹¹³ M. Stirling, J. Blacker, M. I. Page. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1247-1250.

ARTÍCULO III. SÍNTESIS ESTEREOSELECTIVA DE 2,3-
DIHIDROBENZOFURANOS MEDIANTE UN PROCESO DE
BIOTRANSFORMACIÓN SEGUIDO DE CICLACIÓN
INTRAMOLECULAR

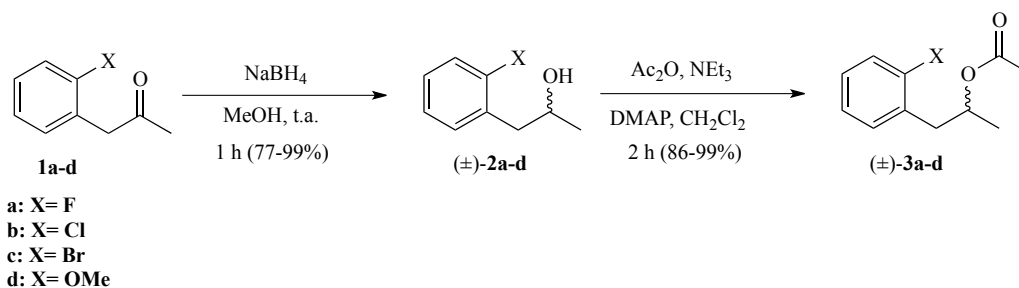
En la introducción anterior, se ha destacado la importancia biológica que poseen los 2,3-dihidrobencofuranos, presentes en el esqueleto de numerosos productos naturales y otros productos con actividad biológica. A continuación, se describe la preparación de una nueva familia de 2,3-dihidrobencofuranos ópticamente activos mediante una síntesis quimioenzimática asimétrica. Los resultados obtenidos en esta investigación, se encuentran recogidos en “*Straighforward synthesis of enantiopure 2,3-dihydrobenzofurans by a sequential stereoselective biotransformation and chemical intramolecular cyclization*”. J. Mangas-Sánchez, E. Busto, V. Gotor-Fernández y V. Gotor. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3498-3501.

II.III.1. Resultados y discusión

La estrategia sintética consiste en la combinación de la resolución cinética de 1-aril-2-propanoles, o la biorreducción de las correspondientes cetonas, junto con un proceso posterior de ciclación intramolecular. De esta forma, se ha conseguido acceder a estos compuestos en forma enantioméricamente pura y con buenos rendimientos.

II.III.1.1. Preparación de los compuestos racémicos.

En un primer lugar, partiendo de las fenilacetonas **1a-d** comerciales, se prepararon los alcoholes racémicos **2a-d** correspondientes con rendimientos entre buenos y moderados (77-99%) por reducción con borohidruro de sodio en metanol (Esquema III.1). A partir de éstos, y con el objetivo de poder seguir el curso estéreoquímico de la resolución cinética catalizada por lipasas empleando la técnica de HPLC con columnas de relleno quiral, se prepararon los correspondientes ésteres racémicos **3a-d** mediante acilación con anhídrido acético, usando trietilamina como base, *N,N*-dimetilaminopiridina como catalizador en diclorometano seco. Las condiciones óptimas de separación cromatográfica se encuentran recogidas en el material suplementario.



Esquema II.III.1. Preparación de los alcoholes (±)-**2a-d** y acetatos (±)-**3a-d** en forma racémica.

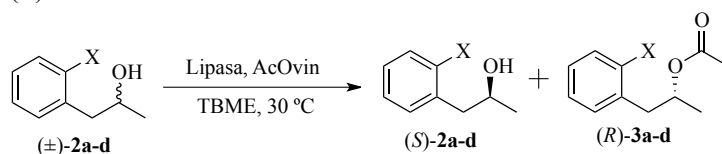
II.III.1.2. Estudio de resolución cinética y biorreducción

Para el estudio de la resolución cinética de los alcoholes racémicos **2a-d** (Tabla II.III.1) se utilizaron la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PSL-C) y la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B), ya que habían mostrado buenas actividades en la resolución cinética de alcoholes secundarios de estructura similar.¹¹⁴ Como agente de acilación se eligió el acetato de vinilo, empleando TBME seco como disolvente y a 30 °C. En todos los casos,

¹¹⁴ T. Ema, M. Yoshii, T. Korenaga, T. Sakai. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 1223-1229.

los mejores resultados se encuentran con la PSL-C, mostrando unas enantioselectividades moderadas para los derivados halogenados (entradas 1, 2 y 4) y excelentes con el derivado con la sustitución metoxi (entrada 6), siendo significativamente superiores a las mostradas por la CAL-B (entradas 3 y 5).

Tabla II.III.1. Resultados más significativos en la resolución cinética catalizada por lipasas de los alcoholes racémicos (\pm)-**2a-d**.



Entrada	Lipasa	X	t (h)	ee_p (%) ^a	ee_s (%) ^a	c (%) ^b	E^c
1	PSL-C I	F (2a)	6	89	95	52	61
2	PSL-C I	Cl (2b)	4	95	55	37	72
3	CAL-B	Cl (2b)	8	71	96	58	22
4	PSL-C I	Br (2c)	8	89	95	51.5	65
5	CAL-B	Br (2c)	8	67	>99	60	36
6	PSL-C I	OMe (2d)	9	95	>99	51.5	>200

^a Determinado mediante HPLC. ^b $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$. ^c $E = \ln[(1-c) \times (1-ee_s)] / \ln[(1-c) \times (1+ee_p)]$.

A la vista de estos resultados, se decidió explorar la biorreducción de las cetonas **1a-d** (Tabla II.III.2). Para este estudio se utilizaron las siguientes ADH comerciales: T (*Thermoanaerobacter species*), A (*Rhodococcus ruber*), LB (*Lactobacillus brevis*) y CP (*Candida parapsilopsis*). De ellas, la T, A y CP son de preferencia “Prelog”, por lo que el alcohol que se obtiene en la biorreducción es el de configuración *S*, mientras que cuando se utilizan las ADH LB y PR2, el alcohol que se obtiene es el de configuración contraria. Los mejores resultados se obtienen con las ADH CP y A (Tabla II.III.2), alcohol deshidrogenasas que mostraron actividades y selectividades excelentes, obteniéndose los cuatro alcoholes de configuración *S* en forma enantiopura y con conversiones superiores al 92%. En cuanto a los biocatalizadores “anti-Prelog”, la ADH LB fue capaz de reducir con total estereoselectividad las cetonas de estudio, sin embargo, los alcoholes se obtuvieron con conversiones de bajas a moderadas (1-43%).

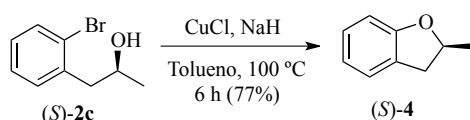
Tabla II.III.2. Biorreducción de las cetonas **1a-d** a 30 °C y 250 rpm durante 24 h usando ADH-A y ADH-CP como biocatalizadores.

Entrada	ADH	X	ee_p (%) ^a	c (%) ^b
1	CP	F	>99	99
2	A	F	>99	99
3	CP	Cl	>99	97
4	A	Cl	>99	99
5	CP	Br	>99	92
6	A	Br	>99	99
7	CP	OMe	>99	95
8	A	OMe	>99	98

^a En todos los casos se obtienen los (*S*)-**2a-d**. ee determinados mediante HPLC con columnas de relleno quiral. ^b Conversiones determinadas por cromatografía de gases sobre el crudo de reacción.

II.III.1.3. Preparación del (*S*)-2-metil-2,3-dihidrobencofurano

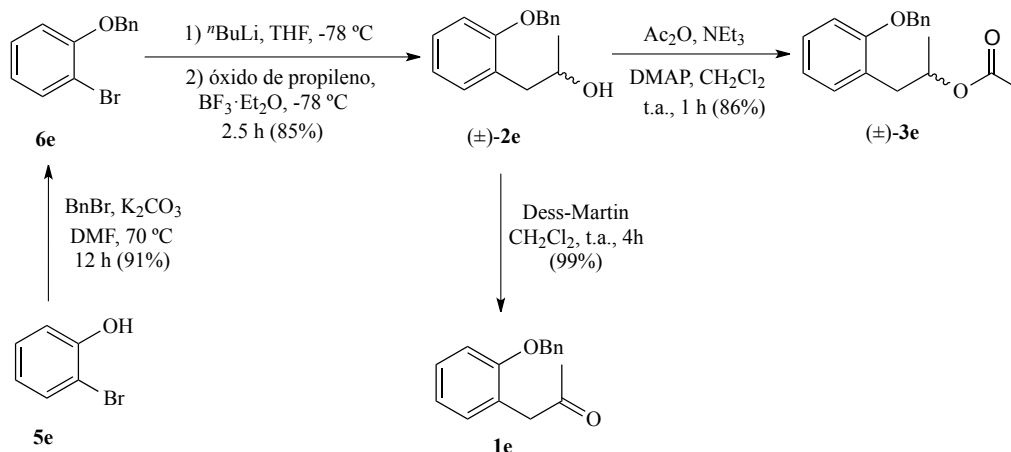
Una vez hecho el estudio enzimático para obtener los 1-aryl-2-propanoles de interés en forma enantiopura, se procedió a estudiar el proceso de ciclación para llegar a los 2,3-dihidrobencofuranos en forma ópticamente activa. Partiendo de los alcoholes (*S*)-**2a-d**, se llevaron a cabo una serie de procedimientos sintéticos para la obtención del (*S*)-2-metil-2,3-dihidrobencofurano **4**. Desafortunadamente, sólo se pudo acceder a **4** a través del alcohol **2c** (R=Br) por reacción con cloruro de cobre (I) e hidruro de sodio en tolueno a 100 °C (Esquema II.III.2). De esta forma, se obtiene el (*S*)-2-metil-2,3-dihidrobencofurano (**4**) sin pérdida de la pureza óptica. En el caso de **2d**, se realizaron diversos esfuerzos para la obtención del fenol correspondiente, sin embargo ninguna de las metodologías estudiadas para romper el enlace O-C en el grupo metoxilo llevó al producto deseado sin que hubiera racemización. Como consecuencia, y viendo que la metodología propuesta no es general, se decidió explorar una síntesis alternativa.



Esquema II.III.2. Preparación del (S)-2-metil-2,3-dihidrobenzofurano a partir de (S)-2c mediante ciclación intramolecular catalizada por Cu (I).

II.III.1.4. Desarrollo de una síntesis alternativa para la preparación del 2-metil-2,3-dihidrobenzofurano.

Para ello, partiendo del 2-bromofenol comercial **5e**, mediante un primer paso de protección del fenol con bromuro de bencilo, seguido de una reacción de trasmetalación con ⁿBuLi y apertura del óxido de propileno en presencia de trifluoroeterato de boro, se llega al correspondiente 1-[(2-benciloxi)fenil]propan-2-ol (**2e**) en forma racémica (Esquema II.III.3).

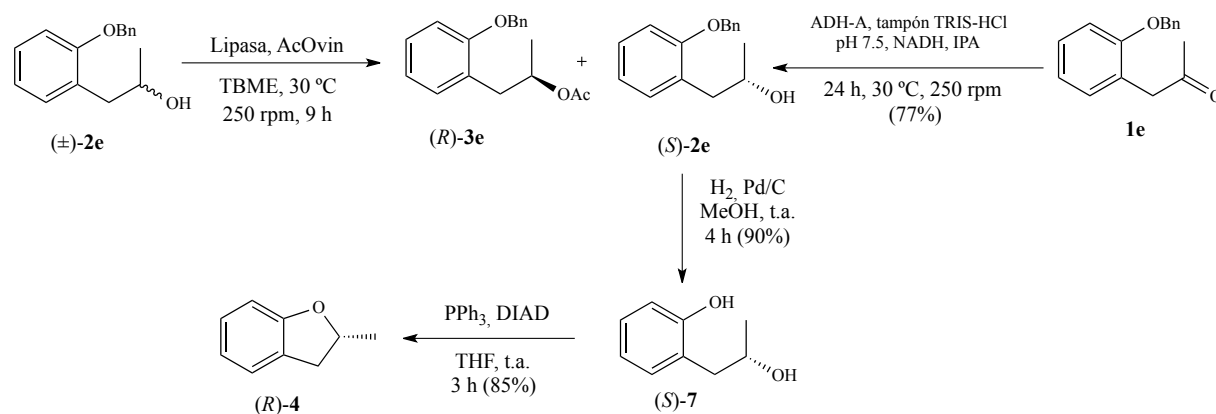


Esquema II.III.3. Preparación de los productos de partida y finales en forma racémica de las reacciones enzimáticas.

Una vez preparado el alcohol **2e**, se procedió al estudio tanto de su resolución cinética como de la biorreducción de la correspondiente cetona **1e** (Esquema II.III.4). Ésta se prepara con rendimiento cuantitativo mediante oxidación de **2e** con el reactivo de Dess-Martin en diclorometano (Esquema II.III.3). En el caso de la biorreducción, tan sólo la ADH-A mostró buenos resultados. Utilizando el doble de unidades de enzima que en el caso de las 2-arilacetonas estudiadas anteriormente, se obtiene el alcohol de configuración *S* en forma enantiopura con un 74% de conversión. En este caso, la sustitución OBn es muy voluminosa y la reactividad de la alcohol deshidrogenasa es mucho menor que en los casos anteriores.

En cuanto a la resolución cinética de **2e**, utilizando PSL-C I como biocatalizador y acetato de vinilo como donador de acilo en TBME, tras 5.5 h se obtiene un 48% de conversión, aislándose

el éster de configuración *R* con un *ee* del 97% y el alcohol *S* remanente con un 81%. Teniendo en cuenta que la reacción es bastante rápida, se decidió rebajar la cinética de la reacción disminuyendo la carga de biocatalizador a la mitad. De esta forma, tras 9 h se puede aislar el éster (*R*)-**3e** con un 96% de *ee* y el alcohol en forma enantiopura.

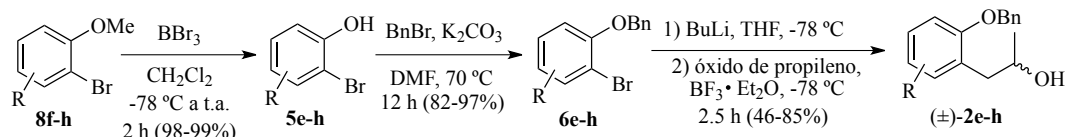


Esquema II.III.4. Resolución del alcohol racémico **2e** y posterior preparación de (*R*)-**4** mediante un proceso de desprotección y ciclación intramolecular.

Finalmente, partiendo de (*S*)-**2e**, fue posible preparar el (*R*)-2-metil-2,3-dihidrobenzofurano (*R*)-**4** mediante un primer paso de desprotección del grupo bencilo a través de una hidrogenación catalítica usando Pd/C como catalizador con un rendimiento aislado del 90%, obteniéndose el fenol (*S*)-**7**. Finalmente, se pudo obtener (*R*)-**4** mediante una ciclación intramolecular en las condiciones de Mitsunobu aprovechando el carácter ácido del fenol, usando trifenilfosfina y DIAD en THF, aislándose el (*R*)-2-metil-2,3-dihidrobenzofurano (*R*)-**4** en forma enantiopura con un rendimiento del 85%.

II.III.1.5. Ampliación de la metodología al resto de sustratos

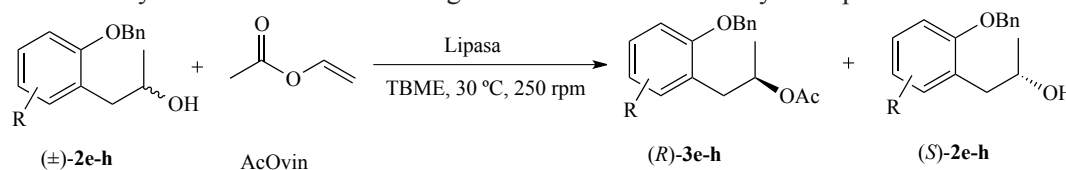
Una vez desarrollada esta vía, se decidió ampliar el estudio a derivados con sustitución en el anillo aromático (Esquema II.III.5). De esta forma, partiendo de los 2-bromoanisoles comerciales **8f-h**, se llega a los correspondientes fenoles **5f-h** con rendimientos cuantitativos mediante ruptura del enlace O-C con tribromuro de boro en diclorometano. De forma análoga a **5e**, fue posible obtener los alcoholes racémicos **2f-h** mediante un primer paso de protección del fenol para dar los derivados **6f-h** con rendimientos excelentes (82-97%), y posterior reacción de trasmetalación con BuLi y apertura del óxido de propileno (rendimientos aislados (43-85%).



Esquema II.III.5. Preparación de los alcoholes racémicos **2e-h** a partir de los productos comerciales **5e** y **8f-h**.

Llegados a este punto y viendo que la resolución cinética mostraba mejores resultados que la biorreducción, se procedió únicamente al estudio de la transesterificación enzimática de estos alcoholes. Al igual que en los casos anteriores, se utilizaron la PSL-C I y la CAL-B. Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla II.III.3.

Tabla II.III.3. Resolución cinética catalizada por lipasas de los alcoholes **2e-h** utilizando TBME como disolvente y acetato de vinilo como agente de acilación a 30 °C y 250 rpm.



Entrada	Alcohol	Lipasa	t (h)	ee_p (%) ^a	ee_s (%) ^a	c (%) ^b	E^c
1	2e	CAL-B ^d	5.5	81	94	56	33
2	2e	CAL-B ^e	5	92	91	50	70
3	2e	PSL-C I ^d	5.5	97	81	48	176
4	2e	PSL-C I ^e	9	96	>99	50	>200
5	2f	CAL-B ^d	3	98	95	49	>200
6	2f	CAL-B ^e	5	97	>99	50	>200
7	2f	PSL-C I ^d	5	>99	25	20	>200
8	2f	PSL-C I ^e	7	>99	24	19	>200
9	2g	CAL-B ^d	15	92	>99	52	179
10	2g	CAL-B ^e	5.5	99	>99	50	>200
11	2g	PSL-C I ^d	15	99	32	24	>200
12	2h	CAL-B ^d	39	99	>99	50	>200
13	2h	PSL-C ^d	15	97	9	9	72

^a Determinado mediante HPLC. ^b $c = ee_s/(ee_s+ee_p)$. ^c $E = \ln[(1-c)(1-ee_s)]/\ln[(1-c)(1+ee_p)]$. ^d Relación enzima:sustrato en peso 1:1. ^e Relación enzima:sustrato en peso 0.5:1.

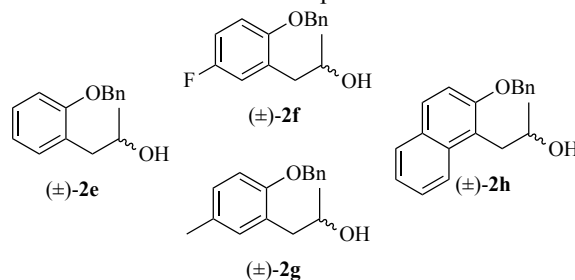
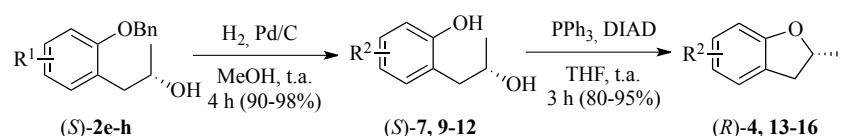


Figura II.III.1. Alcoholes racémicos **2e-h** estudiados

De esta forma, se tomaron como punto de partida las condiciones ya optimizadas para **2e** (1:0.5 relación sustrato:enzima en peso). Así como para **2e** la PSL-C I mostró ser el biocatalizador más adecuado, a medida que la sustitución en el anillo aromático es más voluminosa, se observa una pérdida de actividad significativa. En el caso de **2f** (R=5-F) y **2g** (R=5-Me), tras 9 y 15 h de reacción respectivamente se alcanzaron conversiones por debajo del 25% (entradas 7, 8 y 11). Por el contrario, la CAL-B se comporta mucho mejor cuanto mayor es el sustituyente. Para los derivados **2f** y **2g** se alcanzan conversiones del 50% con total enantiodiscriminación tras 5 h de reacción (entradas 6 y 10). Cabe destacar que fue necesario usar una relación 1:1 sustrato:enzima en peso para alcanzar esos resultados.

Finalmente, para el derivado **2h** [R=3,4-(CH₃)₂], la diferencia entre las dos lipasas se acentúa mucho más, y tan sólo la CAL-B se muestra como un catalizador adecuado para la obtención del precursor enantiopuro con buenas conversiones (entrada 12).

Una vez obtenidos con éxito los 1-aryl-2-propanoles enantioméricamente puros, se procedió a la preparación de los dihidrobencofuranos mediante un paso de desprotección del grupo bencilo seguido de una ciclación intramolecular (Esquema II.III.6). Cabe destacar que, en el caso de (*S*)-**2h**, en la hidrogenación, dependiendo de la carga de Pd/C, se pueden obtener dos productos. Así, cuando se utilizaron 84 mg de Pd/C al 10% por cada mmol de sustrato, se aisló el diol aromático (*S*)-**11** con un 98% de rendimiento aislado. Sin embargo, utilizando una carga de catalizador de 334 mg por mmol, se obtuvo el producto (*S*)-**12** con el anillo exterior totalmente hidrogenado con un 90% de rendimiento aislado tras cromatografía de columna. Finalmente, tras una ciclación intramolecular usando trifenilfosfina y DIAD, se obtuvieron los (*R*)-2-metil-2,3-dihidrobencofuranos **13-16** en forma enantiopura con muy buenos rendimientos (85-90%).



Esquema II.III.6. Preparación final de los (*R*)-2-metil-2,3-dihidrobencofuranos **4**, **13-16** a partir de los alcoholes (*S*)-**2e-h**.

II.III.2. Conclusiones

Se ha desarrollado una metodología eficaz, sencilla y general para la preparación de una familia de (*R*)-2-metil-2,3-dihidrobenzofuranos enantiopuros a partir de una serie de 1-[(2-benciloxi)fenil]propan-2-oles racémicos que han sido resueltos con éxito usando las lipasas de *Pseudomonas cepacia* y de *Candida antarctica* de tipo B como biocatalizadores. Una vez obtenidos los alcoholes en forma enantiopura, se ha podido acceder a los correspondientes dihidrobenzofuranos, sin pérdida de la pureza óptica, a través de un paso de desprotección mediante hidrogenación, seguido de una ciclación intramolecular.

Straightforward Synthesis of Enantiopure 2,3-Dihydrobenzofurans by a Sequential Stereoselective Biotransformation and Chemical Intramolecular Cyclization

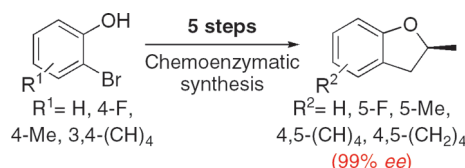
Juan Mangas-Sánchez, Eduardo Busto, Vicente Gotor-Fernández,* and Vicente Gotor*

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, Universidad de Oviedo, E-33006 Spain

vicgotfer@uniovi.es; vgs@fq.uniovi.es

Received June 10, 2010

ABSTRACT



A new family of optically active 2,3-dihydrobenzofurans has been prepared by a simple chemoenzymatic asymmetric strategy. This synthetic approach is based on the combination of a lipase-mediated kinetic resolution of 1-aryl-2-propanols or bioreduction of the corresponding ketones followed by an intramolecular cyclization reaction. These novel compounds have been prepared in enantiopure form and in good overall yield through a straightforward route.

Furan derivatives constitute a versatile class of heterocycles because of their presence in many biologically active compounds and their applications in a wide range of chemical transformations.¹ Among them, 2,3-dihydrobenzofurans are an attractive type of oxygenated organic compound since its basic skeleton is present in serotobenine, darifenacin, corsifuran A, or (–)-ephedrine A, substrates with remarkable biological properties. A series of nonstereoselective² and stereoselective chemical syntheses of this class of

materials have been reported in the literature,³ chemoenzymatic methods scarcely being reported for the preparation of 2,3-dihydrobenzofuran.⁴

Here we first report an exhaustive enzymatic study for the production of adequate alcohol intermediates in the synthesis of 2,3-dihydrobenzofurans, which will be later used in intramolecular cyclization reactions to obtain a wide family of enantiopure 2,3-dihydrobenzofurans.

(1) (a) Lipshutz, B. H. *Chem. Rev.* **1986**, *86*, 795. (b) Durani, N.; Jain, R.; Saeed, A.; Dikshit, D. K.; Durani, S.; Kapil, R. S. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1700. (c) McCallion, G. D. *Curr. Org. Chem.* **1999**, *3*, 67. (d) Mortensen, D. S.; Rodriguez, A. L.; Carlson, K. E.; Sun, J.; Katzenellenbogen, B. S.; Katzenellenbogen, J. A. *J. Med. Chem.* **2001**, *33*, 3838.

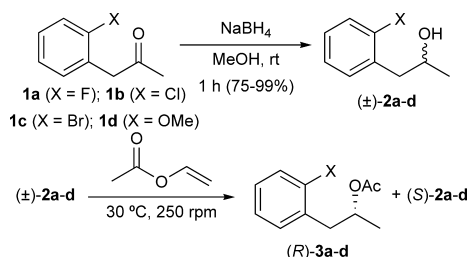
(2) See for example: (a) Chow, Y. L.; Zhou, X.-M.; Gaitan, T. J.; Wu, Z.-Z. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3813. (b) Bernard, A. M.; Cocco, M. T.; Onnis, V.; Oiras, P. P. *Synthesis* **1997**, 41. (c) Zulfikar, F.; Kitazume, T. *Green Chem.* **2000**, *2*, 296. (d) Tsukada, N.; Yagura, Y.; Sato, T.; Inoue, Y. *Synlett* **2003**, 1431. (e) Grant, V. H.; Liu, B. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1237. (f) Reich, N. W.; Yang, C.-G.; Shi, Z.; He, C. *Synlett* **2006**, 1278. (g) Ohta, T.; Kataoka, Y.; Miyoshi, A.; Oe, Y.; Furukawa, I.; Ito, Y. *J. Organomet. Chem.* **2007**, *692*, 671.

(3) See, for example: (a) Engler, T. A.; Letavic, M. A.; Reddy, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5068. (b) Petit, F.; Furtoss, R. *Synthesis* **1995**, 1517. (c) Enders, D.; Vázquez, J.; Raabe, G. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1999**, 701. (d) Engler, T. A.; Letavic, M. A.; Iyengar, R.; La Tessa, K. O.; Reddy, J. P. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2391. (e) Garzino, F.; Méou, A.; Brun, P. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9803. (f) Kuwabe, S.-i.; Torracca, K. E.; Buchwald, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12202. (g) Garzino, F.; Méou, A.; Brun, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1410. (h) Kurosawa, W.; Kan, T.; Fukuyama, T. *Synlett* **2003**, 1028. (i) Kaiser, S.; Smidt, S. P.; Pfaltz, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 5194. (j) Chuang, C.-P.; Tsai, A.-I. *Synthesis* **2006**, 675. (k) Chuang, C.-P.; Chen, K.-P.; Hsu, Y.-L.; Tsai, A.-I.; Liu, S.-T. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 7511. (l) Adams, H.; Gilmore, N. J.; Jones, S.; Muldowney, M. P.; von Reuss, S. H.; Vemula, R. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1457.

(4) Itoh, T.; Kawai, K.; Hayase, S.; Ohara, H. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4081.

Taking advantage of the high stereodiscrimination shown by enzymes⁵ and the fact that resolution of racemic mixtures is probably the most common technique used in the industrial sector for the preparation of enantiomerically pure compounds,⁶ we have considered the kinetic resolution of (\pm)-**2a–d**, compounds easily prepared by chemical reduction of commercially available ketones **1a–d** using sodium borohydride in MeOH (Scheme 1). The chemical reduction processes proceed smoothly obtaining the racemic 1-aryl-2-propanols **2a–d** in good to excellent yields after 1 h. This simple chemical reaction is a more efficient alternative than the previous synthesis reported for this family of alcohols.^{3f,7}

Scheme 1. Chemical Synthesis and Lipase-Mediated Kinetic Resolution of Racemic Alcohols **2a–d**



Then, after a preliminary screening of enzymatic activity, we found *Pseudomonas cepacia* lipase (PSL-C I), also known as *Burkholderia cepacia* lipase, as the most efficient biocatalyst for the asymmetric preparation of (*R*)-acetates **3a–d** and (*S*)-alcohols **2a–d** (Table 1). In the lipase-mediated acetylation, stereochemistries were in accordance with Kazlauskas' rule⁸ and previous enzymatic studies carried out with **2d**.⁹ Vinyl acetate was used as adequate irreversible acyl donor, observing moderate enantioselectivity values when halogen atoms were present in the 2-position of the phenyl ring (F, Cl, and Br). PSL-C I allowed the recovery of the (*R*)-acetates **3a–d** up to 89% ee in all cases (entries 1, 2, 4, and 6), obtaining the best results with the methoxy derivative **2d**. In general, CAL-B showed lower stereopreference values, although in the case of compounds **2b,c** (X = Cl and Br, entries 3 and 5) made possible the recovery of the (*S*)-alcohols in nearly enantiopure form (96–99% ee).

