Departamento de Química Orgánica e Inorgánica

Máster Universitario en Química y Desarrollo Sostenible

Síntesis quimioenzimática y asimétrica de derivados de benzoxazina. Aplicación de hidrolasas en procesos de resolución cinética.

Trabajo Fin de Máster

Julio 2015

Ángela Mourelle Insua

ÁNGELA MOURELLE INSUA, estudiante del Máster Universitario "Química y Desarrollo Sostenible", organizado por el Centro Internacional de Postgrado de la Universidad de Oviedo

PRESENTA

El trabajo titulado **"Síntesis quimioenzimática y asimétrica de derivados de benzoxazina. Aplicación de hidrolasas en procesos de resolución cinética."**, que ha sido realizado en el Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo.

Este trabajo de investigación se ha llevado a cabo bajo la tutela de la Profesora Titular Francisca Rebolledo Vicente, y la supervisión del Profesor Titular Vicente Gotor Fernández, ambos miembros del Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo, los cuales autorizan su presentación para que sea calificado como Proyecto Fin de Máster.

Oviedo, 8 de Julio 2015

Firmado por:

Vicente Gotor Fernández

Francisca Rebolledo Vicente

Ángela Mourelle Insua

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AcOEt	Acetato de etilo
AcOVin	Acetato de vinilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADH	Alcohol deshidrogenasa
Asp	Ácido aspártico
BINAP	2,2'-Bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo
BINOL	1,1'-Bi-2-naftol
BNPPA	1,1'-Binaftaleno-2,2'-diil-hidrogenofosfato
BPPM	(2*S*, 4*S*)-1-*tert*-butoxicarbonil-4-difenilfosfino-2-difenilfosfino metilpirrolidina
BY	Levadura de panadería (*Baker's yeast*)
ºC	Grados Celsius
CAL-A	Lipasa de *Candida antarctica* de tipo A
CAL-B	Lipasa de *Candida antarctica* de tipo B
CLEAS	Agregado entrecruzado enzimático (Cross-linked enzyme aggregates)
CLECs	Entrecruzado enztimático cristalino (Cross-linked enzyme crystals)
cm^{-1}	Ciclos por centímetro
COD	1,5-Ciclooctadieno (1,5-cyclooctadiene)
CRL	Lipasa de *Candida rugosa*
d	Doblete
dd	Doble doblete
ddd	Doble doblete de dobletes
DEAD	Azodicarboxilato de dietilo (Diethyl azadicarboxylate)

DEPT	Aumento de distorsión por transferencia de polarización (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer)
DIBOA	2,4-Dihidroxi-*2H*-1,4-benzoxazin-3(*4H*)-ona
DIMBOA	2,4-Dihidroxi-7-metoxi-(*2H*)-1,4-benzoxazin-3(*4H*)-ona
Dis	Disolución
DKR	Resolución cinética dinámica (Dynamic kinetic resolution)
DMAP	4-(*N*,*N*-dimetilamino)piridina
DMF	*N*,*N*-Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
dt	Doble triplete
E	Enzima
EC	Comisión enzimática (Enzyme Commission)
ee	Exceso enantiomérico
EM	Espectrometría de masas
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (Environmental Protection Agency)
ES	Complejo enzima-sustrato
ESI^+	Ionización por electrospray en modo positivo
EtOH	Etanol
Et_2O	Dietil éter
g	Gramos
Glu	Ácido glutámico
h	Horas
His	Histidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución

	(High-performance liquid chromatography)
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución (High-resolution mass spectrometry)
Hz	Hertzios
IR	Infrarrojo
IT	Intermedio tetraédrico
J	Constante de acoplamiento
k	Constante de velocidad (reacción no catalizada)
k_{cat}	Constante de velocidad de la reacción enzimática
k_{rac}	Constante de velocidad de racemización
KR	Resolución cinética (Kinetic resolution)
L	Litros
m	Metros
m	Multiplete
MeOH	Metanol
min	Minutos
mM	Milimolar
mmol	Milimol
m/z	Relación masa/carga
NAD	Dinucleótido de nicotinamida-adenina (Nicotinamide adenine dinucleotide)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida-adenina reducido (Nicotinamide adenine dinucleotide reduced)
NADP	Dinucleótido fosfato de nicotinamida-adenina (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NADPH	Dinucleótido fosfato de nicotinamida-adenina reducido

	(Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced)
Nu	Nucléofilo
PLE	Esterasa de hígado de cerdo (*pig liver esterase*)
PLP	Pirodoxil-5-fosfato
ppm	Partes por millón
PSL	Lipasa de *Pseudomonas cepacia*
rdto	Rendimiento
R_f	Factor de retención
RML	Lipasa de *Rhizomucor miehei*
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
s	Singulete
S	Sustrato
Ser	Serina
SegPhos	4,4’-Bi-1,3-benzodioxol-5,5’-diilbis(difenilfosfano)
SPINOL	1,1′-Spirobiindano-7,7′-diol
t	Triplete
T	Temperatura
t.a.	Temperatura ambiente
TBME	*tert*-Butilmetil éter
TEA	Trietanolamina
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía de capa fina (Thin Layer Chromatography)
t_R	Tiempo de retención

U	Unidades de actividad enzimática
U/g	Unidades enzimáticas/gramo de proteína
uma	Unidades de masa atómica
UV	Ultravioleta
δ	Desplazamiento químico
ν	Frecuencia
Xantphos	4,5-Bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN **1**

1.1. LA BIOCATÁLISIS **4**

1.1.1. Biocatálisis y Química Sostenible **6**

1.1.2. Clasificación de enzimas **7**

1.1.3. Tipos de preparados enzimáticos **8**

1.2. PREPARACIÓN DE AMINAS QUIRALES **10**

1.2.1. Síntesis química de aminas ópticamente activas **11**

1.2.2. Enzimas en síntesis asimétrica **11**

1.2.3. Síntesis enzimática de aminas ópticamente activas **14**

1.3. LIPASAS **16**

1.3.1. Aspectos mecanísticos: mecanismo de las serín-hidrolasas **17**

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

ANTECEDENTES **21**

2.1. IMPORTANCIA DE LAS BENZOXAZINAS **24**

2.2. APROXIMACIONES QUIRALES EN LA SÍNTESIS QUÍMICA DE 1,4-BENZOXAZINAS **25**

2.2.1. Catálisis asimétrica **25**

2.2.2. Resolución cinética **28**

2.3. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE 1,4-BENZOXAZINAS **30**

OBJETIVOS **33**

RESULTADOS Y DISCUSIÓN **37**

4.1. SÍNTESIS DE LAS AMINA RACÉMICA **4a** **40**

4.1.1. Síntesis de 1-(2-bromofenoxi)propan-2-amina en forma racémica (**4a**) **40**

4.1.2. Acilación química de la amina racémica **4a** y separación analítica de sus enantiómeros **41**

4.1.3. Acilación enzimática de la amina racémica **4a** utilizando la CAL-B **42**

4.2. SÍNTESIS Y RESOLUCIÓN CINÉTICA DE LAS 1-(HETERO)ARILOXI-PROPAN-2-AMINAS (±)-**4b-f** **44**

4.2.1. Síntesis de las aminas racémicas **4b-f** **45**

4.2.2. Acilación química de las aminas racémicas **4b-f** y separación analítica mediante HPLC **45**

4.2.3. Acilación enzimática de las aminas racémicas **4b-f** utilizando CAL-B **46**

4.3. ASIGNACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA DE LAS AMINAS Y METOXIACETAMIDAS OBTENIDAS **47**

CONCLUSIONES **49**

PARTE EXPERIMENTAL **53**

6.1. DISOLVENTES Y REACTIVOS GENERALES **55**

6.2. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS **55**

6.2.1. Cromatografía en gel de sílice **55**

6.2.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) **55**

6.2.3. Espectroscopía infrarroja (IR) **56**

6.2.4. Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) **56**

6.2.5. Puntos de fusión **56**

6.2.6. Resonancia magnética nuclear (RMN) **56**

6.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES **56**

6.3.1. Procedimiento para la síntesis de las cetonas **3a-f** **56**

6.3.2. Procedimiento para la síntesis de las aminas racémicas **4a-f** **57**

6.3.3. Procedimiento para la síntesis de la acetamida racémica **8a** **57**

6.3.4. Procedimiento para la síntesis de las metoxiacetamidas racémicas **9a-f** **57**

6.3.5. Procedimiento para la resolución cinética de la amina (±)-**4a** con acetato de etilo **57**

6.3.6. Procedimiento para la resolución enzimática de las aminas (±)-**4a-f** con metoxiacetato de etilo **58**

6.3.7. Procedimiento para la derivatización de la amina **4b** remanente en la resolución enzimática de la misma amina racémica **58**

6.4. DATOS EXPERIMENTALES: CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL **59**

REFERENCIAS **75**

APÉNDICE DE ESPECTROS **83**

INTRODUCCIÓN

La Biocatálisis consiste en la utilización de enzimas aisladas o complejos multienzimáticos como catalizadores de reacciones químicas. El empleo de enzimas en síntesis orgánica ha ido ganando importancia desde la segunda mitad del siglo XX, entre otros motivos debido a su indudable conexión con la Química Verde o Química Sostenible, lo que incluso ha permitido el desarrollo de procesos industriales empleando biocatalizadores.

Las enzimas pueden catalizar multitud de reacciones, actuando sobre muy diversas familias de compuestos como puedan ser alcoholes, aminas, ácidos carboxílicos, amidas o ésteres entre otros. En este Trabajo Fin de Máster se llevará a cabo la preparación de aminas y amidas de forma estereoselectiva, compuestos que juegan un papel fundamental en la química industrial, ya que son precursores de productos con destacadas actividades farmacéuticas.[1] En concreto, se ha desarrollado un proceso quimioenzimático basado en la síntesis de aminas racémicas, precursoras de derivados de benzoxazina, y se ha estudiado posteriormente su resolución cinética empleando lipasas como catalizadores.

Antes de exponer los antecedentes y resultados de esta investigación, se pretende inicialmente introducir al lector en el ámbito de la Biocatálisis y explicar sus aportaciones a la Química Sostenible. Por ello, se hará a continuación un breve comentario de los distintos tipos de biocatalizadores que se conocen en la actualidad. Así mismo, se presentarán de manera resumida, distintas estrategias enzimáticas que conducen a la obtención de aminas ópticamente activas, prestando especial atención al

[1] M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Kesseler, R. Stuermer, T. Zelinski, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 788-824.

uso de las lipasas puesto que es el grupo de enzimas al que pertenece la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B), cuyo empleo ha permitido la efectiva resolución cinética de las aminas racémicas consideradas en este Trabajo Fin de Máster.

1.1. LA BIOCATÁLISIS

Las biotransformaciones son las reacciones de compuestos químicos en organismos vivos, englobando la Biocatálisis que de un modo general puede definirse como el empleo de sistemas biológicos para catalizar reacciones químicas.[2]

Las enzimas han sido utilizadas como biocatalizadores por los humanos desde hace miles de años en procesos tan conocidos como la fermentación, que se utilizaba ya en la antigüedad para la producción y conservación de alimentos. Siglos después, en 1858, Louis Pasteur hizo uso del hongo *Penicillium glaucum* y llevó a cabo la que, posiblemente, fue la primera resolución cinética enzimática, consiguiendo enriquecer una mezcla racémica del ácido tartárico en el (–)-enantiómero. Durante los siguientes años, se produjeron grandes avances aunque bien es cierto que los mayores logros se alcanzaron en el campo de la síntesis orgánica "clásica" y que no fue hasta los años 60 cuando la Biocatálisis, impulsada por el gran desarrollo de disciplinas como la Bioquímica, la Biología molecular o la Bioinformática, comenzó a desarrollarse de manera plena.[3]

Uno de los grandes hitos que ha permitido el desarrollo de la Biocatálisis fue el descubrimiento de que algunas enzimas conservan su actividad en disolventes orgánicos. Esto permitió que muchas reacciones que eran inviables en su medio acuoso natural debido a problemas de solubilidad o reacciones secundarias de hidrólisis o racemización, pudiesen llevarse a cabo. Así mismo, se descubrió que algunas enzimas son capaces de catalizar reacciones distintas a las que llevan a cabo en la naturaleza, lo que se conoce hoy en día bajo el nombre de *promiscuidad biocatalítica*.[4] Además, la aplicación de técnicas de ADN recombinante ha permitido la modificación de la secuencia de aminoácidos de muy diversas clases de enzimas, lo que se traduce en

[2] T. Hudlicky, J. W. Reed, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3117-3132.
[3] (a) C. M. Clouthier, J. N. Pelletier, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585-1605; (b) M. T. Reetz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12480-12496.
[4] (a) K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231-238; (b) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504-4523; (c) Q. Wu, B.-K. Liu, X.-F. Lin, *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 1966-1968; (d) M. S. Humble, P. Berglund, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3391-3401; (e) M. Kapoor, M. N. Gupta, *Process Biochem.* **2012**, *47*, 555-569.

cambios sustanciales en su comportamiento, siendo posible la mejora de su actividad y estabilidad, así como el desarrollo de procesos más selectivos sobre una variedad estructural más amplia de sustratos.[5]

Una de estas técnicas de modificación genética racional es la *evolución dirigida*, que ha permitido solventar en gran medida las limitaciones que se le han atribuido históricamente a las enzimas como catalizadores en síntesis orgánica relacionadas con aspectos como su selectividad, especificidad por ciertos tipos de sustratos, baja estabilidad e inhibición debida a productos o sustratos. La evolución dirigida (Figura 1) consiste en la repetición de ciclos compuestos de etapas de mutagénesis, expresión y selección. Esto quiere decir que las mutantes obtenidas al modificar uno o varios aminoácidos son expresadas en un huésped y, posteriormente se realiza un screening rápido de su actividad, volviendo a repetirse el ciclo de mutagénesis con aquellas cepas que presentan mejores resultados y así hasta que se consiguen las enzimas con las características deseadas.[3b,6]

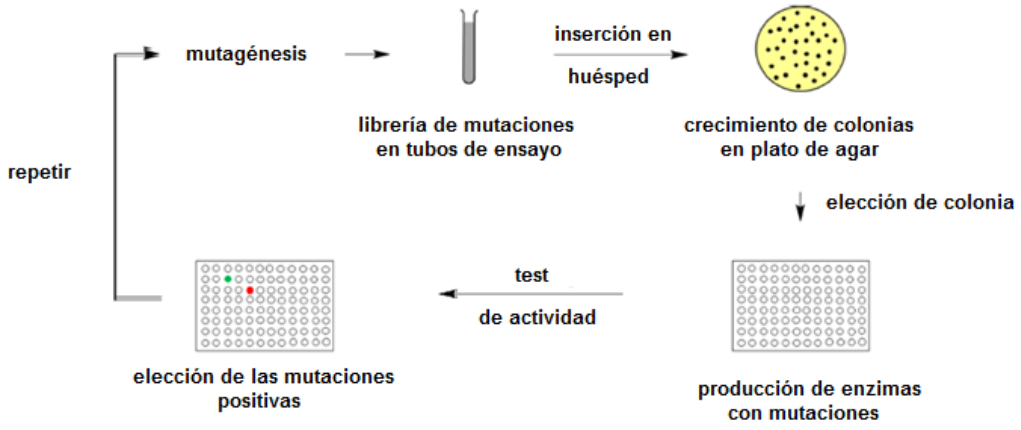


Figura 1. Descripción del proceso de mutagénesis de un enzima mediante evolución dirigida.

Hoy en día, casi cualquier reacción orgánica puede llevarse a cabo mediante el uso de enzimas, habiendo sido posible su empleo en el sector industrial para la

[5] (a) M. Widesten, *Curr. Opin, Chem. Biol.* **2014**, *21*, 42-47; (b) M. D. Lane, B. Seelig, *Curr. Opin, Chem. Biol.* **2014**, *22*, 129-136; (c) C. G. Acevedo-Rocha, R. Agudo, M. T. Reetz, *J. Biotechnol.* **2014**, *191*, 3-10.
[6] (a) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185-194; (b) S. Wallace, E. P. Balskus, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *30*, 1-8.

preparación de productos de alto valor añadido, especialmente en campos relacionados con el desarrollo de nuevos materiales, agroquímicos y fármacos.[7] De hecho, una de las principales ventajas de la Biocatálisis radica en su gran capacidad para conducir a la síntesis de productos naturales y sus derivados empleando enzimas que participan en las rutas biosintéticas de metabolitos secundarios.[8]

1.1.1. Biocatálisis y Química Sostenible

El concepto de Química Verde es relativamente reciente, data de principios de los años 90, surgiendo debido a la crítica situación ambiental y a la necesidad de alcanzar la sostenibilidad, de ahí que se conozca también como Química Sostenible.[9] Este campo de la química ha demostrado que pueden llevarse a cabo procesos y obtenerse productos de una forma productiva, sin poner en riesgo la salud humana ni el medioambiente. Todo ello engloba una serie de criterios conocidos como los doce principios de la Química Verde que se han recogido bajo el término inglés *productively* (*productivamente*, Tabla 1).

Tabla 1. Doce principios de la Química Verde.

P	Prevent wastes	Minimizar residuos
R	Renewable materials	Utilización de materiales renovables
O	Omit derivatization steps	Omitir pasos de derivatización
D	Degradable chemical products	Empleo de reactivos degradables
U	Use safe synthetic methods	Métodos sintéticos no peligrosos
C	Catalytic reagents	Utilización de catalizadores
T	Temperature, pressure ambiente	Condiciones de reacción suaves
I	In-process monitoring	Análisis en tiempo real
V	Very few auxiliary substances	Reducción de sustancias auxiliares
E	E-factor, maximise feed in product	Factor-E = kg residuos/kg producto
L	Low toxicity of chemical products	Síntesis de productos con baja toxicidad
Y	Yes, it is safe	Proceso seguro

[7] Hans-Peter Meyer, E. Eichhorn, S. Hanlon, S. Lütz, M. Schürmann, R. Wohlgemuth, R. Coppolecchia, *Catal. Sci. Technol.* **2013**, *3*, 29-40.
[8] J. D. Mortison, D. H. Sherman, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7041-7051.
[9] (a) S. L. Y. Tang, R. L. Smith, M. Poliakoff, *Green Chem.* **2005**, *7*, 761-762; (b) P. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301-312.

La Biocatálisis se ajusta casi a la perfección a la mayoría de estos doce principios ya que las enzimas son biodegradables además de no tóxicas, suelen dar lugar a los productos deseados con elevado rendimiento y sin gran cantidad de residuos al no emplear pasos innecesarios de protección-desprotección de grupos funcionales, lo que proporciona valores favorables del factor-E. Además, los procesos catalíticos suelen llevarse a cabo en condiciones de reacción suaves (temperatura y presión ambiente, así como pH neutro) y por tanto de manera segura.

Por otra parte, las enzimas ofrecen otras ventajas como son sus elevadas velocidades de reacción, que pueden alcanzar constantes cinéticas de hasta 10^{20} veces superiores a la constante cinética del proceso no catalizado, y su habilidad para acelerar procesos de manera regio-, químio- y estereoselectiva. Esta última característica ha sido uno de los grandes motivos de su extensa aplicación en síntesis orgánica. El regiocontrol y el estereocontrol enzimático derivan del contacto entre la superficie de la enzima y el sustrato de tal forma que, una única área (regiocontrol) y una única cara (estereocontrol) del sustrato se posicionan de la manera adecuada para que tenga lugar la catálisis enzimática. Una consecuencia directa de esto es la quimioselectividad ya que si se introduce una molécula en la que tengamos grupos o átomos con igual o similar reactividad, solo uno de ellos se situará en la posición adecuada y, por lo tanto, solo éste reaccionará.[2b,6]

1.1.2. Clasificación de enzimas

En la actualidad se conocen más de 3000 enzimas que se clasifican en seis grupos atendiendo al tipo de reacciones que catalizan de manera convencional (Tabla 2). Cada grupo posee un código de cuatro dígitos que viene precedido de las siglas EC (Enzyme Commission).[10]

[10] K. Drauz, H. Gröger, O. May, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis;* Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2012**.

Tabla 2. Clasificación de enzimas según el tipo de reacción convencional que catalizan.