(5) (a) *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*; Gotor, V., Alfonso, I., García-Urdiales, E., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2008. (b) *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Medium*; Carrea, G., Riva, S., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2008. (c) Fessner, W.-D.; Anthonsen, T. *Modern Biocatalysis. Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions*; Wiley-VCH: Weinheim, 2009. (d) Hudlicky, T.; Reed, J. W. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3117.

(6) Breuer, M.; Ditrich, K.; Habicher, T.; Hauer, B.; Kebeler, M.; Stürmer, R.; Zelinski, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 788.

(7) (a) Kataoka, N.; Shelby, Q.; Stambuli, J. P.; Harwig, J. F. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5553. (b) Shimizu, H.; Saito, T.; Kumobayashi, H. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 185. (c) Erdélyi, B.; Szabó, A.; Seres, G.; Birincsik, L.; Ivanics, J.; Szatker, G.; Poppe, L. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 268.

(8) Kazlauskas, R. J.; Weissfoch, A. N. E.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656.

(9) Ema, T.; Yoshii, M.; Korenaga, T.; Sakai, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 1223.

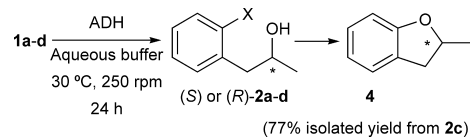
Table 1. Lipase-Mediated Kinetic Resolutions of Alcohols (\pm)-**2a–d** Using 3 equiv of Vinyl Acetate in THF at 30 °C and 250 rpm

entry	lipase	X	t (h)	ee _p (%) ^a	ee _S (%) ^a	c (%) ^b	E ^c
1	PSL-C I	F	6	89	95	52	61
2	PSL-C I	Cl	4	95	55	37	72
3	CAL-B	Cl	8	71	96	58	22
4	PSL-C I	Br	8	89	95	51.5	65
5	CAL-B	Br	8	67	>99	60	36
6	PSL-C I	OMe	9	95	>99	51.5	>200

^a Determined by HPLC. ^b c = ee_S/(ee_S + ee_p). ^c E = ln[(1 - c) × (1 - ee_p)]/ln[(1 - c) × (1 + ee_p)].¹⁰

Additionally, bioreduction processes offer a new alternative for the production of enantiopure alcohols, particularly substituted 1-phenylpropan-2-ols.^{7,11} To examine the scope of this methodology, ketones **1a–d** were stereoselectively reduced using a set of alcohol dehydrogenases (ADH): T, LB, CP, PR2, RS1, and A (Scheme 2). The best results are summarized in Table 2.

Scheme 2. Bioreduction of Ketones **1a–d** Followed by Intramolecular Cyclization to Afford 2,3-Dihydrobenzofuran **4**



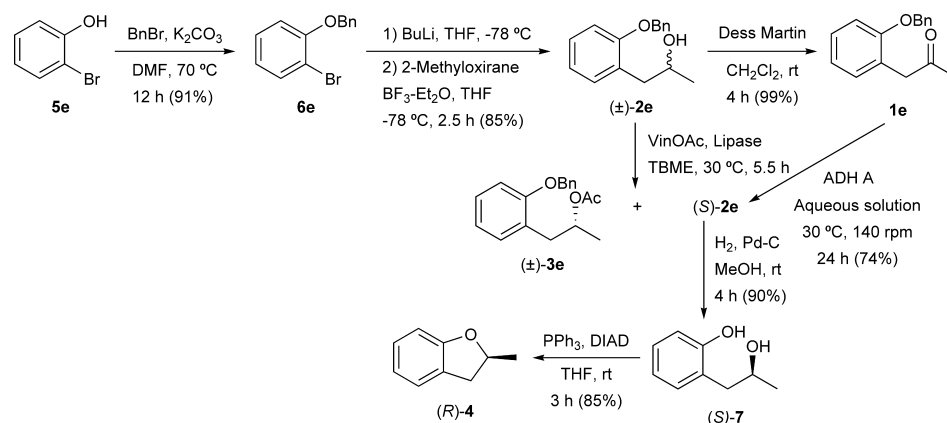
From all of the ADH tested, T, CP, RS1, and A led to the production of the (*S*)-alcohols; meanwhile, LB and PR2 allowed the isolation of the complementary (*R*)-alcohols (see also Table S4 in the Supporting Information). In general, ADH CP and ADH A acted with higher levels of stereopreference toward the formation of (*S*)-**2a–d**, observing slightly higher activity values for ADH A. Comparing both lipase-catalyzed and bioreduction processes we can conclude that meanwhile the classical kinetic resolution of alcohols (\pm)-**2a–d** allows the recovery of both alcohol and acetate of opposite configurations in good to excellent optical purities, and these biotransformations are limited to a maximum 50% isolated yield. In contrast, the bioreductions have led to the isolation of the (*S*)-alcohols in enantiopure form and quantitative yield, although any of the ADH tested has allowed the recovery of enantiopure (*R*)-alcohols up to 43% yield (see Table S4 in the Supporting Information). For all the above reasons, bioreduction and lipase-catalyzed resolutions can be considered as ideal complementary tools for the production of enantiomerically pure compounds.

To examine the synthetic possibilities of the resulting enantiopure alcohols, (*S*)-**2a–d** were reacted in different

(10) Chen, C.-S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294.

(11) Schubert, T.; Kula, M.-R.; Müller, M. *Synthesis* **1999**, 2045.

Scheme 3. Chemoenzymatic Synthesis of 2,3-Dihydrobenzofuran (*R*)-**4a** from Commercially Available 2-Bromophenol (**5e**)



conditions to obtain the corresponding (*S*)-2-methyl-2,3-dihydro-1-benzofuran (**4**).¹² It must be mentioned that for (*S*)-**2d** a previous deprotection of the methoxy group is needed for the intramolecular coupling. Unfortunately, in all the experimental conditions tested, racemization occurred in a high extension. The best results were obtained when using the brominated derivative (*S*)-**2c** and a combination of sodium hydride and copper(I) chloride in refluxing toluene, yielding a complete conversion into the desired benzofuran in 77% isolated yield without any loss of the optical purity.¹³ Unfortunately, the lack of access to valuable precursors for the preparation of substituted 1-(2-bromophenyl)propan-2-ols made us focus on an alternative synthetic route.

To overcome these limitations and try to increase the isolated yields, we move forward to the development of the synthesis and enzymatic kinetic resolution of a more versatile racemic intermediate, 1-2-(benzyloxy)phenyl-propan-2-ol (**2e**). To achieve this aim, 2-bromophenol (**5e**) was smoothly protected in the presence of benzyl bromide and potassium carbonate yielding **6e**,¹⁴ which was subsequently reacted with BuLi and 2-methyloxirane in the presence of a Lewis acid, obtaining the desired (±)-**2e** in high overall yield (Scheme 3). Two different approaches were considered for the production of enantiopure (*S*)-**2e**: (a) lipase-mediated acetylation of its free hydroxyl group, which occurred with an excellent selectivity when PSL was used as biocatalyst (the results will be analyzed later in the manuscript, see Table 3) and (b) bioreduction of ketone **1e**, obtained by chemical oxidation of alcohol **2e** using the Dess–Martin reagent, which proceeded with an excellent stereopreference with ADH A toward the production of (*S*)-**2e** in 74% yield (see Table S4 in the Supporting Information).

(12) (a) Grondon, M. F.; Stewart, D.; Watts, W. E. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, 573. (b) Saiser, S.; Smidt, S. P.; Pfaltz, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 5194. (c) Zhang, L.; Zhang, W.; Liu, J.; Hu, J. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2850.

(13) To assure that no racemization occurred during the process, the racemic furan derivative **4** was also prepared. Both optically active and racemic **4** were injected in the HPLC using a chiral column, finding clear evidence of no racemization during the process as it is shown in the Supporting Information.

(14) Thede, K.; Diedrichs, N.; Ragot, J. P. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4595.

Cleavage of the benzyl group by palladium-catalyzed hydrogenation reaction of (*S*)-**2e** in MeOH led to diol (*S*)-**7** in 92% isolated yield. Then, final intramolecular cyclization in Mitsunobu conditions¹⁵ using triphenylphosphine and diisopropyl azodicarboxylate (DIAD) allowed the recovery of the benzofuran (*R*)-**4** in enantiopure form and with good overall yield.

Table 2. Bioreduction of Ketones **1a–d** at 30 °C and 250 rpm during 24 h Using ADH CP and ADH A^a

entry	ADH	X	c (%) ^b	ee _p (%) ^c
1	CP	F	99	>99
2	A	F	99	>99
3	CP	Cl	97	>99
4	A	Cl	99	>99
5	CP	Br	92	>99
6	A	Br	99	>99
7	CP	OMe	95	>99
8	A	OMe	98	>99

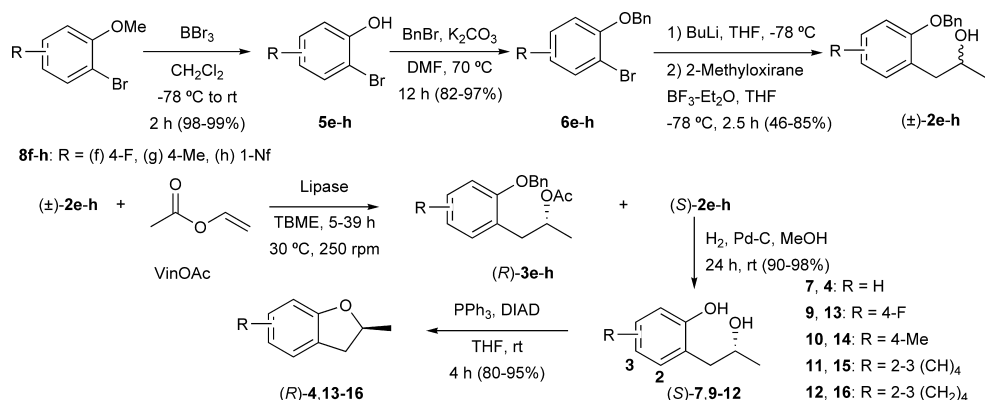
^a See Supporting Information for individual conditions. ^b Conversion value determined by GC of the reaction crude. ^c (*S*)-Alcohols **2a–d** were obtained. The ee was determined by HPLC or GC.

To examine the scope of this synthetic methodology, we decided to extend these studies toward the stereoselective preparation of a set of optically active benzofurans from conveniently substituted benzene derivatives. This general synthetic strategy has been outlined in Scheme 4 and is based on the preparation of the corresponding benzylic alcohols **2f–h** that could be enzymatically resolved and later transformed into the desired benzofurans (*R*)-**13–15**.

Initially, the starting methoxy compounds **8f–h** were chemically deprotected using boron tribromide in dichloromethane to afford phenols **5f–h** in quantitative yield, protecting next their free hydroxyl group with benzyl

(15) Prakash, G. K. S.; Do, C.; Wang, F.; Mathew, T.; Olah, G. A. *Synthesis* **2010**, 1891.

Scheme 4. Chemoenzymatic Synthesis of 2,3-Dihydrobenzofurans (*R*)-**13**–**16** from Commercially Available **8f**–**g**



bromide in the presence of potassium carbonate, to afford **6f**–**h** in good to excellent yield.¹⁶ These compounds were subsequently reacted with BuLi and 2-methyloxirane obtaining the racemic alcohols **2f**–**h** in moderate to good yields, substrates used in the subsequent lipase-mediated kinetic resolution experiments. The best results have been summarized in Table 3, and it is important to stress that in all cases alcohols (*S*)-**2e**–**h** or acetates (*R*)-**3e**–**h** have been obtained in enantiopure form by using CAL-B or PSL-C I as biocatalyst in TBME as solvent, 3 equiv of vinyl acetate as acyl donor, and 30 °C. Depending on the reactivity of each individual substrate, we have modified the amount of enzyme aiming to stop the reactions closer to 50% conversion value, yielding both substrate and product in excellent enantiomeric excesses.

PSL-C I showed an excellent selectivity toward alcohol **2e**, achieving the best stereocontrol when using a substrate:enzyme ratio of 1:0.5 to achieve in 9 h the isolation of both alcohol and acetate in up to 96% ee (entry 4). However, the introduction of substituents in the phenyl ring has led to a dramatic decrease in the reaction rate (for **2f,g**, entries 7, 8, and 11) or in the enantioselectivity (for **2h**, entry 13) shown by PSL-C I. The best results for alcohols **2f**–**h** were found with CAL-B by using a substrate:enzyme ratio of 1:0.5 for **2f,g** (entries 6 and 10); meanwhile, **2h** which possesses a more hindered substitution need longer reaction rates and higher loading of biocatalyst (entry 12).

Finally, the alcohols (*S*)-**2f**–**h** were reacted under the previously optimized reaction conditions for (*S*)-**2e**; that means palladium-catalyzed hydrogenation to remove the benzyl group affording (*S*)-**9**–**11**, which was subjected to an intramolecular cyclization reaction under Mitsunobu conditions to isolate optically active 2,3-dihydrobenzofurans (*R*)-**13**–**15** in good overall yield. It must be mentioned that at higher palladium loading the hydrogenation of the benzo-fused phenyl ring of (*S*)-**2h** was observed, leading to the formation of diol (*S*)-**12**, an adequate precursor for the synthesis of benzofuran (*S*)-**16**. Thus, a general chemoenzymatic

Table 3. Lipase-Mediated Kinetic Resolution of (±)-**2e**–**h** in TBME Using 3 equiv of VinOAc at 30 °C and 250 rpm

entry	2e – h	lipase	<i>t</i> (h)	ee _P (%) ^a	ee _S (%) ^a	<i>c</i> (%) ^b	<i>E</i> ^c
1	2e	CAL-B ^d	5.5	81	94	56	33
2	2e	CAL-B ^e	5	92	91	50	70
3	2e	PSL-C I ^d	5.5	97	81	48	176
4	2e	PSL-C I ^e	9	96	>99	50	>200
5	2f	CAL-B ^d	3	98	95	49	>200
6	2f	CAL-B ^e	5	97	>99	50	>200
7	2f	PSL-C I ^d	5	>99	25	20	>200
8	2f	PSL-C I ^e	7	>99	24	19	>200
9	2g	CAL-B ^d	15	92	>99	52	179
10	2g	CAL-B ^e	5.5	99	>99	50	>200
11	2g	PSL-C I ^d	15	99	32	24	>200
12	2h	CAL-B ^d	39	99	>99	50	>200
13	2h	PSL-C I ^d	15	97	9	9	72

^a Determined by HPLC. ^b Conversion value: $c = ee_S/(ee_S + ee_P)$. ^c $E = \ln[(1 - c) \times (1 - ee_P)]/\ln[(1 - c) \times (1 + ee_P)]$.¹⁰ ^d Ratio substrate:enzyme (1:1). ^e Ratio substrate:enzyme (1:0.5).

matic strategy has been developed for the synthesis of a wide family of 2,3-dihydrobenzofurans.

In summary, we have developed a new access to a novel family of enantiomerically pure benzofurans by means of an asymmetric enzymatic process followed by an intramolecular chemical cyclization reaction. This system here developed opens a new window of research for the synthesis of related oxygenated and nitrogenated heterocyclic compounds in a stereoselective fashion.

Acknowledgment. This work has been supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN, CTQ 2007-61126). V. G.-F. (Ramón y Cajal Program) and J. M.-S. (FPU fellowship) thank also MICINN for personal funding.

Supporting Information Available: General methods, experimental procedures, characterization data for new compounds, and copies of ¹H, ¹³C, and DEPT NMR experiments. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

(16) Spivey, A. C.; Fekner, T.; Spey, S. E.; Adams, H. J. *Org. Chem.* **1999**, *64*, 9430.

Additions and Corrections

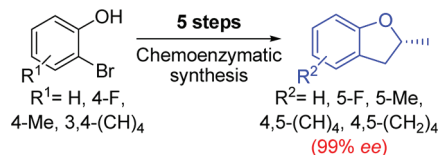
Volume 12, 2010

Juan Mangas-Sánchez, Eduardo, Busto, Vicente Gotor-Fernández,* and Vicente Gotor*

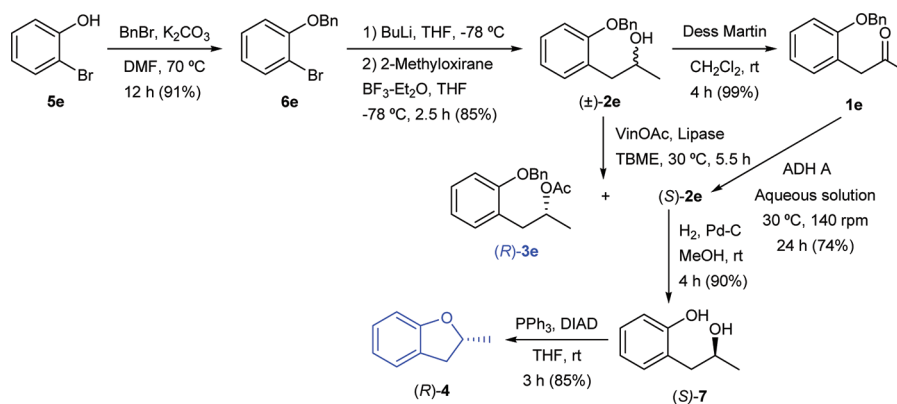
Straightforward Synthesis of Enantiopure 2,3-Dihydrobenzofurans by a Sequential Stereoselective Biotransformation and Chemical Intramolecular Cyclization

Several stereochemical configurations are incorrect in the Graphical Abstract and Schemes 3 and 4. Corrections are shown in blue.

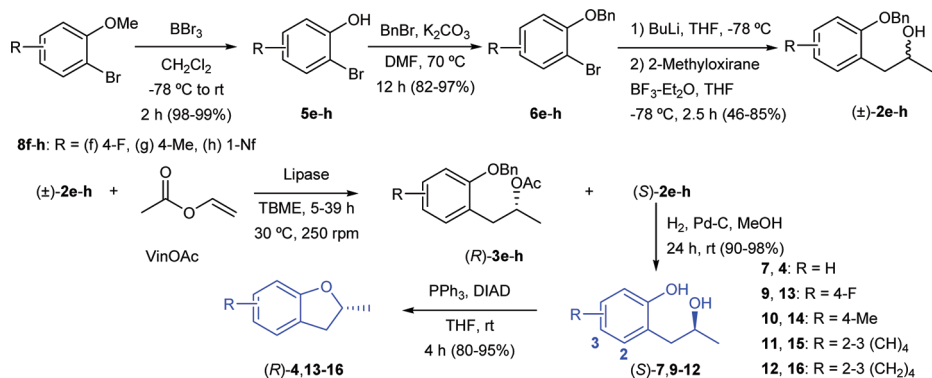
In the Graphical Abstract, the stereochemistry of the benzofuran derivative chiral center should be as follows.

In Scheme 3, previous (\pm)-**3e** should be (*R*)-**3e** and the stereochemistry of the benzofuran derivative (*R*)-**4** chiral center should be as follows.

Scheme 3



Scheme 4



In Scheme 4, the stereochemistry of alcohols (*S*)-7 and 9–12 and benzofuran derivatives (*R*)-4 and 13–16 were wrong and have been corrected.

Page 3501, bottom left column. Replace “benzofuran (*S*)-16.” with “benzofuran (*R*)-16.” in this sentence: “It must be mentioned that at higher palladium loading the hydrogenation of the benzofused phenyl ring of (*S*)-2h was observed, leading to the formation of diol (*S*)-12, an adequate precursor for the synthesis of benzofuran (*R*)-16.”

10.1021/ol202473w

Published on Web 09/28/2011

ARTICULO IV. SÍNTESIS ESTEREOSELECTIVA DE 3-METIL
ISOBENZOFURAN-1(3*H*)-ONAS MEDIANTE MÉTODOS
BIOCATALÍTICOS

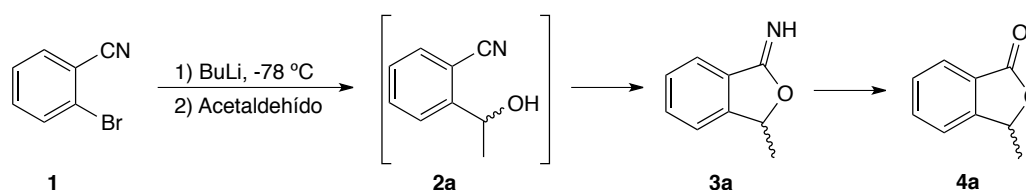
Como se ha comentado anteriormente, el esqueleto de isobenzofuranona se encuentra presente en numerosos productos naturales bioactivos que han sido utilizados tradicionalmente como fármacos y fragancias. En este trabajo de investigación, se han preparado análogos de 3-metilisobenzofuran-1(3H)-onas con buenos rendimientos y en forma enantiopura mediante una estrategia simple basada en la biorreducción asimétrica de 2-cianoacetofenonas seguida de un proceso de ciclación intramolecular. Los resultados han sido publicados en “*Highly stereoselective chemoenzymatic synthesis of the 3H-Isobenzofuran skeleton. Access to enantiopure 3-Methylphthalides*”. J. Mangas-Sánchez, E. Busto, V. Gotor-Fernández y V. Gotor. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1444-1447.

II.IV.1. Resultados y discusión

En este capítulo se describe de una manera general la preparación de 2-cianoacetofenonas a partir de ácidos 2-aminobenzoicos para, posteriormente, estudiar con detalle la reducción enzimática asimétrica de las correspondientes cetonas y preparar una familia de 3-metilisobenzofuran-1(3H)-onas en forma ópticamente activa.

II.IV.1.1. Preparación de los productos de partida y finales en forma racémica.

Teniendo en cuenta el trabajo anterior de preparación de 2,3-dihidrobenzofuranos, en un primer lugar se intentó preparar el 2-(1-hidroxietil)-benzonitrilo racémico (**2a**) y, a partir de él, estudiar la resolución cinética enzimática mediante un proceso de transesterificación catalizada por lipasas. Para ello, partiendo del 2-bromobenzonitrilo (**1**), y por reacción de trasmetalación con $n\text{BuLi}$, se formó el correspondiente organolítico, que se trató *in situ* con acetaldehído para formar el alcohol deseado. Sin embargo, debido al medio fuertemente básico que se genera en el medio de reacción, unido a la estabilidad del ciclo de 5 miembros benzofusionado, se favorece el ataque del alcóxido derivado de **2a** al grupo nitrilo, generando tras hidrólisis el correspondiente imidato racémico **3a** (Esquema II.IV.1). Este imidato es estable en condiciones anhidras formándose, en contacto con la humedad, la isobenzofuranona **4a**.

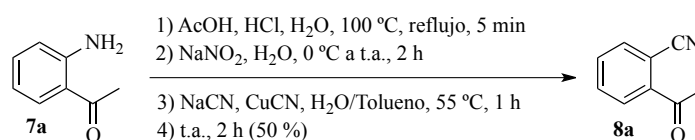


Esquema II.IV.1. Formación espontánea del imidato racémico **3a** y su posterior evolución hacia la isocromanona **4a**.

Pese a que los espectros de ^1H -RMN del imidato **3a** y de la isobenzofuranona **4a** son muy parecidos, se pueden distinguir inequívocamente las especies formadas mediante experimentos de IR. De obtener el alcohol **2a** se esperaría ver la banda del grupo nitrilo ($\sim 2225\text{ cm}^{-1}$). Sin embargo, en el producto formado no se observa dicha banda, apareciendo la correspondiente a la tensión C-N de un enlace imínico ($< 1700\text{ cm}^{-1}$). Posteriormente, tras varios días al aire, se forma la isobenzofuranona **4a**, desplazando la banda hacia la zona de

tensión del carbonilo de un éster cíclico ($\sim 1750\text{ cm}^{-1}$).

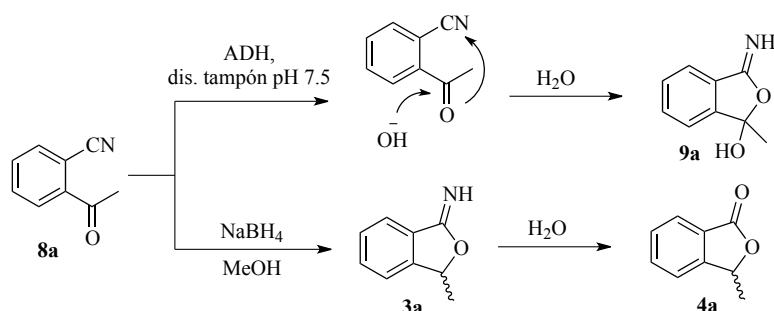
Viendo que mediante esta aproximación no era posible acceder a los productos deseados, se decidió explorar otras posibilidades. Así, partiendo de la 2-aminoacetofenona (**7a**) se puede llegar, en un solo paso, al 2-acetilbenzonitrilo (**8a**) mediante una reacción de Sandmeyer con rendimiento moderado (50%). En un primer paso, se genera la sal de diazonio con nitrito de sodio en medio ácido. Posteriormente, se produce una sustitución nucleófila radicalaria aromática en donde el Cu (I) se oxida a Cu (II), formándose un radical benceno y liberándose N_2 . A continuación el nucleófilo ataca al radical, liberándose un electrón que regenera el catalizador. En este caso, el nucleófilo es el cianuro por lo que se forma el 2-acetilbenzonitrilo correspondiente (Esquema II.IV.2).



Esquema II.IV.2. Preparación de **8a** mediante reacción de Sandmeyer a partir de la 2-aminoacetofenona comercial (**7a**).

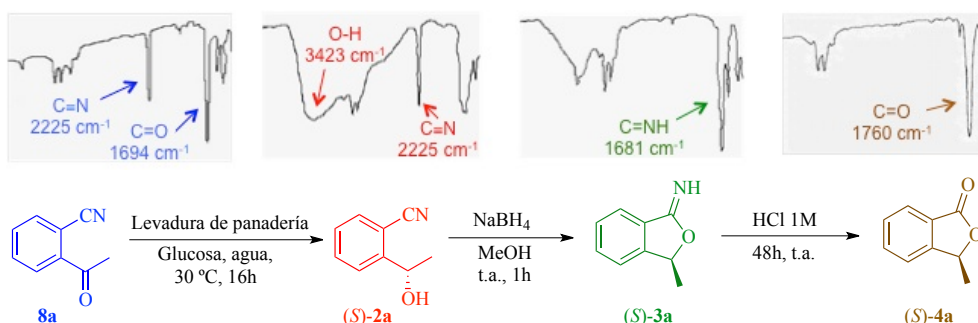
II.IV.1.2. Estudio de biorreducción.

Una vez obtenida la cetona **8a**, se llevó a cabo el estudio de biorreducción empleando distintas alcohol deshidrogenasas. Previamente, se intentó preparar el alcohol correspondiente en forma racémica mediante reducción con borohidruro de sodio pero, al igual que en el caso anterior, al formarse el alcohol en medio básico se genera espontáneamente el imidato racémico **3a** que evoluciona hacia la isobenzofuranona. Pese a no tener el producto de reducción, se estudió igualmente la biorreducción ya que, tras posterior ciclación, se podría determinar tanto la actividad como la estereoselectividad de los biocatalizadores al haber obtenido previamente las isobenzofuranonas en forma racémica. Al probar las ADHs comerciales en una disolución tampón TRIS-HCl a pH 7.5, se observó que la cetona **8a** no era estable a ese pH, formándose un producto secundario hemiacetálico cíclico **9a** correspondiente al ataque nucleófilo de un grupo hidroxilo al carbonilo seguido de un ataque nucleófilo al grupo nitrilo (Esquema II.IV.3).



Esquema II.IV.3. Productos secundarios formados en medios neutro-básicos.

Viendo que en medios neutros-básicos ni las cetonas ni los alcoholes son estables, se decidió utilizar la levadura de panadería como biocatalizador (Esquema II.IV.4). La razón reside en que la levadura, como consecuencia de su metabolismo, genera un pH ácido en el medio de reacción. Cuando se hace reaccionar **8a** en una disolución acuosa de glucosa con levadura de panadería, se observa la desaparición total del producto de partida tras 16 h, obteniéndose el alcohol (*S*)-**2a** con rendimiento cuantitativo. Cabe destacar que la reacción tiene lugar también sin añadir glucosa adicional, aunque el rendimiento que se obtiene es ligeramente inferior (83%).



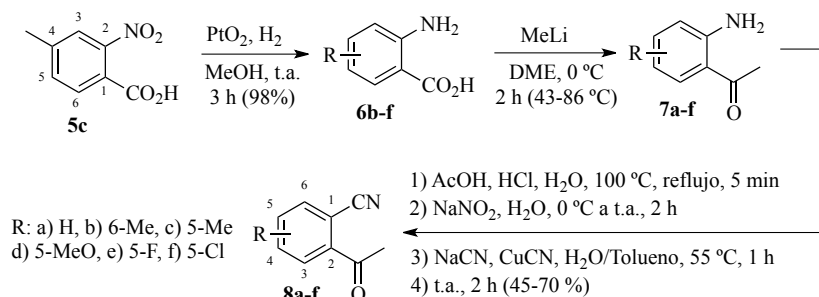
Esquema II.IV.4. Preparación de la isobenzofuranona (*S*)-**4a** a partir de la cetona **8a** mediante biorreducción usando levadura de panadería como biocatalizador. Espectros de IR de las diferentes especies implicadas.

El pH al que tiene lugar el proceso está entre 3.9-4.4 y no se detecta ningún producto secundario. Una vez obtenido el alcohol, se puede llegar al imidato (*S*)-**3a** incubándolo en un medio básico anhidro, como una disolución de borohidruro de sodio en metanol seco. Finalmente, se llega a la 3-metilisobenzofuranona (*S*)-**4a** en forma enantiopura haciendo reaccionar el imidato (*S*)-**3a** en HCl acuoso durante 48 h. Para corroborar e identificar correctamente las estructuras de los compuestos implicados se hizo un estudio de IR que aparece en el Esquema II.IV.4. El producto que se obtiene tras la desaparición del material de partida contiene una banda ancha a 2225 cm^{-1} , correspondiente con la banda de tensión de un enlace triple C-N. Tras el tratamiento con borohidruro de sodio, dicha banda desaparece y se

forma otra a 1680 cm^{-1} , que corresponde con la banda de tensión del enlace imínico. Finalmente, tras incubar en medio ácido acuoso durante 48 h se observa una sola banda a 1760 cm^{-1} , que corresponde con la banda de tensión de un carbonilo de éster cíclico, como el de la isobenzofuranona (*S*)-**4a**.

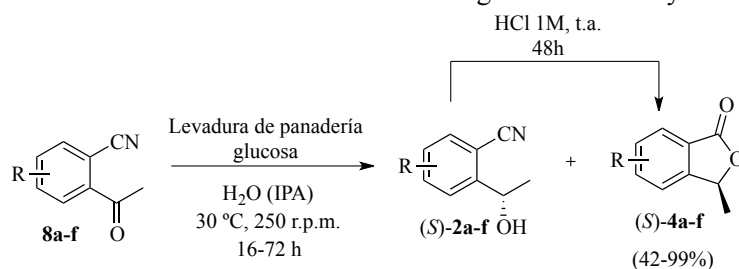
II.IV.1.3. Estudio de la generalidad del método.

Una vez conocido el proceso y optimizadas las condiciones, se intentó dar generalidad a la metodología descrita. Para ello, se partieron bien de diferentes ácidos 2-aminobenzoicos comerciales (**6b,d-f**), ó bien del ácido 2-nitro-4-metilbenzoico (**5c**) que, tras hidrogenación catalítica usando óxido de platino (IV), permitió obtener el correspondiente ácido 2-amino-4-metilbenzoico (**6c**) con rendimiento cuantitativo (Esquema IV.5). A partir de los ácidos **6b-f**, se preparan las correspondientes acetofenonas mediante alquilación con MeLi en 1,2-dimetoxietano (DME) a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, aislándose las 2-aminoacetofenonas **7b-f** con rendimientos entre moderados y buenos (43-86%). Posteriormente, al igual que en el caso de **6a**, se prepararon los correspondientes 2-acetilbenzonitrilos **8b-f** mediante sustitución del grupo amino por el grupo nitrilo a través de la reacción de Sandmeyer con rendimientos entre moderados y buenos (43-70%).



Esquema II.IV.5. Preparación de los 2-acetilbenzonitrilos **8a-f**.

A continuación, se llevó a cabo el estudio de biorreducción usando levadura de panadería como biocatalizador. Los resultados se encuentran recogidos en la Tabla II.IV.1.

Tabla II.IV.1. Resultados de la biorreducción de los 2-acetilbenzonitrilos **8a-f** usando levadura de panadería como biocatalizador en una disolución acuosa de glucosa a 30 °C y 250 r.p.m.

Entrada	Cetona	t (h)	c (%) ^a	(S)-2 (%) ^b	(S)-4 (%) ^b	(S)-4 (% ee) ^c
1	8a	16	>97	>97	<3 (99)	>99
2	8b	72	85	85	<3 (61)	99
3	8c	48	>97	88	12 (81)	>99
4	8d	67	50	---	50 (42)	>99
5	8e	54	95	45	50 (92)	>99
6	8f	48	>97	29	71 (72)	>99

^a Determinada mediante cromatografía de gases. ^b Determinado mediante ¹H-RMN sobre el crudo de reacción una vez desaparecido el material de partida. Rendimientos aislados entre paréntesis tras incubar el crudo de reacción en HCl 1M durante 48h. ^c Determinado mediante HPLC con columna de relleno quiral.

Como se puede observar, en todos los casos se obtuvieron conversiones excelentes salvo en el caso de **8d** (4-metoxilo), en el que se obtiene una conversión del 50% tras 67 h de reacción. Tras finalizar la reacción, en todos los casos se disuelve el crudo de reacción en HCl 1M durante 48 h a t.a., obteniéndose las lactonas **4a-f** con buenos rendimientos y en forma enantiopura. En cuanto a la proporción de productos que se forman, se observa diferente comportamiento dependiendo de la naturaleza del sustituyente (Gráfico II.IV.1). Cuando tenemos grupos electrodonadores débiles como en **8a** y **8b**, el alcohol formado es estable en medio ácido y es el único producto de reacción detectado. Sin embargo, si el grupo metilo está en posición 5 (**8c**) se obtiene un 12% de la lactona. En el caso de **8d**, en donde el grupo metoxilo cede mucha más densidad de carga al anillo, tan sólo se observa la formación de la lactona. En un primer lugar, se forma el alcohol que, en el medio de reacción, cicla espontáneamente. Al estar en un medio acuoso se obtiene la lactona y no el imidato correspondiente. En cuanto a **8e** y **8f** en donde los sustituyentes son grupos electrón atractores, se obtienen mezclas de ambos productos.

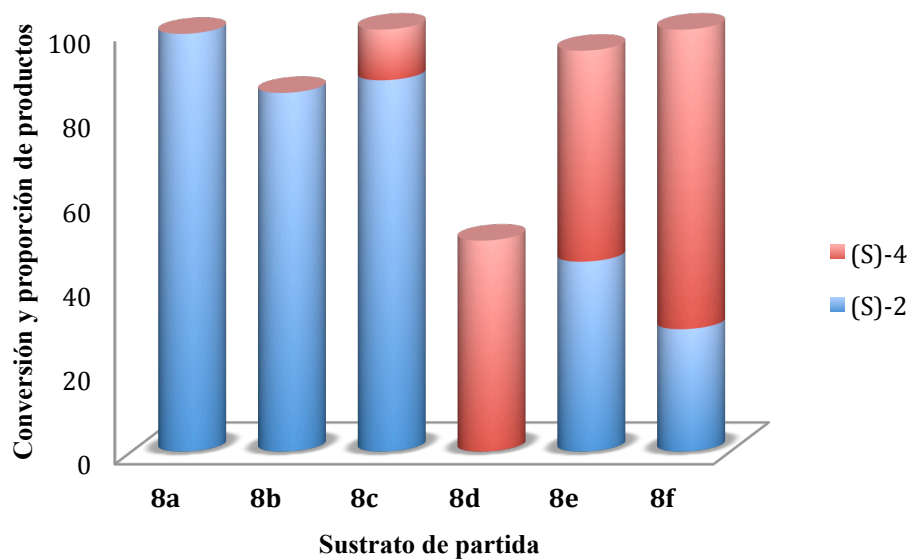


Gráfico II.IV.1. Proporción de alcohol (2, azul) e isobenzofuranona (4, rojo) en la biorreducción en función al sustrato de partida.

II.IV.2. Conclusiones.

En resumen, se ha descrito una síntesis sencilla y eficaz para la preparación de (*S*)-isobenzofuranonas en forma enantiopura a partir de ácidos nitrobenzoicos, ácidos aminobenzoicos y 2-aminoacetofenona, comercialmente accesibles, en donde el paso clave es la biorreducción estereoselectiva de 2-acetilbezocnitrilos usando levadura de panadería como biocatalizador. En todos los casos se llega a las 3-metilisobenzofuran-1(3*H*)-onas (*S*)-**4a-f** de interés con rendimientos entre moderados y excelentes (42-99%), obteniéndose éstas en forma enantiopura.

Highly Stereoselective Chemoenzymatic Synthesis of the 3*H*-Isobenzofuran Skeleton. Access to Enantiopure 3-Methylphthalides

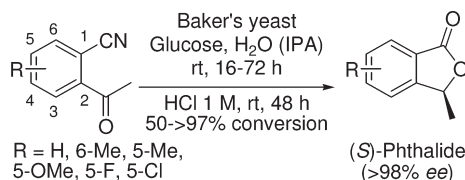
Juan Mangas-Sánchez, Eduardo Busto, Vicente Gotor-Fernández,* and Vicente Gotor*

Organic and Inorganic Department, Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, Universidad de Oviedo Calle Julián Clavería s/n, Oviedo 33006, Spain

vicgotfer@uniovi.es; vgs@uniovi.es

Received January 24, 2012

ABSTRACT



A straightforward synthesis of (*S*)-3-methylphthalides has been developed, with the key asymmetric step being the bioreduction of 2-acetylbenzonitriles. Enzymatic processes have been found to be highly dependent on the pH value, with acidic conditions being required to avoid undesired side reactions. Baker's yeast was found to be the best biocatalyst acting in a highly stereoselective fashion. The simple treatment of the reaction crudes with aqueous HCl has provided access to enantiopure (*S*)-3-methylphthalides in moderate to excellent yields.

In recent decades, the syntheses of heterocyclic compounds have attracted the attention of a vast audience of organic chemists,¹ with oxygenated and nitrogenated systems being the most common synthetic targets. In particular, phthalides, also known as 1-(3*H*)-isobenzofuranones, are five-membered ring lactones frequently found as scaffolds in basic bioactive molecules that have

traditionally been used as medicines or fragrances.² Access to racemic phthalides has been reported with high success in recent years and applied to the synthesis of more complex organic structures.³ In contrast, development of asymmetric routes remains as a highly demanding goal.⁴

Examples of metal-catalyzed transformations,⁵ chemical enantioresolutions,⁶ or organocatalytic processes have been extensively reported.⁷ Alternatively biocatalytic methods have been scarcely studied for the production of optically active 3-alkylphthalide derivatives⁸ through the selective action of oxidoreductases toward adequate intermediates such as 2'-iodoacetophenone^{8a} or methyl 2-acetylbenzoate,^{8b} while lipases have been efficiently used in the hydrolysis of esters^{8a} or the acetylation of alcohols.^{8c} Unfortunately a lack of general methods is currently

(1) *Targets in Heterocyclic Systems. Chemistry and Properties*, Vol. 10; Attanasio, O. A., Spinelli, D., Eds.; Società Chimica Italiana: Rome, 2010.

(2) Beck, J. J.; Chou, S.-C. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 891.

(3) Xiong, M. J.; Li, Z. H. *Curr. Org. Chem.* **2007**, *11*, 833.

(4) See for instance: (a) Witulski, B.; Zimmermann, A. *Synlett* **2002**, 1855. (b) Ye, Z.; Lv, G.; Wang, W.; Zhang, M.; Cheng, J. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 3671. (c) Singh, M.; Argade, N. P. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3121. (d) Lv, G.; Huang, G.; Zhang, G.; Pan, C.; Chen, F.; Cheng, J. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 4879.

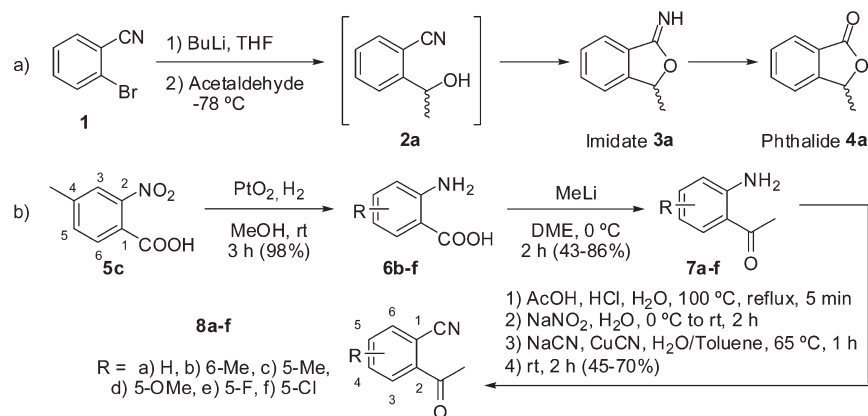
(5) See for instance: (a) Lei, J.-G.; Hong, R.; Yuan, S.-G.; Lin, G.-Q. *Synlett* **2002**, 927. (b) Tanaka, K.; Nishida, G.; Wada, A.; Noguchi, K. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 6510. (c) Chang, H.-T.; Jeganmohan, M.; Cheng, C.-H. *Chem.—Eur. J.* **2007**, *13*, 4356. (d) Chen, W.-W.; Xu, M.-H.; Lin, G.-Q. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7508. (e) Phan, D. H. T.; Kim, B.; Dong, V. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15608. (f) Zhang, B.; Xu, M.-H.; Lin, G.-Q. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4712. (g) Willis, M. C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 6026. (h) Zhang, H.; Zhang, S.; Liu, L.; Luo, G.; Duan, W.; Wang, W. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 368. (i) Zhang, Z.-B.; Lu, Y.-Q.; Duan, X.-F. *Synthesis* **2011**, 3435.

(6) Kosaka, M.; Sekiguchi, S.; Naito, J.; Uemura, M.; Kuwahara, S.; Watanabe, M.; Harada, N.; Hiroi, K. *Chirality* **2005**, *17*, 218.

(7) (a) Xing, C.-H.; Liao, Y.-X.; He, P.; Hu, Q.-S. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3010. (b) Chang, C.-W.; Chein, R.-J. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4154.

(8) (a) Izumi, T.; Itou, O.; Kodera, K. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1996**, *67*, 89. (b) Kitayama, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 3765. (c) Oguro, D.; Watanabe, H. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 777.

Scheme 1. Preparation of 3-Methylphthalide Precursors^a



^a (a) Synthesis and spontaneous intramolecular cyclization of 2-(1-hydroxyethyl)benzonitrile; (b) Chemical synthesis of 2-acetylbenzonitriles **8a–f** from the adequate precursor.

noticed. Herein we wish to report a general and straightforward chemoenzymatic asymmetric approach for the synthesis of 3-methylphthalides in enantiopure form based on the synthesis and bioreduction of substituted 2-acetylbenzonitriles.

On the basis of our previous experience in the chemoenzymatic synthesis of optically active 2,3-dihydrobenzofuranes,⁹ we decided to react 2-bromobenzonitrile (**1**) with acetaldehyde in order to develop a synthetic pathway for the preparation of 2-(1-hydroxyethyl)benzonitrile (**2a**, Scheme 1a). As previously observed by other research groups,¹⁰ the strongly basic reaction medium promoted the spontaneous intramolecular cyclization of the alcohol. The corresponding imidate **3a** was isolated as the sole product, which slowly evolved to the complete formation of the phthalide **4a** under atmospheric conditions impeding the use of enzymatic transformations. This fact was clearly demonstrated by infrared data of the nonsubstituted imidate C=NH band (around 1680 cm⁻¹) and the phthalide C=O band (around 1760 cm⁻¹). IR spectra are shown in Figure 1a. As the racemic alcohol was not accessible, an alternative synthetic approach based on the chemical preparation of ketonitriles **8a–f** and latter stereoselective reduction of the carbonyl group with alcohol dehydrogenases was designed (Scheme 1b).

2-Acetylbenzonitriles **8a–f** were prepared from commercially available 2'-aminoacetophenone (**7a**), amino acids **6b,d–f**, or 4-methyl-2-nitrobenzoic acid (**5c**) respectively. Therefore, 4-methyl-2-nitrobenzoic acid was hydrogenated in the presence of platinum(IV) oxide obtaining the amino acid **6c** in quantitative yield. Treatment of **6b–f** with a methyl lithium solution afforded

aminoacetophenones **7b–f** in moderate to good yields,¹¹ being lower when electronegative atoms were bonded to the C-4 position (OMe, F, and Cl, 43–53%).

Finally the amino ketones were converted into the desired 2-acetylbenzonitriles by Sandmeyer's reaction,¹² obtaining **8a–f** in moderate yields, attaining in 70% yield the methoxy and the chlorinated derivatives **8d,f** while the others, **8a,b,c,e**, were isolated in 45–50% yields.

With 2-acetylbenzonitrile (**8a**) selected as a model substrate, the first focus was on the development of bioreduction experiments catalyzed by a panel of commercially available alcohol dehydrogenases in Tris-HCl buffer working at their optimum pH (around 7.5), but in all cases 3-hydroxy-3-methyl-2-benzofuran-1(3*H*)-imine (**9a**) was observed as the unique final product. Product formation may be explained by the instability of the ketone at pH > 7 as outlined in Scheme 2a. First, the formation of the hemiacetal is highly favored at high pH's. Then, the intramolecular cyclization followed by the protonation of the imide anion led to the formation of the imidate **3a**. At the same time a sample of the racemic alcohol **2a** was searched for analytical purposes, so the chemical reduction of ketone **8a** was attempted with sodium borohydride (Scheme 2b). Nevertheless, the imidate **3a** was obtained as a unique product instead of the alcohol **2a** due to the instability of the alcohol at basic pH, which lately evolved to the racemic phthalide **4a** under atmospheric conditions or more rapidly with acidic catalysis.

At this point we moved forward to the use of other oxidoreductases capable of reacting at neutral or acidic pH. Among them Baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) is possibly one of the most frequently employed microorganisms in C=O or C=C bond reductions due to its easy

(9) Mangas-Sánchez, J.; Busto, E.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3498.

(10) (a) Parham, W. E.; Jones, L. D. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 1187. (b) Kobayashi, K.; Matsumoto, K.; Konishi, H. *Heterocycles* **2011**, *83*, 99.

(11) (a) Lee, J. I.; Youn, J. S. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2008**, *29*, 1853. (b) Kern, J. C.; Terefenko, E. A.; Fensome, A.; Unwalla, R.; Wrobel, J.; Cohen, J.; Zhu, Y.; Berrodin, T. J.; Yudit, M. R.; Winneker, R. C.; Zhang, Z.; Zhang, P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5015.

(12) (a) Kushner, S.; Morton, J., II; Boothe, J. H.; Williams, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 1097. (b) Radziejewski, C.; Ghosh, S.; Kaiser, E. T. *Heterocycles* **1987**, *26*, 1227. (c) Vogl, M.; Kratzer, R.; Nidetzky, B.; Brecker, L. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 5863.

(13) (a) Servi, S. *Synthesis* **1990**, *1*. (b) Csuk, R.; Glaenger, B. I. *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 49. (c) Komentani, T.; Yoshii, H.; Matsuno, R. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1996**, *1*, 45.

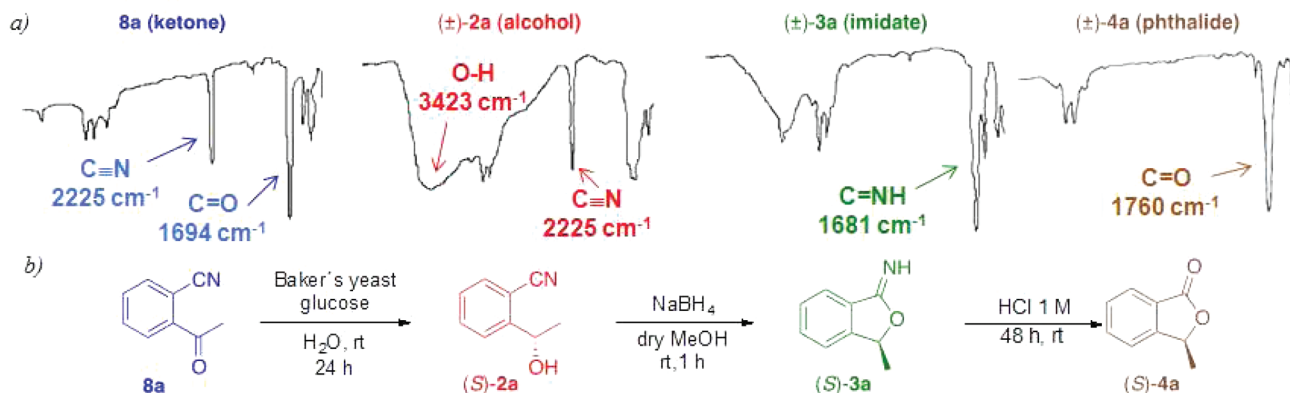
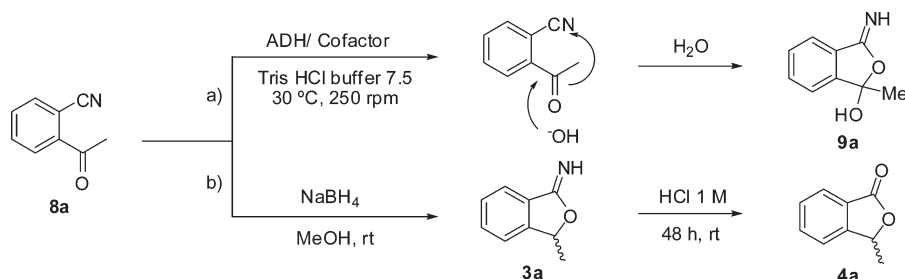


Figure 1. (a) Infrared spectra of ketone **8a** and alcohol (±)-**2a**, imidate (±)-**3a**, and phthalide (±)-**4a**. (b) Chemoenzymatic route for the preparation of (S)-**4a**.

Scheme 2. Approach for the Preparation of 3-Methyl Phthalide (**4a**)^a



^a (a) Instability of ketone **8a** at pH above 7; (b) synthesis of racemic **4a**.

handling and high availability.¹³ The bioreduction of **8a** was conducted in an aqueous medium, and the complete disappearance of the starting material was observed after 16 h, obtaining the (S)-alcohol **2a** as sole product and in quantitative yield. Then Baker's yeast was identified as a suitable biocatalyst within this context. Notably, when

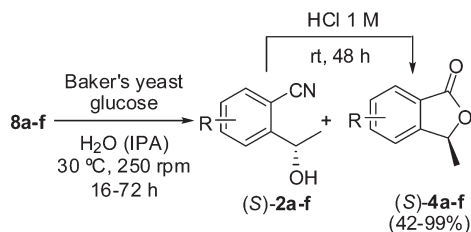
(14) *N*-Protected chiral imidates have been recently synthesized from chiral amines and later applied as ligands in asymmetric aziridination reactions or diethylzinc additions to benzaldehyde: Noël, T.; Vandyck, K.; Robeyns, K.; Van Meervelt, L.; Van der Eycken, J. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 8879.

(15) **General procedure for the synthesis of phthalides (S)-4a–f.** Baker's yeast (2.2 g) was added to a solution of glucose (282 mg) in H₂O (19 mL) with stirring of the resulting suspension for 15 min at 30 °C and 250 rpm. After this time the corresponding ketone **8a–f** (0.29 mmol) was added (dissolved in 453 μL of IPA for **8d**), and the suspension stirred for the required time (see Table 1). Then the reaction was centrifuged, and the supernatant was extracted with Et₂O (3 × 20 mL). Organic phases were combined, dried over Na₂SO₄, and filtered, and the solvent was evaporated under reduced pressure affording a reaction crude containing a mixture of alcohol (S)-**2a–f** and phthalide (S)-**4a–f**. The reaction crude was dissolved in HCl 1 M (2.0 mL), and the solution was stirred at room temperature for 48 h. After this time the solution was extracted with CH₂Cl₂ (3 × 5 mL). Organic layers were combined, dried over Na₂SO₄, and filtered, and the solvent was evaporated by distillation under reduced pressure. Finally the reaction crude was purified by flash chromatography (30% EtOAc/hexane) affording the corresponding enantiomerically pure phthalides (S)-**4a–f** (42–98%).

the reaction was carried out in the absence of glucose, the alcohol was also obtained although in lower isolated yield (83%). Undesired products were not detected in any case as the bioreduction occurs at the pH range 3.9–4.4 due to the Baker's yeast metabolism. The treatment of (S)-**2a** with NaBH₄ afforded the enantiopure imidate (S)-**3a**, a very interesting compound with potential applications in asymmetric catalysis.¹⁴ Subsequently the imidate was transformed into the phthalide in the presence of hydrochloric acid during 48 h at room temperature. In this manner the (S)-phthalide **4a** was finally isolated in quantitative yield and in enantiopure form. The complete reaction pathway is represented in Figure 1b together with the IR spectrum of each of the species involved in the sequential strategy.

Once the best experimental conditions were found, we decided to explore the bioreduction of other 2-acetylbenzonitriles **8b–f** previously synthesized following the strategy showed in Scheme 1. For this study 5- and 6-substituted derivatives were considered due to the commercial availability of amino acids **6b,d–f** and benzoic acid **5c**. Satisfyingly, a similar reactivity compared to that with **8a** (Table 1, entry 1) was observed for the 6-methyl

Table 1. Enzymatic Reduction of Ketones **8a–f** Using Baker's Yeast in H₂O at 30 °C and 250 rpm for the Asymmetric Synthesis of Enantiopure Phthalides (*S*)-**4a–f**¹⁵



entry	ketone	<i>t</i> (h)	<i>c</i> (%) ^a	(<i>S</i>)- 2 (%) ^b	(<i>S</i>)- 4 (%) ^b	(<i>S</i>)- 4 (% <i>ee</i>) ^c
1	8a (H)	16	>97	>97	<3 (99)	>99
2	8b (6-Me)	72	85	85	<3 (61)	99
3	8c (5-Me)	48	>97	88	12 (81)	>99
4 ^d	8d (5-OMe)	67	50	–	50 (42)	>99
5	8e (5-F)	54	95	45	50 (92)	>99
6	8f (5-Cl)	48	>97	29	71 (72)	>99

^a Conversion value of the reaction related to the disappearance of starting material and the formation of alcohol and phthalide (unique reaction products). ^b Ratio of alcohol and phthalide calculated by ¹H NMR of the reaction crude. Isolated yields of phthalides in brackets after acidic treatment. ^c Enantiomeric excess determined by HPLC. ^d 2-Propanol (IPA, 453 μL) used to dissolve the starting ketone (0.29 mmol).

substituted ketone **8b**, yielding preferentially the alcohol although with a lower reaction rate (entry 2).

Different trends were observed for the 5-substituted derivatives in terms of alcohol/phthalide ratio although in all cases phthalides (*S*)-**4c–f** were obtained in enantiopure form. Weak electron-donating groups led preferen-

(16) (a) Optical rotation power obtained for (*S*)-**4a**: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -39.5$ (*c* 1, CHCl₃) (>99% *ee*). Described $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -42.1$ (*c* 0.95, CHCl₃) in ref 5f. (b) Optical rotation power obtained for (*S*)-**4c**: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -36.0$ (*c* 1, CHCl₃) (>99% *ee*). Described $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -35.0$ (*c* 1, CHCl₃) in ref 5e. (c) Optical rotation power obtained for (*S*)-**4f**: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -33.7$ (*c* 1, CHCl₃) (>99% *ee*). Described $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -36.1$ (*c* 0.3, CHCl₃) in ref 5e.

tially to the formation of the alcohol (entry 3), while strong electron-donating groups as the 5-methoxy group (entry 4) favored the formation of the phthalide although with moderate yields due to the low solubility of the ketone in water. On the other hand weak electron-withdrawing groups such as fluoride or chloride led to the isolation of mixtures, where the formation of phthalides was slightly favored (entries 5 and 6). The (*S*)-stereochemistry for the phthalide chiral center was assigned in accordance with the data already reported in the literature.¹⁶

In summary a straightforward synthesis of (*S*)-3-methylphthalides has been designed from commercially available nitro acids, amino acids, or amino ketones where the key step is the bioreduction of 2-acetylbenzotrioles in a highly stereoselective fashion. Baker's yeast was found to be the optimal biocatalyst displaying excellent degrees of activity and stereoselectivity, fulfilling the prerequisites to act at acidic pH's toward these panels of substrates. Different treatments of the reaction crudes enable the production of highly valuable compounds in enantiopure form, such as the alcohol (*S*)-**2a**, the imidate (*S*)-**3a**, or the phthalides (*S*)-**4a–f**, the last ones being isolated in moderate to excellent yields depending on the ring pattern substitution.

Acknowledgment. Financial support of this work by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) through CTQ 2007-61126 projects is gratefully acknowledged. V.G.-F. thanks MICINN for a postdoctoral grant (Ramón y Cajal Program). J.M.-S. thanks MICINN for a predoctoral fellowship (FPU Program).

Supporting Information Available. General methods, experimental procedures, characterization data for new compounds, and copies of ¹H, ¹³C, and DEPT NMR experiments. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

The authors declare no competing financial interest.