Clase	Tipo de enzima	Reacción que catalizan
EC 1	Oxidorreductasas	Oxidación y reducción
EC 2	Transferasas	Transferencia de grupos
EC 3	Hidrolasas	Hidrólisis
EC 4	Líasas (“sintasas”)	Formación y ruptura de enlaces de forma no hidrolítica
EC 5	Isomerasas	Isomerización
EC 6	Ligasas (“sintetasas”)	Formación de enlaces

No debe olvidarse que a pesar de que estas son las reacciones convencionales que catalizan cada uno de estos tipos de enzimas es innegable la existencia de la *promiscuidad catalítica*,[4] característica que permite que algunas enzimas catalicen reacciones no convencionales.

1.1.3. Tipos de preparados enzimáticos

A pesar de sus numerosas ventajas, las enzimas presentan también algunos inconvenientes entre los que cabe destacar su a menudo inestabilidad en medios de reacción que no son el natural. Este problema puede solucionarse por medio de la inmovilización. Las enzimas inmovilizadas son, por supuesto, más estables y habitualmente también más activas. Además, pueden separarse del medio de reacción mediante una simple filtración, lo que facilita los procesos de purificación y de recuperación del catalizador, para su posterior reutilización. Otra ventaja de la técnica de inmovilización es que ayuda a reducir el coste global del proceso ya que la enzima puede mantener su actividad durante varios ciclos o, incluso, en procesos desarrollados en continuo. Esencialmente, hay tres tipos de inmovilización (Figura 2):[11]

- *Enlace a un soporte*, pudiendo ser el enlace de naturaleza física (como interacciones hidrofóbicas o de Van der Waals), iónica o covalente. Los soportes

[11] (a) R. A. Sheldon, S. van Pelt, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223-6235; (b) A. Liese, H. Hilterhaus, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6236-6249.

más utilizados para este tipo de inmovilización son las resinas sintéticas, biopolímeros como los polisacáridos y sólidos inorgánicos como las zeolitas.

- *Encapsulamiento* de la enzima en una red polimérica de naturaleza orgánica o inorgánica o en membranas. Para llevar a cabo este tipo de inmovilización suele ser necesario sintetizar la matriz polimérica en presencia del enzima.

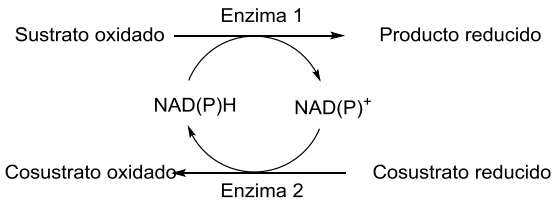
- *Agregado entrecruzado enzimático* (*Cross-linked enzyme crystals*, CLECs) o *agregado entrecruzado enzimático* (*Cross-linked enzyme aggregates*, CLEAS). El primer tipo de entrecruzamiento se consigue dejando que las enzimas cristalicen en una disolución reguladora con un pH óptimo y añadiendo, posteriormente, un reactivo bifuncional que permita entrecruzar los cristales. El problema en este caso es que hay que cristalizar la enzima, cosa que a veces es complicada y que suele requerir enzimas de elevada pureza. Debido a ello, se desarrolló el entrecruzamiento de agregados que conlleva un procedimiento más simple y barato ya que no es necesario purificar previamente la enzima y, además, no requiere un soporte adicional. Este tipo de inmovilización se consigue añadiendo un agente de precipitación a una solución acuosa de la enzima, lo que provoca el precipitado de la misma formando agregados, los cuales se mantienen unidos mediante enlaces no covalentes. Los agregados permanecen insolubles y, como la estructura terciaria de la enzima no se ve alterada, mantienen su superestructura y, por lo tanto, su actividad catalítica.

Figura 2. Representación general de los tipos de inmovilización enzimática.

Para aquellas enzimas que involucran el desarrollo de procesos redox y por tanto el uso necesario de cofactores, una posibilidad que resulta muy ventajosa es el empleo de *células enteras* en lugar de las propias enzimas purificadas. En contra de lo que pueda pensarse, suelen ser muy estables y pueden manipularse tanto en medios acuosos, como en presencia de cosolventes o en sistemas bifásicos. La principal ventaja es que

las células vivas presentan todos los cofactores necesarios para llevar a cabo las transformaciones deseadas. Por supuesto, también presentan inconvenientes puesto que en algunos casos la presencia de otras enzimas en este preparado puede dar lugar a reacciones secundarias o indeseadas. Además, pueden aparecer problemas en el transporte del sustrato o del producto dentro y fuera de la célula, pudiendo darse el caso de que el producto sea tóxico para las células a concentraciones elevadas.

Una alternativa al uso de células enteras es el empleo de enzimas purificadas a las que se acopla un sistema de reciclaje del cofactor, lo que implica el acoplamiento de una segunda reacción que regenere el cofactor empleado en la reacción enzimática principal (Esquema 1).[12] Esta necesidad viene dada por el alto precio de los cofactores, generalmente derivados del dinucléotido de β-nicotinamida adenina que existe en su forma oxidada tanto con el grupo fosfato ($NADP^+$) como sin él (NAD^+), al igual que sucede en su forma reducida [NAD(P)H].



Esquema 1. Proceso de reducción con empleo de un sistema de regeneración del cofactor.

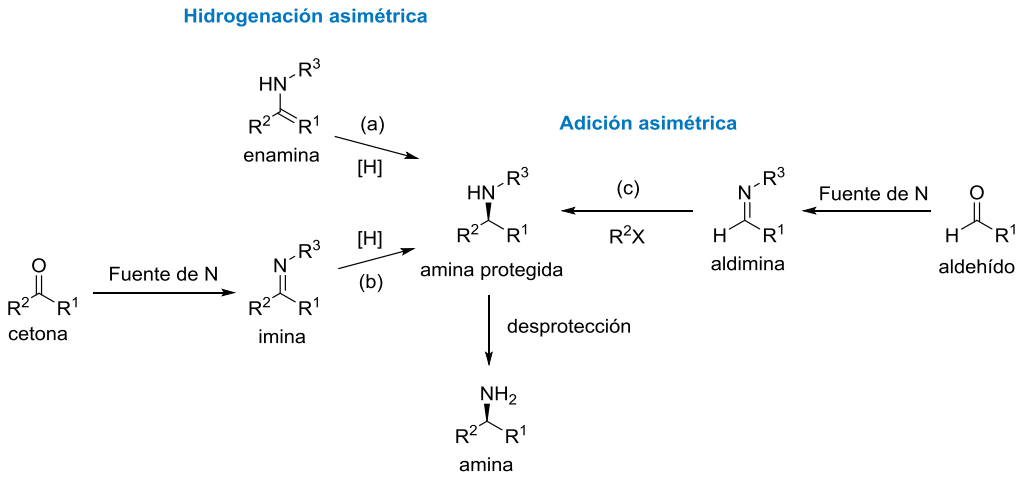
1.2. PREPARACIÓN DE AMINAS QUIRALES

Como ya se ha comentado con anterioridad, la preparación de aminas ópticamente activas juega un papel muy importante en la Química Orgánica actual, puesto que son compuestos de elevado interés en industrias como la farmacéutica, la agroquímica y la química.[13] En este Trabajo Fin de Máster, se ha desarrollado la síntesis de una amplia familia de aminas racémicas que posteriormente han sido resueltas enzimáticamente. Por ello, a continuación se describen de manera general los métodos químicos y enzimáticos más apropiados para la síntesis asimétrica de aminas, prestando especial atención a los métodos exclusivamente enzimáticos, en especial a través de procesos de resolución cinética.

[12] (a) H. Wu, C. Tian, X. Song, C. Liu, D. Yang, Z. Jiang, *Green Chem.* **2013**, *15*, 1773-1789; M. Richter, *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 1324-1345; (b) S. Kara, J. H. Schrittwieser, F. Hollmann, *Appl. Microbiol Biotechnol.* **2014**, *98*, 1517-1529.
[13] T. C. Nugent. *Chiral Amine Synthesis: Methods, Developments and Applications*; Wiley-VCH: Weinheim (Alemania), **2010**.

1.2.1. Síntesis química de aminas ópticamente activas

Históricamente, la cristalización de sales diastereoméricas empleando ácidos carboxílicos quirales ha sido la estrategia más empleada en la síntesis de aminas ópticamente activas partiendo de sus correspondientes racematos. No obstante, cabe destacar el desarrollo de procesos más recientes empleando sustratos proquirales, como son la hidrogenación asimétrica de enaminas e iminas, o la adición asimétrica de carbaniones a aldiminas (Esquema 2). La mayor o menor selectividad de un método u otro al doble enlace depende mayoritariamente de los sustituyentes en posición α. De los correspondientes precursores, la hidrogenación asimétrica suele transcurrir con elevadas enantioselectividades. Alternativamente, cuando se plantea la síntesis de aminas con dos sustituyentes alquílicos iguales, o bien dos sustituyentes arilos, la selectividad a la que conduce la adición asimétrica es generalmente mayor que la resultante de la hidrogenación.[14]



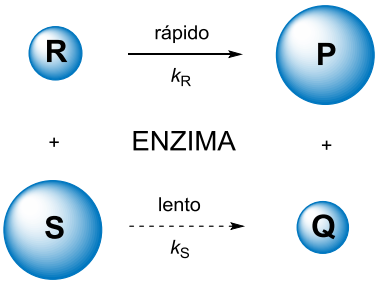
Esquema 2. Principales métodos químicos para la síntesis asimétrica de aminas.

1.2.2. Enzimas en síntesis asimétrica

Como se comentaba anteriormente, las resoluciones cinéticas siguen teniendo un papel sumamente importante tanto a nivel industrial como académico.[15] En concreto, las resoluciones catalizadas por enzimas han ido ganando especial importancia en años recientes.[16]

[14] M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42-51.
[15] A. Kamal, M. A. Azhar, T. Krishnaji, M. S. Malik, A. Azeeza, *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 569-592.
[16] (a) A. Ghanem, H. Y. Aboul-Enein, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3331-3351; (b) A. Ghanem, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1721-1754.

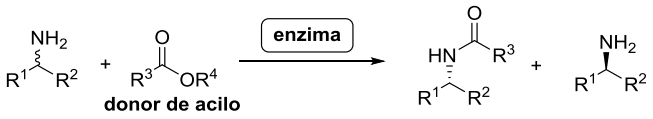
Las lipasas, dentro del grupo de las hidrolasas, son las enzimas que se emplean más habitualmente en este tipo de procesos.[17] En cualquier caso, y de forma general, podemos definir una resolución cinética (KR del inglés *kinetic resolution*) como un proceso en el que uno de los enantiómeros de una mezcla racémica es más susceptible de reaccionar con un reactivo para dar lugar a un producto (Esquema 3).



Esquema 3. Resolución cinética una mezcla racémica compuesta por dos enantiómeros R y S, en la que la enzima reacciona preferentemente con uno de ellos (R) para dar lugar a un solo producto (P).

El requisito indispensable para que una resolución cinética (enzimática o no) pueda llevarse a cabo es que la constante de velocidad del proceso sea considerablemente distinta para un enantiómero que para el otro ($k_R \neq k_S$, donde R y S son los distintos enantiómeros). Idealmente, al alcanzar un 50% de conversión se obtendrá uno de los enantiómeros sin reaccionar mientras que el otro habría evolucionado completamente hacia la formación del producto.

En la mayor parte de los procesos de resolución de aminas racémicas se desarrolla la acilación selectiva de uno de sus dos enantiómeros (Esquema 4). El grupo acilo se transfiere al sustrato desde el donor de acilo, éster no activado, que se añade al medio de reacción en cantidades estequiométricas o en exceso con respecto del sustrato.



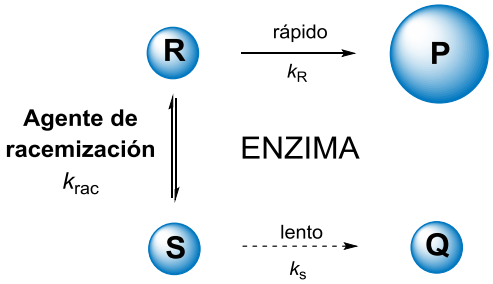
Esquema 4. Acilación enzimática de una amina racémica.

Este tipo de procesos de resolución cinética clásica presenta la limitación de que solo puede alcanzarse un 50% de conversión en un compuesto en forma enantioméricamente pura. Con el fin de evitar esta limitación, se presentan los procesos

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

de resolución dinámica cinética (DKR del inglés *dynamic kinetic resolution*), donde teóricamente es posible alcanzar conversiones de hasta el 100% en el enantiómero de producto deseado. En este tipo de procesos, se combinan una resolución cinética convencional y un proceso de racemización químico o enzimático, donde el sustrato inalterado se transformaría en la mezcla racémica de modo que, tras varios ciclos de reacción, todo el sustrato se habría transformado en el enantiómero de producto deseado (Esquema 5). No obstante, las resoluciones cinéticas dinámicas son procesos difíciles de optimizar puesto que hay varios requisitos que deben cumplirse:[18]

- La enantioselectividad del proceso ha de ser alta ($E = k_{rápida}/k_{lenta} > 20$) al igual que la velocidad del proceso de racemización ($k_{racemización} > k_{lenta}$, al menos 10 veces).
- En caso de utilizar un catalizador para la racemización, éste no puede reaccionar con el producto de la reacción.
- La racemización y la biotransformación han de ser compatibles en las condiciones de reacción.



Esquema 5. Representación esquemática de un proceso de resolución cinética dinámica enzimática.

Las hidrolasas catalizan procesos de DKR en combinación con ésteres ó carbonatos y complejos de metales de transición, lo que ha permitido la resolución de aminas[19] y otras muy diversas familias de compuestos como alcoholes o derivados de aminoácidos.[20]

[18] O. Verho, J. -E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3996-4009.
[19] D. Ghislieri, N. J. Turner, *Top. Catal.* **2014**, *57*, 284-300.
[20] (a) J. H. Lee, K. Han, M.-J. Kim, J. Park, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 999-1015; (b) Y. Kim, J. Park; M.-J Kim, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 271-277; (c) P. Hoyos, V. Pace, A. R. Alcántara, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 2585-2611.

1.2.3. Síntesis enzimática de aminas ópticamente activas

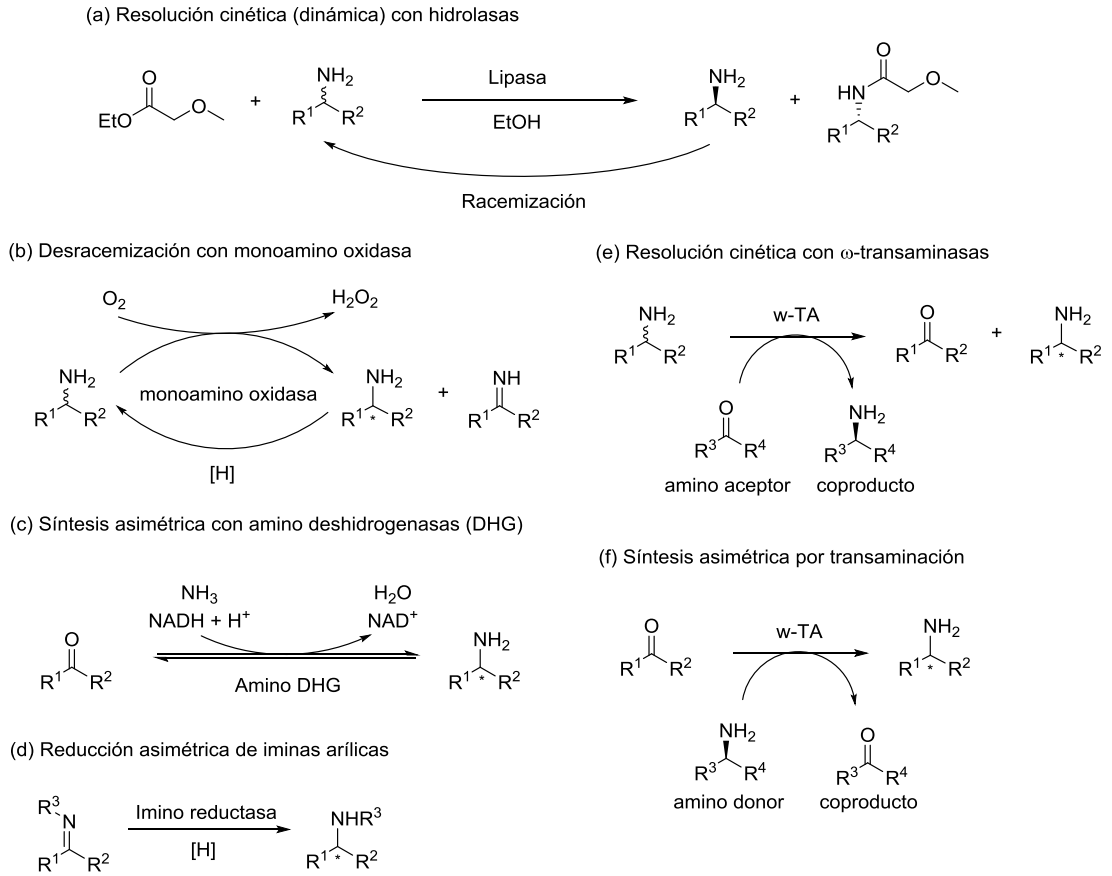
Hoy en día, existen varios tipos de enzimas que pueden intervenir en procesos que conducen a la formación de aminas ópticamente activas, como puedan ser hidrolasas, oxidorreductasas y transferasas (Esquema 6).[19] El hecho de que se opte por una ruta u otra depende, entre otras cosas, de la especificidad, estereopreferencia y estereoselectividad del enzima en cuestión además de cómo pueda ser encajado el proceso enzimático dentro de la síntesis global del producto deseado.

La primera vía de reacción a destacar es la resolución cinética (dinámica) de aminas (Esquema 6a) que puede llevarse a cabo en medios acuosos mediante la hidrólisis de amidas o en medios orgánicos mediante la acilación de aminas. Este método sintético presenta una amplia especificidad de sustrato y se ha utilizado industrialmente en más de una ocasión como es el caso de la producción a gran escala de aminas alifáticas, bencílicas y aminoalcoholes empleando la lipasa de *Burkholderia plantarii*.[21]

Otra vía de obtención de aminas quirales empleando enzimas como biocatalizadores es la desracemización empleando monoamino oxidasas (Esquema 6b). Estas enzimas oxidan uno de los enantiómeros de una amina racémica a la correspondiente imina, la cual únicamente es estable en medio acuoso cuando se consideran aminas cíclicas, transformándose inevitablemente en la correspondiente cetona. Para evitar este inconveniente, Turner y colaboradores han combinado el uso de monoamino oxidasas con agentes reductores químicos como los boranos para acceder a aminas enantiopuras con un rendimiento teórico del 100%.[22] Este tipo de enzimas acepta una amplia variedad de sustratos, incluyendo aminas primarias, secundarias y terciarias.[23] Su principal inconveniente es que se conocen solo unas pocas monoamino

[21] F. Balkenhohl, K. Ditrich, B. Hauer, W. Ladner, *J. Prakt. Chem.* **1997**, *339*, 381-384.
[22] (a) M. Alexeeva, A. Enright, M. J. Dawson, M. Mahmoudian, N. J. Turner; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3177-3180; (b) R. Carr, M. Alexeeva, A. Enright, T. S. C. Eve, M. J. Dawson, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4807-4810.
[23] (a) R. Carr, M. Alexeeva, M. J. Dawson, V. Gotor-Fernandez, C. E. Humphrey, N. J. Turner, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 637-639; (b) K. R. Bailey, A. J. Ellis, R. Reiss, T. J. Snape, N. J. Turner, *Chem. Commun.* **2007**, 3640-3642.

oxidasas (*S*)-selectivas, es por ello que se han desarrollado mutantes a través de métodos de evolución dirigida para invertir la estereopreferencia del enzima.[24]



Esquema 6. Rutas enzimáticas para la síntesis de aminas ópticamente activas en rendimientos teóricos del 100%.

Un proceso similar al catalizado por las monoamino oxidasas es la síntesis asimétrica de aminas ópticamente activas empleando amino deshidrogenasas. Presenta como principal ventaja que partiendo de una cetona proquiral y utilizando un dador de nitrógeno barato como es el amoniaco puede llevarse a cabo una aminación reductora asimétrica (Esquema 6c).