ARTÍCULO V. PREPARACIÓN DIVERGENTE
QUIMIOENZIMÁTICA DE 3-METIL-1,2,3,4-
TETRAHIDROISOQUINOLINAS Y 3,4-
DIHIDROISOCUMARINAS EN FORMA ENANTIOPURA

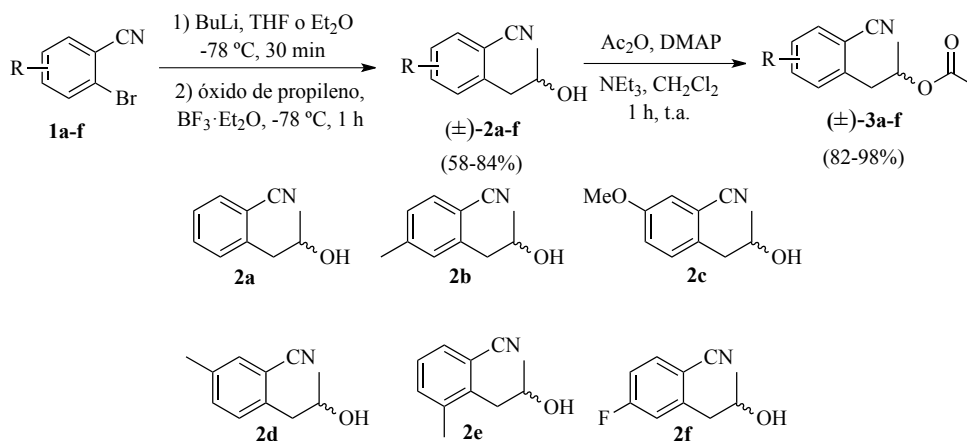
Basándonos en los resultados obtenidos en anteriores trabajos de investigación con derivados de 1-aril-2-propanol, y en la experiencia de nuestro grupo de investigación en la obtención de alcoholes ópticamente activos, nos planteamos la preparación de diferentes alcoholes y cetonas susceptibles de ser, o bien resueltos o bien reducidos estereoselectivamente, para desarrollar, a partir de ellos, una síntesis divergente de dos familias de compuestos como son las 3,4-dihidroisocumarinas y las 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolinas en forma enantiopura. Los resultados de este trabajo de investigación se encuentran recogidos en “*Enantiopure 3-methyl-3,4-dihydroisocoumarins and 3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines via chemoenzymatic asymmetric transformations*”. J. Mangas-Sánchez, E. Busto, V. Gotor-Fernández y V. Gotor. *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2*, 1590-1595.

II.V.1. Resultados y discusión.

En este capítulo se describe la preparación de dos familias de compuestos diferentes como son las 3,4-dihidroisocumarinas y las 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolinas. Para ello, se ha desarrollado una síntesis quimioenzimática eficaz partiendo de diferentes 2-bromobenzonitrilos accesibles comercialmente. Tras preparar los correspondientes 2-(2-hidroxiopropil)benzonitrilos y 2-(2-oxopropil)benzonitrilos, se llevaron a cabo procesos de resolución cinética y reducción estereoselectiva con diferentes biocatalizadores para llegar, tras varios pasos de reacción posteriores, a los compuestos de interés en forma enantiopura.

II.V.1.1. Preparación de los productos racémicos.

En primer lugar, se prepararon los 2-(2-hidroxiopropil)benzonitrilos racémicos **2a-f** para estudiar el proceso de resolución cinética clásica catalizado por lipasas. Así, partiendo de diferentes 2-bromobenzonitrilos **1a-f** comerciales se accede a los alcoholes **2a-f** racémicos mediante un paso de trasmetalación con ⁿBuLi y posterior apertura nucleófila del óxido de propileno, usando trifluoroeterato de boro como ácido de Lewis (Esquema II.V.1).



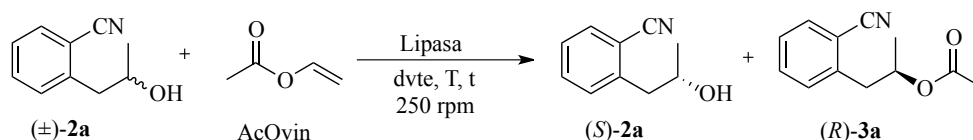
Esquema II.V.1. Preparación de los alcoholes y ésteres racémicos.

En todos los casos el disolvente elegido fue el THF, observándose la formación de los alcoholes con rendimientos de moderados a altos (58-84%). Sin embargo, en el caso del derivado fluorado **1f**, se obtuvo una mezcla de productos en donde se aisló de forma mayoritaria el producto de alquilación en el carbono 3 del anillo. Esto se debe a la acidez del H situado entre el F y el Br que hace que sea más favorable la alquilación que el intercambio

Br-Li.¹¹⁵ Cuando se utilizó dietiléter como disolvente, disminuyen los problemas de autometalación y se obtuvo como producto mayoritario el alcohol **2f**. A continuación, se prepararon los correspondientes ésteres racémicos (\pm)-**3a-f** para poder seguir el curso estereoquímico de la reacción por reacción de (\pm)-**2a-f** con anhídrido acético, trietilamina, *N,N*-dimetilaminopiridina y diclorometano como disolvente con rendimientos muy buenos en todos los casos (82-98%). Las condiciones de separación cromatográfica para llevar a cabo el seguimiento estereoquímico de las reacciones se encuentra en la parte suplementaria.

II.V.1.2. Resolución cinética clásica de los alcoholes (\pm)-**2a-f**.

A continuación, se procedió al estudio de resolución cinética utilizando el alcohol **2a** como sustrato modelo. Para ello, se realizó un estudio preliminar con diferentes lipasas a 30 °C y con 3 equivalentes de acetato de vinilo como agente de acilación (Esquema II.V.2).



Esquema II.V.2. Resolución cinética catalizada por lipasas del sustrato modelo **2a**

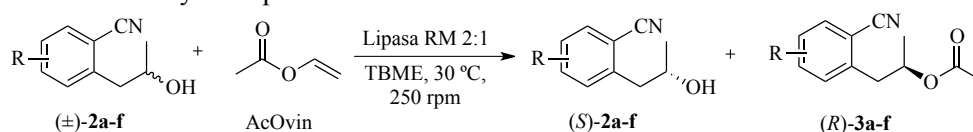
Las lipasas de *Candida cylindracea* (CCL), de páncreas porcino (PPL), de *Pseudomonas fluorescens* (AK), lipasa de *Thermomyces lanuginosa* (TLL) y la alcalasa de CLEA mostraron bajas conversiones y valores de enantiodiscriminación bajos. Por otro lado, las lipasas de *Candida antarctica* de tipo A y B (CAL-A y CAL-B) así como la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PSL-IM), mostraron buenas actividades pero enantioselectividades bajas ($E < 20$). Sin embargo, la lipasa de *Rhizomucor miehei* (RML IM) condujo a excelentes enantioselectividades, por lo que se procedió a la optimización del proceso con este biocatalizador. Se probaron diferentes cargas de enzima así como temperaturas y disolventes diferentes, obteniéndose los mejores resultados cuando se utilizó una relación enzima: sustrato 2:1 a 30 °C en TBME como disolvente (entrada 1, Tabla II.V.1). En estas condiciones, se aisló tanto producto como sustrato con un 96% de *ee* tras 8 h.

Posteriormente, se amplió el estudio al resto de sustratos utilizando estas mismas condiciones. En todos los casos se pudieron aislar los correspondientes acetatos con unos *ee* muy buenos

¹¹⁵ P. L. Coe, A. J. Waring, T. D. Yarwood. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, 2729-2737.

(92-99%) aunque tan sólo para **2a** y para los derivados con sustitución en la posición 4 (**2b,f**) se obtuvieron altas enantioselectividades (entradas 1, 2 y 6). En el caso de los derivados con sustitución en 5 (**2c,d**), se obtuvieron selectividades moderadas (entradas 3 y 4) y, finalmente, con el derivado 3-sustituido **2e** se obtiene una conversión y una selectividad mucho más bajas debido principalmente a motivos estéricos ya que el grupo metilo se encuentra muy cerca del centro reactivo (entrada 5).

Tabla II.V.1. Estudio de resolución cinética de **2a-f** catalizado por la lipasa de *Rhizomucor miehei* (RML IM) en una relación enzima:sustrato 2:1, usando TBME como disolvente, 3 equivalentes de acetato de vinilo a 30°C y 250 rpm.



Entrada	Alcohol	t (h)	ee_s (%) ^a	ee_p (%) ^a	c (%) ^b	E^c
1	2a	8	96	96	50	194
2	2b	8	99	96	51	>200
3	2c	24	80	92	47	59
4	2d	9	61	95	39	73
5	2e	9	20	94	17	39
6	2f	24	57	99	37	>200

^a Determinado mediante HPLC con columna de relleno quiral. ^b $c = ee_s/(ee_s+ee_p)$. ^c $E = \ln[(1-c) \times (1-ee_s)] / \ln[(1-c) \times (1+ee_p)]$.

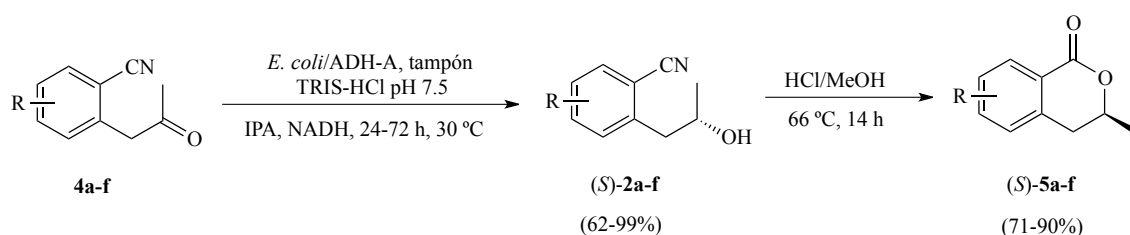
II.V.1.3. Estudio de biorreducción de las cetonas **4a-f** y preparación de las dihidroisocumarinas en forma enantiopura

Una vez estudiado el proceso de resolución cinética, se decidió explorar el potencial que presentan las ADHs en la biorreducción de las correspondientes cetonas. Para ello, se oxidaron los alcoholes **2a-f** con el reactivo de Dess-Martin en diclorometano a temperatura ambiente. Tras 4 h de reacción se aíslan las cetonas correspondientes **4a-f** con buenos rendimientos en todos los casos (70-81%).

A continuación, se llevó a cabo el estudio de biorreducción usando como modelo la cetona **4a**. Para ello se usaron las ADH de *Rhodococcus ruber* (ADH-A), tanto la proteína pura comercial como el enzima sobreexpresado en *E. coli*, *Candida parapsilosis* (ADH-CP), *Lactobacillus kefir* (ADH-LK) y la levadura de panadería. En todos los casos se obtuvieron ee

excelentes y, exceptuando la LK, se obtuvieron conversiones casi totales.

Atendiendo a razones de disponibilidad de la proteína, la extensión a otros sustratos y los posteriores escalados, se llevaron a cabo usando la ADH-A sobreexpresada en *E. coli* (*E. coli*/ADH-A). Para las cetonas **4b-f** se obtienen al igual que en el caso de **4a** todos los alcoholes de configuración (*S*) en forma enantiopura y con conversiones totales salvo en el caso de **4e**, que al igual que ocurría en la resolución cinética el grupo metilo en posición contigua al centro reactivo hace que la reactividad sea mucho más baja atendiendo a razones estéricas.



Esquema II.V.3. Biorreducción y ciclación intramolecular para la formación de las 3-metil-3,4-dihidroisocumarinas (*S*)-**5a-f** en forma enantiopura.

Finalmente, las biorreducciones se llevaron a una escala de 80 mg y, tras 24 h para las cetonas **4a-d,f** y de 72 h para el caso de **4e**, se obtienen, con conversión total y rendimientos aislados entre buenos y excelentes tras purificación (62-99%), los alcoholes (*S*)-**2a-f** en forma enantiopura (Tabla II.V.2).

Tabla II.V.2. Resultados obtenidos en el escalado a 80 mg de la biorreducción de las cetonas **4a-f** usando ADH-A sobreexpresada en *E. coli* como biocatalizador en un tampón TRIS-HCl, NADH 1 mM como cofactor e IPA como cosustrato.

Entrada	Cetona	t (h)	ee_p (%) ^a	c (%) ^b	Rdto (%) ^c
1	4a	24	>99	>97	99
2	4b	24	>99	>97	93
3	4c	24	>99	>97	99
4	4d	24	>99	>97	82
5	4e	72	>99	>97	62
6	4f	24	>99	>97	77

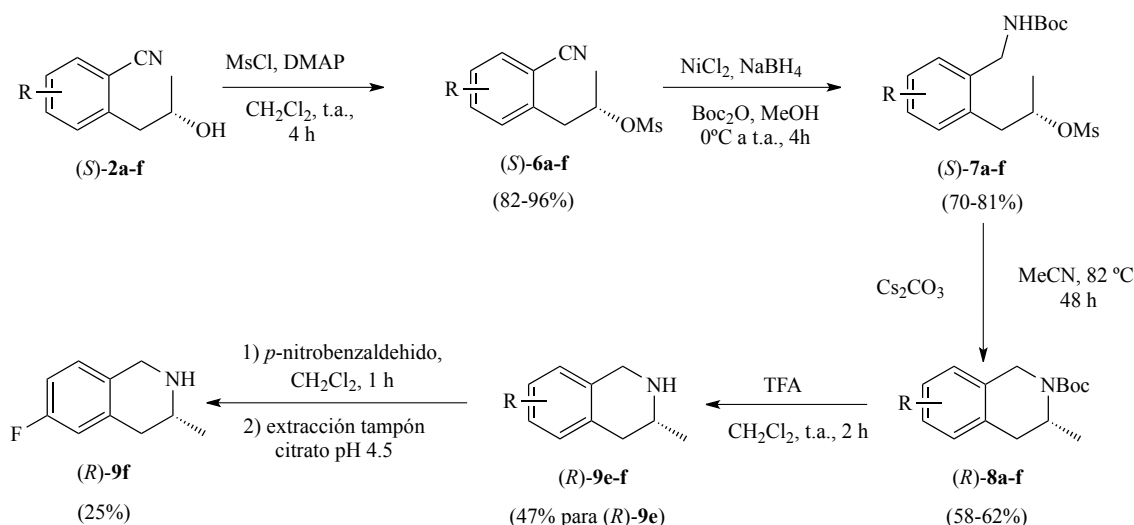
^a Determinado mediante HPLC con columna de relleno quiral. ^b Determinado mediante cromatografía de gases. ^c Rendimientos aislados.

Finalmente, tras ciclación intramolecular en una mezcla 1:1 HCl:MeOH a 66 °C se obtienen las 3-metil-3,4-dihidroisocumarinas (*S*)-**5a-f** sin pérdida de la pureza óptica con rendimientos

entre buenos y excelentes (65-90%).

II.V.1.4. Preparación de las 1,2,3,4-tetrahidroisocumarinas en forma enantiopura

Una vez preparadas las lactonas y debido a la doble funcionalidad presente en los alcoholes **2a-f**, se procedió a la síntesis de las 3-metil-1,2,3,4-tetrahidroisocumarinas (Esquema II.V.4).



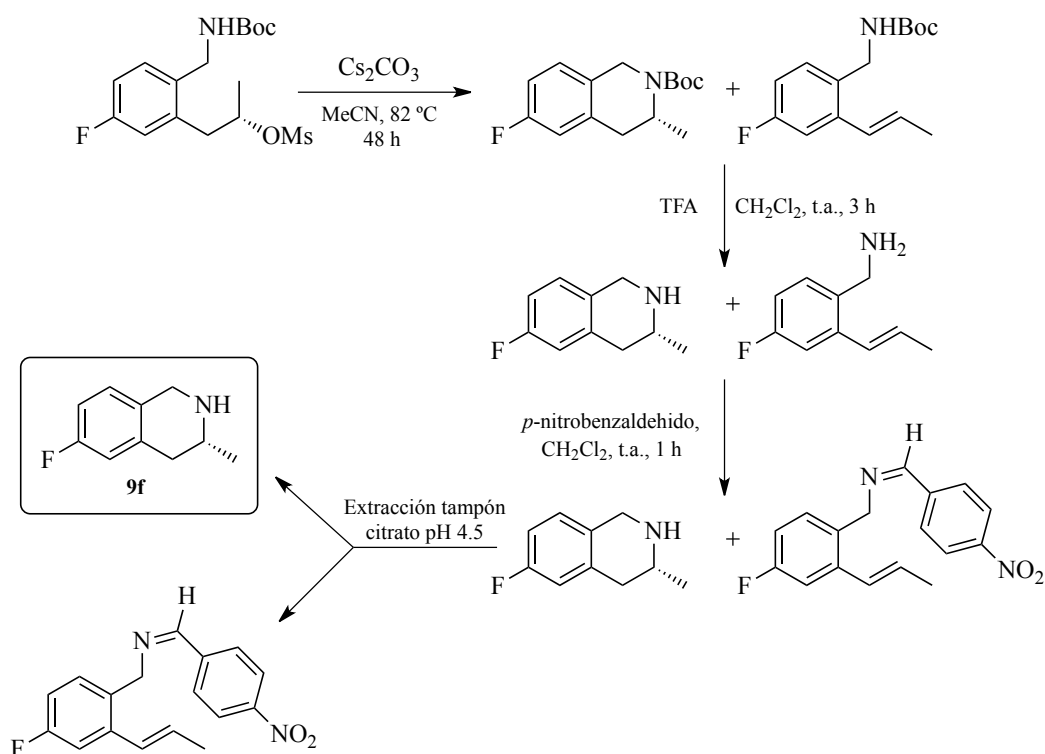
Esquema II.V.4. Preparación de 3-metil-1,2,3,4-tetrahidroisocumarinas en forma enantiopura a partir de **(S)-2a-f**.

En un primer lugar, se llevó a cabo la mesilación del grupo alcohol con el objetivo de aumentar el carácter de buen grupo saliente y favorecer posteriormente la ciclación intramolecular. De este modo, se prepararon los mesilatos **(S)-6a-f** con rendimientos muy buenos (82-96%) tras cromatografía de columna usando cloruro de metanosulfonato, trietilamina como base y *N,N*-dimetilaminopiridina en diclorometano a temperatura ambiente.

A continuación, se llevó a cabo la reducción del grupo nitrilo. En un primer lugar se probó la hidrogenación catalítica usando Pd/C y 4 atm de H₂ pero no se observó nada del producto de reacción. Cuando sobre esas mismas condiciones se hidrogena el benzonitrilo se obtiene la correspondiente amina con total conversión por lo que de algún modo el grupo mesilo envenena el catalizador y la reacción no tiene lugar. Por ello, se optó por generar *in situ* un hidruro mixto de níquel y boro añadiendo cloruro de níquel (II) hexahidratado sobre una disolución de **(S)-6a-f** con borohidruro de sodio en metanol seco. Además, se añade al medio

pirocarbonato de di-*tert*-butilo (Boc_2O) para proteger la amina que se va formando.¹¹⁶ De esta forma, se obtienen las correspondientes aminas protegidas (*S*)-**7a-f** en forma enantiopura con buenos rendimientos aislados tras cromatografía de columna (70-82%).

Finalmente, mediante reacción de sustitución nucleófila intramolecular en acetonitrilo a 82 °C usando carbonato de cesio como base, se llega a las correspondientes 3-metil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolinas (*R*)-**8a-f** sin pérdida de la pureza óptica. Sin embargo, (*R*)-**9e-f** resultaron ser aminas inestables en gel de sílice por lo que se tuvo que desproteger la correspondiente amina con ácido trifluoroacético. En el caso de (*R*)-**9e** fue suficiente y se pudo aislar tras cromatografía de columna con un 47% de rendimiento aislado, sin embargo, en el caso de (*R*)-**9f**, no se pudo obtener. Debido a que el producto secundario que se forma en la ciclación es el correspondiente a la reacción de eliminación del grupo mesilo, añadiendo al medio de reacción *p*-nitrobenzaldehído, se forma la imina con el producto de eliminación ya que es la única amina primaria del medio (Esquema II.V.5). Posteriormente se realiza una extracción con un tampón de citrato de sodio a pH 4.5 y se pueden separar los dos productos, obteniéndose (*R*)-**9f** con un rendimiento aislado del 25%.



Esquema II.V.5. Purificación de **9f** basado en la formación de una imina en el medio de reacción y posterior extracción en una disolución tampón.

¹¹⁶ S. Caddick, D. B. Judd, A. K. K. Lewis, M. T. Reich, M. R. V. Williams. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5417-5423.

II.V.2. Conclusiones

Como conclusiones a este capítulo se puede decir que se ha desarrollado un síntesis quimioenzimática divergente de 3-metil-3,4-dihidroisocumarinas y 3-metil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolinas a partir de 2-(2-hidroxiopropil)benzonitrilos **2a-f** que se han preparado con buenos rendimientos y en forma enantiopura a partir de las correspondientes cetonas. La ADH-A de *Rhodococcus ruber* sobreexpresada en *E. coli* ha mostrado ser el biocatalizador más adecuado para la preparación de estos alcoholes a partir de los cuales, mediante reacciones de modificación de grupos funcionales y reacciones de ciclación intramolecular sencillas, se ha podido acceder a dihidroisocumarinas y tetrahidroisoquinolinas en forma enantiopura.

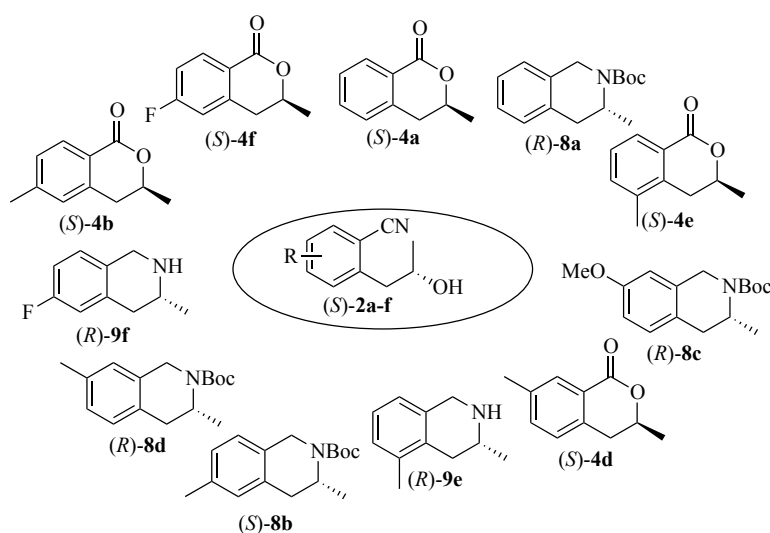


Figura II.V.1. Dihidroisocumarinas y tetrahidroisoquinolinas preparadas a partir de los alcoholes (S)-2a-f

Enantiopure 3-methyl-3,4-dihydroisocoumarins and 3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines *via* chemoenzymatic asymmetric transformations†

Juan Mangas-Sánchez, Eduardo Busto, Vicente Gotor-Fernández* and Vicente Gotor*

Received 14th February 2012, Accepted 20th April 2012

DOI: 10.1039/c2cy20152f

A new divergent and asymmetric synthetic route has been developed for the production of enantiomerically pure isocoumarin and isoquinoline derivatives. Stereoselective formation of 2-(2-hydroxypropyl)benzotrioles has been identified as the key step. *Rhizomucor miehei* lipase has displayed from moderate to excellent selectivities in the acetylation of its (*R*)-enantiomers, while ADH-A from *Rhodococcus ruber* catalyzed the bioreduction of the corresponding ketones with excellent activities and stereopreferences. Enantiopure alcohols obtained in this manner have been used for the straightforward synthesis of a series of 3-methyl-3,4-dihydroisocoumarins and 3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines with good overall yields.

Introduction

The development of new strategies in heterocyclic chemistry continues to be an attractive and challenging task for synthetic chemists. In this context, the preparation of 3,4-dihydroisocoumarins has been gathering increasing attention in recent years because of their structural implications as basic scaffolds in alkaloids and many natural products¹ that exhibit a broad range of biological activities. Both non-asymmetric and stereoselective methods for the preparation of this family of oxygenated compounds have been extensively reported in recent years.² In addition, dihydroisocoumarins are a class of naturally occurring biologically active lactones possessing remarkable antibacterial, anticancer, antifungal or antimalarial properties.³ Asymmetric synthesis and isolation from plant extracts of 3-substituted-3,4-dihydroisocoumarins have particularly attracted attention.⁴ However, only a few chemoenzymatic routes have been reported until now, among which biocatalytic methods for the preparation of 3-methyl-3,4-dihydroisocoumarins only include chemoenzymatic pathways involving ketone transformations such as Baeyer–Villiger oxidations⁵ or bioreduction processes.⁶

Here we describe for the first time a divergent synthetic approach for the production of 3-methyl-3,4-dihydroisocoumarins and 3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines starting from readily commercially available 2-bromobenzonitriles.

The asymmetric actions of several lipases and alcohol dehydrogenases (ADHs) have been considered in the search for the optimal production of enantiopure 2-(2-hydroxypropyl)benzotrioles, which have shown an excellent versatility as key intermediates for the preparation of the target molecules.

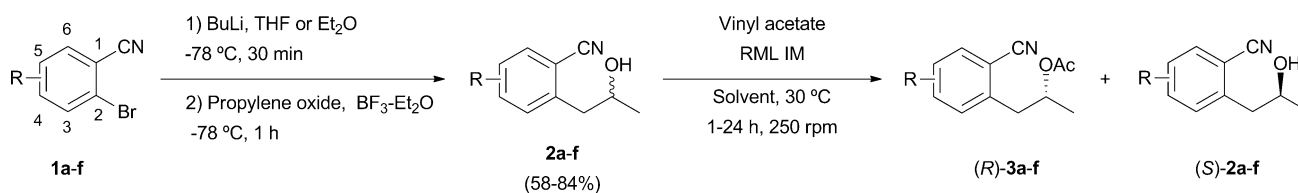
Results and discussion

Hydrolase-catalyzed kinetic resolution⁷ and dynamic kinetic resolution⁸ of racemic 1-phenylpropan-2-ols have been widely reported through acylation processes using a variety of acyl donors and biocatalysts. In spite of the fact that lipases act with a different degree of selectivity in the resolution of 1-phenylpropan-2-ols,⁹ their action towards 2-(2-hydroxypropyl)benzotrioles still remains unexplored. The reaction of commercially available 2-bromobenzonitrile (**1a**) with a solution of butyl lithium in THF as solvent, followed by the addition of propylene oxide in the presence of boron trifluoride etherate, afforded racemic 2-(2-hydroxypropyl)benzotriole (**2a**) in 71% yield (Scheme 1).

The lipase-catalyzed kinetic resolution of (\pm)-**2a** was then analyzed using 3 equiv. of vinyl acetate and variable biocatalyst loadings and solvents at 30 °C. *Candida cylindracea* lipase (CCL), porcine pancreas lipase (PPL), lipase AK from *Pseudomonas fluorescens*, *Thermomyces lanuginosa* lipase (TLL) and alcalase CLEA all displayed very low conversions and poor enantio-discrimination values, while *Candida antarctica* lipase type A (CAL-A), *Candida antarctica* lipase type B (CAL-B) and *Burkholderia cepacia* lipase (PSL-IM) led to higher reactivities, with close to 50% conversion, but very poor selectivities ($E < 20$). However, the use of *Rhizomucor miehei* lipase (RML IM) as a biocatalyst led to excellent enantioselectivities ($E > 150$) at different temperatures and variable protein loadings (Table 1, entries 1–3). Optimal results were found when using a substrate:enzyme ratio

Universidad de Oviedo, Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, Avenida Julián de Clavería 8, Oviedo 33006, Spain.
E-mail: vicgotfer@uniovi.es, vgs@uniovi.es; Fax: +34 985103451;
Tel: +34 985103448

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c2cy20152f



Scheme 1 Chemical synthesis and kinetic resolution of racemic alcohols **2a-f** using *Rhizomucor miehei* lipase.

of 1:2 at 30 °C, with both substrate and product being recovered in 96% ee after 8 h (entry 3). Similar results in terms of excellent selectivities were achieved with other solvents, such as 1,4-dioxane, THF, toluene or vinyl acetate as both solvent and acyl donor, although with a lower reactivity (entries 4–7).

To examine the scope of RML IM lipase, the kinetic resolution of the substituted benzene derivatives **2b-f** was studied. Racemic alcohols **2b-e** were prepared in moderate to high yields using an identical synthetic approach. However, for the 4-fluorinated derivative **1f**, 2-bromo-4-fluoro-3-(2-hydroxypropyl) benzonitrile was isolated as the unique reaction product due to the fluorine promoted metallation at the C3-position.¹¹ The use of Et₂O instead of THF as reaction medium led to the bromine–lithium exchange, the desired alcohol **2f** being obtained in 73% isolated yield. Lipase-catalyzed acetylation led to the production of all the acetates (*R*)-**3b-f** in a range between 92 and 99% ee using TBME as solvent (entries 8–12). However only non-substituted alcohol **2a** (entry 3, *E* = 194) and 4-substituted **2b,f** (*E* > 200, entries 8 and 12) were acetylated with very good to excellent enantioselectivities. On the other hand, the 5-substituted **2c,d** (entries 9 and 10) and the 3-methylated substrate **2e** (entry 11) led to moderate selectivities, the reaction rate being much lower for **2e**, which poses the substitution closer to the reacting centre.

In order to improve the synthetic access to enantiopure precursors of 3-methyl-3,4-dihydroisocoumarins, and motivated by the high potential shown by redox enzymes in the bioreduction of 1-aryl-2-propanones,¹² we decided to explore the potential of alcohol dehydrogenases for the production of enantioenriched **2a-f**. To do this, racemic alcohols **2a-f** were chemically oxidized, the bioreduction of the ketones **4a-f** obtained in this way was then studied. The Dess–Martin reagent was chosen to perform the chemical oxidations due to the mild conditions required, affording **4a-f** in good yields (Scheme 2).