Una estrategia enzimática escasamente investigada hasta la fecha, es la reducción de iminas a aminas (Esquema 6d), siendo las imino reductasas responsables de este tipo de procesos.[25]

[24] D. Ghislieri, A. P. Green, M. Pontini, S. C. Willies, I. Rowles, A. Frank, G. Grogan, N. J. Turner, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10863-10869.
[25] (a) D. Gamenara, P. Domínguez de María, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 2989-2992; (b) J. H. Schrittwieser, S. Velikogne, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1655-1685.

Las transaminasas son biocatalizadores muy versátiles en la síntesis de aminas ópticamente activas así como de α-aminoácidos.[26] Actúan de tal forma que transfieren un grupo amino desde un sustrato donor a uno aceptor para lo cual requieren la utilización de un cofactor, el pirodoxil-5-fosfato (PLP). Dicha reacción puede llevarse a cabo de dos formas distintas: por un lado, puede partirse de una amina racémica y llevar a cabo una resolución cinética de la misma (Esquema 6e), o bien partir de la cetona proquiral llevándose a cabo una reacción de transaminación (Esquema 6f). En el primero de los casos, se establece un equilibrio entre la amina y la cetona que puede desplazarse hacia la formación de la cetona empleando como aceptor de amino el piruvato. Actualmente, hay una gran cantidad de transaminasas disponibles pero no es posible llevar a cabo una resolución cinética dinámica, por lo que superar el 50% de conversión es imposible. Además, suelen aparecer problemas de inhibición por parte del sustrato o del producto y los ee_s altos solo consiguen alcanzarse cuando la conversión del enantiómero reactivo es alta. En el caso de la síntesis asimétrica a partir de la cetona, teóricamente podría alcanzarse el 100% de conversión pero, bien es cierto, que para alcanzar esos valores tan elevados hay que desplazar el equilibrio existente entre la forma amina y la cetona. Además, suelen aparecer procesos de inhibición enzimática por parte del sustrato y del producto.

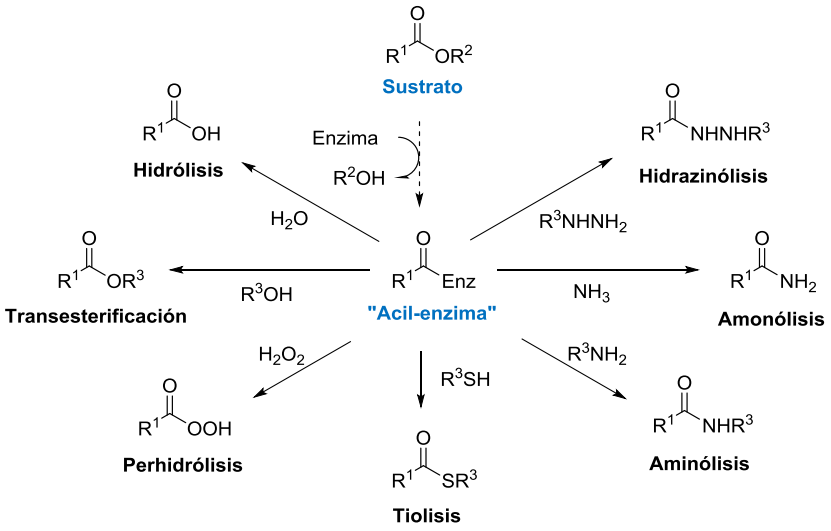
Con todo esto queda claro, como ya se había comentado con anterioridad, que las resoluciones cinéticas enzimáticas son el método enzimático más empleado para conseguir aminas ópticamente activas y que, además, el uso de hidrolasas (especialmente de lipasas) en este tipo de procesos está más que aceptado y es una herramienta común a nivel industrial. Por ello, a continuación pasaremos a presentar brevemente las características generales de este tipo de enzimas hidrolíticas.

1.3. LIPASAS

Las lipasas (triacilglicerol hidrolasas, EC 3.1.1.3) son enzimas pertenecientes a la familia de las serín-hidrolasas cuya función natural es catalizar la digestión hidrolítica de lípidos. La versatilidad y popularidad de estas enzimas se debe a su elevada eficiencia catalítica para un amplio rango de sustratos, combinada con unas elevadas

[26] (a) S. Mathew, H. Yun, *ACS Catal.* **2012**, *2*, 993-1001; (b) W. Kroutil, E.-M. Fischereder, C. S. Fuchs, H. Lechner, F. G. Mutti, D. Pressnitz, A. Rajagopalan, J. H. Sattler, R. C. Simon, E. Siirola, *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 751-759; (c) R. C. Simon, N. Richter, E. Busto, W. Kroutil, *ACS Catal*. **2014**, *4*, 129-143.

regioselectividad y reconocimiento quiral. Por si fuera poco, son enzimas de elevada estabilidad ya que aceptan disolventes orgánicos y temperaturas elevadas y son baratas, pudiendo adquirirse como distintos preparados.[27] En la parte práctica, su manejo es muy sencillo y su principal diferencia con el resto de hidrolasas es que su actividad catalítica se ve notablemente incrementada cuando se encuentran en una interfase agua/lípido. Este fenómeno se conoce como activación interfacial y se traduce en una capacidad de la enzima para adoptar distintas conformaciones y, en consecuencia, aceptar distintos sustratos. Por lo tanto, es posible reemplazar al agua como nucleófilo natural de las lipasas por otra gran variedad de compuestos, lo que permite que se lleven a cabo una gran variedad de transformaciones catalizadas por lipasas (Esquema 7).

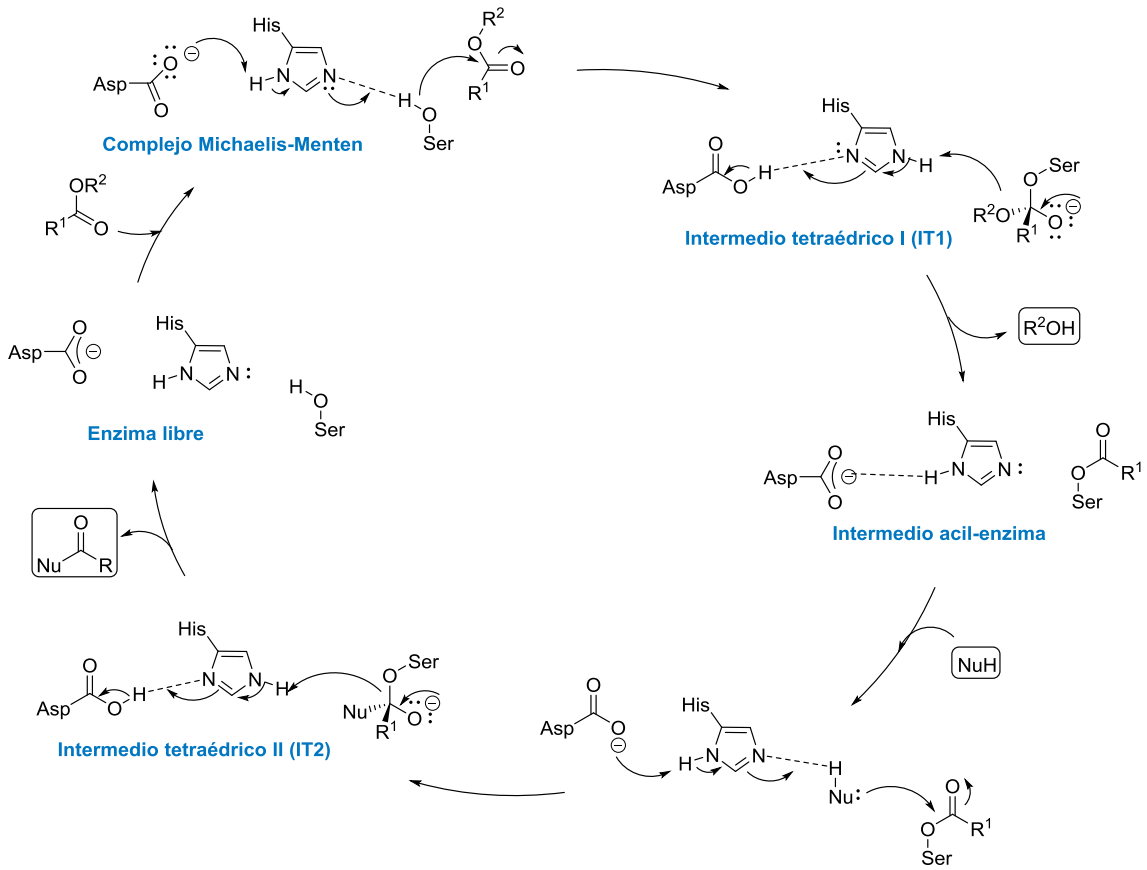


Esquema 7. Transformaciones catalizadas por lipasas.

1.3.1. Aspectos mecanísticos: mecanismo de las serín-hidrolasas

Las lipasas contienen una tríada catálitica en el centro activo de la enzima que está compuesta por un residuo de aspartato (Asp), histidina (His) y serina (Ser) y su mecanismo de actuación está muy establecido (Esquema 8).

[27] D. Wiktelius, *Synlett* **2005**, 2113-2114.



Esquema 8. Mecanismo de actuación de las serín-hidrolasas.

Hay dos pasos fundamentales en este mecanismo que son la formación del *intermedio tetraédrico I* (IT_1) y del *intermedio tetraédrico II* (IT_2). La formación del primero se ve favorecida por la formación del *complejo Michaelis-Menten* en el cual el sustrato y la enzima se asocian de forma no covalente. De esta forma, el aspartato facilita la desprotonación de la serina a través de los protones de la histidina de manera que se produce el ataque del grupo hidroxilo de la serina al carbonilo del sustrato. El intermedio así obtenido evoluciona hacia el intermedio acil-enzima al donarse un protón de la histidina al heteroátomo del grupo saliente. El ataque del nucleófilo al intermedio así obtenido da lugar a la formación del IT_2 que, al descomponerse, libera el producto y permite que se regenere el enzima libre que actúa como catalizador. Este último intermedio (el IT_2) suele ser el causante de la enantioselectividad ya que en él se encuentran diferenciados un hueco para el nucleófilo y otro para el grupo acilo.

Las lipasas más utilizadas en la actualidad son las lipasas de *Candida antarctica* de tipo A y B (CAL-A y CAL-B) y la de *Pseudomonas cepacia* (PSL). En este Trabajo Fin de Máster se ha estudiado únicamente el comportamiento de la CAL-B, por lo que a continuación se destacan las características generales de este enzima.

1.3.2. Lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B)[28]

La CAL-B proviene de la levadura de *Candida antarctica*, que fue descubierta en la Antártida durante la búsqueda de enzimas que fueran activas en condiciones extremas. Se trata de una proteína globular cuya cadena polipeptídica está compuesta de 317 aminoácidos dispuestos de tal manera que adoptan una configuración tridimensional conocida como pliegue de la α/β-hidrolasa (Figura 3). En su centro activo hay dos canales casi paralelos que se extienden desde la serina del centro activo hasta la superficie y que se encuentran parcialmente separados por dos cadenas hidrofóbicas de isoleucina. En dichos canales se alojan los reactivos de las transformaciones catalizadas por la CAL-B. Además, presenta un fragmento de hélice α con cierta movilidad que no impide que el disolvente pueda acceder al centro activo, cosa que sí ocurre con otras lipasas.

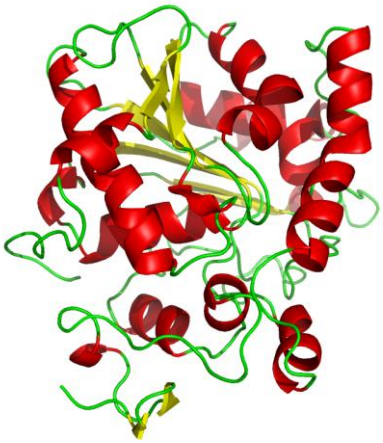


Figura 3. Estructura tridimensional de la CAL-B.

La enantiopreferencia de la CAL-B en la resolución de aminas sigue la regla semiempírica conocida como *Regla de Kazlauskas*,[29] que fue descrita inicialmente para alcoholes secundarios y que es aplicable a la mayoría de las lipasas. A pesar de que se trata de una metodología relativa, se ha utilizado en numerosas ocasiones para asignar la configuración absoluta de los productos de resoluciones enzimáticas en algunas ocasiones por si sola y, en otras ocasiones, como complemento de información obtenida mediante otras técnicas. Esta regla se basa en el tamaño de los sustituyentes unidos al estereocentro para predecir qué enantiómero reaccionará más rápidamente. Así, para un

[28] S. Lutz, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2743-2748.
[29] R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665.

sustrato que posea un sustityente grande y otro pequeño se asume que el enantiómero que reacciona más rápido se acomodará de tal forma en el centro activo de la enzima que el sustituyente más voluminoso (G) se aloja en el hueco de mayor tamaño, mientras que el menos voluminoso (M) se acomoda en el hueco de menor tamaño (Figura 4). La situación en el caso del enantiómero desfavorecido sería justamente la contraria y, por ello, cuanto mayor sea la diferencia de tamaños entre los sustituyentes, mayor será la selectividad con la que transcurre la reacción siempre y cuando ambos sustituyentes puedan acomodarse en el centro activo de la lipasa.

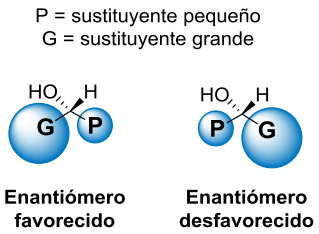


Figura 4. Regla empírica de Kazlauskas para la predicción de la enantioselectividad de un proceso de acilación catalizado por lipasas.

ANTECEDENTES

En la introducción de este Trabajo Fin de Máster se ha resaltado el papel que desempeña la Biocatálisis en el progreso de la Química Sostenible, centrando la atención en la elevada eficiencia con la que actúan las lipasas y, concretamente, la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B). Este enzima, ha demostrado su aplicación en un gran número de procesos tanto sintéticos como hidrolíticos,[30] siendo también capaz de catalizar procesos poco convencionales para enzimas hidrolíticos como la formación de enlaces carbono-carbono y carbono-heteroátomo.[31] Es por todo ello, que nos hemos planteado el empleo de la CAL-B en procesos de resolución cinética de 1-(hetero)ariloxi-propan-2-aminas, precursoras inmediatas de interesantes derivados de 1,4-benzoxazina.

A continuación, se describen brevemente las distintas estrategias sintéticas descritas en la bibliografía, para la síntesis asimétrica de 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazinas. Destaca la escasez de métodos enzimáticos descritos hasta la fecha hacia la formación de esta familia de compuestos, lo que incide en la importancia de la investigación aquí presentada.

[30] V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 797-812.
[31] M. López-Iglesias, V. Gotor-Fernández, *Chem. Rec.* **2015**, en prensa, doi/10.1002/tcr.201500008.

2.1. IMPORTANCIA DE LAS BENZOXAZINAS

Los primeros compuestos de la familia de las benzoxazinas conocidos y aislados fueron la 2,4-dihidroxi-2*H*-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona (DIBOA, Figura 5) y la 2,4-dihidroxi-7-metoxi-(2*H*)-1,4-benzoxazin-3(4*H*)-ona (DIMBOA, Figura 5). Desde entonces, el esqueleto de las 1,4-benzoazinas ha atraído un alto interés desde un punto de vista sintético, y, en particular, de los derivados 3,4-dihidro, puesto que este fragmento se encuentra presente en moléculas biológicamente activas que abarcan desde herbicidas y fungicidas hasta compuestos de interés farmacéutico.[32] De hecho, algunos derivados de benzoxazina han superado ya la fase clínica o, incluso han llegado a comercializarse, mientras que otros se encuentran en fase de desarrollo como potenciales fármacos.[33] Un ejemplo de un derivado de benzoxazina que ya se encuentra en el mercado es el ofloxacino (Figura 5), un antibiótico de amplio espectro que se emplea en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias tanto gram-positivas como gram-negativas. Su isómero *S*, conocido como levofloxacino, es un claro ejemplo del papel crucial que juega el centro quiral situado en posición C-3 en las propiedades farmacológicas de las benzoxazinas, ya que se ha encontrado que es entre 8 y 128 veces más activo que el isómero *R* y el doble que el racemato en algunas capacidades inhibitorias.[34]

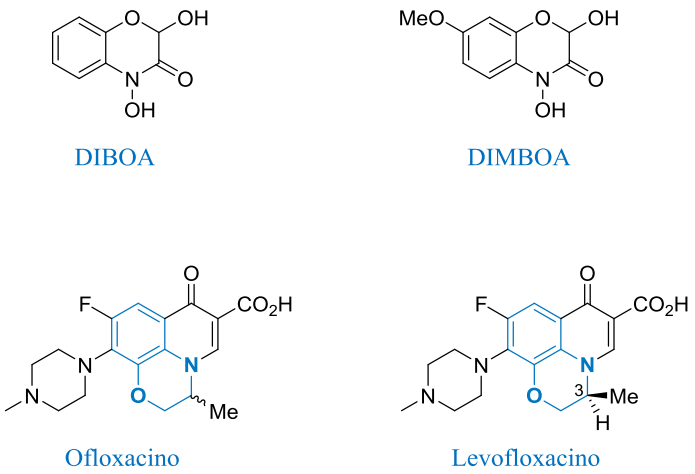


Figura 5. Estructura de la DIBOA, la DIMBOA, el ofloxacino y el levofloxacino.

[32] N. Siddiqui, R. Ali, M. S. Alam, W. Ashan, *J. Chem. Pharm. Res.* **2010**, *2*, 309-316.
[33] J. Ilaš, P. Š. Anderluh, M. S. Dolenc, D. Kikelj, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 1325-1348.
[34] B. Achari, S. B. Mandal, P. K. Dutta, C. Chowdhury, *Synlett* **2004**, *14*, 2449-1467.

Hasta la fecha se han descrito un gran número de síntesis de 1,4-benzoxazinas y derivados de las mismas.[33, 35] En el presente trabajo nos centraremos en las metodologías desarrolladas para la síntesis de 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazinas ópticamente activas.

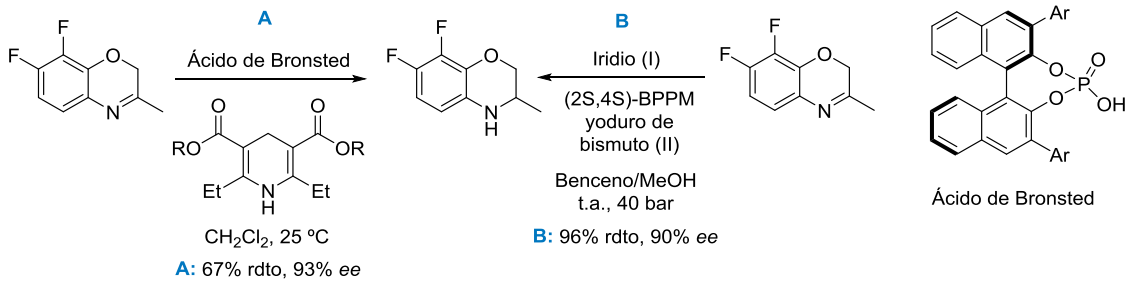
2.2. APROXIMACIONES QUIRALES EN LA SÍNTESIS QUÍMICA DE 1,4-BENZOXAZINAS

La preparación de 1,4-benzoxazinas ópticamente activas puede dividirse, fundamentalmente, en dos grandes grupos, como son la reducción asimétrica de iminas o la síntesis asimétrica empleando sintones aquirales, aunque bien es cierto que en la bibliografía pueden encontrarse algunas otras metodologías que difieren de estas dos rutas principales.

2.2.1. Catálisis asimétrica

La hidrogenación asimétrica de iminas precursoras de benzoxazinas ha sido uno de los métodos más empleados para la síntesis de 1,4-benzoxazinas enantioenriquecidas. Se han conseguido altas estereoselectividades y buenos rendimientos aislados empleando como catalizadores ácidos fosfóricos derivados del BINOL, así como ésteres de Hantzch o benzotiazoles como fuentes de hidruro.[36] Dos claros ejemplos de este tipo de procesos son los descritos para la síntesis del levofloxacino. El primero de ellos supone el empleo de ácidos fosfóricos derivados del BINOL en presencia de ésteres de dihidropiridina y diclorometano como disolvente (Esquema 9A).[37] El segundo ejemplo a destacar, se basa en la hidrogenación asimétrica descrita por Kanai y colaboradores (Esquema 9B) en la que se empleó como sistema catalítico un complejo de iridio (I) con (2*S*, 4*S*)-1-*tert*-butoxicarbonil-4-difenilfosfino-2-(difenilfosfino) metilpirrolidina (BPPM) y yoduro de bismuto (III).[38]

[35] S. K. Singh, A. K. Bajpai, R. Saini, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 7132-7135.
[36] J. G. de Vries, N. Mršić, *Catal. Sci. Technol.* **2011**, *1*, 727-735.
[37] M. Rueping, M. Stoeckel, E. Sugiono, T. Theissmann, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 6565-6568.
[38] K. Satoh, M. Inenaga, K. Kanai, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 2657-2662.



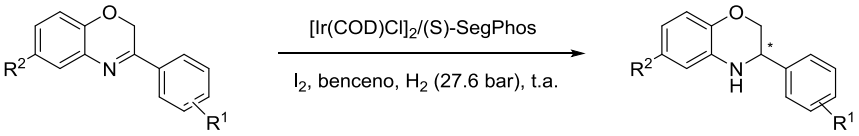
Esquema 9. Comparación entre dos estrategias descritas para la hidrogenación catalítica de benzoxazinas con aplicación a un precursor de levofloxacino.

Recientemente, Zhang y colaboradores han desarrollado una nueva ruta síntetica hacia benzoxazinas 3-aril-sustituidas, similar a la descrita en el Esquema 9A. Así, se han empleado ésteres de Hantzch en combinación con ácidos fosfóricos derivados del SPINOL, consiguiendo reducir hasta 20 benzoxazinas, de manera que se aislaron los correspondientes heterociclos hidrogenados con elevados excesos enantioméricos (91-99% *ee*) y rendimientos entre altos y excelentes (85-99%).[39]

Una técnica que se ha empleado para mejorar los excesos enantioméricos de los productos obtenidos en estas reacciones de hidrogenación se basa en la inmovilización del catalizador formando una cadena polimérica microporosa preparada a partir del monómero del mismo, el 1,1'-binaftaleno-2,2'-diil-hidrogenofosfato (BNPPA).[40]

El sistema catalítico Ir/difosfina/I_2 se utilizó también como catalizador en este tipo de procesos de hidrogenación asimétrica tras haber sido empleado con éxito con estructuras similares estructuralmente a las benzoxazinas, como son las quinolinas.[41] Bien es cierto que, para alcanzar excesos enantioméricos elevados, hubo que modificar el ligando quiral y emplear el (*S*)-SegPhos en lugar del BINAP. De esta forma se redujeron 15 benzoxazinas 3-aril-sustituidas, obteniéndose las respectivas aminas con rendimientos aislados muy buenos (91-98%) y selectividades altas (79-90% *ee*) de manera independiente de la posición y naturaleza electrónica de los sustituyentes del anillo de benceno (Esquema 10). Este mismo sistema fue aplicado, también, a la hidrogenación asimétrica de derivados de 3-aril-2*H*-1,4-benzoxazina. En este caso, hubo que añadir un paso de hidrogenación catalizada por paladio sobre carbono a 27.6 bares.

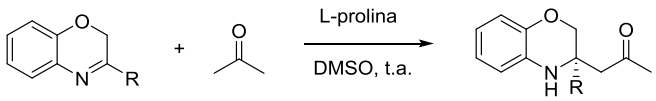
[39] Y. Zhang, R. Zhao, R. Li-Yuan Bao, L. Shi, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 3344-3351.
[40] D. S. Kundu, J. Schmidt, C. Bleschke, A. Thomas, S. Blechert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5456-5459.
[41] K. Gao, C. B. Yu, D. S. Wang, Y. G. Zhou, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 483-488.



Esquema 10. Hidrogenación asimétrica de 3-aril-2*H*-1,4-benzoxazinas.

Zhang y colaboradores describieron otro tipo de reducción de 1,4-benzoxazinas basada en la hidrosililación enantioselectiva de enlaces C=N. Empleando como organocatalizadores bases quirales de Lewis, consiguieron sintetizar dihidro-2*H*-benzoxazinas con buenos rendimientos (86-98%) pero con selectividades entre bajas y buenas (18-87% *ee*).[42] Dichas inducciones asimétricas han conseguido mejorarse con el empleo de un nuevo catalizador basado en la L-fenilalanina, obteniéndose 3-aril-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazinas con rendimientos y excesos enantioméricos que van desde moderados a excelentes (66-97% rendimiento, 70-99% *ee*).[43]

Hasta ahora, todas las rutas aquí comentadas se basan en la reducción de sus iminas precursoras. Sin embargo, una alternativa sintéticas bien diferente es la adición de nucleófilos a enlaces C=N haciendo uso de reacciones de tipo Mannich entre acetona y 2*H*-1,4-benzoxazinas sustituidas en la posición 3, aislándose las aminas deseadas con buenos rendimientos y excelentes selectividades (Esquema 11).

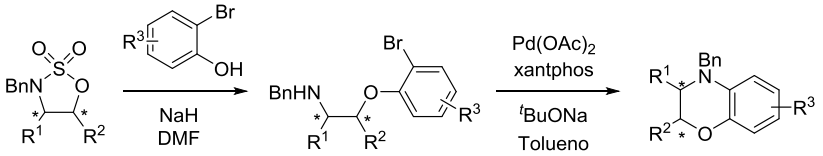


Esquema 11. Reacción de Mannich asimétrica entre acetona y 2*H*-1,4-benzoxazinas 3-sustituidas en posición 3 empleando L-prolina como organocatalizador.

Una última aproximación a la síntesis de benzoxazinas, entre ellas la precursora del levofloxacino, se basa en un protocolo de dos pasos a partir de una serie de sulfamidatos 1,2-cíclicos enantiopuros y 2-bromofenoles con distinta sustitución (Esquema 12).[44] En el primer paso de reacción se lleva a cabo una apertura de los sulfamidatos con los 2-bromofenoles, obteniéndose rendimientos de moderados a excelentes (57-100%), y finalmente las benzoxazinas mediante una ciclación en las condiciones de Buchwald-Hartwig con buenos rendimientos (50-88%). La benzoxazina precursora del levofloxacino consiguió sintetizarse de manera similar haciendo

[42] Y. Jiang, L. X. Liu, W. C. Yuan, X. M. Zhang, *Synlett* **2012**, *23*, 1797-1800.
[43] X. W. Liu, C. Wang, Y. Yan, Y. Q. Wang, J. Sun, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 6276-6280.
[44] J. F. Bower, P. Szeto, T. Gallagher, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3283-3286.

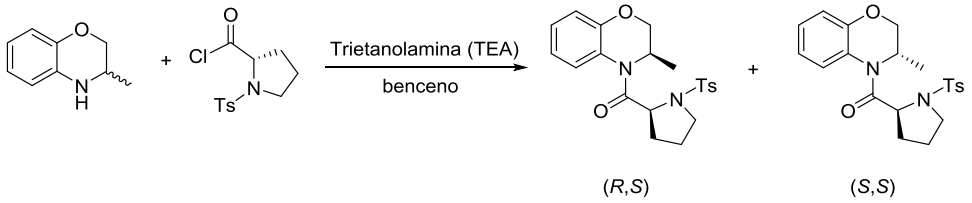
reaccionar el 6-bromo-2,3-difluorofenol con el derivado 4-metilbenzenosulfonato de la L-alanina.[45] La ciclación, en este caso, se llevó a cabo empleando CuI como catalizador en presencia de K_2CO_3 y DMF como disolvente tras llevar a cabo la desprotección del grupo amino.



Esquema 12. Síntesis de benzoxazinas por σ-alquilación seguida de ciclación.

2.2.2. Resolución cinética

Una alternativa adecuada a la síntesis asimétrica es la resolución cinética de racematos, pudiéndose obtener enantioselectividades considerablemente altas empleando agentes de resolución quiral. Esta técnica se empleó en la resolución de la (±)-3-metil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzo[*b*]oxazina con el cloruro de *N*-tosil-*(S)*-propilo (Esquema 13).[46] Empleando 2 equivalentes de la amina y el agente de resolución quiral, se aisló el diastereoisómero (*R*,*S*) con un exceso del 80%, permitiendo la hidrólisis de la amida en condiciones ácidas, con el fin de aislar la amina de configuración (*R*).



Esquema 13. Resolución cinética de benzoxazinas mediante agentes quirales.

Los mismos autores han conseguido llegar, también por medio de la resolución cinética de las aminas racémicas, a los diastereoisómeros de configuración (*S*, *S*) y, por lo tanto, a las (*S*)-aminas empleando cloruros de acilo ópticamente activos como agentes de resolución. En concreto, se alcanzaron excelentes resultados, empleando el cloruro de (*S*)-naproxeno y el cloruro de *N*-ftaloil-(*S*)-alanilo (Figura 6).[47]La influencia

[45] M. K. Parai, G. Panda, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4703-4705.
[46] V. P. Krasnov, G. L. Levit, I. M. Bukrina, I. N. Andreeva, L. S. Sadretdinova, M. A. Korolyova, M. I. Kodess, V. N. Charushin, O. N. Chupakhin, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 1985-1988.
[47] (a) V. N. Charushin, V. P. Krasnov, G. L. Levit, M. A. Korolyova, M. I. Kodess, O. N. Chupakhin, M. H. Kim, H. S. Lee, Y. J. Park, K. C. Kim, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 2691-2702; (b) V. P. Krasnov, G. L. Levit, M. I. Kodess, V. N. Charushin, O. N. Chupakhin, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 859-862.

del disolvente y la presencia o ausencia de aminas terciarias como bases auxiliares de los procesos son factores que influyen y que se han estudiado a fondo.[48]

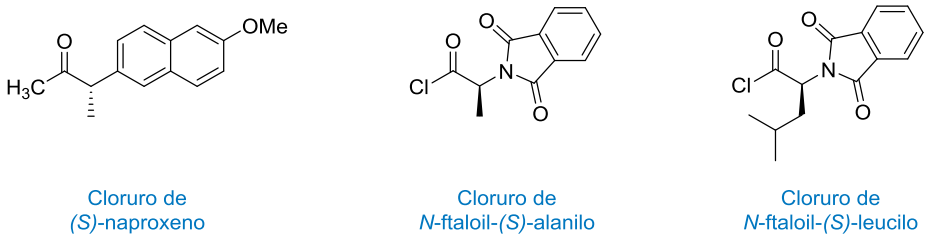
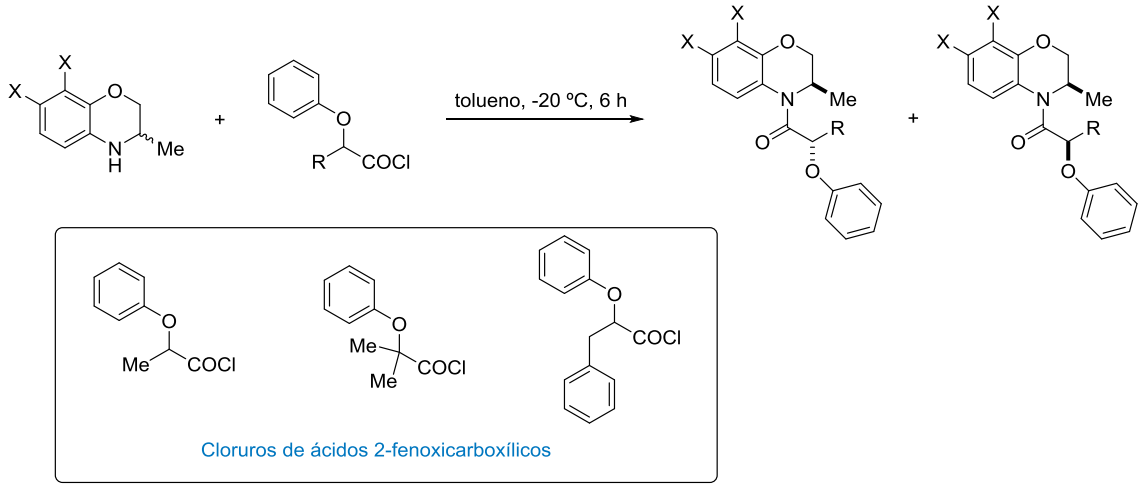


Figura 6. Agentes químicos de resolución quiral de aminas.

Otro aspecto relevante y que ha dado pie a diversos estudios es el efecto que ejerce la estructura del agente de resolución en la estereoquímica del producto final.[49] Tras estudiar la resolución de aminas precursoras de benzoxazina con distintos de cloruros de ácido se determinó que el más efectivo era el cloruro de *N*-ftaloil-(*S*)-leucilo (Figura 6) y se observó que tanto los factores estéricos como las interacciones aromáticas contribuían en la estereoselectividad del proceso.[50]

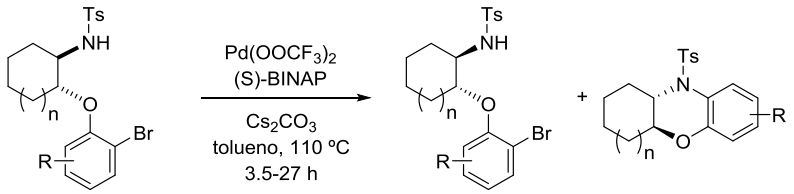
Una última aproximación descrita por Krasnov y colaboradores se basa en la resolución de benzoxazinas empleando para ello cloruros de acilo obtenidos de ácidos 2-fenoxicarboxilícos (Esquema 14).[51] El estudio de la resolución cinética con distintos cloruros de acilo demostró que la selectividad de la acilación depende tanto de la estructura del agente de acilación como de las condiciones de reacción.

[48] V. P. Krasnov, G. L. Levit, M. A. Korolyova, I. M. Bukrina, L. S. Sadretdinova, I. N. Andreeva, V. N. Charushin, O. N. Chupakhin, *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.* **2004**, *53*, 1253-1256.
[49] D. A. Gruzdev, G. L. Levit, V. P. Krasnov, *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 1640-1646.
[50] D. A. Gruzdev, E. N. Chulakov, G. L. Levit, M. A. Ezhikova, M. I. Kodess, V. P. Krasnov, *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24*, 1240-1246.
[51] S. A. Vakarov, D. A. Gruzdev, L. Sh. Sadretdinova, E. N. Chulakov, M. G. Pervova, M. A. Ezhikova, M. I. Kodess, G. L. Levit, V. P. Krasnov, *Tetrahedron: Asymmetry* **2015**, *26*, 312-319.



Esquema 14. Resolución cinética de benzoxazinas mediante el uso de cloruros de acilo derivados de ácidos 2-fenoxicarboxilícos.

Otro tipo de resoluciones cinéticas que se han empleado en la síntesis de 1,4-benzoxazinas, fue la llevada a cabo por Sekar y Rao. En este caso, la adición de un ligando quelante quiral en el medio de reacción conduce a una reacción de acoplamiento catalizada por paladio. Tras un proceso de optimización, desarrollaron un proceso en el que se emplea el (*S*)-BINOL como fuente de quiralidad, el complejo $Pd(OOCF_3)_2$ como catalizador, Cs_2CO_3 como base y tolueno como disolvente (Esquema 15). Así, se alcanzan excesos enantioméricos moderados tanto de los sustratos como de las benzoxazinas finales.[52]



Esquema 15. Resolución cinética por acoplamiento catalizado por paladio.

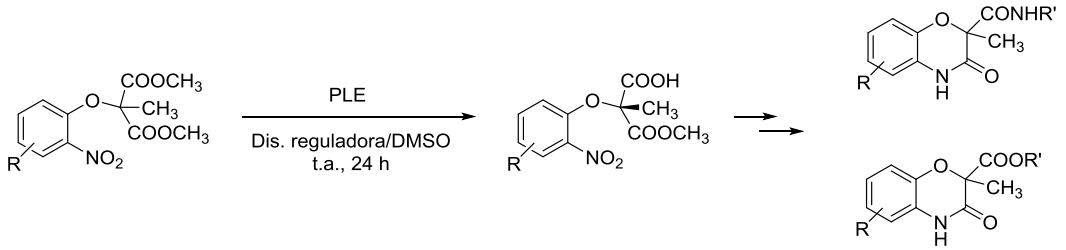
2.3. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE 1,4-BENZOXAZINAS

Si bien distintas familias de enzimas hidrolíticas han permitido la preparación de heterociclos en forma ópticamente activa,[53] el empleo de enzimas en la síntesis de 1,4-benzoxazinas ha sido escasamente investigado.

Uno de estos ejemplos es la hidrólisis de dimetil 2-metil-2-(2-nitrofenoxi)malonatos catalizada por la esterasa de hígado de cerdo (*pig liver esterase*,

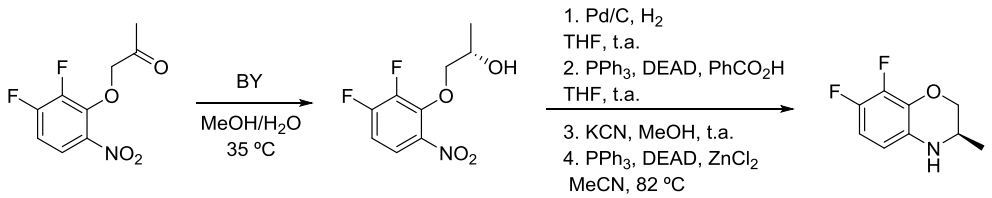
[52] R. K. Rao, G. Sekar, *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 948-954.
[53] E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3998-4035.

PLE) para dar lugar a una serie de ácidos carboxílicos (Esquema 16).[54] La hidrólisis enzimática se llevó a cabo en una disolución reguladora de fosfatos (pH 7) empleando el DMSO como cosolvente en proporción 8:2 v/v, obteniéndose los correspondientes (*R*)-malonatos con excesos enantioméricos de moderados a buenos (73-88%). Una serie de transformaciones químicas posteriores permitieron el aislamiento de derivados de la 2-metil-3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazina tanto en forma de carboxilatos como de carboxamidas, y con ambas estereoquímicas.



Esquema 16. Hidrólisis catalizada por la PLE de dimetil 2-metil-2-(2-nitrofenoxi)malonatos y aplicación a la síntesis de benzoxazinas.

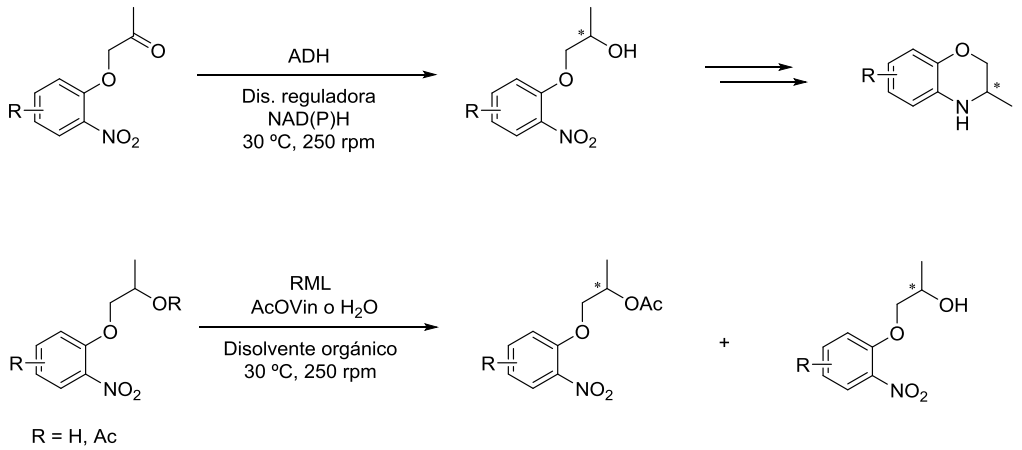
En el caso del levofloxacino, solo se han encontrado ejemplos de dos enzimas que den lugar al producto de manera selectiva. El primero de ellos se basa en la biorreducción de una nitrocetona proquiral al correspondiente nitroalcohol empleando para ello la levadura de panadería (*Baker's yeast*, BY). Con el nitroalcohol así obtenido se sintetiza mediante una serie de transformaciones químicas la benzoxazina de interés (Esquema 17).[55] La PLE se ha empleado, también, en procesos hidrolíticos en los que se sintetizó el levofloxacino con excesos enantioméricos moderados a partir de los ésteres de butilo del ofloxacino.[56]



Esquema 17. Síntesis quimioenzimática del levofloxacino empleando levadura de panadería.