A series of ADHs were tested for the bioreduction of **4a**, including alcohol dehydrogenases from *Rhodococcus ruber* (ADH-A), *Candida parapsilosis* (ADH-CP) or *Lactobacillus kefir* (ADH-LK), and also the very well known Baker's yeast.¹³ Initial experiments were carried out in the mg-scale, obtaining alcohol (*S*)-**2a** in high to excellent enantiomeric excess, except for the reaction with ADH-LK which, following the anti-Prelog stereoselectivity rule, led to the opposite enantiomer (Table 2, entries 1–4). On the basis of these results, and bearing in mind the scaling-up of the biocatalytic processes for further synthetic applications, ADH-A overexpressed in *E. coli* was successfully applied in the bioreduction of **4a**, yielding identical results to those of commercially available ADH-A (entry 5).

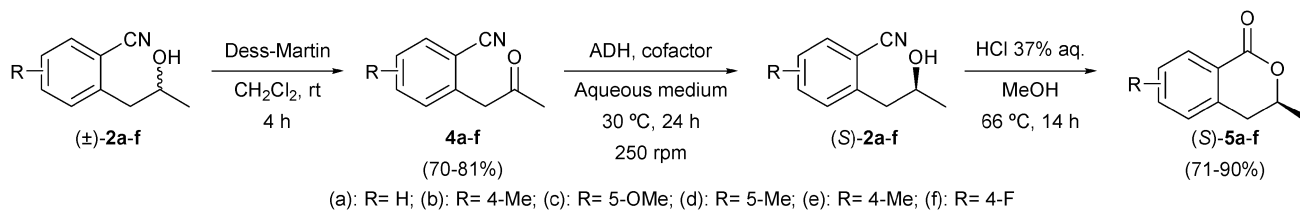
Using our knowledge of the best reaction conditions, an extension of this enzymatic study was done for substituted ketones **4b-f**. The formation of the enantiopure (*S*)-alcohols in complete conversion was detected after 24 h for all the substrates, with the exception of the bioreduction of the 3-methyl derivative (**4e**), which reached 49% conversion (data not shown). This may be explained by the hindering effect of the methyl group which is very close to the carbonyl group. Biocatalytic reactions were subsequently scaled-up to 80 mg of substrate. In all cases complete conversions (entries 6–11) were obtained, longer reaction times (72 h) only being required for ketone **4e** (entry 10). Finally, the intramolecular cyclisation of alcohols (*S*)-**2a-f** in acidic medium led to the enantiopure 3-methyl-3,4-dihydroisocoumarins (*S*)-**5a-f** after purification by extraction with CH₂Cl₂ (65–90%).¹⁴

In order to expand the applicability of these enantiomerically pure alcohol intermediates, we decided to move towards the asymmetric synthesis of structurally similar compounds. The possibility of using the same alcohol precursors highlights the importance of this divergent synthetic approach, especially

Table 1 Lipase-catalyzed kinetic resolution of 2-(2-hydroxypropyl)benzonitriles **2a-f** using vinyl acetate as an acyl donor

Entry	Substrate	RML IM : 2a-f ^a	<i>T</i> /°C	Solvent	<i>t</i> /h	ee _p ^b (%)	ee _s ^b (%)	<i>c</i> ^c (%)	<i>E</i> ^d
1	2a	1:1	30	TBME	23	99	63	39	> 200
2	2a	1:1	45	TBME	8	> 99	35	26	> 200
3	2a	2:1	30	TBME	8	96	96	50	194
4	2a	2:1	30	1,4-Dioxane	23	> 99	32	24	> 200
5	2a	2:1	30	THF	23	> 99	14	12	> 200
6	2a	2:1	30	Toluene	23	98	85	47	> 200
7	2a	2:1	30	Vinyl acetate	23	98	44	31	153
8	2b (R = 4-Me)	2:1	30	TBME	8	96	99	51	> 200
9	2c (R = 5-OMe)	2:1	30	TBME	24	92	80	47	59
10	2d (R = 5-Me)	2:1	30	TBME	9	95	61	39	73
11	2e (R = 3-Me)	2:1	30	TBME	9	94	20	17	39
12	2f (R = 4-F)	2:1	30	TBME	24	99	57	37	> 200

^a Ratio enzyme : substrate in weight (w/w). ^b Enantiomeric excesses of product (ee_p) and substrate (ee_s) determined by HPLC. ^c Conversion values calculated as $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$. ^d Enantiomeric ratio calculated as $E = \ln[(1 - ee_s) / (1 + (ee_s / ee_p))] / \ln[(1 + ee_s) / (1 + (ee_s / ee_p))]$.¹⁰



Scheme 2 Chemoenzymatic synthesis of 3-methyl-3,4-dihydroisoquinolines through bioreduction processes.

Table 2 Bioreduction of ketones **4a–f** in aqueous medium at 30 °C and 250 rpm

Entry	Ketone	ADH ^a	t/h	ee _p ^b (%)	c ^c (%)
1	4a	ADH-A	24	>99	>97
2	4a	Baker's yeast	24	96	>97
3	4a	ADH-CP	24	>99	>97
4	4a	ADH-LK	24	98	38
5	4a	<i>E. coli</i> /ADH-A	24	>99	>97
6 ^d	4a	<i>E. coli</i> /ADH-A	24	>99	>97 (>97)
7 ^d	4b	<i>E. coli</i> /ADH-A	24	>99	>97 (93)
8 ^d	4c	<i>E. coli</i> /ADH-A	24	>99	>97 (>97)
9 ^d	4d	<i>E. coli</i> /ADH-A	24	>99	>97 (82)
10 ^d	4e	<i>E. coli</i> /ADH-A	72	>99	>97 (62)
11 ^d	4f	<i>E. coli</i> /ADH-A	24	>99	>97 (77)

^a (*S*)-Alcohols **2a–f** were obtained as final products with the exception of the bioreduction of **4a** with ADH-LK. ^b Determined by HPLC. ^c Determined by GC. ^d Reactions in 80 mg scale of substrate. Isolated yields in brackets.

when the desired targets are isoquinoline derivatives, a class of nitrogenated compounds that are widely distributed in Nature and show a potent physiological action.¹⁵ As a result of their importance, a number of research groups have reported the asymmetric synthesis of isoquinoline derivatives.¹⁶ Biocatalytic production of these derivatives is nowadays mainly based upon lipase-catalyzed kinetic resolution,¹⁷ bioreduction of cyclic imines with metalloenzymes¹⁸ or deracemisation experiments using evolved monoamine oxidases combined with non-selective reducing agents.¹⁹ However, little attention has been paid to the asymmetric synthesis of 3-substituted tetrahydroisoquinolines,²⁰ a class of compounds that not only shows remarkable biological activity²¹ but also offers practical applications in asymmetric catalysis.²²

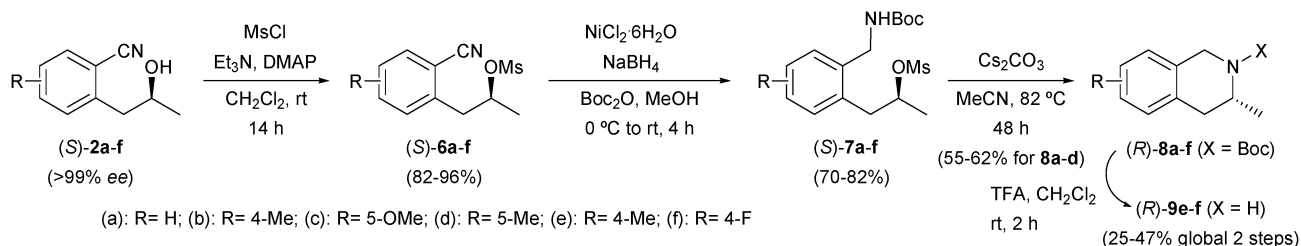
Taking advantage of the versatility of (*S*)-**2a–f**, our aim was to design a general synthetic pathway for the synthesis of 3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines. To do this, alcohols were mesylated in dichloromethane at room temperature, and then different methods to reduce the nitrile group were attempted. The mild reduction procedure with NiCl₂–NaBH₄,²³ followed by an *in situ* protection of the amine formed, was found to be an ideal strategy for the preparation of the diprotected compounds

(*S*)-**7a–f** (Scheme 3). The intramolecular cyclisation of (*S*)-**7a–f** in the presence of cesium carbonate yielded enantiopure *N*-Boc amines (*R*)-**8a–f**, a minimum presence of the corresponding *tert*-butyl 2-((1*E*)-prop-1-en-1-yl)benzyl carbamates (2–10%) being observed in all cases. The chromatographic purification of the reaction crudes afforded the *N*-protected amines **8a–d** in moderate yield.

However, the *N*-Boc tetrahydroisoquinolines **8e,f** decomposed in silica gel, so further transformations were required for the isolation of these amines. Then, (*R*)-**8e,f** were chemically deprotected with trifluoroacetic acid in dichloromethane, yielding (*R*)-**9e** in 47% overall yield after flash chromatography. Purification of (*R*)-**9f** proved unsuccessful, since it shows a high instability in the chromatographic purification step. To avoid this drawback we designed an alternative procedure using *p*-nitrobenzaldehyde as a scavenger for the remaining amounts of 1-(2-((1*E*)-prop-1-en-1-yl)-*p*-fluorophenyl)methanamine, followed by an extraction purification step affording (*R*)-**9f** in high chemical purity and low yield. In order to confirm the absolute configuration of the final products, we have synthesized (*R*)-3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (**9a**) from **8a**. The optical rotation value is in concordance with previously published data for (*R*)-**9a**.²⁴

Conclusions

2-(2-Hydroxypropyl)benzimidazoles have been found to be adequate building blocks in the divergent asymmetric synthesis of enantiopure substituted 3-methyl-3,4-dihydroisoquinolines and 3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines. *Rhizomucor miehei* lipase has displayed the best results in the lipase-catalyzed acetylation of racemic alcohols. However, enantioselectivity was found to be highly dependent on the ring pattern substitution, with moderate stereoselectivities being found for 3- and 5-monosubstituted alcohols, and very high to excellent values being achieved with none or 4-substituted derivatives. The chemical oxidation of racemic alcohols and subsequent bioreduction of the related ketones provided access to a series of novel enantiopure 2-(2-hydroxypropyl)benzimidazoles, ADH-A



Scheme 3 Chemoenzymatic synthesis of 3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines.

from *Rhodococcus ruber* being found as an excellent asymmetric biocatalyst for this reduction step. The enantiopure alcohols so obtained were treated in acidic medium, leading to a family of substituted (*S*)-3-methyl-3,4-dihydroisocoumarins in moderate to very high yield by intramolecular cyclisation. Taking advantage of their versatility, alcohol precursors were used in the synthesis of enantiopure *N*-Boc-3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines through a three-step synthesis in a very straightforward manner and without loss of the optical purity.

Experimental

General procedure for the synthesis of 2-(2-hydroxypropyl)-benzonitriles 2a–f

To a solution of the corresponding commercially available 2-bromobenzonitriles **1a–f** (1 equiv.) in THF (or Et₂O for **1f**, 0.2 M), BuLi (1.1 equiv., 1.6 M in hexane) was added dropwise at –78 °C under an inert atmosphere. The solution was stirred for 30 min at –78 °C and then, propylene oxide (1.5 equiv.) and boron trifluoride etherate (1.5 equiv.) were added dropwise. The mixture was stirred at –78 °C for additional 1 h, until the reaction was quenched with water. The mixture was extracted with Et₂O (3 × 20 mL), organic layers were collected, dried over Na₂SO₄, and the solvent evaporated under reduced pressure. The resulting crude was purified by flash chromatography (50% Et₂O/hexane), obtaining the corresponding alcohols **2a–f** in high yields (69–84%).

General procedure for the synthesis of racemic 1-(2-cyanophenyl)propan-2-yl acetates 3a–f

To a solution of the corresponding racemic alcohols **2a–f** (1 equiv.) in dry CH₂Cl₂ (0.1 M), triethylamine (3 equiv.), 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridine (0.3 equiv.) and acetic anhydride (2 equiv.) were successively added at rt under an inert atmosphere. The mixture was stirred and the reaction monitored by TLC analysis (50% Et₂O/hexane) until no starting material was detected (30–60 min). Solvent was evaporated afterwards and the crude purified by flash chromatography (50% Et₂O/hexane), obtaining the corresponding 1-(2-cyanophenyl)propan-2-yl acetates **3a–f** in high to excellent yields (82–98%).

General procedure for the synthesis of 2-(2-oxopropyl)-benzonitriles 4a–f

To a solution of the corresponding racemic alcohols **2a–f** (1 equiv.) in CH₂Cl₂ (0.1 M), the Dess–Martin reagent (1.5 equiv.) was added at rt under an inert atmosphere. The mixture was stirred for 4 h. Then, the reaction was quenched with an aqueous saturated 1 : 1 solution of Na₂S₂O₃–NaHCO₃. The mixture was extracted afterwards with CH₂Cl₂, organic layers were collected, dried over Na₂SO₄, filtered, and the solvent evaporated under reduced pressure. The resulting crude was purified by flash chromatography (50% Et₂O/hexane), affording the corresponding ketones **4a–f** in high yields (70–81%).

General procedure for the synthesis of 3-methylisochroman-1-ones 5a–f

The corresponding alcohols **2a–f** (1 equiv.) were dissolved in a 1 : 1 solution of MeOH and hydrochloric acid (37%) (0.02 M). The solution was warmed to 66 °C and stirred overnight under reflux.

The reaction was quenched with water and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 10 mL). Organic layers were collected, dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent evaporated under reduced pressure, affording the corresponding lactones **5a–f** without further purification in high yields (71–90%).

General procedure for the synthesis of 1-(2-cyanophenyl)propan-2-yl methanesulfonates 6a–f

To a solution of the corresponding alcohols **2a–f** (1 equiv.) in CH₂Cl₂ (0.1 M), triethylamine (2 equiv.), 4-(*N,N*-dimethylamino)pyridine (0.1 equiv.) and methanesulfonyl chloride (2 equiv.) were successively added under an inert atmosphere. The reaction was stirred overnight at rt and then the solvent evaporated under reduced pressure. The resulting crude was purified by flash chromatography (50% Et₂O/hexane), to afford the corresponding 1-(2-cyanophenyl)propan-2-yl methanesulfonates **6a–f** in good yields (82–96%).

General procedure for the synthesis of 1-[2-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)methyl)phenyl]propan-2-yl methanesulfonates 7a–f

To a solution of the corresponding 1-(2-cyanophenyl)propan-2-yl methanesulfonates **6a–f** (1 equiv.) in MeOH (0.13 M), NiCl₂·6H₂O (0.1 equiv.), di-*tert*-butyldicarbonate (2 equiv.) were added under an inert atmosphere. Then, the mixture was cooled to 0 °C and NaBH₄ (7 equiv.) was added in small portions over 15 min. The reaction was warmed to rt afterwards and stirred for 4 h. Then, the solution was filtered over Celite[®], the solvent evaporated under reduced pressure and the resulting crude purified by flash chromatography (50% Et₂O/hexane), affording the corresponding protected amines **7a–f** with good yields (70–82%).

General procedure for the synthesis of *tert*-butyl 3-methyl-3,4-dihydroisoquinoline-2(1*H*)-carboxylates 8a–d

To a solution of the corresponding 1-[2-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)methyl)phenyl]propan-2-yl methanesulfonates **7a–d** (1 equiv.) in dry MeCN (0.1 M), cesium carbonate was added (10 equiv.) under an inert atmosphere. The mixture was stirred at 82 °C for 2 days. Then, water was added and the reaction extracted with CH₂Cl₂ (3 × 10 mL), organic layers were collected, dried over Na₂SO₄, filtered, and the solvent evaporated under reduced pressure. The resulting crude was purified by flash chromatography (5% EtOAc/hexane), affording the corresponding *tert*-butyl 3-methyl-3,4-dihydroisoquinoline-2(1*H*)-carboxylates **8a–d** in good yields (55–62%).

General procedure for the synthesis of 3-methyltetrahydroisoquinolines 9a,e

To a solution of the corresponding 1-[2-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)methyl)phenyl]propan-2-yl methanesulfonates **7a,e** (1 equiv.) in dry MeCN (0.1 M), cesium carbonate was added (10 equiv.) under an inert atmosphere. The mixture was stirred at 82 °C for 2 days. Then, water was added and the reaction extracted with CH₂Cl₂ (3 × 10 mL), organic layers were collected, dried over Na₂SO₄, filtered, and the solvent was evaporated under reduced pressure. The mixture was then dissolved in a 1 : 1 mixture of CH₂Cl₂ and TFA (0.025 M), stirred for 2 h, and then basified with NaOH (3 N) and extracted with CH₂Cl₂.

Organic layers were collected, dried over Na₂SO₄, filtered, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the resulting crude purified by flash chromatography (10% MeOH/CH₂Cl₂), affording the corresponding 3-methyltetrahydroisoquinolines **9a,e** in moderate global yields for the two steps (47–54%).

General procedure for the synthesis of (*R*)-6-fluoro-3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline **9f**

To a solution of (*S*)-1-(2-(((*tert*-butoxycarbonyl)amino)-methyl)-5-fluorophenyl)propan-2-yl methanesulfonate **7f** (53 mg, 0.15 mmol) in dry MeCN (1.5 mL), cesium carbonate was added (478 mg, 1.46 mmol) under an inert atmosphere. The mixture was stirred at 82 °C for 2 days. Then, water was added and the reaction extracted with CH₂Cl₂ (3 × 15 mL), organic layers were collected, dried over Na₂SO₄, filtered, and the solvent evaporated under reduced pressure. The resulting crude was then dissolved in CH₂Cl₂ (2 mL) and TFA (2 mL) was added. The mixture was stirred for 2 h at rt, and then basified with NaOH (3 N), and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 15 mL). Organic layers were collected, dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent evaporated under reduced pressure. The mixture was then dissolved in CH₂Cl₂ (10 mL) and 4-nitrobenzaldehyde (15 mg, 0.10 mmol) and MgSO₄ (100 mg, 0.83 mmol) were added. The mixture was stirred for 30 min. Then, the mixture was extracted with a pH 4.5 NaOAc/HCl buffer (30 mL). The aqueous phase was afterwards basified with NaOH (3 N) and extracted with CH₂Cl₂ (3 × 10 mL). Organic layers were collected, dried over Na₂SO₄, filtered, and the solvent evaporated under reduced pressure, affording pure **9f** in low yield (6 mg, 25%).

General procedure for the lipase mediated kinetic resolution of alcohols **2a–f**

To a suspension of racemic alcohols **2a–f** (0.2 mmol, 1 equiv.) and the adequate lipase in dry solvent (2 mL), vinyl acetate (55 μL, 0.6 mmol) was added under an inert atmosphere. The reaction was shaken at 30 °C and 250 rpm, taking regularly aliquots that were analyzed by HPLC until around 50% conversion was reached. Then the reaction was stopped, and the enzyme filtered with CH₂Cl₂ (3 × 10 mL). The solvent was evaporated and the crude of the reaction purified by flash chromatography on silica gel (50% Et₂O/hexane), obtaining the corresponding enantiomerically enriched acetates (*R*)-**3a–f** and the alcohols (*S*)-**2a–f** (see Table 1 for additional details).

General procedure for the bioreduction of ketones **4a–f** with ADHs

Different protocols were used depending on the enzyme and have been listed below. See Table 2 for additional details.

Bioreduction of **4a–f with ADH-A.** In an eppendorf tube containing the corresponding ketone (2 mg) in TRIS–HCl 50 mM pH 7.5 buffer (325 μL), isopropyl alcohol (25 μL), 50 μL of a NADH 10 mM solution in TRIS–HCl buffer and 100 μL of an ADH-A solution (3 U) were successively added. Reaction was shaken at 250 rpm and 30 °C for 24 h. Then, the mixture was extracted with EtOAc (2 × 500 μL) and dried over Na₂SO₄, analyzing the reaction crude by GC (conversion) and HPLC (enantiomeric excess).

Bioreduction of **4a with Baker's yeast.** Baker's yeast (2.2 g) was added to a solution of glucose (282 mg) in H₂O (19 mL) stirring the resulting suspension for 15 min at 30 °C and 250 rpm. After this time the corresponding ketone **4a** (0.29 mmol) was added and the suspension was stirred at 30 °C and 250 rpm. Then the reaction was centrifuged and the supernatant extracted with Et₂O (3 × 20 mL). Organic phases were combined, dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent evaporated under reduced pressure affording a reaction crude containing alcohol (*S*)-**2a**.

Bioreduction of **4a with ADH-CP.** In an eppendorf tube containing **4a** (2 mg, 0.012 mmol) in TRIS–HCl 50 mM pH 7.5 buffer (425 μL), isopropyl alcohol (25 μL), 50 μL of a NADH 10 mM solution in TRIS–HCl buffer and 7.5 μL of ADH-CP (3 U) were successively added. Reaction was shaken at 250 rpm and 30 °C for 24 h. Then, the mixture was extracted with EtOAc (2 × 500 μL) and dried over Na₂SO₄, analyzing the reaction crude by GC (conversion) and HPLC (enantiomeric excess).

Bioreduction of **4a with ADH-LK.** In an eppendorf tube containing **4a** (2 mg, 0.012 mmol) in TRIS–HCl 50 mM pH 7.5 buffer (450 μL), 20 μL of glucose-6-phosphate, 10 μL of glucose 6-phosphate dehydrogenase (3 U), 50 μL of a NADPH 10 mM solution in TRIS–HCl buffer and 2 mg of ADH-LK (3 U) were successively added. Reaction was shaken at 250 rpm and 30 °C for 24 h. Then, the mixture was extracted with EtOAc (2 × 500 μL) and dried over Na₂SO₄, analyzing the reaction crude by GC (conversion) and HPLC (enantiomeric excess).

Bioreduction of **4a–f with ADH-A overexpressed in *E. coli*.** 15 mg of *E. coli*/ADH-A cells (15 mg) were rehydrated in TRIS–HCl 50 mM pH 7.5 buffer (500 μL) inside an eppendorf tube. The mixture was shaken at 250 rpm for 30 min. Then, the corresponding ketones **4a–f** (2 mg), isopropyl alcohol (30 μL) and NADH 10 mM solution (60 μL) were added. The reaction was shaken at 250 rpm and 30 °C for 24 h, analyzing the reaction crude by GC (conversion) and HPLC (enantiomeric excess).

Scale up bioreduction of ketones **4a–f with *E. coli*-ADH-A.** To a solution containing rehydrated *E. coli*-ADH-A cells (150 mg) in TRIS–HCl 50 mM pH 7.5 buffer (5 mL), isopropyl alcohol (300 μL), NADH 10 mM in TRIS–HCl 50 mM pH 7.5 solution (600 μL) and the corresponding ketones **4a–f** (80 mg) were successively added. The reaction was shaken until no starting material was detected by GC analysis. Then, the mixture was extracted with Et₂O (3 × 10 mL), organic layers were combined, dried over Na₂SO₄, filtered and the solvent removed under reduced pressure, affording the corresponding alcohols (*S*)-**2a–f** in excellent yields without further purification.

Acknowledgements

We thank Novozymes for the generous gift of the CAL-B (Novozyme 435), and also Prof. Wolfgang Kroutil for ADH-A overexpressed in *E. coli* cells. Financial support of this work by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) through CTQ 2007-61126 and BIO 2008-03683 projects is gratefully acknowledged. V.G.-F. acknowledges MICINN for a postdoctoral grant (Ramón y Cajal Program). J.M.-S. acknowledges MICINN for a predoctoral fellowship (FPU Program).

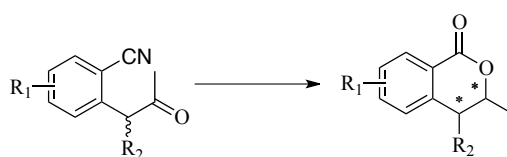
Notes and references

- 1 *The Alkaloids Chemistry and Pharmacology*, ed. G. A. Cordell, Academic Press, San Diego, 1995.
- 2 For recent articles about the synthesis of racemic 3,4-dihydroiso-coumarins: E. T. da Penha, J. A. Forni, A. F. P. Biajoli and C. R. D. Correia, *Tetrahedron Lett.*, 2011, **52**, 6342; M. D. Obushak, V. S. Matiychuk and V. V. Turytsya, *Tetrahedron Lett.*, 2009, **50**, 6112; I. Ullah, M. Sher, R. A. Khera, A. Ali, M. F. Ibad, A. Villinger, C. Fischer and P. Langer, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 1874; S. K. Mandal and S. C. Roy, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 11050; M. Sher, A. Ali, H. Reinke and P. Langer, *Tetrahedron Lett.*, 2008, **49**, 5400; S. K. Mandal and S. C. Roy, *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 4131; T. Suzuki, T. Yamada, K. Watanabe and T. Katoh, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2005, **15**, 2583.
- 3 C. A. Higgins, Z. Delbederi, K. McGarel, T. Mills, O. McGrath, S. Feutren-Burton, W. Watters, P. Armstrong, P. G. Johnston, D. Waugh and H. van den Berg, *Bioconjugate Chem.*, 2009, **20**, 1737 and references cited therein.
- 4 For recent literature: C. Zidorn, B. O. Petersen, V. Sareedenchai, E. P. Ellmerer and J. Ø. Duus, *Tetrahedron Lett.*, 2010, **51**, 1390; Y. Li, I. Plitzko, J. Zaugg, S. Hering and M. Hamburger, *J. Nat. Prod.*, 2010, **73**, 768; R. Haritakun, M. Sappan, R. Suvannakad, K. Tasanathai and M. Isaka, *J. Nat. Prod.*, 2010, **73**, 75; S. A. Shahzad, C. Venin and T. Wirth, *Eur. J. Org. Chem.*, 2010, 3465; A. Kumar Sharma, Y. Maheshwary, P. Singh and K. N. Singh, *ARKIVOC*, 2010, (ix), 54; B. Cramer, H. Harrer, K. Nakamura, D. Uemura and H.-U. Humpf, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **18**, 343; A. Habel and W. Boland, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 1601; S. Shinkaruk, B. Bennetau, P. Babin, J.-M. Schmitter, V. Lamothe, C. Bennetau-Pelissero and M. C. Urdaci, *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, **16**, 9383; K. Uchida, T. Fukuda and M. Iwao, *Tetrahedron*, 2007, **63**, 7178; G. Kerti, T. Kurtán, T.-Z. Illyés, K. E. Kövér, S. Sólyom, G. Pescitelli, N. Fujioka, N. Berova and S. Antus, *Eur. J. Org. Chem.*, 2007, 296; H. B. Mereyala and G. Pathuri, *Synthesis*, 2006, 2944; Y. Kurosaki, T. Fukuda and M. Iwao, *Tetrahedron*, 2005, **61**, 3289.
- 5 A. Ríoz-Martínez, G. de Gonzalo, D. E. Torres Pazmiño, M. W. Fraaije and V. Gotor, *J. Org. Chem.*, 2010, **75**, 2073.
- 6 T. Schubert, M.-R. Kula and M. Müller, *Synthesis*, 1999, 2045.
- 7 L. L. Machado, T. L. G. Lemos, M. C. de Mattos, M. C. F. de Oliveira, G. de Gonzalo, V. Gotor-Fernández and V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2008, **19**, 1418; C. Csajági, G. Szatzker, E. R. Tóke, L. Úrge, F. Darvas and L. Poppe, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2008, **19**, 237; G. Kerti, T. Kurtán, T.-Z. Illyés, K. E. Kövér, S. Sólyom, G. Pescitelli, N. Fujioka, N. Berova and S. Antus, *Eur. J. Org. Chem.*, 2007, 196; V. Kiss, G. Egri, J. Bálint, I. Ling, J. Barkóczi and E. Fogassy, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2006, **17**, 2220; A. Ghanem and V. Schurig, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003, **14**, 2547; N. S. Hatzakis and I. Smonou, *Bioorg. Chem.*, 2005, **33**, 325; A. Ghanem and V. Schurig, *Monatsh. Chem.*, 2003, **134**, 1151; D. Bianchi, P. Cesti and E. Battistel, *J. Org. Chem.*, 1988, **53**, 5531; K. Laumen, D. Breitgoff and M. P. Schneider, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1998, 1459; K.-E. Jaeger, B. Schneidinger, F. Rosenau, M. Werner, D. Lang, B. W. Dijkstra, K. Schimossek, A. Zonta and M. T. Reetz, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 1997, **3**, 3; S. Ruppert and H.-J. Gais, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1997, **8**, 3657.
- 8 M. Pääviö, D. Mavrynsky, R. Leino and L. T. Kanerva, *Eur. J. Org. Chem.*, 2011, 1452; S.-B. Ko, B. Baburaj, M.-J. Kim and J. Park, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 6860; B. Martín-Matute, M. Edin, K. Bogár, F. B. Kaynak and J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 8817; M.-J. Kim, H. M. Kim, D. Kim, Y. Ahn and J. Park, *Green Chem.*, 2004, **6**, 471; M.-J. Kim, Y. I. Chung, Y. K. Choi, H. K. Lee, D. Kim and J. Park, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 11494; J. H. Koh, H. M. Jung, M.-J. Kim and J. Park, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 6281.
- 9 J. Mangas-Sánchez, E. Busto, V. Gotor-Fernández and V. Gotor, *Org. Lett.*, 2010, **12**, 3498; D. Acetti, E. Brenna, C. Fuganti, F. G. Gatti and S. Serra, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2009, **20**, 2413; M. Fujii, S. Yasuhara and H. Akita, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2009, **20**, 1286; P. Bachu, J. Sperry and M. A. Brimble, *Tetrahedron*, 2008, **64**, 4827; T. Choshi, Y. Uchida, Y. Kubota, J. Nobuhiro, M. Takeshita, T. Hatano and S. Hibino, *Chem. Pharm. Bull.*, 2007, **55**, 1060; T. Ema, M. Yoshii, T. Korenaga and T. Sakai, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2002, **13**, 1223.
- 10 C.-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Giridaukas and C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 7294; J. L. L. Rakels, A. J. J. Straathof and J. J. Heijnen, *Enzyme Microb. Technol.*, 1993, **15**, 1051.
- 11 P. L. Coe, A. J. Waring and T. D. Yarwood, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1995, 2729.
- 12 G. A. Petkova and V. Král, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **18**, 6651; S. Broussy, R. S. Cheloha and D. B. Berkowitz, *Org. Lett.*, 2009, **11**, 305; M. M. Musa, K. I. Ziegelmann-Fjeld, C. Vieille and R. S. Phillips, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 887; K. I. Ziegelmann-Fjeld, M. M. Musa, R. S. Phillips, J. G. Zeikus and C. Vieille, *Protein Eng., Des. Sel.*, 2007, **20**, 47; M. M. Musa, K. I. Ziegelmann-Fjeld, C. Vieille, J. G. Zeikus and R. S. Phillips, *J. Org. Chem.*, 2007, **72**, 30; M. M. Musa, K. I. Ziegelmann-Fjeld, C. Vieille, J. G. Zeikus and R. S. Phillips, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**, 3091; B. Erdélyi, A. Szabó, G. Seres, L. Birincisk, J. Ivanics, G. Szatzker and L. Poppe, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2006, **17**, 268; K. Inoue, Y. Makino and N. Itoh, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2005, **16**, 2539; J. D. Scott and R. M. Williams, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 1669; K. Nakamura and T. Matsuda, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 8957.
- 13 G. Fronza, C. Fuganti, P. Grasselli and A. Mele, *J. Org. Chem.*, 1991, **56**, 6019.
- 14 (*S*)-**5a**: [α]_D²⁰ +116.1 (*c* 1, CHCl₃) (>99% ee) in comparison with previously described [α]_D²⁰ +90.2 (*c* 0.55, CH₂Cl₂) in ref. 4 (K. E. Kövér, S. Sólyom, G. Pescitelli, N. Fujioka, N. Berova and S. Antus, *Eur. J. Org. Chem.*, 2007, 296).
- 15 *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*, ed. J. D. Philipson, M. F. Roberts and M. H. Zenk, Springer-Verlag, Berlin, 1985; J. D. Scott and R. M. Williams, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 1669.
- 16 P. Siengalewicz, U. Rinner and J. Mulzer, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 2676; Z. Czarnocki, A. Siwicka and J. Szawkalo, *Curr. Org. Synth.*, 2005, **2**, 301; A. B. J. Bracca and T. S. Kaufman, *Tetrahedron*, 2004, **60**, 10575; J. L. Vicario, D. Badía, L. Carrillo and J. Etxeberria, *Curr. Org. Chem.*, 2003, **7**, 1775.
- 17 A. J. Blacker, M. J. Stirling and M. I. Page, *Org. Process Res. Dev.*, 2007, **11**, 642; M. Stirling, J. Blacker and M. I. Page, *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 1247; T. A. Paál, E. Forró, F. Fülöp, A. Liljebblad and L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2008, **19**, 2784.
- 18 M. Dürrenberger, T. Heinisch, Y. M. Wilson, T. Rossel, E. Nogueira, L. Knörr, A. Mutschler, K. Kersten, M. J. Zimbron, J. Pierron, T. Schirmer and T. R. Ward, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, **50**, 3026.
- 19 K. R. Bailey, A. J. Ellis, R. Reiss, T. J. Snape and N. J. Turner, *Chem. Commun.*, 2007, 3640; J. M. Foulkes, K. J. Malone, V. S. Coker, N. J. Turner and J. R. Lloyd, *ACS Catal.*, 2011, **1**, 1589.
- 20 D. García, F. Foubelo and M. Yus, *Eur. J. Org. Chem.*, 2010, 2893; D. García, B. Moreno, T. Soler, F. Foubelo and M. Yus, *Tetrahedron Lett.*, 2009, **50**, 4710; L. Carrillo, D. Badía, E. Dominguez, E. Anakabe, I. Osante, I. Tellitu and J. L. Vicario, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 1115.
- 21 For biological activity related to 3-substituted-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines: T. Saitoh, A. Yamashita, K. Abe, K. Ogawa, M. Kitabake, K. Taguchi and Y. Horiguchi, *Med. Chem.*, 2008, **4**, 531; G. L. Grunewald, M. R. Seim, J. Lu, M. Nakbaud and K. R. Criscione, *J. Med. Chem.*, 2006, **49**, 2939; G. L. Grunewald, T. M. Caldwell, Q. Li and K. R. Criscione, *J. Med. Chem.*, 1999, **42**, 3315; G. L. Grunewald, V. H. Dahanukar, B. Tok and K. R. Criscione, *J. Med. Chem.*, 1999, **42**, 1982; G. L. Grunewald, V. H. Dahanukar, P. Ching and K. R. Criscione, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 3539.
- 22 B. K. Peters, S. K. Chakka, T. Naicker, G. E. M. Maguire, H. G. Kruger, P. G. Andersson and T. Governder, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2010, **21**, 679.
- 23 S. Caddick, D. B. Judd, A. K. K. Lewis, M. T. Reich and M. R. V. Williams, *Tetrahedron*, 2003, **59**, 5417.
- 24 (*R*)-**9a**: [α]_D²⁰ -110.0 (*c* 0.6, CHCl₃) (>99% ee) in comparison with previously described [α]_D²⁰ -113.6 (*c* 1, CHCl₃) in ref. 21 (T. Saitoh, A. Yamashita, K. Abe, K. Ogawa, M. Kitabake, K. Taguchi and Y. Horiguchi, *Med. Chem.*, 2008, **4**, 531).