[54] M. Breznik, V. Hrast, A. Mrcina, D. Kikelj, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 153-167.
[55] S. B. Kang, E. J. Ahn, Y. Kim, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 9317-9320.
[56] (a) S. Y. Lee, B. H. Min, S. H. Hwang, Y. M. Koo, C. K. Lee, S. W. Song, S. Y. Oh, S. M. Lim, S. L. Kim, D. I. Kim, *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 1033-1037; (b) S. Y. Lee, B. H. Min, S. W. Song, S. Y. Oh, S. M. Lim, D. I. Kim, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2001**, *6*, 179-182.

Rencientemente, nuestro grupo de investigación ha descrito la síntesis quimioenzimática asimétrica de 1,4-benzoxazinas aplicada a la síntesis del precursor de levofloxacino.[57] En este trabajo, se han utilizado alcohol deshidrogenasas y lipasas para acceder a precursores de ambos enantiómeros de distintas 3-metil-3,4-dihidro-2*H*-benzo[*b*][1,4]oxazinas (Esquema 18). La biorreducción de 1-(2-nitrofenoxi)propan-2-onas, permitió acceder por un lado a los (*R*)-alcoholes en el caso de la alcohol deshidrogenasa de *Rhodococcus ruber* y, por otro, a los (*S*)-alcoholes cuando se emplea la ADH comercial evo-1.1.200. En el caso de las lipasas, se consiguieron desarrollar procesos de resolución cinética clásica de acilación y de hidrólisis que, de manera complementaria, permitieron obtener los (*S*)-alcoholes a través de reacciones de acilación y los (*R*)-alcoholes cuando se lleva a cabo hidrólisis, empleando la lipasa de *Rhizomucor miehei* (RML) como biocatalizador.



Esquema 18. Proceso quimioenzimático para la síntesis de derivados de 1,4-benzoxazinas.

[57] M. López-Iglesias, E. Busto, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 3815-3824.

OBJETIVOS

En la introducción de este Trabajo Fin de Máster se ha puesto de manifiesto la creciente importancia de las biotransformaciones en procesos sintéticos, las cuales transcurren con elevada eficiencia y selectividad catalítica de forma acorde a los 12 principios básicos de la Química Sostenible.

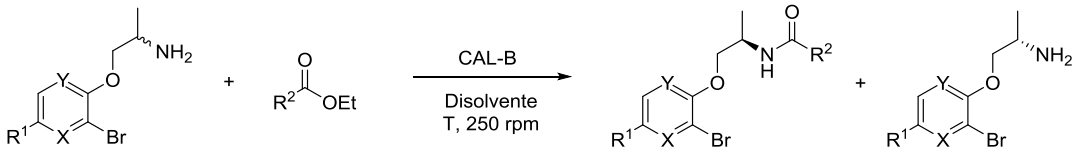
Basándonos en la capacidad de las lipasas para catalizar procesos asimétricos de acilación de aminas y en la experiencia previa de nuestro grupo de investigación en este campo, nos hemos planteado (Esquema 19):

- Diseñar un método general de síntesis de 1-(hetero)ariloxi-propan-2-aminas racémicas con distintas sustituciones en el anillo aromático, las cuales son precursoras inmediatas de derivados de benzoxazina.

- Desarrollar métodos analíticos tanto para las aminas como para las amidas racémicas correspondientes, productos de partida y finales de las reacciones enzimáticas, que nos permitan un adecuado seguimiento de las biotransformaciones.

- Seleccionar la 1-(2-bromofenoxi)propan-2-amina como sustrato modelo y estudiar el comportamiento de la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B en su resolución enzimática variando distintos parámetros de reacción como el disolvente, la cantidad y tipo de agente acilante, la temperatura y el tiempo de reacción.

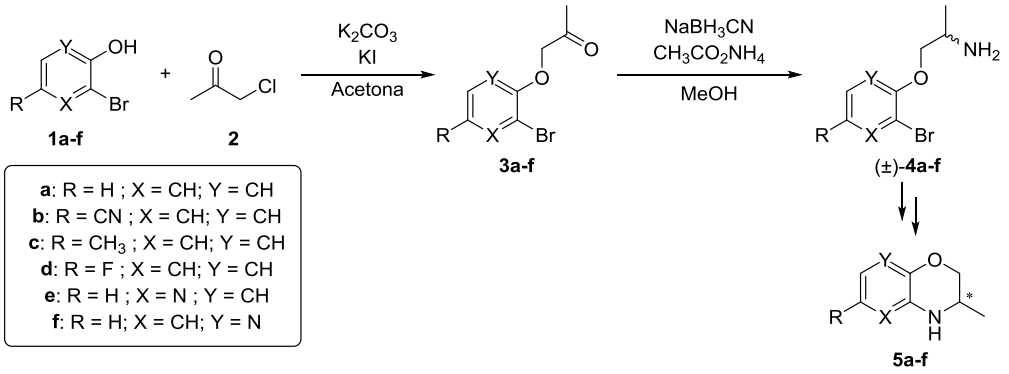
- Extender la metodología enzimática optimizada a otras 1-(hetero)ariloxi-propan-2-aminas, con el fin de obtener una serie de aminas y amidas con buenos excesos enantioméricos y rendimientos.



Esquema 19. Resolución cinética de 1-(hetero)ariloxi-propan-2-aminas catalizada por la CAL-B, a través de procesos de acilación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se plantea la síntesis de derivados de benzoxazina en forma enantiopura utilizando para ello la lipasa de *Candidaantarctica* de tipo B (CAL-B) como catalizador dela resolución cinética de las aminas racémicasprecursoras. Para ello inicialmente se sintetizarán una serie de 1-(hetero)ariloxi-propan-2-aminas**4a-f** a partir de los correspondientes bromofenoles**1a-f**comercialmente accesibles (Esquema 20).



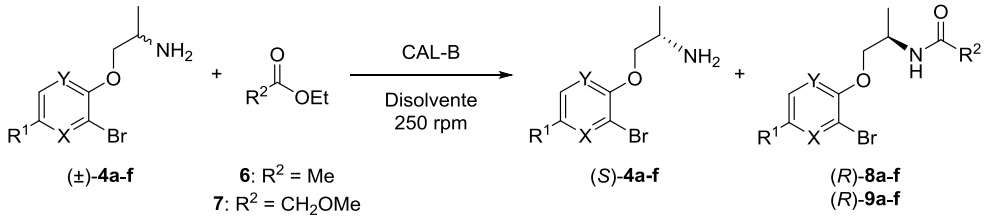
Esquema 20. Propuesta de síntesis química de lasbenzoxazinas**5a-f** en forma racémica.

De forma resumida, se ha planteado llevar a cabo esta síntesis en dos pasos de reacción. Así, en un primer lugar, se llevará a cabo el acoplamiento del correspondiente bromofenol**1a-f** con la cloroacetona (**2**). Posteriormente, laaminación reductora de las propanonas**3a-f** conduciría a la formación de las aminas racémicas **4a-f**, que tras una ciclación intramolecular en las condiciones de la reacción de Buchwald-Hartwig permitiría la obtención de las 3,4-dihidro-benzoxazinas**5a-f**.

Una vez obtenidas las aminas (±)-**4a-f** se estudiarásu resolución cinética enzimática empleando la CAL-B en unas condiciones similares a las empleadas anteriormente en nuestro grupo de investigación para la resolución de aminas primarias (Esquema 21).[58]Para el correcto seguimiento de estas reacciones enzimáticas será necesario desarrollar robustos métodos analíticos que permitan una correcta medida de las conversiones y de los excesos enantioméricos tanto de las aminas de partida como de las correspondientes amidas. En este punto se desarrollará un completo análisis de

[58](a) J. González-Sabín, V. Gotor, F. Rebolledo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 1515-1520; (b) O. Torre, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1481-1488; (c) M. Rodríguez-Mata, V. Gotor-Fernández, J. González-Sabín, F. Rebolledo, V. Gotor, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2274-2278.

los procesos enzimáticos atendiendo a muy diversos parámetros que afectan a la catálisis enzimática como la cantidad y el tipo de donador de acilo, la temperatura o el disolvente entre otros.



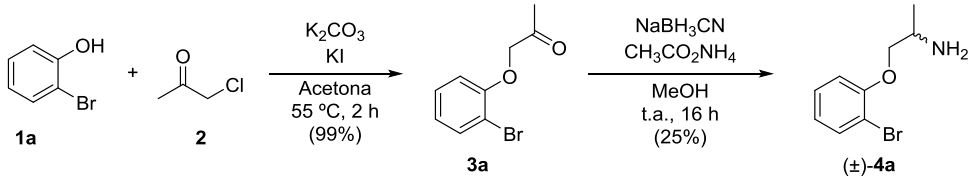
Esquema 21. Representación general de la resolución enzimática de las aminas racémicas**4a-f**.

4.1. SÍNTESIS Y REACTIVIDAD DE LA AMINARACÉMICA 4a

Con el fin de desarrollar una metodología sencilla y general para la síntesis y posterior resolución enzimática de 1-(hetero)ariloxi-propan-2-aminas, se decidió comenzar el estudio eligiendo la 1-(2-bromofenoxi)propan-2-amina (**4a**) como sustrato modelo.

4.1.1. Síntesis de 1-(2-bromofenoxi)propan-2-amina en forma racémica (4a)

La amina racémica**4a** se sintetizó a partir del 2-bromofenol (**1a**) que es comercialmente accesible.En un primer lugar, se llevó a cabo la reacción entre **1a** y un ligero exceso de lacloroacetona (**2**, 1.2 equivalentes) en presencia de 2 equivalentes de carbonato potásico (K_2CO_3) y cantidades catalíticas de yoduro potásico (KI, 0.3 equivalentes), empleando acetona como disolvente (Esquema 22). Así, tras 2 horas de reacción a 55 ºC, se aisló la cetona **3a** con un rendimiento cuantitativo tras un simple proceso de extracción. Posteriormente el tratamiento de **3a**con 2 equivalentes de cianoborohidruro sódico ($NaBH_3CN$) y un gran exceso de acetato amónico ($CH_3CO_2NH_4$, 10 equivalentes) empleando metanol (MeOH) como disolvente, condujo a la amina deseada **4a** con un rendimiento únicamente del 25%.Este bajo rendimientose atribuye a la formación de productos secundarios ya que en ninguna de las pruebas realizadas se observaba sustrato de partida remanente.

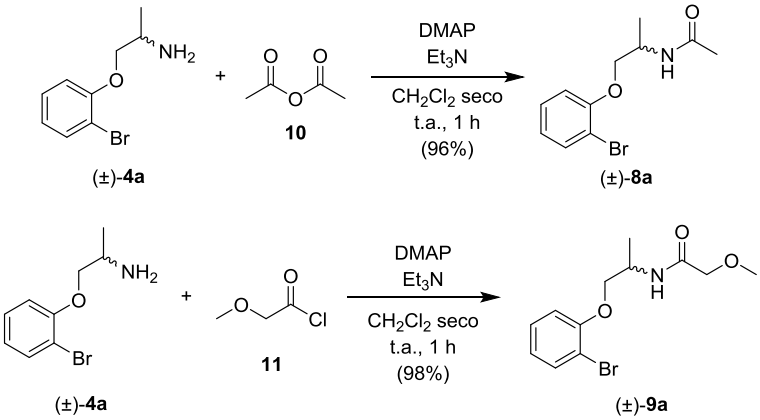


Esquema 22.Síntesis química dela amina racémica**4a** partiendo de 2-bromofenol (**1a**) y cloroacetona (**2**).

4.1.2. Acilación química de la amina racémica 4a y separación analítica de sus enatiómeros

Una vez obtenida la amina racémica**4a** se procedió a sintetizar la amidas racémicas**8a** y **9a** que serían los productos resultantes de las reacciones catalizadas por lipasas entre (±)-**4a**y ésteres no activados, como puedan ser el acetato de etilo (AcOEt, **6**) o el metoxiacetato de etilo (**7**).

Para la síntesis de la acetamida (±)-**8a** se empleó anhídrido acético (**10**), mientras que para (±)-**9a** se usó el cloruro de metoxiacetilo (**11**). Ambas reacciones se llevaron a cabo en diclorometano(CH_2Cl_2) seco y a temperatura ambiente, usando 2 equivalentes del agente acilante, 3 de trietilamina (Et_3N) y cantidades catalíticas de 4-(*N*,*N*-dimetilamino)piridina (DMAP). Después de una hora de reacción y tras un proceso de extracción y posterior purificación en columna de gel de sílice, fue posible el asilamiento de las amidas **8a** y **9a** con un rendimiento del 96 y el 98% respectivamente (Esquema 23).



Esquema 23. Acilaciónquímica de la amina racémica**4a** empleando anhídrido acético o cloruro de metoxiacetilo.

Una vez sintetizadas ambas amidas, se llevó a cabo una optimización de la separación de ambos enantiómeros. Así, se consideraron la amina (±)-**4a**, la acetamida (±)-**8a** y la metoxiacetamida (±)-**9a**, obteniendo para todas ellas buenas separaciones quirales empleando la técnica de HPLC con la columna de relleno quiralChiralpak AD-H a una temperatura de 30 ºC y un flujo de 0.8 mL/min de un eluyente formado por hexano y 2-propanol (95:5 v/v). Cromatogramas e información adicional de estos experimentos de separación analítica se encuentran recogidos en la Parte Experimental de este Trabajo Fin de Máster.

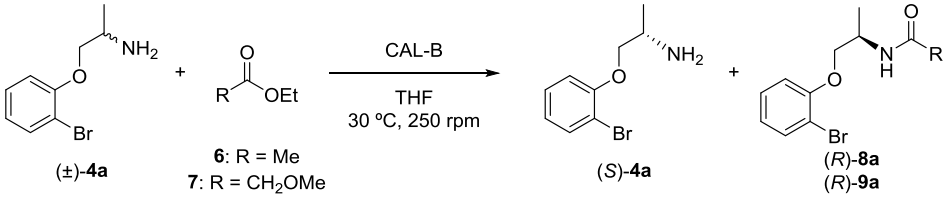
4.1.3. Acilación enzimática de la amina racémica 4a utilizando la CAL-B

Una vez sintetizadas las amidas de referencia y optimizadas las condiciones de separación mediante HPLC, se procedió a llevar a cabo la acilación enzimática de la amina (±)-**4a** catalizada por la CAL-B y empleando como donadores de acilo acetato de etilo y metoxiacetato de etilo.

La resolución enzimática de la amina racémica**4a** se decidió llevar a cabo fijando unas condiciones de reacción como son la utilización de CAL-B en una relación sustrato:enzima(1:1) en peso, tetrahidrofurano (THF)secocomo disolvente, 30 ºC y 250 rpm, estudiando la influencia del donador de acilo. La elección de éste fue basada en la nula de reactividad del mismo en ausencia de enzimas, por lo que se eligieron dos ésteres no activados como son el AcOEt (**6**) y el metoxiacetato de etilo(**7**).

Inicialmente se emplearon 3 equivalentes del éster con relación a la amina (±)-**4a**, haciendo un seguimiento temporal del proceso en las condiciones de HPLC previamente descritas. Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en la Tabla 3. Así, se puede observar que la CAL-B mostró una clara selectividad por la acilación del enantiómero (*R*)-**4a**, observándose una menor rapidez en el proceso realizado con AcOEt como donador de acilo (entradas 1-6), donde tras 43 h se superó el 50% de conversión. Por otro lado, la reacción con el metoxiacetato de etilo condujo a una conversión del 54% tras recoger la primera alícuota de reacción, es decir, a las 5 horas (entrada 7), aislando satisfactoriamente en este caso el sustrato en forma prácticamente enantiopura incluso a tiempos más largos de reacción (entradas 8 y 9).

Tabla 3. Resolución cinética de la amina (±)-**4a** utilizando CAL-B y3 equivalentes de acetato de etilo (**6**) o metoxiacetato de etilo (**7**) en THF seco a 30 ºC y 250 rpm.



Entrada	Donador de acilo	t (h)	ee_p (%)[a]	ee_s (%)[a]	c (%)[b]	E[c]
1	**6**	5	95	38	28	57
2	**6**	19	93	69	43	55
3	**6**	21	92	71	44	50
4	**6**	23	92	74	45	52
5	**6**	43	87	91	51	45
6	**6**	45	86	93	52	45
7	**7**	5	83	99	54	56
8	**7**	19	69	99	59	32
9	**7**	21	68	99	59	25

[a] Excesos enantiómericos determinados mediante HPLC.
[b] Conversiones calculadas como $c = ee_s/(ee_s+ee_P)$.
[c] Valores de la enantioselectividad del proceso: $E = \ln[(1-c)x(1-ee_s)]/\ln[(1-c)x(1+ee_P)]$.

Seleccionado el metoxiacetato de etilo como donador de acilo ideal, se llevó a cabo un estudio de las condiciones óptimas para la resolución cinética enzimática de la amina racémica**4a**. Para ello se estudió la influencia de diversos parámetros de reacción como la temperatura, el disolvente, los equivalentes del éster, así como la proporción en peso de sustrato *vs* CAL-B. Las biotransformaciones se analizaron tomando una serie de alícuotas a lo largo del tiempo, y los datos más representativos se encuentran recogidos en la Tabla 4.

Con el fin de intentar disminuir la velocidad de reacción y tratar así de encontrar unas condiciones de reacción que nos permitieran obtener la metoxiacetamida(*R*)-**9a** en forma enantioméricamente pura, se llevaron a cabo experimentos en los que se disminuyeron los equivalentes de metoxiacetato de etilo (entradas 2 y 3). En ambos casos se obtuvieron conversiones cercanas al 50% con excelentes selectividades, aislando la amina enantiopura tras tan solo 1.5 horas cuando se empleaban 2 equivalentes de **7**. En esas mismas condiciones se empleó otro disolvente orgánico apolar como es el *tert*-butilmetil éter (TBME), el cual condujo a la amina en forma enantiopura pero a conversiones más altas y por tanto con enantioselectividadases algo

inferiores que en el caso del THF (entradas 2 y 4). Por otro lado, se observó que al disminuir la temperatura de reacción a 20 °C, la velocidad de reacción disminuía como era esperable, y tras 2 horas de reacción alcanzó una conversión del 51% con una excelente selectividad (entrada 5).

Tabla 4. Resolución cinética de la amina (±)-**4a** utilizando CAL-B ymetoxiacetato de etilo (**7**) en THF seco a 250 rpm.

Entrada	CAL-B:4a[a]	Disolv.	7 (eq)	T (°C)	t (h)	ee_p (%)[b]	ee_s (%)[b]	c (%)[c]	E[d]
1	1:1	THF	3	30	5	83	99	54	56
2	1:1	THF	2	30	1.5	93	>99	52	156
3	1:1	THF	1	30	2.5	95	95	50	154
4	1:1	TBME	2	30	1.5	69	>99	59	72
5	1:1	THF	2	20	1	95	99	51	>200
6	0.5:1	THF	2	20	1	97	86	47	195
7	0.5:1	THF	2	20	2	96	96	50	193
8	1:1	THF	2	4	1	97	92	49	>200
9	1:1	THF	2	4	2	96	99	51	>200

[a] Relación sustrato: enzima en peso.
[b] Excesos enantiómericos determinados mediante HPLC.
[c] Conversiones calculadas como $c = ee_s/(ee_s+ee_P)$.
[d] Valores de la enantioselectividad del proceso: $E = \ln[(1-c)x(1-ee_s)]/\ln[(1-c)x(1+ee_P)]$.

Alentados por estos resultados, se decidió rebajar cantidad de enzima a una relación CAL-B:sustrato de 0.5:1 en peso, alcanzándose tras 2 horas de reacción una conversión del 50%, con la amina y la amida en un 96% *ee* (entradas 6 y 7). Por último se disminuyó la temperatura de la reacción hasta los 4 °C, obteniéndose de la misma manera excelentes enantioselectividades (entradas 8 y 9).

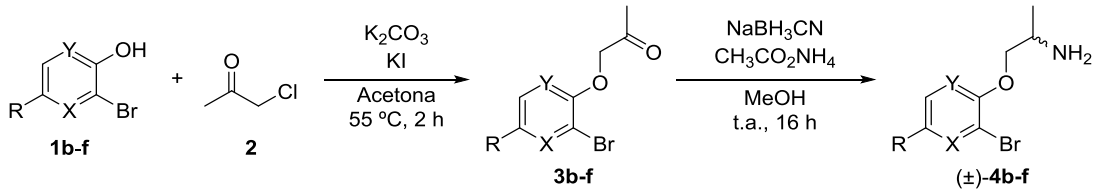
4.2. SÍNTESIS Y RESOLUCIÓN CINÉTICA DE LAS 1-(HETERO)ARILOXI-PROPAN-2-AMINAS (±)-4b-f

Una vez optimizada la resolución cinética de la 1-(2-bromofenoxi)propan-2-amina (**4a**) catalizada por la CAL-B, se decidió intentar dar una generalidad amplia a esta metodología para lo cual se eligieron una serie de bromofenoles sustituidos en posición 4 con diversos restos como un grupo ciano (**1b**), metilo (**1c**) o fluoruro (**1d**), además de una serie de derivados de piridina como el 2-bromopiridin-3-ol (**1e**) o el 3-bromo-piridin-2-ol (**1f**).

4.2.1. Síntesis de las aminas racémicas 4b-f

La síntesis de (±)-**4b-f** se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo seguido para la síntesis de la amina **4a** partiendo del 2-bromofenol(**1a**). Es decir, el primer paso de reacción consistió en el acoplamiento de los alcoholes comerciales **1b-f** con la cloroacetona(**2**) empleando 2 equivalentes de carbonato potásico, cantidades catalíticas de yoduro potásico y acetona como disolvente, aislando tras 2 horas de reacción las propan-2-onas**3b-f** con rendimientos entre altos y excelentes (Tabla 5). Por otro lado, en el caso de la reacción de aminación reductiva con 2 equivalentes de cianoborohidruro sódico y 10 de acetato de amónico, se encontraron rendimientos de entre un 32 y un 41% similares al encontrado para la amina **4a**.Además de la aminación reductora, y con el objetivo de intentar mejorar el rendimiento de este paso de reacción, se procedió a emplear otra metodología con la se pretendía transformar las cetonas **3b-f**en las aminas (±)-**4b-f** con formiato amónico (HCO_2NH_4) en MeOH desoxigenado y agua, empleando un 10% de Pd-C. Se observó que la reacción no tenía lugar, por lo que se descartó esta posible vía sintética.

Tabla 5.Síntesis química de las cetonas **3b-f** y las aminas **4b-f**.



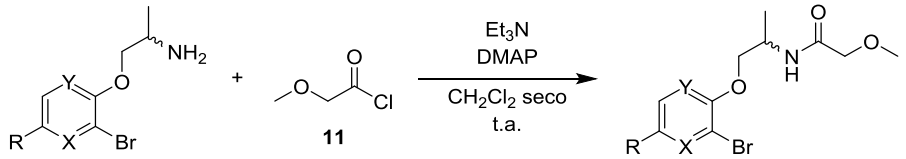
Entrada	1b-f	R	X	Y	Rdto. 3b-f (%)	Rdto. 4b-f (%)
1	**b**	CN	CH	CH	99	40
2	**c**	CH_3	CH	CH	99	31
3	**d**	F	CH	CH	88	34
4	**e**	H	N	CH	90	32
5	**f**	H	CH	N	95	36

4.2.2. Acilación química de las aminas racémicas 4b-f y separación analítica mediante HPLC

La acilación química de las 1-(hetero)ariloxi-propan-2-aminas (±)-**4b-f**se llevó a cabo con cloruro de metoxiacetilo siguiendo el mismo procedimiento que ya se empleara para la síntesis de la metoxiacetamidaracémica**9a**, aislando las amidas **9b-f**tras

cromatografía de columna en gel de sílice con rendimientos entre algos y excelentes (Tabla 6).

Tabla 6. Acilación de las aminas racémicas**4b-f** con 2 equivalentes de cloruro de metoxiacetilo, 3 equivalentes de trietilamina y 0.2 equivalentes de DMAP en diclorometano seco a temperatura ambiente.



(±)-**4a-f** (±)-**9b-f**

Entrada	4b-f	R	X	Y	t (h)	Rdto. 4b-f (%)
1	**b**	CN	CH	CH	1	87
2	**c**	CH_3	CH	CH	3	85
3	**d**	F	CH	CH	1	99
4	**e**	H	N	CH	12	99
5	**f**	H	CH	N	1	89

Aisladas con alta pureza las correspondientes aminas **4b-f** y metoxiacetamidas**9b-f** se desarrollaron métodos de HPLC empleando columnas de relleno quiral, cuyas condiciones se han detallado en la Parte Experimental de este Trabajo Fin de Máster. En el caso de la amina (±)-**4b** no se encontraron unas condiciones de HPLC en las que ambos enantiómeros se separasen, por ello, fue necesario derivatizar la amina remanente a la correspondiente metoxiacetamida tras la reacción enzimática.

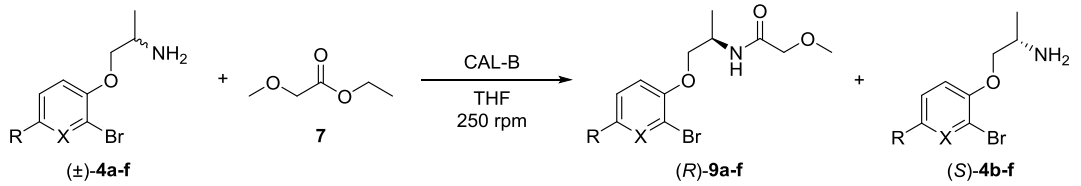
4.2.3. Acilación enzimática de las aminas racémicas 4b-f utilizando la CAL-B

Con las aminas racémicas (±)-**4b-f** sintetizadas y las condiciones de HPLC optimizadas para el seguimiento de sus resoluciones enzimáticas por reacción de acilación, se procedió a extender la metodología ya estudiada y optimizada previamente con la amina racémica**4a**(Tabla 7). Es decir, inicialmente se llevaron a cabo las reacciones en presencia de 2 equivalentes de metoxiacetato de etilo, con una relación de CAL-B *vs* amina (1:1), THF seco como disolvente a 20 ºC y 250 rpm (entrada 1).

En el caso de la amina **4b** con el resto ciano en posición 4 (entrada 2), se observó una reactividad similar a la de la amina sin sustituyentes en la posición 4 (**4a**, entrada

1), si bien tiempos prolongados de reacción condujeron a una pérdida de la selectividad del proceso (E = 64). Sin embargo, se apreciaron excelentes selectividades en la formación de las metoxiacetamidas (*R*)-**9c**,**d** tras simplemente 1 hora de reacción (entradas 3 y 4). Este efecto se observó también en el caso de las heteroaminas**4e** y **4f** (entradas 5-8), las cuales mostraron una cinética similar observándose una pérdida paulatina de la selectividad con el tiempo. Tanto para **4e** como para **4f** se alcanzaron conversiones del 50% con excelente selectividad tras tan solo 45 minutos de reacción.

Tabla 7. Resolución cinética de las amina (±)-**4a-f** utilizando CAL-B (relación 1:1 en peso con respecto a la amina) ymetoxiacetato de etilo (**7**, 2 equivalentes) en THF seco a 20 ºC y 250 rpm.



Entrada	4a-f	R	X	Y	t (h)	ee_p (%)[a]	ee_s (%)[a]	c (%)[b]	E[c]
1	**a**	H	CH	CH	1	95	99	51	206
2	**b**	CN	CH	CH	1	93	90	50	91
3	**c**	CH_3	CH	CH	1	97	>99	51	>200
4	**d**	F	CH	CH	1	95	>99	51	>200
5	**e**	H	N	CH	0.75	99	>99	50	>200
6	**e**	H	N	CH	1	97	>99	51	450
7	**f**	H	N	CH	0.75	98	>99	50	145
8	**f**	H	CH	N	1	93	>99	52	56

[a] Excesos enantioméricos determinados mediante HPLC.
[b] Conversiones calculadas como $c = ee_s/(ee_s+ee_P)$.
[c] Valores de la enantioselectividad del proceso: $E = \ln[(1-c)x(1-ee_s)]/\ln[(1-c)x(1+ee_P)]$.

4.3. ASIGNACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA DE LAS AMINAS Y METOXIACETAMIDAS OBTENIDAS

Las aminas y metoxiacetamidasenantioenriquecidas obtenidas mediante la resolución cinética enzimática no han sido descritas previamente en la bibliografía. Por ello, se han asignado sus configuraciones absolutas a través del modelo empírico descrito como regla de Kazlauskas.[27]

Esta regla ha sido presentada anteriormente en la introducción de este Trabajo Fin de Mástery se basa en el tamaño de los sustituyentes unidos al estereocentro para

predecir qué enantiómero reaccionará más rápidamente. De esta forma, el sustituyente más voluminoso se alojará en el hueco de mayor tamaño, mientras que el sustituyente menos voluminoso se alojará en el de menor tamaño (Figura 4,Introducción). Si aplicamos la regla de Kazlauskas a nuestros sustratos (Figura 7), se puede asumir que reaccionará más rápidamente el enantiómero de la amina de configuración (*R*), obteniéndose por tanto las (*R*)-metoxiacetamidas**9a-f** y las aminas remanentes **4a-f**. Adicionalmente, y en un estudio paralelo desarrollado en nuestro grupo de investigación sobre la transaminación de cetonas con ω-transaminasas de estereopreferencia conocida,[59] se han comparado las rotaciones ópticas de las aminas obtenidas empleando estas dos estrategias enzimáticas de manera independiente, llegando a la misma conclusión derivada de la aplicación de la Regla de Kazaluskas.

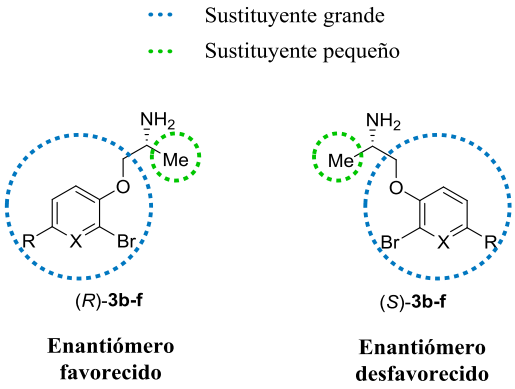


Figura 7. Regla de Kazlauskas aplicada a la resolución de las aminas (±)-**4b-f** por acilación catalizada con la CAL-B.

[59] Tesis Doctoral de María López Iglesias, **2015**, Universidad de Oviedo: "Síntesis de heterociclos nitrogenados mediante la combinación de estrategias químicas y enzimáticas. Aplicación de la biocatálisis en procesos no convencionales".

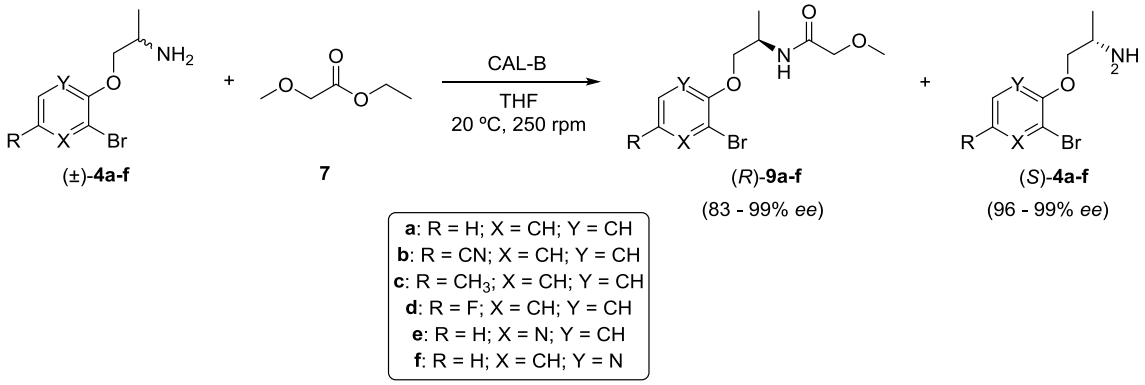
CONCLUSIONES

En este Trabajo Fin de Máster se ha desarrollado una metodología de síntesis sencilla y general de una serie de 1-(hetero)ariloxi-propan-2-aminas racémicas que difieren en la sustitución presente en el anillo aromático.

Una vez sintetizadas químicamente las correspondientes metoxiacetamidas racémicas con rendimientos entre moderados y excelentes, se han desarrollado métodos de HPLC empleando columnas de relleno quiral, adecuados para el seguimiento temporal de las resoluciones cinéticas enzimáticas.

Se ha llevado a cabo una optimización de las condiciones de reacción empleando la 1-(2-bromofenoxi)propan-2-amina como sustrato modelo, estudiando la influencia de muy diversas variables que afectan a la catálisis enzimática como la cantidad de enzima y donor de acilo, disolvente, temperatura y el tiempo de reacción.

La lipasa de Candida antarctica tipo B (CAL-B) en combinación con el metoxiacetato de etilo ha permitido la resolución de una familia de 1-(hetero)ariloxi-propan-2-aminas con excelentes selectividades, aislando en todos los casos las aminas en forma enantiopura (Esquema 24).



Esquema 24. Resolución cinética enzimática de 1-(hetero)ariloxi-propan-2-aminas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y habiendo accedido a una serie de precursores de 2,3-dihidrobenzoxazinas, nos planteamos como planes futuros la preparación de una serie representativa de este tipo de compuestos heterocíclicos.

PARTE EXPERIMENTAL

6.1. DISOLVENTES Y REACTIVOS GENERALES

Los reactivos químicos fueron adquiridos de distintas casas comerciales como Sigma-Aldrich, Acros o Fluka y fueron emplearon sin necesidad de purificación adicional.

La lipasa de *Candida antarctica* tipo B (CAL-B, Novozym-435, 7300 PLU/g) fue donada por la compañía Novo Nordisk y está inmovilizada sobre un soporte de tipo polimérico.

Los disolventes empleados en las reacciones de aminación reductora y de acilación tanto química como enzimática fueron previamente destilados bajo atmósfera de nitrógeno y secados con desecantes adecuados a casa caso. En el caso del metanol se empleó hidruro cálcico, al igual que para el diclorometano. Para el tetrahidrofurano, el *tert*-butilmetil éter y el dietil éter se usó sodio, empleando benzofenona como indicador.

6.2. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS

6.2.1. Cromatografía en gel de sílice

Las cromatografías en capa fina (TLC, del inglés *thin layer chromatography*) se realizaron sobre un soporte de cromatofolios de gel de sílice 60 de 0.25 mm de espesor que incorporan un revelador de ultravioleta (λ_{max} = 254 nm), comercializados por Merck.

Como revelador se empleó una disolución de *p*-anisaldehído (12 mL) en ácido sulfúrico fumante (17 mL), ácido acétido (5 mL) y MeOH (450 mL). Alternativamente, se empleó una disolución de nihidrina en etanol.

Las cromatografías en columna fueron realizadas sobre gel de sílice 60 (230-400 *mesh*) comercializada por Merck. Como eluyentes se utilizaron mezclas de CH_2Cl_2 y MeOH.

6.2.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Los análisis llevados a cabo empleando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se realizaron en un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 utilizando diferentes columnas quirales. La detección se llevó a cabo en la zona del espectro visible-ultravioleta a unas longitudes de

onda de 210 y 215 nm. Como fase móvil se utilizaron mezclas de hexano e isopropanol o, alternativamente, de hexano y etanol, detallándose en la caracterización de cada producto la proporción exacta para la separación de los enantiómeros de cada compuesto.

6.2.3. Espectroscopía infrarroja (IR)

Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro PERKIN-ELMER FT: ESPECTRUM 100T empleando como soporte dos monocristales de NaCl cuando se trataba de compuestos líquidos, o bien pastillas de KBr cuando eran sólidos. En todos los casos, los espectros de IR se registraron en la zona comprendida entre 4000 y 700 cm^{-1}. Las bandas de vibración se indican en valores de ν máxima y se expresan en cm^{-1}.

6.2.4. Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)

Los experimentos de masas de alta resolución (HRMS) se realizaron empleando un espectrómetro micrOTOF-Q y se obtuvieron espectros de masas empleando la técnica ESI^+. Los valores se refieren a unidades de masa atómica (uma).

6.2.5. Puntos de fusión

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

6.2.6. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los experimentos de resonancia magnética nuclear de ^{1}H-RMN, ^{13}C-RMN y DEPT se realizaron en los espectrómetros Bruker AV-300 (300.13 MHz para ^{1}H y 75.5 MHz para ^{13}C) y Bruker DPX-300 (300.13 MHz para ^{1}H y 75.5 MHz para ^{13}C) empleándose $CDCl_3$ como disolvente salvo para el caso de la amina (±)-**3c** en el que se empleó MeOD. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón, relativos a la señal del tretametilsilano como referencia interna, y las constantes de acoplamiento (*J*) en Hertzios (Hz).

6.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS

6.3.1. Procedimiento para la síntesis de las cetonas 3a-f

A una mezcla de carbonato potásico (2 equiv), yoduro potásico (0.29 equiv) y el correspondiente bromofenol **1a-f** (1 equiv) en acetona (0.3 M) se añade la cloroacetona (**2**, 1.2 equiv) a temperatura ambiente y la mezcla se calienta a reflujo durante 2 h. Transcurrido ese tiempo, el contenido del matraz se vuelca sobre H_2O (5 mL) y se extrae con Et_2O (5 x 10 mL). Las fases orgánicas se lavan con H_2O (20 mL), se secan con Na_2SO_4 y se evapora el disolvente,

aislando las bromocetonas **3a-f** con rendimientos muy altos (**3a**: 99%; **3b**: 99%; **3c**: 99%; **3d**: 88%; **3e**: 90%; **3f**: 95%; Esquema 21 y Tabla 3) y sin necesidad de purificación adicional.

6.3.2. Procedimiento para la síntesis de las aminas racémicas 4a-f

A una disolución de la correspondiente cetona **3a-f** (1 equiv) en metanol seco (0.32 M) bajo atmósfera de nitrógeno se adicionan, sucesivamente, el acetato de amonio (10 equiv) y el cianoborohidruro de sodio (2 equiv). La mezcla agita a temperatura ambiente durante 16 h y, pasado ese tiempo, se adiciona H_2O (15 mL) para detener la reacción. A continuación, se acidifica con HCl concentrado (unas gotas) y se extrae con Et_2O (3 x 15 mL). La fase orgánica se desecha y la fase acuosa se alcaliniza con NaOH (dos/tres pastillas) y se extrae con Et_2O (3 x 20 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4, se filtra y se evapora el disolvente. El crudo de reacción obtenido se purifica mediante columna de cromatografía en gel de sílice (10% $MeOH/CH_2Cl_2$), aislando las aminas racémicas (**4a**: 25%; **4b**: 40%; **4c**: 31%; **4d**: 34%; **4e**: 32% y **4f**: 36%; Esquema 21 y Tabla 3).

6.3.3. Procedimiento para la síntesis de la acetamida racémica 8a

A una disolución de la amina racémica **4a** (75 mg, 0.328 mmoles) en diclorometano seco (2 mL) bajo atmósfera de nitróogeno se añaden, sucesivamente, DMAP (8.0 mg, 0.066 mmoles), trietilamina (72.2 µL, 0.983 mmoles) y anhídrido acético (**10**, 72.2 µL, 0.655 mmoles). La mezcla se deja agitando a temperatura ambiente durante una hora. El crudo de reacción obtenido tras la evaporación del disolvente se purifica mediante columna cromatográfica (5% $MeOH/CH_2Cl_2$), aislando la acetamida **8a** con un rendimiento del 96%.

6.3.4. Procedimiento para la síntesis de las metoxiacetamidas racémicas 9a-f

A una disolución de la amina racémica **4a-f** (1 equiv) en diclorometano seco (2.1 mL) se añaden, sucesivamente, dimetilaminopiridina (0.2 equiv), trietilamina (3 equiv) y cloruro de metoxiacetilo (**11**, 2 equiv). La mezcla se deja agitando a temperatura ambiente durante una hora y el crudo de reacción obtenido tras la evaporación del disolvente se purifica mediante columna cromatográfica (5% $MeOH/CH_2Cl_2$), aislando las metoxiacetamidas con buenos rendimientos (**9a**: 98%; **9b**: 87%; **9c**: 85%; **9d**: 99%; **9e**: 99%; **9f**: 89%; Esquema 22 y Tabla 4).

6.3.5. Procedimiento para la resolución cinética enzimática de la amina (±)-4a con acetato de etilo

A una suspensión de CAL-B (25 mg, 1:1 en peso) y amina (±)-**4a** (25 mg, 0.109 mmoles), bajo atmósfera de N_2, en THF seco (1 mL) se añade acetato de etilo (**6**, 32 µL, 0.327 mmoles). La mezcla se agita a 30 °C y 250 rpm durante 45 h. El crudo de reacción se filtra, se

lava la enzima con THF (3 x 5mL) y se evapora disolvente. El crudo de reacción se purifica mediante columna cromatográfica en gel de sílice empleando un gradiente de eluyentes (95-10% MeOH/CH_2Cl_2). Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 3.