ARTICULO VI. DESARROLLO DE PROCESOS DE
RESOLUCIÓN CINÉTICA REDUCTIVA. SÍNTESIS
ESTEREOSELECTIVA DE 4-ALQUIL-3-METIL-3,4-
DIHIDROISOCUMARINAS

Las resoluciones cinéticas (KRs) permiten acceder a compuestos enantioenriquecidos aprovechando la diferente velocidad de reacción que presentan los enantiómeros en un racemato.⁴² Sin embargo, las KRs presentan la limitación de que tan sólo se obtiene, en un caso ideal, el producto deseado en forma enantiopura con un 50% de rendimiento. Esta desventaja se puede superar cuando se introduce en el medio un sistema de racemización que interconvierta ambos enantiómeros, de modo que se puede obtener el producto con un 100% de rendimiento.⁴¹ Este tipo de procesos está bien establecido para alcoholes secundarios, aminas y β -cetoésteres, sin embargo, la resolución cinética dinámica de aldehídos y cetonas racémicas no ha sido estudiada aún en profundidad. En este último caso, denominado resolución cinética dinámica reductiva (DYRKR), se combina la reducción estereoselectiva por parte de una cetereductasa junto con un sistema de racemización compatible, formándose de forma teórica e ideal, un producto diastereo- y enantiopuro con un 100% de rendimiento.

En este último capítulo, nos planteamos la posibilidad de estudiar la resolución cinética dinámica reductiva de una serie de cetonas racémicas y su posterior aplicación en la preparación de 4-alkil-3-metil-3,4-dihidroisocumarinas (Esquema II.VI.I), las cuales, como se ha comentado anteriormente, forman parte del esqueleto de numerosos productos naturales con actividad antifúngica, antibacteriana o anticancerígena.^{106d, 117} Los resultados de este trabajo han sido enviados para su publicación: “*One-pot synthesis of enantiopure 3,4-dihydroisocoumarines through dynamic reductive kinetic resolution processes*” Juan Mangas-Sánchez, Eduardo Busto, Vicente Gotor y Vicente Gotor-Fernández. anie.201301424.



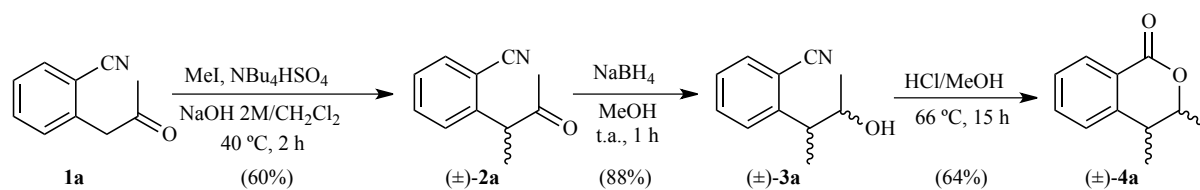
Esquema II.VI.1. Preparación estereoselectiva de 3-metil-4-alkil-3,4-dihidroisocumarinas.

II.VI.1. Resultados y discusión

II.VI.1.1. Síntesis de 4-alkil-3-metil-3,4-dihidroisocumarinas. Preparación de los productos racémicos.

Tomando como punto de partida el 2-(2-oxopropil)benzonitrilo (**1a**), preparado en el capítulo anterior para la síntesis de las 3-metil-3,4-dihidroisocumarinas, se llevó a cabo una metilación en posición bencílica y, asimismo, α a la cetona, usando yoduro de metilo y un catalizador de transferencia de fase (hidrogenosulfato de tetrabutilamonio) en un medio bifásico compuesto por diclorometano e hidróxido de sodio 2 M a 40 °C (Esquema II.VI.2). Tras 2 h de reacción y posterior extracción y purificación mediante cromatografía de columna, se obtuvo la cetona metilada **2a** con un 60% de rendimiento aislado. A continuación, se preparó el alcohol correspondiente mediante reducción con borohidruro de sodio en metanol seco, obteniéndose **3a** en forma racémica con un rendimiento aislado del 88% y un exceso diastereomérico del 64%. A partir de **3a** se llega a la 3,4-dimetil-3,4-dihidroisocumarina **4a** mediante una ciclación intramolecular en una mezcla metanol/ácido clorhídrico 1:1 a 66 °C durante 15 h (64% rendimiento aislado).

¹¹⁷ D. C. Endringer, K. G. Guimarães, T. P. Kondraty, J. M. Pezzuto, F. C. Braga, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1082-1084.



Esquema II.VI.2. Preparación de los productos racémicos

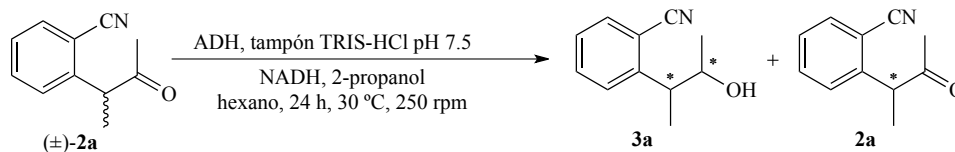
II.VI.1.2. Estudio de Resolución Cinética de la cetona (±)-2a.

Una vez obtenidos los productos en forma racémica, se llevó a cabo una optimización de las condiciones cromatográficas para poder seguir el curso estereoquímico de la reacción (ver información suplementaria). A continuación, se estudió la resolución cinética de la cetona **2a**. Para ello, se usó la ADH-A de *Rhodococcus ruber* sobreexpresada en *E. coli* ya que había mostrado los mejores resultados en el capítulo anterior frente a la biorreducción de cetonas estructuralmente similares.

En un principio, se usaron 10 mg de células liofilizadas (entrada 1), usando NADH como cofactor en todos los casos, 2-propanol como cosustrato y una solución tampón TRIS-HCl a pH 7.5 (Tabla II.VI.1). Tras 24 h, se obtuvo un 38% de conversión, recuperando la cetona de partida con un exceso enantiomérico del 56%, lo que significa que la proteína mostraba preferencia por uno de los dos enantiómeros de la cetona.

A continuación, se realizó un estudio de la carga de enzima. Cuando se usan 15 mg se obtienen mejores actividades (41%, entrada 2), desafortunadamente, mayores cargas de proteína (25 mg, entrada 3) no condujeron a mayores conversiones. Sorprendentemente, cuando se añade el enzima en porciones (entrada 4) se obtiene una conversión ligeramente mayor (44%), lo que indica que puede haber problemas de reversibilidad de la reacción o de inhibición por producto. Para corroborar esta hipótesis, se realizaron dos ensayos utilizando un 10% de 2-propanol (entrada 5), la cual no mejoró los resultados obtenidos, y otra con un 5% de un cosolvente como el hexano (entrada 6) para crear un medio bifásico que actuara como reservorio tanto de sustrato como de producto y reducir de esta forma la concentración de éstos en la fase acuosa. Tras 24 h, se obtiene un 56% de conversión con la cetona en un 90% de *ee*. Este comportamiento inesperado, ya que a conversiones superiores al 50% se esperaría obtener el sustrato en forma enantiopura, puede explicarse considerando una racemización parcial de la cetona en el medio debido a la acidez del hidrógeno en posición α .

Tabla II.VI.1. Resolución cinética de la cetona modelo (\pm)-**2a**

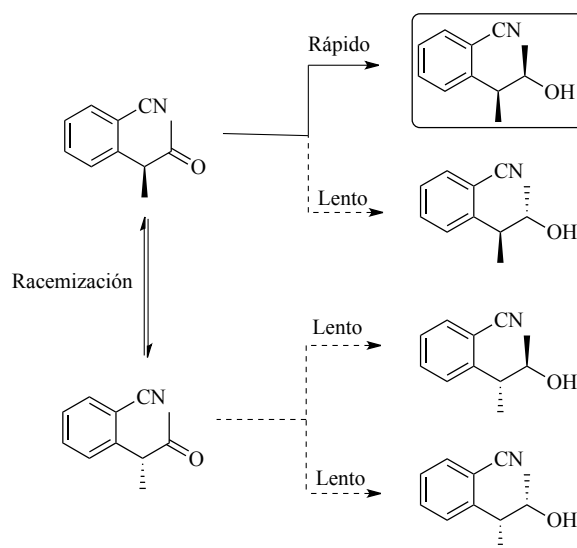


Entrada	Carga	<i>ee</i> 2a (%) ^a	<i>ee</i> 3a (%) ^b	<i>c</i> (%) ^a
1	10 mg	56	>99	38
2	15 mg	60	>99	41
3	25 mg	59	>99	42
4	10 + 10 mg	64	>99	44
5 ^c	15 mg	64	>99	44
6 ^d	15 mg	90	>99	56

^a Determinado mediante cromatografía de gases con columna de relleno quiral. ^b Determinado por HPLC con columna de relleno quiral tras formar la 3,4-dihidroisocumarina con HCl concentrado. ^c 10% de 2-propanol. ^d En medio bifásico con 5% de hexano.

II.VI.1.3. Estudio de Resolución Cinética Dinámica Reductiva de la cetona (\pm)-**2a**.

Una vez optimizada la resolución cinética, se llevó a cabo el estudio de resolución cinética dinámica reductiva (Esquema II.VI.3).

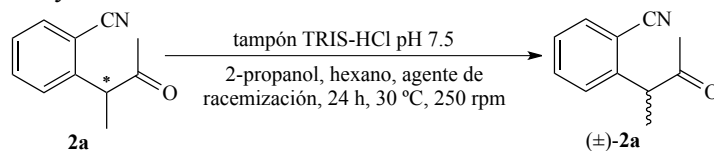


Esquema II.VI.3. Proceso de resolución cinética dinámica reductiva detallado para la cetona racémica **2a**.

En primer lugar, se optimizó el proceso de racemización de la cetona **2a**. Para ello, se usó la cetona con excesos enantioméricos en torno al 60%, se disolvieron en buffer TRIS-HCl pH 7.5 con un 5% de 2-propanol, y se utilizaron diferentes condiciones para llevar a cabo la

racemización (Tabla II.VI.2). En primer lugar, se probaron las mejores condiciones de resolución cinética, observándose una mínima racemización que resulta insuficiente para llevar a cabo una resolución cinética dinámica efectiva (entrada 1), pero que explica que en la resolución cinética se haya obtenido un 56% de conversión y el alcohol en forma enantiopura. A continuación, se añadió al medio una resina de intercambio iónico débil (DOWEX WMA-1), ya que anteriormente habían proporcionado buenos resultados en la racemización de cetonas similares,⁵⁰ y una base orgánica como la trietilamina. En ambos casos, tras 24 h, se observa una racemización total o prácticamente total del sustrato (entradas 2-4).

Tabla II.VI.2. Estudio de racemización de **2a** usando un tampón TRIS-HCl a pH 7.5, 5% de 2-propanol, 5% de hexano y diferentes condiciones de racemización.



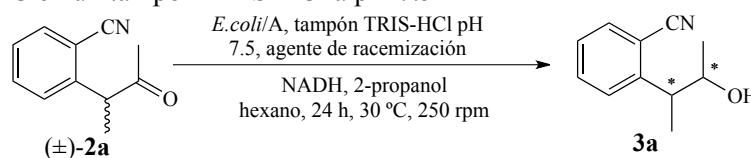
Entrada	Aditivo(s)	ee 2a inicial (%) ^a	ee 2a final (%) ^a
1	5% hexano	60	54
2	Dowex MWA-1	66	6
3	5% hexano + Dowex MWA-1	57	5
4	5% hexano + 1% NEt ₃	63	0

^a Determinado mediante cromatografía de gases con columna de relleno quiral.

Una vez optimizada la racemización, se comenzó el estudio de la resolución cinética dinámica reductiva (Tabla II.VI.3). Para ello, se combinaron las mejores condiciones de resolución cinética con las mejores de racemización usando células de *E. coli*/ADH-A liofilizadas, 5% de hexano, 5% de 2-propanol como cosustrato, trietilamina como sistema de racemización, NADH como cofactor en una disolución tampón TRIS-HCl pH 7.5 (entrada 1). Tras 44 h, se alcanza un 81% de conversión, obteniéndose **3a** en forma enantiopura como un solo diastereómero. Sin embargo, el sustrato **2a** se obtuvo con un 45% de *ee*. Tiempos más largos de reacción no mejoraron el proceso (entrada 2), por lo que los resultados sugieren que el sistema no es lo suficientemente bueno como para llevar a cabo una resolución cinética dinámica efectiva. Mayor proporción de trietilamina conduce a la inactivación del enzima (entradas 3 y 4). Teniendo en cuenta los buenos resultados que proporcionó la resina de intercambio aniónico en el estudio de racemización, se decidió probar este sistema. Tras 24 h se obtiene un 63% de conversión, obteniendo **2a** con un 81% de *ee*. Tras 92 h, se obtiene un 86% de conversión, con la cetona en bajo *ee* (13%), por lo que la resina parece comportarse

mejor en combinación con el proceso enzimático. Al igual que en el caso de la resolución cinética, en todos los casos se obtiene el alcohol **3a** en forma diastereo- y enantiopura.

Tabla II.VI.3. Estudio de *DYRKR* de la cetona racémica **2a** utilizando diferentes estrategias de racemización a 30 °C en un tampón TRIS-HCl a pH 7.5

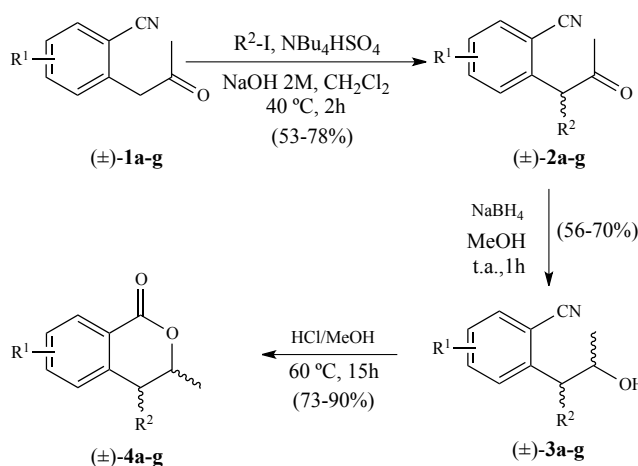


Entrada	Sistema racemización	t (h)	<i>ee</i> 2a (%) ^a	<i>ee</i> 3a (%) ^b	<i>rd</i> 3a (%) ^b	<i>c</i> (%) ^a
1	1% NEt ₃	44	45	>99	>99:1	81
2	1% NEt ₃	72	45	>99	>99:1	85
3	2% NEt ₃	70	0	>99	>99:1	77
4	3% NEt ₃	70	0	>99	>99:1	45
5	Dowex MWA-1	24	81	>99	>99:1	63
6	Dowex MWA-1	92	13	>99	>99:1	86

^a Determinado mediante cromatografía de gases con columna de relleno quiral. ^b Determinado por HPLC con columna de relleno quiral tras formar la 3,4-dihidroisocumarina con HCl concentrado.

II.VI.1.4. Ampliación de la metodología al resto de sustratos.

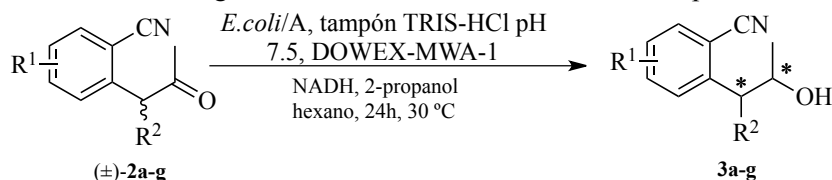
Una vez optimizado el proceso para el sustrato modelo, se llevó a cabo un estudio de la generalidad del proceso utilizando para ello cetonas con diferente patrón de sustitución en el anillo aromático y con diferentes restos alquilo en posición α . Para ello, partiendo de las cetonas **1a-g** preparadas en el capítulo anterior, se prepararon las cetonas **2b-g** mediante alquilación con diferentes ioduros de alquilo mediante una metodología análoga a la usada para preparar **2a**, obteniéndose las cetonas **2b-g** con rendimientos entre 53-78% tras purificación mediante cromatografía de columna. A partir de ellas, se prepararon los correspondientes alcoholes racémicos **3b-g** mediante reducción con borohidruro de sodio en metanol seco y, finalmente, tras ciclación intramolecular en medio ácido se llega a las 3,4-dihidroisocumarinas finales **4b-g** en forma racémica (Esquema II.VI.4).



Esquema II.VI.4. Preparación de los productos de partida y finales en forma racémica.

Una vez desarrollado el método cromatográfico para llevar a cabo el seguimiento del proceso enzimático (ver información suplementaria), se procedió al estudio (Tabla II.VI.4). Para ello se tomaron las mejores condiciones de *DYRKR* obtenidas para el sustrato modelo, obteniéndose en todos los casos se obtienen conversiones, diastereoselectividades y excesos enantioméricos excelentes tras 72 h de reacción, sin que la naturaleza del sustituyente en el anillo aromático o la cadena alquílica tenga influencia en la selectividad del enzima. Sin embargo, diferencias en la actividad pueden deberse a la influencia que tengan éstos sobre la acidez del protón y, por tanto, afectar al proceso de racemización. Al igual que en el caso anterior, una vez que termina el proceso enzimático, se añade HCl concentrado y se agitan las reacciones durante 24 h, obteniéndose en todos los casos las 3,4-dihidroisocumarinas **4b-g** en forma diastereo y enantiopura.

Tabla II.VI.4. Estudio de *DYRKR* de las cetonas racémicas **2a-g** usando la resina de intercambio aniónico DOWEX MWA-1 como agente de racemización a 30 °C en un tampón TRIS-HCl a pH 7.5.

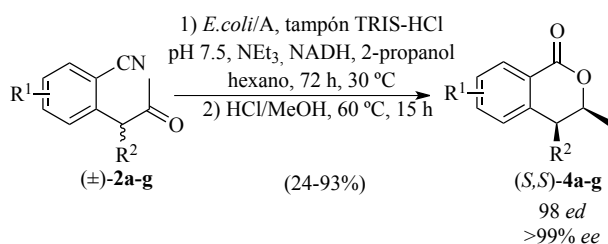


Entrada	R ¹	R ²	c (%) ^a	rd 3a-h (%) ^b	ee 3a-h (%) ^b
1	H	Me	86	>99:1	>99
2	4-Me	Me	72	>99:1	>99
3	5-OMe	Me	77	>99:1	>99
4	5-Me	Me	93	99:1	>99
5	4-F	Me	95	99:1	>99
6	H	Et	87	>99:1	>99
7	H	Alilo	96	99:1	>99

^a Determinado mediante cromatografía de gases con columna de relleno quiral. ^b Determinado por HPLC con columna de relleno quiral tras formar la 3,4-dihidroisocumarina con HCl concentrado.

II.VI.1.5. Desarrollo del proceso de síntesis “one-pot” de las 3,4-dihidroisocumarinas

Finalmente, se llevó a cabo la preparación asimétrica de 4-alkil-3-metil-3,4-dihidroisocumarinas mediante un proceso “one-pot” DYRKR-ciclación intramolecular. En este caso, el sistema de racemización formado por la resina de intercambio aniónico mostró problemas de reproducibilidad y eficacia, por lo que se probó la racemización con trietilamina. A esta escala, la trietilamina se comportó mucho mejor y se utilizó para llevar a cabo el proceso “one-pot”. El escalado se realizó empleando 0.3 mmoles de sustrato **2a-g** a una concentración 0.2 mM, 5% de hexano como cosolvente, 5% de 2-propanol como cosustrato, 1% de trietilamina, NADH 1mM como cofactor y 128 mg (425 mg/mmol sustrato) de células de *E. coli*/ADH-A liofilizadas (Esquema II.VI.5). Tras 72 h, se añadió HCl concentrado y se dejaron agitando 24 h a 30 °C, obteniéndose en todos los casos conversiones excelentes (70-96%) y rendimientos entre buenos y excelentes (59-93%). Cabe mencionar el caso del derivado fluorado cuyo rendimiento aislado es muy bajo debido a que se forma el ácido proveniente de la hidrólisis del nitrilo y tan solo se obtiene la lactona **4e** con un 24% de rendimiento aislado.



Esquema II.VI.5. Preparación “one-pot” de las 3-metil-4-alkil-3,4-dihidroisocumarinas (*S,S*)-**4a-g** en forma enantiopura.

II.VI.1.6. Determinación de la configuración relativa y absoluta de los productos finales.

La determinación de la configuración relativa de las 3,4-dihidroisocumarinas **4a-g** se realizó mediante análisis *NOESY*, revelando una configuración relativa *syn* en el producto final (Ver información adicional). Para la determinación de la configuración absoluta de los productos elegimos el alcohol **3a** y el **3f**, ya que en la zona de los metilos había buena resolución de los picos, y preparamos los ésteres de Mosher usando el (*S*)-(+)-cloruro de Mosher para determinar la configuración del carbono unido al OH (Figura II.VI.1).

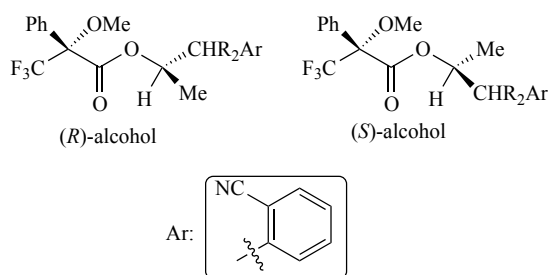


Figura II.VI.1. Ésteres de Mosher preparados para la determinación de la configuración absoluta de los productos finales.

En ambos casos, en los alcoholes racémicos se observa una buena resolución de los 4 OMe correspondientes a los 4 diastereoisómeros. Los 2 OMe correspondientes a los alcoholes *syn* salen más desapantallados que los *anti*. En el ¹H-NMR del producto enantiopuro solamente se observa el pico del OMe más desapantallado de los dos (Figura II.VI.2), es decir, que el OMe está en posición relativa *trans* con respecto al grupo CHR²Ar, por tanto el carbono tiene configuración (*S*). Como la configuración relativa de los alcoholes es *syn*, los productos finales poseen configuración absoluta (*S,S*).

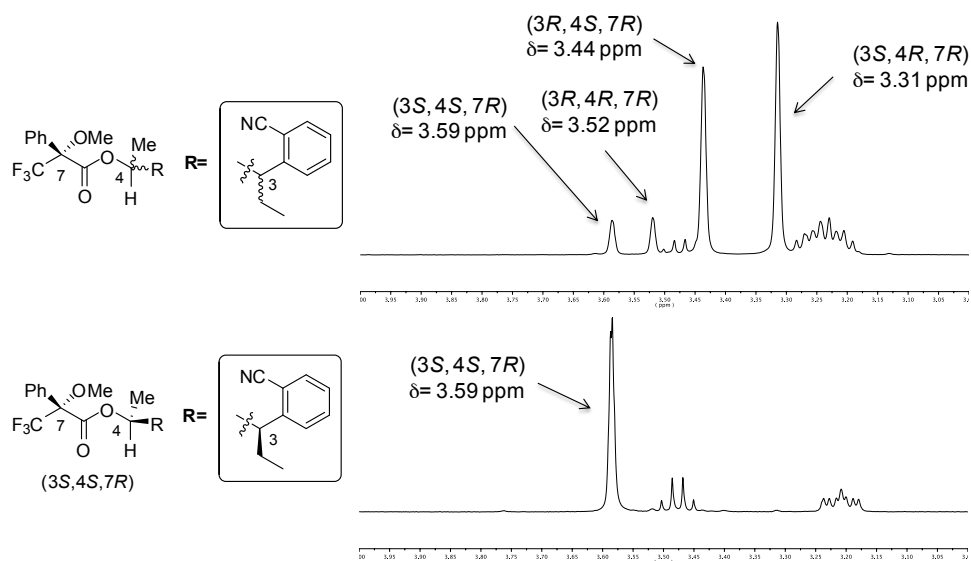


Figura II.VI.2. Espectros de ¹H-RMN de los ésteres de Mosher de los alcoholes (±)-**3f** y (+)-**3f**.