6.3.6. Procedimiento para la resolución enzimática de las aminas (±)-4a-f con metoxiacetato de etilo

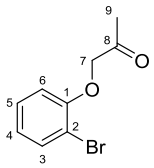
A una suspensión de CAL-B (1:1 en peso) y la correspondiente amina (±)-**4a-f** (0.10 mmoles), bajo atmósfera de N_2, en el disolvente seco (0.1 M, 1 mL) se añade metoxiacetato de etilo (**7**. La mezcla se agita orbitalmente a 250 rpm hasta que se da por concluida la reacción, momento en el que se filtra la reacción y se evaporan disolventes. Posteriormente, se purifica el crudo de reacción mediante columna cromatográfica en gel de sílice empleando un gradiente de eluyentes (5-10% MeOH/CH_2Cl_2). Los resultados obtenidos se recogen en las Tablas 3, 4 y 7.

6.3.7. Procedimiento para la derivatización de la amina 4b remanente en la resolución enzimática de la misma amina racémica

A una disolución de la amina **4b** (6.4 mg, 0.025 mmoles) en diclorometano seco (0.3 mL), bajo atmósfera de nitrógeno se añaden, sucesivamente, DMAP (0.6 mg, 0.005 mmol), trietilamina (10.5 µL, 0.075 mmoles) y cloruro de metoxiacetilo (**11**, 4.6 µL, 0.05 mmoles). La mezcla se deja agitando a temperatura ambiente durante una hora y el crudo de reacción se purifica mediante columna cromatográfica en gel de sílice (10% MeOH/CH_2Cl_2), aislando la metoxiacetamida con un rendimiento del 83%.

6.4. DATOS EXPERIMENTALES: CARACTERIZACIÓN EXPERIMENTAL

1-(2-Bromofenoxi)propan-2-ona (3a)



Fórmula molecular: $C_9H_9BrO_2$ **Peso molecular:** 229.07 g/mol

Aspecto físico: Aceite incoloro ***R_f*** (40% AcOEt/Hex): 0.61

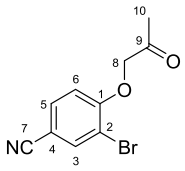
IR (NaCl): ν 3450, 3066, 3007, 2919, 1732, 1586, 1575, 1478, 1444, 1431, 1360, 969, 932, 863, 830 cm^{-1}

^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 2.37 (s, 3H, H_9), 4.54 (s, 2H, H_7), 6.75-6.78 (dd, $^3J_{HH}$ = 8.4 Hz, $^4J_{HH}$ = 0.9 Hz, 1H, H_6), 6.86-6.92 (m, 1H, H_4), 7.25 (ddd, $^3J_{HH}$ = 8.4, 7.5 Hz, $^4J_{HH}$ = 1.6 Hz, 1H, H_5), 7.57 (dd, $^3J_{HH}$ = 8.1 Hz, $^4J_{HH}$ = 1.6 Hz, 1H, H_3) ppm

^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 27.0 (C_9), 73.8 (C_7), 112.1 (C_6), 113.1 (C_4), 122.9 (C_3), 128.6 (C_5), 133.7 (C_2), 154.1 (C_1), 205.5 (C_8) ppm

HRMS (ESI^+, m/z): $(C_9H_9BrNaO_2)^+$ $(M+Na)^+$ calculada 250.9678; encontrada 250.9691

1-(2-bromo-4-cianofenoxi)propan-2-ona (3b)



Fórmula molecular: $C_{10}H_8BrNO_2$ **Peso molecular:** 254.08 g/mol

Aspecto físico: Sólido amarillento ***R_f*** (20% Et_2O/Hex): 0.33

T_{fus}: 109-110 °C

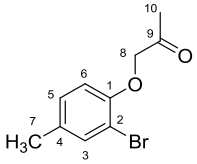
IR (KBr): ν 3364, 3054, 2987, 2306, 1731, 1601, 1440, 1377, 1322, 923, 896 cm^{-1}

^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 2.39 (s, 3H, H_{10}), 4.66 (s, 2H, H_8), 6.81 (d, $^3J_{HH}$ = 8.5 Hz, 1H, H_6), 7.60 (dd $^3J_{HH}$ = 8.5 Hz, $^4J_{HH}$ =2.0 Hz, 1H, H_5), 7.88 (d, $^4J_{HH}$ = 2.0 Hz, 1H, H_3) ppm

^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 26.9 (C_{10}), 73.4 (C_8), 106.4 (C_2), 112.8 (C_6), 117.4 (C_7), 133.1-137.1 (C_3 + C_4), 157.6 (C_1), 203.4 (C_8) ppm

HRMS (ESI^+, m/z): $(C_{10}H_8BrNNaO_2)^+$ $(M+Na)^+$ calculada 275.9631; encontrada 275.9625
$(C_{10}H_9BrNO_2)^+$ $(M+H)^+$ calculada 253.9811; encontrada 253.9813

1-(2-Bromo-4-metilfenoxi)propan-2-ona (3c)



Fórmula molecular: $C_{10}H_{11}BrO_2$ **Peso molecular:** 243.10 g/mol

Aspecto físico: Sólido amarillento ***R_f*** (20% Et_2O/Hex): 0.26

T_{fus}: 47-49 °C

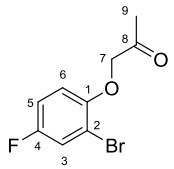
IR (KBr): ν 3055, 2925, 1724, 1606, 1496, 1359, 1290, 947, 882 cm^{-1}

^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 2.28 (s, 3H, H_{10}), 2.36 (s, 3H, H_7), 4.51 (s, 2H, H_8), 6.66 (d, $^3J_{HH}$ = 8.3 Hz, 1H, H_6), 7.03 (dd, $^3J_{HH}$ = 8.3 Hz, $^4J_{HH}$ = 2.0 Hz, 1H, H_5), 7.39 (d, $^4J_{HH}$ = 2.0 Hz, 1H, H_3) ppm

^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 20.3 (C_{10}), 27.1 (C_7), 74.1 (C_8), 112.0 (C_2), 113.2 (C_6), 129.1 (C_5), 132.9 (C_4), 134.2 (C_3), 152.2 (C_1), 206.1 (C_9) ppm

HRMS (ESI^+, m/z): $(C_{10}H_{11}BrNaO_2)^+$ $(M+Na)^+$ calculada 264.9835; encontrada 264.9827

1-(2-Bromo-4-fluorofenoxi)propan-2-ona (3d)



Fórmula molecular: $C_9H_8BrFO_2$ **Peso molecular:** 247.06 g/mol

Aspecto físico: Sólido blanco ***R_f*** (20% Et_2O/Hex): 0.31

T_{fus}: 67-68 °C

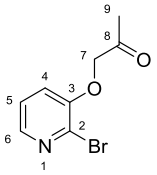
IR (KBr): ν 3401, 3055, 2306, 1730, 1722, 1594, 1489, 1361, 947, 866 cm^{-1}

^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 2.36 (s, 3H, H_9), 4.52 (s, 2H, H_7), 6.75 (dd, $^3J_{HH}$ = 9.0 Hz, $^4J_{FH}$ = 4.6 Hz, 1H, H_6), 6.98 (ddd, $^3J_{HH}$ = 9.0 Hz, $^3J_{FH}$ = 7.7 Hz, $^4J_{HH}$ = 3.0 Hz, 1H, H_5), 7.34 (dd, $^3J_{FH}$ = 7.7 Hz, $^4J_{HH}$ = 3.0, 1H, H_3) ppm

^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 27.0 (C_9), 74.5 (C_7), 112.6 (d, $^3J_{FC}$ = 9.9 Hz, C_2), 114.2 (d, $^3J_{FC}$ = 8.6 Hz, C_6), 115.0 (d, $^2J_{FC}$ = 22.9 Hz, C_5), 121.0 (d, $^2J_{FC}$ = 25.8 Hz, C_3), 151.0 (d, $^4J_{FC}$ = 2.6 Hz, C_1), 157.4 (d, $^1J_{FC}$ = 244.5 Hz, C_4), 205.3 (C_8) ppm

HRMS (ESI^+, m/z): $(C_9H_8BrFNaO_2)^+$ $(M+Na)^+$ calculada 268.9584; encontrada 268.9578

1-((2-Bromopiridin-3-il)oxi)propan-2-ona (3e)



Fórmula molecular: $C_8H_8BrNO_2$ **Peso molecular:** 230.06 g/mol

Aspecto físico: Sólido amarillento ***R_f*** (20% Et_2O/Hex): 0.38

T_{fus}: 73-74 °C

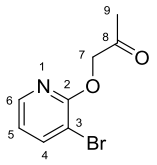
IR (KBr)**:** ν 3054, 2986, 1738, 1565, 1415, 1362, 967, 896, 793, 749, 704 cm^{-1}

^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 2.40 (s, 3H, H_9), 4.60 (s, 2H, H_7), 7.05 (dd, $^3J_{HH}$ = 8.1 Hz, $^4J_{HH}$ = 1.6 Hz, 1H, H_4), 7.23 (dd, $^3J_{HH}$ = 8.1 Hz, $^3J_{HH}$ = 4.7 Hz, 1H, H_5), 8.06 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.7 Hz, $^4J_{HH}$ = 1.6 Hz, 1H, H_6) ppm

^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 26.9 (C_9), 73.5 (C_7), 120.0 (C_4), 123.4 (C_5), 133.0 (C_2), 142.4 (C_6), 151.3 (C_3), 204.1 (C_8) ppm

HRMS (ESI^+, m/z): $(C_8H_9BrNO_2)^+$ $(M+H)^+$ 229.9811; encontrada 229.9812
$(C_8H_8BrNNaO_2)^+$ $(M+Na)^+$ 251.9631; encontrada 251.9624

1-((3-Bromopiridin-2-il)oxi)propan-2-ona (3f)



Fórmula molecular: $C_8H_8BrNO_2$ **Peso molecular:** 230.06 g/mol

Aspecto físico: Sólido marrón ***R_f*** (20% Et_2O/Hex): 0.2

T_{fus}: 101-103 °C

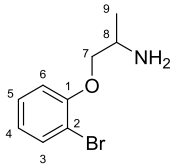
IR (KBr): ν 3055, 2987, 1738, 1656, 1603, 1527, 1422, 1406, 1371, 970, 856, cm^{-1}

^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 2.31 (s, 3H, H_9), 4.76 (s, 2H, H_7), 6.14 (t, $^3J_{HH}$ = 7.0 Hz, 1H, H_5), 7.18 (dd, $^3J_{HH}$ = 7.0, $^4J_{HH}$ = 1.9 Hz, 1H, H_6), 7.78 (dd, $^3J_{HH}$ = 7.0, $^4J_{HH}$ = 1.9 Hz, 1H, H_4)

^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 27.7 (C_8), 58.9 (C_6), 106.1 (C_5), 116.4 (C_3), 137.6 (C_6), 142.2 (C_4), 158.8 (C_2), 200.1 (C_8)

HRMS (ESI^+, m/z): $(C_8H_8BrNNaO_2)^+$ $(M+Na)^+$ 251.9631; encontrada 251.9630

1-(2-Bromofenoxi)propan-2-amina (4a)



Fórmula molecular: $C_9H_{12}BrNO$ **Peso molecular:** 230.11 g/mol

Aspecto físico: Aceite amarillento ***R_f*** (10% MeOH/CH_2Cl_2): 0.28

IR (NaCl): ν 3356, 2965, 2929, 2227, 1658, 1614, 1597, 1487, 1369, 1295, 975, 855, 730 cm^{-1}

^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 1.22 (d, $^3J_{HH}$ = 6.6 Hz, 3H, H_9), 2.25 (s, 2H, NH_2), 3.22-3.57 (m, 1H, H_8), 3.74 (dd, $^2J_{HH}$ = 8.9 Hz, $^3J_{HH}$ = 7.4 Hz, 1H, H_7), 3.96 (dd, $^2J_{HH}$ = 8.9 Hz, $^3J_{HH}$ = 4.0 Hz, 1H, H_7), 6.75-6.92 (m, 2H, H_6 y H_4), 7.24 (td, $^3J_{HH}$ = 8.3 Hz, $^4J_{HH}$ = 1.6 Hz, 1H, H_5), 7.53 (dd, $^3J_{HH}$ = 7.9 Hz, $^4J_{HH}$ = 1.6 Hz, 1H, H_3) ppm.

^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 19.4 (C_9), 46.5 (C_8), 75.2 (C_7), 112.3 (C_2), 113.4 (C_6), 122.1 (C_4), 128.5 (C_5), 133.3 (C_3), 155.1 (C_1) ppm.

HRMS (ESI^+, m/z): $(C_8H_8BrNNaO_2)^+$ $(M+Na)^+$ calculada 251.9631; encontrada 251.9630

Rotación óptica: (*S*)-**4a** $[\alpha]_D^{20}$ = +6.4 (c = 0.5, EtOH) con >99% *ee*

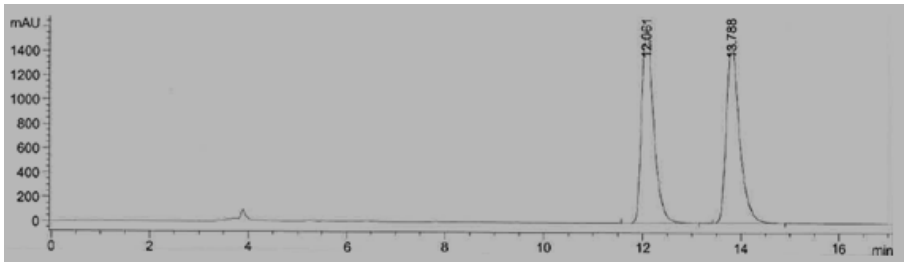
Separación analítica de la amina (±)-4a (HPLC):

Columna: Chiralpak AD-H Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 95:5

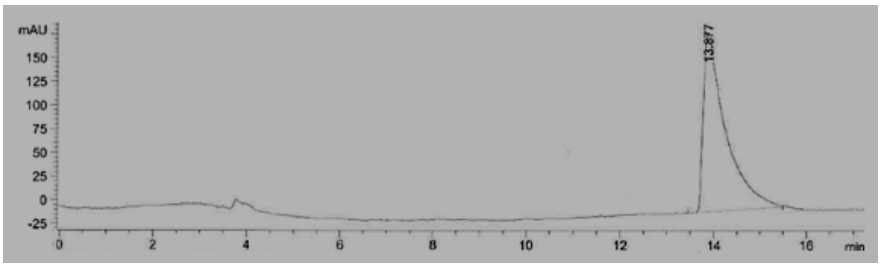
Flujo: 0.8 mL/min Temperatura: 30 °C

Tiempos de retención: t_R = 11.8 y 13.4 min

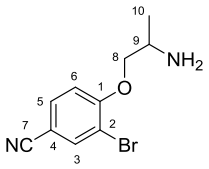
Separación por HPLC de ambos enantiómeros del compuesto (±)-4a:



Compuesto (*S*)-4a con un >99% *ee*:



1-(2-Bromo-4-cianofenoxi)propan-2-amina (4b)



Fórmula molecular: $C_{10}H_{11}BrN_2O$ **Peso molecular:** 255.12 g/mol

Aspecto físico: Aceite amarillento R_f (10% MeOH/CH_2Cl_2): 0.33

IR (NaCl): ν 3364, 3358, 3104, 2227, 1750, 1596, 1494, 1461, 1398, 1397, 886, 816, 751, 715, 672 cm^{-1}

^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 1.24 (d, $^2J_{HH}$ = 6.6 Hz, 3H, H_9), 2.12 (s, 2H, NH_2), 3.47 (td, $^3J_{HH}$ = 6.9, $^3J_{HH}$ = 4.1 Hz, 1H, H_9), 3.82 (dd, $^2J_{HH}$ = 8.8, $^3J_{HH}$ = 7.3 Hz, 1H, H_8), 4.01 (dd, $^2J_{HH}$ = 8.8, $^3J_{HH}$ = 4.1 Hz, 1H, H_8), 6.93 (d, $^3J_{HH}$ = 8.6 Hz, 1H, H_6), 7.58 (dd, $^3J_{HH}$ = 8.5, $^4J_{HH}$ = 2.1 Hz, 1H, H_5), 7.83 (d, $^4J_{HH}$ = 2.1 Hz, 1H, H_3) ppm

^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 19.5 (C_{10}), 46.1 (C_9), 75.5 (C_8), 105.3 (C_2), 112.8 (C_6), 117.7 (C_7), 133.1-136.6 (C_3 + C_4), 158.6 (C_1) ppm

HRMS (ESI^+, m/z): $(C_{10}H_9BrNO)^+$ $(M+H)^+$ calculada 237.9862; encontrada 237.9858

Rotación óptica: (*S*)-**4b** derivatizado a (*S*)-**9b** $[\alpha]_D^{20}$ = - 30.5 (c = 0.5, EtOH) con 90% *ee*

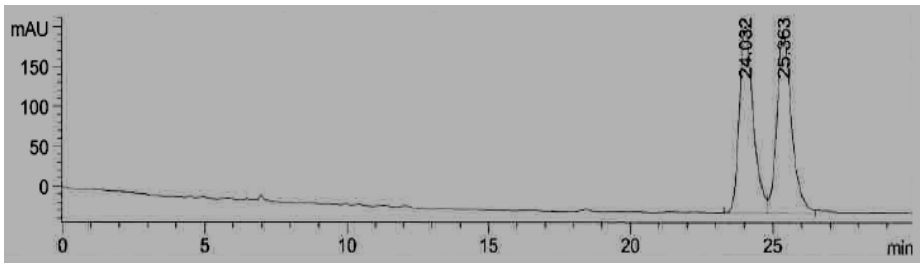
Separación analítica de la metoxiacetamida (±)-9b (HPLC):

Columna: Chiralpak AD-H Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

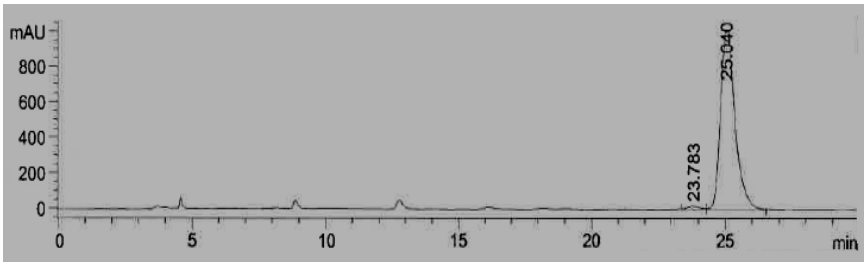
Flujo: 0.8 mL/min Temperatura: 30 °C

Tiempos de retención: t_R = 23.7 y 25.2 min

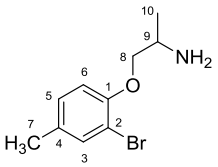
Separación por HPLC de ambos enantiómeros del compuesto (±)-9b:



Compuesto (*S*)-4b derivatizado a (*S*)-9b con un 90% *ee*:



1-(2-Bromo-4-metilfenoxi)propan-2-amina (4c)



Fórmula molecular: $C_{10}H_{14}BrNO$ **Peso molecular:** 244.13 g/mol

Aspecto físico: Aceite amarillento $\boldsymbol{R_f}$ (10% MeOH/CH_2Cl_2): 0.35

IR (NaCl): ν 3355, 2925, 2932, 1663, 1486, 1373, 1287, 933, 796, 782, 685 cm^{-1}

^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 1.22 (d, $^3J_{HH}$ = 6.6 Hz, 3H, H_{10}), 2.27 (s, 2H, NH_2), 2.60 (s, 3H, H_7), 3.42 (m, 1H, H_9), 3.72 (dd, $^2J_{HH}$ = 8.9, $^3J_{HH}$ = 7.4 Hz, 1H, H_8), 3.94 (dd, $^2J_{HH}$ = 8.9, $^3J_{HH}$ = 4.0 Hz, 1H, H_8), 6.78 (d, $^3J_{HH}$ = 8.4 Hz, 1H, H_6), 7.03 (dd, $^3J_{HH}$ = 8.4, $^4J_{HH}$ = 2.1 Hz, 1H, H_5), 7.35 (d, $^4J_{HH}$ = 2.1 Hz, 1H, H_3) ppm