II.VI.2. Conclusiones

Como conclusiones a este último capítulo, se puede decir que se ha preparado una familia de 4-alkil-3-metil-3,4-dihidroisocumarinas mediante un proceso “one-pot” que consiste en la resolución cinética dinámica reductiva de diferentes cetonas racémicas seguido de una ciclación intramolecular. El proceso se lleva a cabo en general con buenos

rendimientos y diastereo- y enantioselectividades excelentes, demostrando el potencial que poseen los métodos biocatalíticos en la generación de más de un centro estereogénico.

One-pot synthesis of enantiopure 3,4-dihydroisocoumarines through dynamic reductive kinetic resolution processes

Juan Mangas-Sánchez, Eduardo Busto, Vicente Gotor and Vicente Gotor-Fernández*

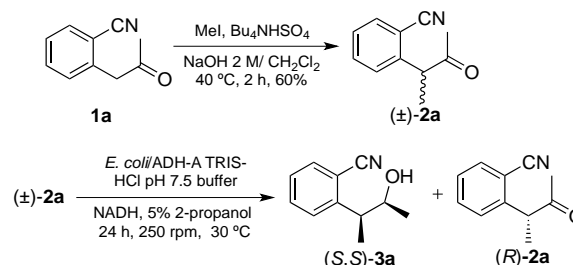
Biocatalytic processes are well-established methodologies for the production of organic compounds under environmentally friendly conditions.¹ In fact, the potential of biotransformations for sustainable manufacturing has gained major attention because of the economic impact of enzymes for industrial applications.² From the group of asymmetric biocatalytic transformations, enzymatic kinetic resolutions (KRs) of racemic mixtures provide a straightforward access to enantiopure compounds. Unfortunately this approach is based on enantiomer separation where the maximum yield is limited to a 50%,³ although the development of elegant enzymatic dynamic kinetic resolutions (DKRs) has overcome this limitation. For instance hydrolases in combination with metal catalysts have allowed the synthesis of a wide variety of enantioenriched compounds from racemic amine or alcohols.⁴ On the other hand Baeyer Villiger mono oxygenases have efficiently catalyzed DKR processes for the formation of enantiopure esters.⁵ However, DKR processes have been scarcely explored using alcohol dehydrogenases (ADHs).⁶ Some examples have been reported in the bioreduction of diketones⁷ and racemic derivatives such as ketones,⁸ β -keto esters⁹ or aldehydes.¹⁰ The possibility to generate more than one stereocenter in a single biotransformation remains nowadays a challenging task, and it will be explored here starting from ketones. In this context, it must be mentioned that DKR processes have been also recently defined as dynamic reductive kinetic resolution processes (DYRKR).¹¹

Chiral heterocyclic compounds are widely found in biologically active natural products, but also a great number of synthetic pharmacologically active molecules contain at least one heterocyclic ring. Therefore, the development of novel synthetic asymmetric methods for the preparation of enantiopure heterocyclic compounds is a highly appealing task for synthetic organic chemists. In particular, the asymmetric synthesis of enantioenriched 3,4-dihydroisocoumarin derivatives has attracted much attention in the last years, due to its presence in many natural products that display a vast range of biological activities such as antibacterial, antifungal, antimalarial or anticancer.¹²

Until now, different enzymatic transformations have been

reported for the asymmetric synthesis of 3-alkyl-3,4-dihydroisocoumarines, such as the oxidation of 2-alkyl-1-indanone using Baeyer-Villiger monooxygenases¹³ or the ADH-catalyzed bioreduction 2-(2-oxopropyl)-benzotrioles.¹⁴ However, as far as we now the chemoenzymatic synthesis of 3,4-dialkyl-3,4-dihydroisocoumarines remains nowadays unexplored. Herein, we report an effective and simple one-pot synthesis of enantiopure 4-alkyl-3-methyl-3,4-dihydroisocoumarines through DYRKR processes by combination of an alcohol dehydrogenase (ADH-A from *Rhodococcus ruber*) and basic catalysis followed by intramolecular cyclisation.

2-(3-Oxobutan-2-yl)benzotriole (**2a**) was chosen as model substrate because of its easy access through methylation of 2-(2-oxopropyl)benzotriole (**1a**) with methyl iodide and sodium hydroxide under phase transfer catalysis conditions (Scheme 1). Trying to find suitable conditions for the dynamic process, KR and racemisation experiments were independently conducted. As occurred with prochiral 2-(2-oxopropyl)-benzotrioles,¹⁴ ADH-A from *Rhodococcus ruber* overexpressed in *E. coli* cells displayed outstanding activities in the bioreduction of racemic **2a**. For that reason this enzyme was chosen for studying in depth the KR experiments (Table 1).



Scheme 1. Chemical synthesis and kinetic resolution of ketone **2a** using *E. coli*/ADH-A cells.

Table 1. Kinetic resolution of racemic ketone **2a** catalysed by ADH-A using 2-propanol as co-substrate (5% v/v), NADH as cofactor in TRIS-HCl pH 7.5 buffer at 250 rpm for 24 h.

Entry	ADH-A (mg)	c (%) ^[a]	ee 2a (%) ^[a]	ee 3a (%) ^[b]	dr 3a ^[b]
1	10 mg	38	56	>99	>99:1
2	15 mg	41	59	>99	>99:1
3	25 mg	41	59	>99	>99:1
4	10+10 mg ^[c]	44	64	>99	>99:1
5	15 mg ^[d]	44	64	>99	>99:1
6	15 mg ^[e]	56	90	>99	>99:1

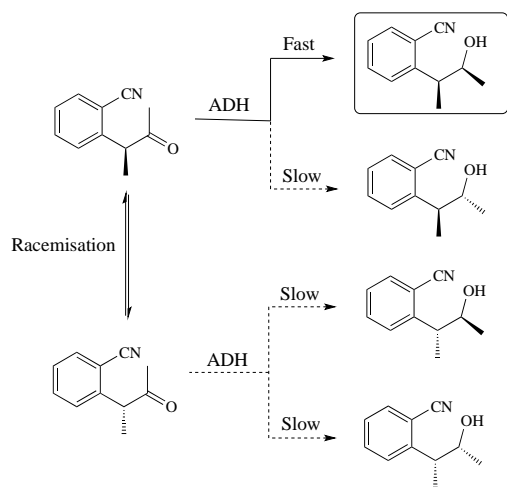
[a] Determined by chiral GC. [b] Determined by chiral HPLC after derivatisation to the 3,4-dihydroisocoumarin **4a** using an aqueous concentrated solution of HCl. [c] Additional 10 mg were added after 12 h. [d] 2-Propanol was used for a total concentration of 10% v/v. [e] Biphasic media with 5% of hexane.

[*] Mr. Juan Mangas-Sánchez, Dr. Eduardo Busto, Prof. Vicente Gotor and Dr. Vicente Gotor-Fernández
Organic and Inorganic Chemistry Department
University of Oviedo
Avenida Julián Clavería s/n
Fax: (+) 34 985 103451
E-mail: vicgotfer@uniovi.es

[**] We thank Dr. Wolfgang Kroutil for providing us ADH-A overexpressed in *E. coli* cells. Financial support of this work by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) through CTQ 2012-24237 project is grateful acknowledged. J.M.-S. thanks MICINN for a predoctoral fellowship (FPU Program).

Supporting information for this article is available on the WWW under <http://www.angewandte.org> or from the author.

Preliminary results showed that, after 24 h, *E. coli*/ADH-A was able to reduce **2a** with 38% of conversion and high enantioselectivity (entry 1). The remaining ketone **2a** was recovered in high *ee* (60%), showing that enzyme reacts exclusively with the (*S*)-enantiomer. Different experiments were performed in order to obtain higher conversions. First, the influence of the enzyme loading was analysed finding a slight improvement when using 15 mg (entry 2), unfortunately the use of higher amounts of the enzyme (25 mg, entry 3) did not provide better results. Interestingly, when the enzyme was added in portions, slightly better results were attained (entry 4) suggesting problems associated with the reversibility of the reaction or a possible inhibition effect by the product. To verify the correct hypotheses, additional 2-propanol and a hydrophobic solvent as hexane were used (entries 5 and 6). Any improvement of the conversion could be detected with higher amounts of 2-propanol discarding the problem of reversibility (entry 5). To our delight, the best conditions were obtained when using 5% of hexane as co-solvent (56% conversion, entry 6). The addition of a hydrophobic co-solvent improved the process since the organic phase acts as a reservoir for product and substrate, reducing its presence in the aqueous phase where the bioreduction takes place. To our surprise, conversion values and substrate *ee* did not fit with a classic KR model since **3a** was found in enantiopure form at conversion values higher than 50%. This unexpected behaviour could be easily explained considering a partial racemisation of the ketone caused by the acidity of the α -hydrogen to the carbonyl group (Scheme 2). Encouraged by this result, the racemisation step has been deeply studied to develop an efficient DKR process.



Scheme 2. General pathway of dynamic reductive kinetic resolutions (DYRKR).

Relative and absolute configurations were determined by NMR experiments (see supporting information). For the relative configuration, $^1\text{H-NMR}$ NOESY experiments were done showing space correlation between the two methyl groups in (+)-**4a**, confirming the *syn* disposition of the substituents. This correlates with the favoured addition of the hydride by NADH to the carbonyl group through the less hindered face, disposing both groups on the same side. Absolute configuration was assigned preparing the Mosher's ester derivative, concluding that the absolute configuration was *S,S* (see supporting information for further details).

Racemisation of the ketone was then investigated using enantioenriched alcohol (*R*)-**2a** obtained during KR studies (Table

2). First, KR conditions were attempted using TRIS-HCl buffer, 5% of 2-propanol as co-substrate and 5% of hexane observing a slight loss of the optical purity (entry 1). Nevertheless, this racemisation is not enough to perform a proper DKR where, at least, racemisation has to be 10 times faster than the conversion of the slow-reacting enantiomer in the kinetic resolution. On the other hand, this slightly decrease of *ee* may explain results observed in the KR optimisation. Then, different additives were assayed to improve the kinetic of the racemisation (entries 2-4). First, anion exchange resins were tested since, as previously reported in our group,¹⁵ they are efficient catalysts for the racemisation of 1-aryl-1-alkylacetones. Satisfyingly, DOWEX MWA-1 afforded the ketone **2a** in almost racemic form after 24 h in both aqueous or biphasic system (entries 2 and 3). Bearing in mind the biphasic media where KR was optimised, we envisaged a plausible racemisation in the hydrophobic phase so an organic base, triethylamine, was tested, affording total racemisation after 24 h (entry 4).

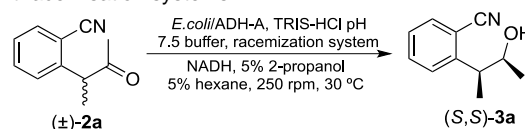
Table 2. Racemisation of (*R*)-**2a** using different additives, 2-propanol as co-substrate (5% v/v) in TRIS-HCl pH 7.5 buffer for 24 h at 30 °C and 250 rpm.

Entry	Additive	Initial <i>ee</i> 2a (%) ^[a]	Final <i>ee</i> 2a (%) ^[a]
1	5% hexane	60	54
2	Dowex MWA-1	66	6
3	5% hexane + Dowex MWA-1	57	5
4	5% hexane + 1% NEt ₃	63	0

[a] Determined by chiral GC.

Once that both KR and racemisation were independently optimised, they were combined in a whole dynamic process (Table 3). First, best conditions of both were brought together, using lyophilised *E. coli*/ADH-A cells, 5% of hexane, 2-propanol as co-substrate (5% v/v), triethylamine as racemisation system and NADH as cofactor in TRIS-HCl pH 7.5 buffer.

Table 3. Dynamic reductive kinetic resolution of ketone **2a** using different racemisation systems.



Entry	Racemisation system	<i>t</i> (h)	<i>ee</i> 2a (%) ^[a]	<i>ee</i> 3a (%) ^[b]	<i>dr</i> 3a ^[b]	<i>c</i> (%) ^[a]
1	1% NEt ₃	44	45	>99	>99:1	81
2	1% NEt ₃	72	45	>99	>99:1	85
3	2% NEt ₃	70	0	>99	>99:1	77
4	3% NEt ₃	70	0	>99	>99:1	45
5	Dowex MWA-1	24	81	>99	>99:1	63
6	Dowex MWA-1	92	13	>99	>99:1	86

[a] Determined by chiral GC. [b] Determined by chiral HPLC after derivatisation to the 3,4-dihydroisocoumarin **4a** using an aqueous concentrated solution of HCl.

After 44 h, 81% conversion was reached, obtaining (*S,S*)-**3a** as single diastereomer and in enantiopure form. However, substrate **2a** was obtained in 45% *ee* and longer reaction times do not improve significantly the process (entry 2). These results suggest that the

racemisation system is not completely effective for a total conversion into (*S,S*)-**3a**. Unfortunately, higher quantities of triethylamine led to enzyme inactivation (entries 3 and 4). Because of the good results previously obtained with the DOWEX MWA-1 anion exchange resin towards the racemisation of ketone **2a** (entries 2 and 3, Table 2), this system was subjected to study. After 24 h, 63% conversion of enantiopure alcohol (*S,S*)-**3a** was reached, obtaining **2a** in 81% *ee* (entry 5). Satisfyingly, both biocatalyst and racemisation system remained active after long reaction times, leading to an efficient DYRKR with 86% conversion after 92 h (entry 6).

With the optimised conditions for the model substrate (\pm)-**2a**, the scope of the methodology was then examined. Ketones (\pm)-**2b-g** were prepared by alkylation of different 1-arylacetonates **1b-g** in moderate to good yields (53–78%, see supporting information). In all cases, good to excellent conversions were reached after 72 h (Table 4), obtaining the enantiopure alcohols (*S,S*)-**3b-g** with a perfect diastereomeric ratio. The presence of different substituents in the aromatic ring (R^1) or in the chiral centre (R^2), does not affect the enzyme selectivity, demonstrating the scope of the methodology; albeit differences in conversions may be explained by the influence they have in the racemisation rate.

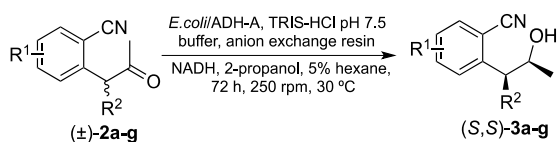
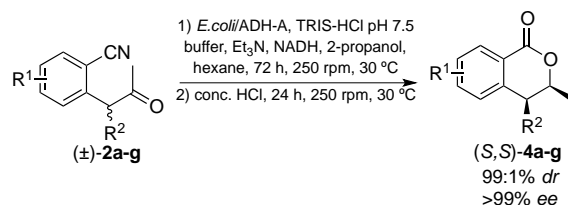


Table 4. Dynamic reductive kinetic resolution of racemic ketones **2a-g** using *E. coli*/ADH-A cells as biocatalysts

Entry	Substrate	R^1	R^2	<i>c</i> (%) ^[a]	<i>ee</i> 3a (%) ^[b]	<i>dr</i> 3a ^[b]
1	2a	H	Me	86 (93)	>99	>99:1
2	2b	4-Me	Me	72 (51)	>99	>99:1
3	2c	5-OMe	Me	77 (53)	>99	>99:1
4	2d	5-Me	Me	93 (59)	>99	99:1
5	2e	4-F	Me	95 (24)	>99	99:1
6	2f	H	Et	87 (67)	>99	>99:1
8	2g	H	allyl	96 (67)	>99	99:1

[a] Determined by chiral GC. Isolated yield in brackets [b] Determined by chiral HPLC after derivatisation to the corresponding 3,4-dihydroisocoumarin **4a-g** using an aqueous concentrated solution of HCl.

Finally, once the dynamic process was studied and optimised, we focused in the development of a one-pot methodology for the preparation of the target molecules in enantiopure form (Scheme 3). Reactions were initially performed using 15 mg of substrate and both racemisation systems. At this scale, Et_3N system showed excellent reliability compared to the anion exchange resin where many phases are involved. Therefore, scale-ups (0.3 mmol) were performed using the Et_3N -catalysed racemisation system at 30 °C and 250 rpm for 72 h. Then, concentrated HCl was added and reactions were shaken for additionally 24 h, affording in all cases enantio- and diastereomerically pure 4-alkyl-3-methyl-3,4-dihydroisocoumarins (*S,S*)-**4a-g** (24–93% overall isolated yields). It is noteworthy the case of (*S,S*)-**4e** ($R=4-F$) where the isolated yield is very low in comparison with the rest of substrates. In this case, the formation of the corresponding carboxylic acid is preferred, obtaining (*S,S*)-**4e** in poor yield (24%).



Scheme 3. One pot synthesis of 4-alkyl-3-methyl-3,4-dihydroisocoumarines in enantiopure form.

In summary, a straightforward method has been described for the transformation of a series of racemic ketones into benzofused lactones as single diastereomers and in enantiopure form. Remarkably, two new stereogenic centers were created starting from a prochiral ketone in a one-pot transformation by means of dynamic kinetic reductive resolution processes catalysed by *E. coli*/ADH-A followed by intramolecular cyclisation reaction.

Experimental Section

General procedure for the synthesis of racemic ketones **2a-g**.¹⁶

To a solution of the corresponding ketone **1a-g** (1 mmol) in a biphasic mixture of CH_2Cl_2 (500 μ L, 2 M) and NaOH 2 M (500 μ L, 2 M), tetrabutylammonium bisulfate (340 mg, 1 mmol) and the corresponding alkyl iodide (1.2 mmol) were added. The reaction mixture was stirred at 40 °C for 2 h until no starting material was detected by TLC analysis. The mixture was extracted afterwards with CH_2Cl_2 (3 x 10 mL), the organic layers were collected, dried over Na_2SO_4 , filtered and the solvent evaporated under reduced pressure. The crude was then purified by flash chromatography (50% Et_2O /Hexane), affording the corresponding alkyl ketones **2a-g** in moderate to good yields (57–78 %).

General procedure for the one-pot synthesis of 4-alkyl-3-methylisochroman-1-ones **4a-g**.

To a solution containing rehydrated *E. coli*/ADH-A cells (425 mg/mmol, 128 mg) in TRIS-HCl 50 mM pH 7.5 buffer (0.02 M, 13.35 mL), isopropyl alcohol (5% v/v, 750 μ L), hexane (5% v/v, 750 μ L), Et_3N (1% v/v, 150 μ L), NADH (1 mM, 10.5 mg) and the corresponding ketone **2a-g** (0.3 mmol) were successively added. The reaction was shaken for 72 h and 250 rpm and then hydrochloric acid was added (37%, 0.02 M, 15 mL) and the mixture was shaken overnight at 30 °C. The reaction was centrifuged and extracted with $EtOAc$ (3 x 25 mL), organic layers were collected, dried over Na_2SO_4 , filtered, the solvent was evaporated under reduced pressure and the crude purified by flash chromatography (50% Et_2O /Hexane) to afford the corresponding enantiopure lactones **4a-g** in low to excellent yields (24–93%).

Received: ((will be filled in by the editorial staff))

Published online on ((will be filled in by the editorial staff))

Keywords: Asymmetric synthesis • Dynamic reductive kinetic resolution • Enzyme catalysis • Isocoumarines • Ketoreductases

-
- [1] a) C. M. Chouthier, J. N. Pelletier, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585-1605; b) G.-W. Zheng, J.-H. Xu, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 784-792; c) T. Hudlicky, J. W. Reed, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3117-3132.
- [2] a) H.-P. Meyer, E. Eichhorn, S. Hanlon, S. Lütz, M. Schürmann, R. Wohlgemuth, R. Coppolecchia, *Catal. Sci. Technol.* **2013**, *3*, 29-40; b) H. Gröger, Y. Asano, U. T. Bornscheuer, J. Ogawa, *Chem. Asian J.* **2012**, *7*, 1138-1153; c) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185-194; d) S. Wenda, S. Illner, A. Mell, U. Kragl, *Green Chem.* **2011**, *13*, 3007-3047.
- [3] a) A. Kamal, M. A. Azhar, T. Krishnaji, M. S. Malik, S. Azeeda, *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 569-592; b) E. Fogassy, M. Nógrádi, D. Kozma, G. Egri, E. Pálóvics, V. Kiss, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3011-3030.
- [4] See for instance recent bibliographic revisions: a) P. Hoyos, V. Pace, A. R. Alcántara, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 2585-2611; b) H. Pellisier, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3769-3802; c) J. H. Lee, K. Han, M.-J. Kim, J. Park, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 999-1015.
- [5] G. de Gonzalo, M. Mihovilovic, M. W. Fraaije, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2208-2231.
- [6] M. M. Musa, R. S. Phillips, *Catal. Sci. Technol.* **2011**, *1*, 1311-1323.
- [7] a) S. Lüdeke, M. Richter, M. Müller, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 253-259; b) A. Ji, M. Wolberg, W. Hummel, C. Wandrey, M. Müller, *Chem. Commun.* **2001**, 57-58; c) M. Wolberg, A. Ji, W. Hummel, M. Müller, *Synthesis* **2001**, 937-942.
- [8] B. D. Feske, I. A. Kaluzna, J. D. Stewart, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9654-9657
- [9] a) A. Cuetos, A. Rioz-Martínez, F. R. Bisogno, B. Grischek, I. Lavandera, G. de Gonzalo, W. Kroutil, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 1743-174; b) S. K. Padhi, I. A. Kaluzna, D. Buisson, R. Azerad, J. D. Stewart, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2133-2138; c) D. Kalaitzakis, S. Kambourakis, J. D. Rozzell, I. Smonou, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2418-2426; d) D. Zhu, C. Mukherjee, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, L. Hua, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 901-905; e) D. Kalaitzakis, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, I. Smonou, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4799-4801; f) I. A. Kaluzna, T. Matsuda, A. K. Sewell, J. D. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12827-12832; g) N. Nakamura, T. Miyai, K. Ushio, S. Oka, A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*, 2089-2093.
- [10] a) D. Giacomini, P. Galletti, A. Quintavalla, G. Gucciardo, F. Paradisi, *Chem. Commun.* **2007**, 4038-4040; b) P. Galletti, E. Emer, G. Gucciardo, A. Quintavalla, M. Pori, D. Giacomini, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4117-4123.
- [11] a) G. A. Applegate, R. W. Cheloha, D. L. Nelson, D. B. Berkowitz, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2420-2422; b) J. A. Friest, Y. Maezato, S. Broussy, D. L. Nelson, D. B. Berkowitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5930-5931;
- [12] a) P. Jiao, J. B. Gloer, J. Campbell, C. A. Shearer, *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 612-615; b) C. Zidorn, U. Lohwasser, S. Pschorr, D. Salvenmoser, K.-H. Ongania, E. P. Ellmerer, A. Börner, H. Stuppner, *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1691-1697; c) K. Umehara, M. Matsumoto, M. Nakamura, T. Miyase, M. Kuroyanagi, H. Noguchi, *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 566-567.
- [13] A. Rioz-Martínez, G. de Gonzalo, D. E. Torres-Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2073-2076.
- [14] J. Mangas-Sánchez, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2*, 1590-1595.
- [15] C. Rodríguez, G. de Gonzalo, A. Rioz-Martínez, D. E. Torres Pazmiño, M. Fraaije and V. Gotor, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1121-1125.
- [16] A. J. Fry, J. P. Bajanauskas, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3157-3167.
-

CONCLUSIONES

Como conclusiones generales a esta Tesis Doctoral se puede decir que se han desarrollado diferentes metodologías para la preparación asimétrica de productos farmacéuticos y moléculas de alto valor añadido empleando para ello procesos biocatalíticos.

En el primer capítulo, se ha llevado a cabo la preparación estereoselectiva del fármaco Rivastigmina, obteniéndose en forma enantiopura y con buenos rendimientos aislados en cada uno de los pasos de reacción. Además se ha optimizado un proceso de resolución cinética dinámica usando un catalizador de rutenio para llevar a cabo la racemización del enantiómero desfavorecido en la resolución. También se estudió con éxito tanto el reciclaje del enzima como el escalado de la reacción en vista a la aplicabilidad industrial del proceso.

En el segundo capítulo, se prepararon en forma enantiopura los enantiómeros de los antifúngicos Miconazol y Econazol mediante un proceso de biorreducción catalizado por la ADH-A de *Rhodococcus ruber*. Además se llevaron a cabo ensayos de inhibición del

Conclusiones

crecimiento de diferentes levaduras y hongos para estudiar el diferente comportamiento que presentan los enantiómeros de un fármaco.

En el tercer capítulo, enfocado a la preparación estereoselectiva de 2,3-dihidrobenzofuranos, se llevó a cabo el estudio tanto de biorreducción de 1-arilacetonas como de resolución cinética de los correspondientes alcoholes racémicos. A partir de los precursores enantiopuros obtenidos mediante procesos de ciclación molecular, se llegó a los heterociclos de interés sin pérdida de la pureza óptica.

En el cuarto capítulo se prepararon con éxito una familia de 3-metilisobenzofuran-1(3*H*)-onas mediante un proceso de biorreducción catalizado por la levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*). Este biocatalizador mostró ser el más efectivo ya que las cetonas precursoras presentaron una gran inestabilidad en pH neutro-básicos. A partir de los alcoholes obtenidos en forma enantipura se llegó a los productos finales con éxito tras ciclación intramolecular.

En el quinto capítulo se ha desarrollado un método divergente para la preparación de 3,4-dihidroisocumarinas y 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolinas en forma enantiopura. En este caso, la ADH-A de *Rhodococcus ruber* sobreexpresada en *E. coli* mostró ser un biocatalizador adecuado para la biorreducción de las cetonas precursoras. Posteriormente, aprovechando la doble funcionalidad presente en los compuestos obtenidos, se pudo llegar a las dos familias de compuestos deseados con buenos rendimientos y excelentes excesos enantioméricos.

Finalmente, en el sexto capítulo, se ha desarrollado un proceso “one-pot” para la preparación de 4-alkil-3-metil-3,4-dihidroisocumarinas mediante una resolución cinética dinámica reductiva catalizada por *E. coli*/ADH-A y una resina de intercambio aniónico o una base, seguido de una ciclación intramolecular en condiciones ácidas. Se obtienen los compuestos deseados con buenos rendimientos en forma diastereo- y enantiopura, demostrando la enorme capacidad que poseen los métodos biocatalíticos para generar varios centros estereogénicos en un solo paso.

PARTE EXPERIMENTAL

DISOLVENTES Y REACTIVOS GENERALES

La lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (Novozyme SP-435L, CAL-B, 7300 PLU/g) inmovilizada por adsorción sobre Lewatit E fue donada por Novozymes. La lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre partículas de cerámica (PSL-C, 1019 U/g) y la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (AK, 22100 U/mg) fueron adquiridas a Sigma-Aldrich. Las lipasas de páncreas porcino (PPL, 46 U/mg) y de *Candida cylindracea* (CCL, 1.41 U/mg) son comercializadas por Sigma. La lipasa de *Candida antarctica* de tipo A (CAL-A, 2.6 U/mg de sólido) se adquirió a Codexis. Las lipasas de *Candida rugosa* (CRL, 1.41 U/g) y *Candida cylindracea* (CCL, 1.41/mg de sólido) se obtuvieron de Sigma. Las lipasas de *Rhizomucor miehei* (RM, 150 IUN/g) y de *Thermomyces lanuginosus* (TLL, 250 IUN/g) se compraron a Novozymes y la alcalasa (476 U/g) se adquirió a CLEA technologies. La lipasa de *Chromobacterium viscosum* (CVL, 3800 U/mg de sólido) ha sido donada por Genzyme Co.

Experimental

Las alcohol deshidrogenasas de *Thermoanaerobacter species* (ADH-T, 750 U/mL), *Lactobacillus brevis* (ADH-LB, 300 U/mL), ADH de *Candida parapsilosis* (ADH-CP, 30 U/mL), ADH-PR2 (0.13 U/mg), ADH-RS1 (274 U/mL) y ADH-A de *Rhodococcus ruber* (18 U/mg) fueron obtenidas a través de Codexis Inc. La ADH de *Lactobacillus kefir* (LK, 0.42 U/mg) fue adquirida a Fluka. La ADH-A sobreexpresada en células de *E. coli* BL21 fue donada por el Prof. Wolfgang Kroutil de la Universidad de Graz. Las células se crecieron en un medio LB con ampicilina como antibiótico (1 L, 100 mg/L) a 30 °C y 250 rpm durante 24 h. A continuación se añadió ampicilina adicional (50 mg/L), ZnCl₂ (100 mg/L) y isopropyl tiogalactósido (IPTG, 450 mg/L) y se dejó agitando 24 h a 20 °C. Las células se centrifugaron y se lavaron y se resuspendieron en una disolución tampón de fosfato (pH 7.5, 50 mM), se congelaron con nitrógeno líquido y se liofilizaron. Las células obtenidas se guardaron a 4 °C. La levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*) fue adquirida en Aldrich.

Todos los demás reactivos se adquirieron a Acros Organics, Aldrich, Fluka o Merck, sin ser necesarios tratamientos previos para su purificación.

Los disolventes empleados fueron sometidos previamente a un tratamiento de secado, almacenándose bajo atmósfera de nitrógeno. El TBME, Et₂O, tolueno, DME, 1,4-dioxano y el THF fueron secados sobre sodio empleando como indicador benzofenona, mientras que el acetonitrilo, DMF, CH₂Cl₂ y el MeOH fueron secados sobre hidruro cálcico.

TÉCNICAS DE ANÁLISIS

Cromatografía

Para la cromatografía en capa fina se han utilizado cromatofolios de gel de sílice POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄ (0.25 mm de espesor) comercializados por Merck, los cuales llevan incorporado un revelador ultravioleta. Como revelador se utilizó una disolución acuosa al 1% de KMnO₄, 5% de K₂CO₃ y un 5% de NaOH.

Para la cromatografía de columna se empleó gel de sílice 60 (230-240 Mesh) adquirida a Merck.

Los análisis mediante cromatografía de gases se realizaron utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890, una columna de relleno aquiral HP-1 (30 m 0.32 mm 0.25 m) y las columnas de relleno quiral CP-Chiralsil-DEX-CB (25 m x 0.25 mm x 0.25 μ m, 12.2 psi N₂) y Rt- β -dexe (30 m 0.25 mm I.D.)

Los análisis mediante la técnica de HPLC se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 y las columnas de relleno quiral Chiralcel OD (25 x 0.46 cm), Chiralpak AS (25 cm x 4.6 mm I.D.), Chiralpak IA (25 cm x 4.6 mm I.D.), Chiralpak IC (25 cm x 4.0 mm I.D.), Chiralcel OB-H (25 cm x 4.6 mm I.D.), Chiralcel OJ-H (25 cm x 4.6 mm I.D.). La detección se efectuó en un detector visible-ultravioleta a 210 y 215 nm. Como fase móvil se emplearon mezclas de hexano/2-propanol.

Espectroscopia infrarroja (IR)

Se registraron los espectros en un espectrómetro Varian 1000 FT-IR empleando pastillas de NaCl o de KBr para muestras sólidas. Las bandas de tensión se indican en valores de ν máxima y se expresan en cm^{-1} .

Puntos de fusión

Los puntos de fusión se han llevado a cabo con un aparato Gallenkamp en tubos capilares abiertos y por tanto sus valores no están corregidos.

Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)

El cálculo de las masas exactas de los compuestos orgánicos obtenidos se llevaron a cabo con un espectrómetro BrukerMicroTofQ empleando las técnicas de ESI⁺, ESI⁻ o EI⁺. Los valores se refieren a unidades de masa atómica (uma).

Experimental

Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y secuencia de pulsos DEPT han sido realizados con espectrómetros Bruker AV-300 (300.13 MHz para ^1H y 75.5 MHz para ^{13}C), Bruker DPX-300 (300.13 MHz para ^1H y 75.5 MHz para ^{13}C) y para los experimentos a diferentes temperaturas un espectrómetro Bruker AV-400 (400.13 MHz para ^1H y 100.6 MHz para ^{13}C). Con el espectrómetro Bruker AV-300 se llevaron a cabo los siguientes experimentos bidimensionales.

Correlaciones homonucleares escalares (^1H - ^1H) con una secuencia de pulsos COSY.

Correlaciones homonucleares bipolares (^1H - ^1H) con una secuencia de pulsos NOESY.

Correlaciones heteronucleares escalares (^1H - ^{13}C) a través de varios enlaces con una secuencia HMBC.

Correlaciones heteronucleares escalares (^1H - ^{13}C) a través de un enlace con una secuencia HSQC.

Los desplazamientos químicos se dan en valores de δ en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento en Hertzios (Hz).

Rotación óptica específica

Para la medida de las rotaciones específicas se ha utilizado un polarímetro Perkin-Elmer 241. Los valores se dan en unidades $10^{-1} \text{ cm}^2 \times \text{grado} \times \text{g}^{-1}$.

REFERENCIAS

- ¹ P. J. Dunn. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1452-1461.
- ² R. A. Sheldon. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1437-1451.
- ³ A. Ghanem. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1721-1754.
- ⁴ A. Zaks, A. M. Klivanov. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 3192-3196.
- ⁵ (a) G. Carrea, S. Riva. *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Medium*. Wiley-VCH. Weinheim, **2008**; (b) S. Hazarika, P. Goswami, N. N. Dutta, A. K. Hazarika. *Chem. Eng. J.* **2002**, *85*, 61-68; (c) A. M. Azevedo, D. M. F. Prazeres, J. M. S. Cabral, L. P. Fonseca, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *15*, 147-153; (d) H. Sztajer, H. Lunsdorf, H. Erdmann, U. Menge, R. Schmid. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1124*, 253-261; (e) A. Zaks, A. M. Klivanov. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 3194-3201.
- ⁶ V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales. *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*. Willey-VCH. Weinheim, **2008**.
- ⁷ S. E. Hilner, A. R. Maguire. *Arkivoc* **2012** (*i*), 321-382.
- ⁸ Algunas revisiones recientes: (a) U. T. Bornscheuer. *Synlett* **2013**, *24*, 150-156; (b) M. B. Quin, C. Schmidt-Dannert. *ACS Catal.* **2011**, *1*, 1017-1021; (c) G. A. Behrens, A. Hummel, S. K. Padhi, S. Schätzle, U. T. Bornscheuer. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2191-2215; (d) S. Lutz. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 734-743; (e) C. Jäckl, D. Hilvert. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 753-759.
- ⁹ M. T. Reetz. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7530-7548.
- ¹⁰ (a) M. Svedendahl, C. Brannenby, L. Lindberg, P. Berglund. *ChemCatChem* **2010**, *2*, 976-980; (b) K. Engström, J. Nyhlén, A. G. Sandström, J.-E. Bäckvall. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7038-7042.
- ¹¹ K. Faber. *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6^a Ed. Springer, Berlin, **2011**.
- ¹² (a) M. S. Humble, P. Berglund. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3391-3401; (b) Q. Wu, B.-K. Liu, X.-F. Lin. *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 1966-1988; (c) K. Hult, P. Berglund. *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 232-238.
- ¹³ E. Busto, V. Gotor-Fernández. V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504-4523.
- ¹⁴ R. Verger. *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 32-38.
- ¹⁵ U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas. *Hydrolases in Organic Synthesis*, 2^a Ed. Wiley-VCH, Weinheim **2005**.
- ¹⁶ V. Gotor- Fernández, R. Brieva, V. Gotor. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *40*, 111-120.

Referencias

- ¹⁷ (a) V. Gotor-Fernández, V. Gotor. *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*. (Eds. V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales). Wiley-VCH. Weinheim, **2008**, Capítulo 7. pp. 171-192; (b) V. Gotor. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2189-2197.
- ¹⁸ A. Ghanem, H. Y. Aboul-Eneim. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3331-3351.
- ¹⁹ S. Lutz. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2743-2748.
- ²⁰ (a) Q. Jing, R. J. Kazlauskas. *Chirality* **2008**, *20*, 724-735; (b) M. Cygler, P. Grochulski, R. J. Kazlauskas, J. D. Schrag, F. Bouthillier, B. Rubin, A. N. Serrequi, A. K. Gupta. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3180-3186; (c) R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665.
- ²¹ V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 797-812.
- ²² (a) T. Schulz, J. Pleiss, R. D. Schmid. *Protein Sci.* **2000**, *9*, 1053-1062; (b) K. Lemke, M. Lemke, F. Theil. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6266-6273; (c) K. K. Kim, H. K. Song, D. H. Shin, K. Y. Hwang, S. W. Suh. *Structure* **1997**, *5*, 173-185.
- ²³ R. C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *64*, 1-22.
- ²⁴ K. Nagaoka, Y. Yamada. *Agric. Biol. Chem.* **1973**, *37*, 2791-2796.
- ²⁵ X.Y. Wu, S. Jaaskelainen, Y.-Y. Linko. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1996**, *59*, 145-158.
- ²⁶ (a) A. Salis, M. Pinna, M. Monduzzi, V. Solinas. *J. Biotechnol.* **2005**, *119*, 291-299; (b) L. A. Nelson, T. A. Foglia, W. N. Marmer. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1996**, *73*, 1191-1195.
- ²⁷ (a) A. R. Moen, R. Karstad, T. Anthonsen. *Biocatal. Biotransform.* **2005**, *23*, 45-51; (b) R. P. C. Cousins, M. Mahmoudian, P. M. Youds. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 393-396.
- ²⁸ P. A. Frey, A. D. Hegeman. *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Oxford University Press. New York, **2007**.
- ²⁹ (a) B. Kosjek, W. Stampfer, M. Pogorevc, W. Goessler, K. Faber, W. Kroutil. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *86*, 55-62; (b) O. Danielsson, S. Atrian, T. Luque, L. Hjelmquist, R. González-Duarte, H. Jörnvall. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1994**, *91*, 4980-4984.
- ³⁰ N. H. Schlieben, K. Niefind, J. Müller, B. Riebel, W. Hummel, D. Schomburg. *J. Mol. Biol.* **2005**, *349*, 801-813.
- ³¹ Revisiones recientes: (a) K. Robins, A. Osorio-Lozada. *Catal. Sci. Technol.* **2012**, *2*, 1524-1530; (b) M. M. Musa, R. S. Phillips. *Catal. Sci. Technol.* **2011**, *1*, 1311-1323; (c) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, D. Holtmann. *Green Chem.* **2011**, *13*, 2285-2313.
- ³² V. Prelog. *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*, 119-130.
- ³³ (a) K. Goldberg, K. Schroer, S. Lütz, A. Liese. *Appl. Microb. Biotechnol.* **2007**, *76*, 237-248; (b) S. M. A. de Wildeman, T. Sonke, H. E. Schoemaker, O. May. *Acc. Chem. Res.* **2007**,

- 40, 1260-1266; (c) W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber. *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 125-142.
- ³⁴ (a) M. Eckstein, T. Daußmann, U. Kragl. *Biocatal. Biotransform.* **2004**, *22*, 89-96; (b) J. Grunwald, B. Wirz, M. P. Scollar, A. M. Klivanov. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6732-6734.
- ³⁵ J. B. Dumas. *Ann. Chim. Phys.* **1874**, *5*.
- ³⁶ V. Crocq, C. Masson, J. Winter, C. Richard, G. Lemaitre, J. Lenay, M. Vivat, J. Buendia, D. Prat. *Org. Proc. Res. Dev.* **1997**, *1*, 2-13.
- ³⁷ S. Servi. *Synthesis* **1990**, 1-25.
- ³⁸ W. Stampfer, B. Kosjek, C. Moitzi, W. Kroutil, K. Faber. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1014-1017.
- ³⁹ K. Edegger, C. C. Gruber, T. M. Poessl, S. R. Wallner, I. Lavandera, K. Faber, F. Niehaus, J. Eck, R. Oehrlein, A. Hafner, W. Kroutil. *Chem. Commun.* **2006**, 2402-2404.
- ⁴⁰ G. de Gonzalo, I. Lavandera, K. Faber, W. Kroutil. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2163-2166.
- ⁴¹ A. Cuetos, M. L. Valenzuela, I. Lavandera, V. Gotor, G. A. Carriedo. *Biomacromolecules* **2010**, *11*, 1291-1297.
- ⁴² C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. Sih. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294-7299.
- ⁴³ A. J. J. Straathof, J. A. Jongejan. *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *21*, 559-571.
- ⁴⁴ Revisiones recientes: (a) P. Hoyos, V. Pace, A. R. Alcántara. *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 2585-2611; (b) H. Pellisier. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3769-3802; (c) H. Pellisier. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 659-676 (d) J. H. Lee, K. Han, M.-J. Kim, J. Park. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 999-1015.
- ⁴⁵ K. Drauz, H. Gröger, O. May. *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. Willey-VCH. Weinheim, **2012**.
- ⁴⁶ (a) J. H. Choi, Y. K. Choi, Y.H. Kim, E. S. Park, M. J. Kim, J. Park. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1972-1977; (b) J. H. Choi, Y. H. Kim, S. H. Nam, S. T. Shin, M. J. Kim, J. Park. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2373-2376; (c) B. A. Persson, A. L. E. Larsson, M. Le Ray, J. E. Bäckvall. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1645-1650; (d) A. L. E. Larsson, B. A. Persson, J. E. Bäckvall. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1211-1212; (e) P. M. Dinh, J. A. Howarth, A. R. Hudnott, J. M. J. Williams, W. Harris. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7623-7626.
- ⁴⁷ (a) B. Martín-Matute, K. Bogar, M. Edin, F. B. Kaynak, J. E. Bäckvall. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 5832-5842.; (b) B. Martín-Matute, M. Edin, K. Bogar, J. E. Bäckvall. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6535-6539.

Referencias

- ⁴⁸ S. Gastaldi, S. Escoubet, N. Vanthuyne, G. Gil, M. P. Bertrand. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 837-839.
- ⁴⁹ (a) P. D'Arrigo, L. Cerioli, A. Fiorati, S. Servi, F. Viani, D. Tessaro. *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 938-944; (b) L. El Blidi, M. Nechab, N. Vanthuyne, S. Gastaldi, M. P. Bertrand, G. Gil. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2902-2904; (c) B. Schnell, K. Faber, W. Kroutil. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 653-666; (d) O. May, S. Verseck, A. Bommarious, K. Drauz. *Org. Proc. Res. Dev.* **2002**, *6*, 452-457.
- ⁵⁰ C. Rodríguez, G. de Gonzalo, A. Rioz-Martínez, D. E. Torres-Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1121-1125.
- ⁵¹ E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, PR110-PR180 (Actualización de la revisión bibliográfica anterior: E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 313-354).
- ⁵² El alcohol obtenido será de configuración *S* siempre que el grupo grande unido a la cetona presente tenga también la prioridad siguiendo las reglas de nomenclatura de Cahn-Ingold-Prelog (CIP).
- ⁵³ T. Matsuda, R. Yamanaka and K. Nakamura. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 513-517.
- ⁵⁴ (a) A. Cuetos, A. Rioz-Martínez, F. R. Bisogno, B. Grischek, I. Lavandera, G. de Gonzalo, W. Kroutil, V. Gotor. *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 1743-1749; (b) D. Kalaitzakis, S. Kambourakis, J. D. Rozzell, I. Smonou. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2418-2426 (c) S. K. Padhi, I. A. Kaluzna, D. Buisson, R. Azerad, J. D. Stewart. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2133-2138; (d) D. Zhu, C. Mukherjee, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, L. Hua. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 901-905; (e) D. Kalaitzakis, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, I. Smonou. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4799-4801; (f) I. A. Kaluzna, T. Matsuda, A. K. Sewell, J. D. Stewart. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12827-12832; (g) K. Nakamura, Y. Kawai, T. Miyai, S. Honda, N. Nakayima, A. Ohno. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 1467-1470; (h) N. Nakamura, T. Miyai, K. Ushio, S. Oka, A. Ohno. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*, 2089-2093.
- ⁵⁵ (a) J. A. Friest, Y. Maezato, S. Broussy, P. Blum, D. B. Berkowitz. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5930-5931; (b) D. Giacomini, P. Galletti, A. Quintavalla, G. Gucciardo, F. Paradisi. *Chem. Comm.* **2007**, *43*, 4038-4040.
- ⁵⁶ (a) C. M. Chouthier, J. N. Pelletier, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585-1605; (b) T. Hudlicky, J. W. Reed, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3117-3132.; (c) A. Mitchinson, J. Finkelstein. *Nature* **2008**, *455*, 303.

- ⁵⁷ (a) W. J. W. Watson. *Green Chem.* **2012**, *14*, 251-259; (b) R. Singh. *Org. Proc. Res. Dev.* **2011**, *15*, 175-179; (c) H.-P. Meyer, E. Eichhorn, S. Hanlon, S. Lütz, M. Schürmann, R. Wohlgemuth, R. Coppolecchia, *Catal. Sci. Technol.* **2013**, *3*, 29-40.
- ⁵⁸ T. W. Johannes, H. Zhao. *Curr. Opin. Microbiol.* **2006**, *9*, 261-267.
- ⁵⁹ (a) S. Sánchez, A. L. Demain. *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 224-230; (b) D. J. Pollard, J. M. Woodley. *Trends Biotech* **2007**, *25*, 66-72.
- ⁶⁰ R. C. Simon, F. G. Mutti, W. Kroutil, *Drug. Discov. Today: Technol.* **2012**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddtec.2012.08.002>.
- ⁶¹ R. N. Patel. *ACS Catal.* **2011**, *1*, 1056-1074.
- ⁶² B. Kasprzyk-Hordern. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4466-4503.
- ⁶³ A. Nguyen, H. He, C. Pham-Huy. *Int. J. Biomed. Sci.* **2006**, *2*, 85-100
- ⁶⁴ M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788-824.
- ⁶⁵ (a) E. Francotte, W. Lindner. *Chirality in Drug Research*. Wiley VCH, **2006**; (b) H. Caner, E. Groner, L. Levy, I. Agranat. *Drug Discov. Today* **2004**, *9*, 105-110. (c) P. Baumann, D. F. Zullino, C. B. Eap. *Eur. Neuropsychopharmacol.* **2002**, *12*, 433-444.
- ⁶⁶ H. Murakami. *Top. Curr. Chem.* **2007**, *269*, 273-299.
- ⁶⁷ A. Kamal, G. B. Ramesh-Khanna, R. Ramu, T. Krishnaji, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4783-4787.
- ⁶⁸ A. Träff, R. Lihammar, J.-E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 3917-3921.
- ⁶⁹ (a) J. Magano, J. R. Dunetz. *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16*, 1156-1184; (b) D. Muñoz-Solano, P. Hoyos, M. J. Hernáiz, A. R. Alcántara, J. M. Sánchez-Montero. *Bioresource Technol.* **2012**, *115*, 196-207.
- ⁷⁰ A. O. King, E. G. Corley, R. K. Anderson, R. D. Larsen, T. R. Verhoevem, P. J. Reider, Y. B. Xiang, M. Belley, Y. Leblanc, M. Labelle, P. Prasit, R. J. Zamboni. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3731-3735.
- ⁷¹ D. Rozell, J. Liang. *Speciality Chemicals Magazine* **2008**, 36-38.
- ⁷² K. B. Hansen, Y. Hsiao, F. Xu, N. Rivera, A. Clausen, M. Kubryk, S. Krska, T. Rosner, B. Simmons, J. Balsells, N. Ikemoto, Y. Sun, F. Spindler, C. Malan, E. J. J. Grabowski, J. D. Armstrong. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8798-8804.
- ⁷³ C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes. *Science* **2010**, *16*, 305-309.

Referencias

- ⁷⁴ M. D. Truppo, H. Strotman, G. Hughes. *ChemCatChem* **2012**, *4*, 1071-1074.
- ⁷⁵ R. Wohlgenuth. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 713-724.
- ⁷⁶ (a) A. L. F. Chan, Y. W. Chien, S. I. Lin. *Drugs Aging* **2008**, *25*, 761-775; (b) G. T. Grossberg, *Drugs Aging* **2008**, *25*, 573-584.
- ⁷⁷ C. M. Spencer, S. Noble. *Drugs Aging* **1998**, *13*, 391-411.
- ⁷⁸ (a) J. Henar, A. Overeem, T. Lambertus. *WO 2008/037433 A1*; (b) Z-H. Wang, S. E. Horne, K. S. K. Murthy, *WO 2007/098573T*.
- ⁷⁹ A. A. Boezio, J. Pytkowicz, A. Côté, A. B. Charette. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14260-14261.
- ⁸⁰ M. Fuchs, D. Koszelewski, K. Tauber, W. Kroutil, K. Faber. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5500-5502.
- ⁸¹ M. Fuchs, D. Koszelewski, K. Tauber, J. Sattler, W. Banko, A. K. Holzer, M. Pickl, W. Kroutil, K. Faber. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7691-7694.
- ⁸² (a) A. Ghanem. H. Y. Aboul-Eneim, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3331-3351; (b) A. Ghanem. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 1721-1754.
- ⁸³ (a) Q. Chen, C. Yuan. *Chem. Commun.* **2008**, 5333-5335; (b) B. Martín-Matute, J.-E. Bäckvall. *Curr. Op. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 226-232; (c) M. Edin, B. Martín-Matute, J.-E. Bäckvall. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 708-715; (d) G. K. M. Verzijl, J. G. de Vries, Q. B. Broxterman. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 1603-1610; (e) B. Martín-Matute, M. Edin, K. Bógar, F. Betül Kainak, J.-E. Bäckvall. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8817-8825; (f) G. Csajernyik, K. Bógar, J.-E. Bäckvall. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 6799-6802; (g) O. Pàmies, J.-E. Bäckvall. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3247-3261.
- ⁸⁴ (a) T. Y. S. But, P. H. Toyi. *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 1340-1355; (b) O. Mitsunobu. *Synthesis* **1981**, 1-28.
- ⁸⁵ L. Toribio, M. J. del Nozal, J. L. Bernal, C. Alonso, J. J. Jiménez, *J. Chromatogr., A* **2007**, *1144*, 255-261.
- ⁸⁶ Y. Y. Yang, X. Q. Ren, A. J. Huang, Y. L. Sun, Z. P. Sun, *J. High Resolut. Chromat.* **1998**, *21*, 421-423.
- ⁸⁷ A. J. Aasen, P. Groth, *Acta Chem. Scand. Phys. Inorg. Chem.* **1987**, *A41*, 496-450.
- ⁸⁸ Y. W. Liao, H. X. Li, *Yaoxue Xuebao* **1993**, *28*, 22-27.
- ⁸⁹ G. Blay, L. R. Domingo, V. Hernández-Olmos, J. R. Pedro, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 4725-4730.
- ⁹⁰ B. P. Bangar, S. V. Bettigeri. *Monatsh. Chem.* **2004**, *135*, 1251-1255.

- ⁹¹ (a) C-Y. Chen, M. Weisel. *Synlett* **2013**, *24*, 189-192; (b) D. S. Mortensen, A. L. Rodriguez, K. E. Carlson, J. Sun, B. S. Katzenellenbogen, J. A. Katzenellenbogen. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 3838-3848; (c) G. D. McCallion. *Curr. Org. Chem.* **1999**, *3*, 67-76; (d) N. Durani, R. Jain, A. Saeed, D. K. Dikshit, S. Durani, R. S. Kapil. *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 1700-1707; (e) B. H. Lipshutz. *Chem. Rev.* **1986**, *86*, 795-819.
- ⁹² (a) I. S. Lee, H.-J. Kim, U.-J. Youn, Q.-C. Chen, J.-P. Kim, D. T. Ha, T. M. Ngoc, B.-S. Min, S.-M. Lee, H.-J. Jung, M.-K. Na, K.-H. Bae. *Helv. Chim. Acta* **2010**, *93*, 272-276; (b) W.-S. Feng, X.-Y. Zang, X.-K. Zheng, Y.-Z. Wang, H. Chen, Z. Li. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2010**, *12*, 557-561; (c) H. Adams, N. J. Gilmore, S. Jones, M. P. Muldowney, S. H. von Reuss, R. Vemula. *Org. Lett* **2008**, *10*, 1457-1460.
- ⁹³ T. D. Sheppard. *J. Chem. Res.* **2011**, 377-385.
- ⁹⁴ X. Wang, Y. Lu, H.-X. Dai, J.-Q. Yu. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12203-12205.
- ⁹⁵ (a) M-W. Chen, L-L. Cao, Z-S. Ye, G-F. Jiang, Y-G. Zhou. *Chem Commun.* **2013**, *49*, 1660-1662; (b) H. Sundén, R. Olsson. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4831-4833; (c) F. A. Siqueira, J. G. Taylor, C. R. D. Correia. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2102-2105; (d) C. Körner, P. Starkov, T. D. Sheppard. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5968-5969; (e) M. Szlosek-Pinaud, P. Diaz, J. Martinez, F. Lamaty. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 3340-3349.
- ⁹⁶ (a) C.-F Pan, J. Yu, Y.-Q. Zhou, Z.-Y Wang, M.-M. Zhou. *Synlett* **2006**, 1657-1662; (b) K. Takeshi, I. Koji. *Heterocycles* **2005**, *65*, 1641-1654.
- ⁹⁷ (a) Q. Shen, Q. Peng, J.-L. Shao, X.-L. Liu, Z.-H Huang, X.-Z Pu, L. Ma, Y.-M Li, A. S. C. Chan, L.-Q Gu. *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 1307-1315; (b) M. Jørgensen, F. C. Krebs, K. Bechgaard. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 8783-8785.
- ⁹⁸ (a) S. Rele, S. Talukdar, A. Banerji, S. Chattopadhyay. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2990-2994; (b) A. Furstner, A. Hupperts. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4468-4475.
- ⁹⁹ N. Ortega, S. Urban, B. Beiring, F. Glorius. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1710-1713.
- ¹⁰⁰ D. Belmessieri, L. C. Morrill, C. Simal, A. M. Z. Slawin, A.D. Smith. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 2714-2720.
- ¹⁰¹ D. Tsi, B.K.H. Tan. *Phytother. Res.* **1997**, *11*, 576-582.
- ¹⁰² T. Zhang, W. Yan, Q. Li, J. Fu, K. Liu, W. Jia, X. Sun, X. Liu. *Neurol. Res.* **2011**, *33*, 396-404.
- ¹⁰³ (a) Vanessa Gonnot, S. Tisserand, M. Nicolas, R. Baatia, C. Mioskowski. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7117-7119; (b) M. L. Patil, H. B. Borate, D. E. Ponde, V. H. Deshpande. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 6615-6620.

Referencias

- ¹⁰⁴ Z. Shen, H. A. Khan, V. M. Dong, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2916-2917
- ¹⁰⁵ (a) M. C. Willis *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2-4; (b) D. H. T. Phan, B. Kim, V. M. Dong, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15608-15609.
- ¹⁰⁶ (a) J. Chen, L. Zhou, C. K. Tan, Y-Y. Yeung. *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 999-1009; (b) C. Zidorn, B. O. Petersen, V. Sareedenchai, E. P. Ellmerer, J. Duus. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 1390-1393; (c) Y. Li, I. Plitzko, J. Zaugg, S. Hering, M. Hamburger. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 768-770; (d) R. Haritakun, M. Sappan, R. Suvannakad, K. Tasanathai, M. Isaka. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 75-78; (e) S. A. Shahzad, C. Venin, T. Wirth. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3465-3472; (f) A. Kumar Sharma, Y. Maheshwary, P. Singh, K. N. Singh. *Arkivoc* **2010**, *ix*, 54-62; (g) B. Cramer, H. Harrer, K. Nakamura, D. Uemura, H.-U. Humpf. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 343-347; (h) A. Habel, W. Boland. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1601-1604.
- ¹⁰⁷ A. Rioz-Martínez, G. de Gonzalo, D. E. Torres-Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 2073-2076.
- ¹⁰⁸ (a) J. D. Scott, R. M. Williams. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1669-1730; (b) K. W. Bentley. *Nat. Prod. Rep.* **1992**, *9*, 365-391; (c) G. L. Grunewald, D. J. Sall, J. A. Monn. *J. Med. Chem* **1988**, *31*, 824-830; (d) M. D. Menachery, G. L. Lavanier, M. L. Wetherly, H. Guinaudeau, M. Shamma. *J. Nat. Prod* **1986**, *49*, 745-788; (e) *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*, ed. J. D. Philipson, M. F. Roberts, M. H. Zenk, Springer-Verlag. Berlin, **1985**.
- ¹⁰⁹ B. K. Peters, S. K. Chakka, T. Naicker, G. E. M. Maguire, H. G. Kruger, P. G. Andersson, T. Govender. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 679-687.
- ¹¹⁰ (a) P. Siengalewicz, U. Rinner, J. Mulzer. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 2676-2690; (b) Z. Czarnocki, A. Siwicka, J. Szawkalo. *Curr. Org. Synth.* **2005**, *2*, 301-331; (c) A. B. J. Bracca, T. S. Kaufman. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 10575-10610; (d) J. L. Vicario, D. Badía, L. Carrillo, J. Etxeberria. *Curr. Org. Chem.* **2003**, *7*, 1775-1792; (e) A. Yokoyama, T. Ohwada, K. Shudo. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 611-617.
- ¹¹¹ M. Dürrenberger, T. Heinisch, Y. M. Wilson, T. Rossel, E. Nogueira, L. Knörr, A. Mutschler, K. Kersten, M. J. Zimbron, J. Pierron, T. Schirmer, T. R. Ward. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 3026-3029.
- ¹¹² T. A. Paál, E. Forró, F. Fülöp, A. Liljebblad, L. T. Kanerva. *Tetrahedron:Asymmetry* **2008**, *19*, 2784-2788.
- ¹¹³ M. Stirling, J. Blacker, M. I. Page. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1247-1250.
- ¹¹⁴ T. Ema, M. Yoshii, T. Korenaga, T. Sakai. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 1223-1229.
- ¹¹⁵ P. L. Coe, A. J. Waring, T. D. Yarwood. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1995**, 2729-2737.

¹¹⁶ S. Caddick, D. B. Judd, A. K. K. Lewis, M. T. Reich, M. R. V. Williams. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5417-5423.

¹¹⁷ D. C. Endringer, K. G. Guimarães, T. P. Kondraty, J. M. Pezzuto, F. C. Braga, *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1082-1084.