^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 19.3 (C_{10}), 20.2 (C_7), 46.4 (C_8), 75.3 (C_8), 112.0 (C_2), 113.5 (C_6), 128.9 (C_5), 131.8 (C_4), 133.6 (C_3), 152.9 (C_1) ppm

HRMS (ESI^+, m/z): $(C_{10}H_{15}BrNO)^+$ $(M+H)^+$ calculada 244.0332; encontrada 244.0322

Rotación óptica: (*S*)-**4c** $[\alpha]_D^{20}$ = + 6.4 (c = 1, EtOH) con >99% *ee*

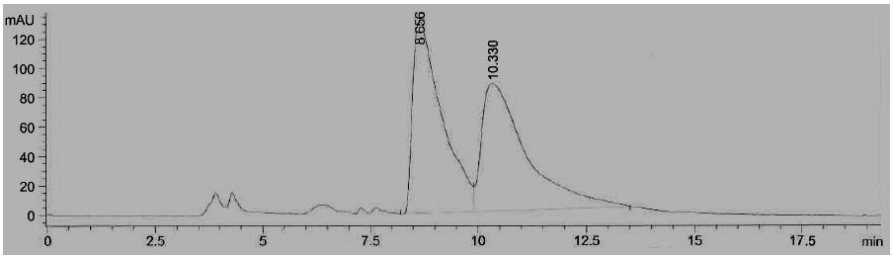
Separación analítica de la amina (±)-4c (HPLC):

Columna: Chiralcel OD-H Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

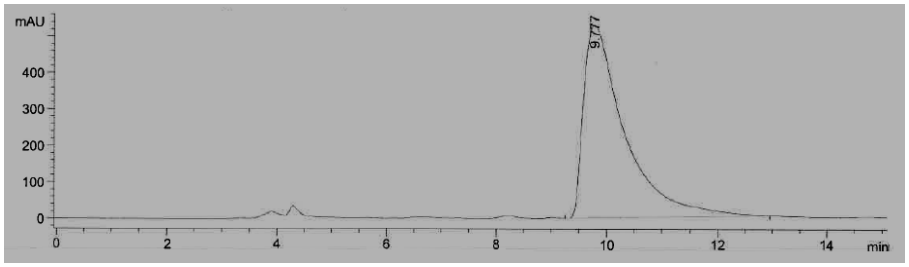
Flujo: 0.8 mL/min Temperatura: 30 °C

Tiempos de retención: t_R = 9.3 y 11.7 min

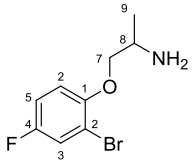
Separación por HPLC de ambos enantiómeros del compuesto (±)-4c:



Compuesto (*S*)-4c con un >99% *ee*:



1-(2-Bromo-4-fluorofenoxi)propan-2-amina (4d)



Fórmula molecular: $C_9H_{11}BrFNO$ **Peso molecular:** 248.10 g/mol

Aspecto físico: Aceite amarillento $\boldsymbol{R_f}$ (10% MeOH/CH_2Cl_2): 0.23

IR (NaCl): ν 3410, 3012, 2979, 1687, 1433, 1326, 1290, 947, 867, 753, 701 cm^{-1}

^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 1.22 (d, $^3J_{HH}$ = 6.6 Hz, 3H, H_9), 2.43 (s, 2H, NH_2), 3.33-3.53 (m, 1H, H_8), 3.71 (dd, $^2J_{HH}$ = 8.8, $^3J_{HH}$ = 7.4 Hz, 1H, H_7), 3.93 (dd, $^2J_{HH}$ = 8.8, $^3J_{HH}$ = 4.0 Hz, 1H, H_7), 6.83 (dd, $^3J_{HH}$ = 9.1, $^4J_{HF}$ = 4.8 Hz, 1H, H_6), 6.95 (m, 1H, H_5), 7.28 (dd, $^3J_{HF}$ = 7.8, $^4J_{HH}$ = 3.0 Hz, 1H, H_3) ppm

^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 19.2 (C_9), 46.4 (C_8), 75.8 (C_7), 112.4 (d, $^3J_{FC}$ = 9.9 Hz, C_2), 114.1 (d, $^3J_{FC}$ = 8.5 Hz, C_6), 114.8 (d, $^2J_{FC}$ = 22.6 Hz, C_5), 120.3 (d, $^2J_{FC}$ = 25.8 Hz, C_3), 151.7 (d, $^4J_{FC}$ = 2.4 Hz, C_1), 156.7 (d, $^1J_{FC}$ = 243.3 Hz, C_4) ppm

HRMS (ESI^+, m/z): $(C_9H_{12}BrFNO_2)^+$ $(M+H)^+$ calculada 248.0081; encontrada 248.0048

Rotación óptica: (*S*)-**4d** $[\alpha]_D^{20}$ = + 2.5 (c = 1, EtOH) con >99% *ee*

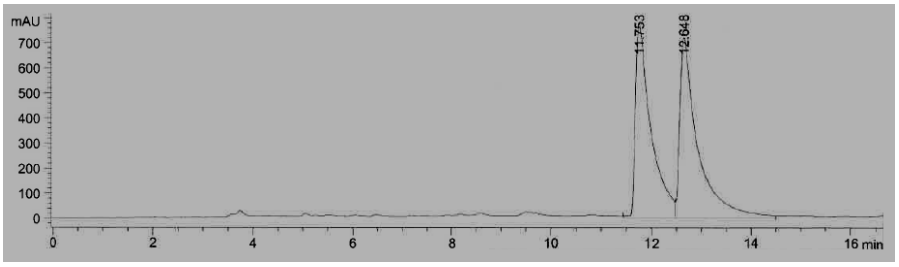
Separación analítica de la amina (±)-4d (HPLC):

Columna: Chiralpak AD-H Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 95:5

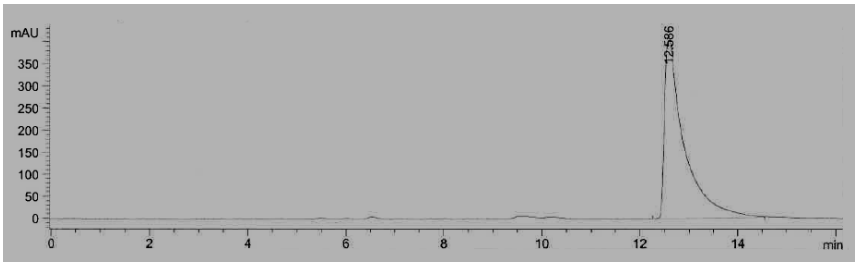
Flujo: 0.8 mL/min Temperatura: 30 °C

Tiempos de retención: t_R = 11.8 y 12.6 min

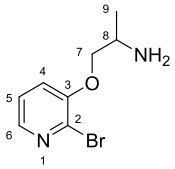
Separación por HPLC de ambos enantiómeros del compuesto (±)-4d:



Compuesto (*S*)-4d con un >99% *ee*:



1-((2-Bromopiridin-3-il)oxi)propan-2-amina (4e)



Fórmula molecular: $C_8H_{11}BrN_2O$ **Peso molecular:** 231.09 g/mol

Aspecto físico: Aceite amarillento ***R*$_f$** (10% MeOH/CH_2Cl_2)**:** 0.28

T$_{fus}$: 80-90 °C

IR (NaCl): ν 3330, 3321, 2960, 2929, 2227, 1645, 1596, 1563, 1538, 1494, 1447, 1416, 849, 795, 726, 680 cm^{-1}

^{1}H-RMN (MeOD, 300.13 MHz): δ 1.29 (d, $^3J_{HH}$ = 6.6 Hz, 3H, H_9), 3.43 (m, 1H, H_8), 3.94 (dd, $^2J_{HH}$ = 9.3, $^3J_{HH}$ = 6.6 Hz, 1H, H_7), 4.09 (dd, $^2J_{HH}$ = 9.3, $^3J_{HH}$ = 4.5 Hz, 1H, H_8), 7.38 (dd, $^3J_{HH}$ = 8.2, $^3J_{HH}$ = 4.9 Hz, 1H, H_5), 7.48 (dd, $^3J_{HH}$ = 8.2, $^4J_{HH}$ = 1.7 Hz, 1H, H_4), 7.95 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.9, $^4J_{HH}$ = 1.7 Hz, 1H, H_6) ppm

^{13}C-RMN (MeOD, 75.5 MHz): δ 21.2 (C_9), 49.8 (C_8), 77.8 (C_7), 124.9 (C_4), 128.0 (C_5), 136.1 (C_2), 144.9 (C_6), 156.3 (C_3) ppm

HRMS (ESI^+, m/z): $(C_8H_9BrNO)^+$ $(M+H)^+$ calculada 213.9862; encontrada 213.9859

Rotación óptica: (*S*)-**4e** $[\alpha]_D^{20}$ = + 4.2 (c = 1, EtOH) con >99% *ee*

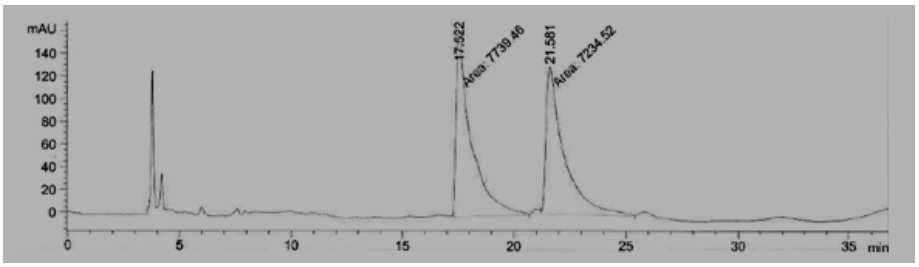
Separación analítica de la amina (±)-4e (HPLC):

Columna: Chiralpak AD-H Eluyente: *n*-hexano/etanol 90:10

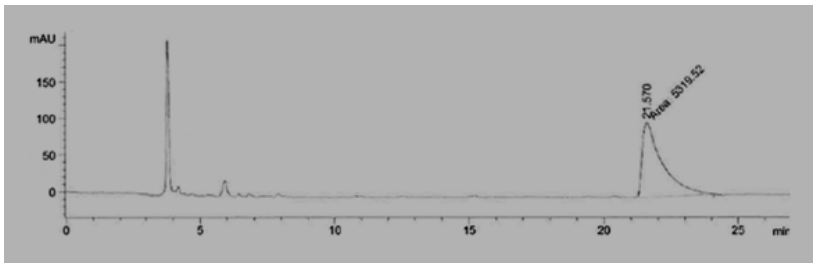
Flujo: 0.8 mL/min Temperatura: 30 °C

Tiempos de retención: t_R = 17.5 y 21.6 min

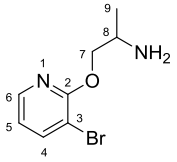
Separación por HPLC de ambos enantiómeros del compuesto (±)-4e:



Compuesto (*S*)-3c con un >99% *ee*:



1-((3-Bromopiridin-2-il)oxi)propan-2-amina (4f)



Fórmula molecular: $C_8H_{11}BrN_2O$ **Peso molecular:** 231.09 g/mol

Aspecto físico: Aceite amarillento ***R_f*** (10% MeOH/CH_2Cl_2): 0.21

IR (NaCl): ν 3419, 3093, 2345, 2177, 1706, 1648, 1583, 1530, 1427, 1396, 1327, 976, 866, 855 cm^{-1}

^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 1.16 (d, $^3J_{HH}$ = 6.5 Hz, 3H, H_9), 1.98 (sa, 2H, NH_2), 3.52-3.59 (m, 1H, H_8), 3.70 (dd, $^2J_{HH}$ = 12.9 Hz, $^3J_{HH}$ = 8.1 Hz, 1H, H_7), 4.08 (dd, $^2J_{HH}$ = 12.9 Hz, $^3J_{HH}$ = 4.7 Hz, 1H, H_7), 6.08 (t, $^3J_{HH}$ = 7.0 Hz, 1H, H_5), 7.37 (dd, $^3J_{HH}$ = 7.0 Hz, $^4J_{HH}$ = 1.9 Hz 1H, H_6), 7.74 (dd, $^3J_{HH}$ = 7.0 Hz, $^4J_{HH}$ = 1.9 Hz, 1H, H_4) ppm

^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 20.9 (C_9), 45.8 (C_8), 58.4 (C_7), 105.8 (C_5), 116.7 (C_3), 138.1 (C_6), 141.7 (C_4), 159.3 (C_2) ppm

HRMS (ESI^+, m/z): $(C_8H_{11}BrN_2NaO)^+$ $(M+Na)^+$ calculada 252.9947; encontrada 252.9945

Rotación óptica: (*S*)-**4f** $[\alpha]_D^{20}$ = + 31.3 (c = 0.5, EtOH) con >99% *ee*

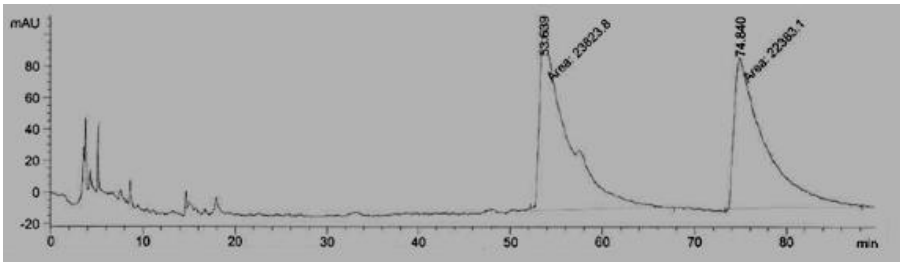
Separación analítica de la amina (±)-4f (HPLC):

Columna: Chiralpak AD-H Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 95:5

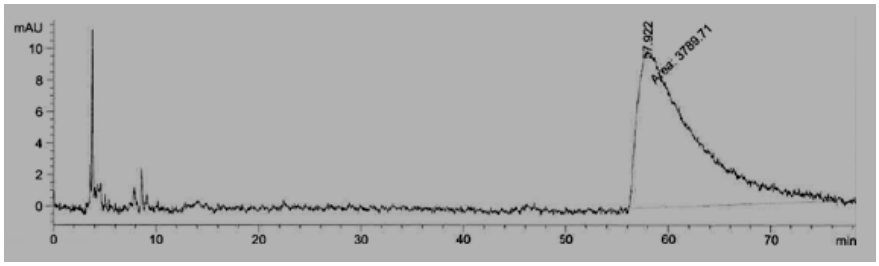
Flujo: 0.8 mL/min Temperatura: 30 °C

Tiempos de retención: t_R = 53.7 y 74.8 min

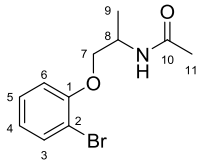
Separación por HPLC de ambos enantiómeros del compuesto (±)-4f:



Compuesto (*S*)-4f con un >99% *ee*:



1-(2-Bromofenoxi)propan-2-acetamida (8a)



Fórmula molecular: $C_{11}H_{14}BrNO_2$ **Peso molecular:** 272.14 g/mol

Aspecto físico: Sólido blanco ***R_f*** (10% MeOH/CH_2Cl_2): 0.65

T_{fus}: 67-68 °C

IR (NaCl): ν 3053, 2987, 1768, 1662, 1608, 1498, 1267, 914, 896, 761, 721 cm^{-1}

^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 1.37 (d, $^3J_{HH}$ = 6.9 Hz, 3H, H_9), 2.01 (s, 3H, H_{11}), 3.97-4.07 (m, 2H, H_7), 4.42 (m, 1H, H_8), 6.82-6.93 (m, 2H, H_6 e H_4), 7.26 (ddd, $^3J_{HH}$ = 8.2, $^3J_{HH}$ = 7.4, $^4J_{HH}$ = 1.6 Hz, 1H, H_5), 7.53 (dd, $^3J_{HH}$ = 7.8, $^4J_{HH}$ = 1.6 Hz, 1H, H_3) ppm

^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 18.0 (C_9), 23.8 (C_{11}), 45.0 (C_8), 72.1 (C_7), 112.7 (C_2), 114.0 (C_6), 127.8 (C_4), 129.1 (C_5), 133.7 (C_3), 155.3 (C_1), 170.4 (C_{10}) ppm

HRMS (ESI^+, m/z): $(C_{11}H_{15}BrO_2)^+$ $(M+H)^+$ calculada 272.0281; encontrada 272.0287;
$(C_{11}H_{14}BrNNaO_2)^+$ $(M+Na)^+$ calculada 294.0100; encontrada 294.0103

Rotación óptica: (*R*)-**8a** $[\alpha]_D^{20}$ = + 23.5 (c = 1, EtOH) con 86% *ee*

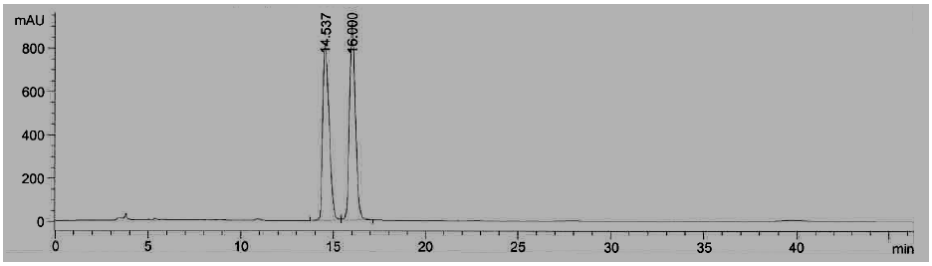
Separación analítica de la acetamida (±)-8a (HPLC):

Columna: Chiralpak AD-H Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 95:5

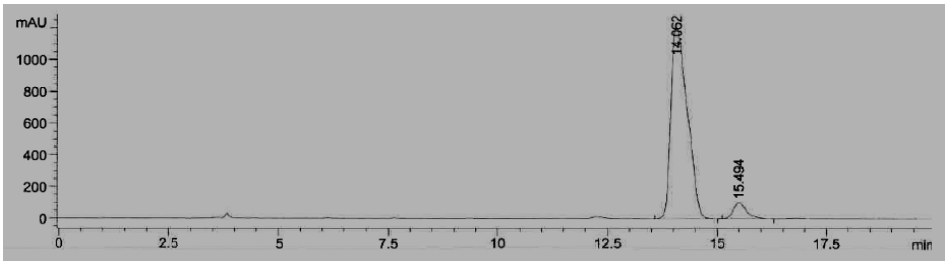
Flujo: 0.8 mL/min Temperatura: 30 °C

Tiempos de retención: t_R = 14.5 y 16.0 min

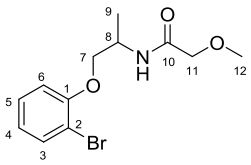
Separación por HPLC de ambos enantiómeros del compuesto (±)-8a:



Compuesto (*R*)-8a con un 86% *ee*:



1-(2-Bromofenoxi)propan-2-metoxiacetamida (9a)



Fórmula molecular: $C_{12}H_{16}BrNO_3$ **Peso molecular:** 302.17 g/mol

Aspecto físico: sólido blanco ***R_f*** (10% MeOH/CH_2Cl_2)**:** 0.79

T_{fus}: 52-53 °C

IR (KBr): ν 3409, 3054, 2983, 2937, 2829, 1678, 1586, 1574, 1483, 1266, 986, 932, 896, 738, 704, 555 cm^{-1}

^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 1.32-1.60 (m, 3H, H_9), 3.42 (s, 3H, H_{12}), 3.89-3.92 (m, 2H, H_{11}), 4.03-4.05 (m, 2H, H_7), 4.43-4.51 (m, 1H, H_8), 6.77-6.93 (m, 2H, H_6 e H_4), 7.18-7.33 (m, 1H, H_5), 7.45-7.59 (m, 1H, H_3) ppm

^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz)**:** δ 18.1 (C_9), 44.4 (C_8), 59.6 (C_{12}), 72.0 (C_7), 72.3 (C_{11}), 112.8 (C_2), 113.8 (C_6), 122.7-129.0 (C_4 + C_5), 133.7 (C_3), 155.2 (C_1), 169.5 (C_{10}) ppm

HRMS (ESI^+, m/z): $(C_{12}H_{17}BrNO_3)^+$ $(M+H)^+$ calculada 302.0386; encontrada 302.0381; $(C_{12}H_{16}BrNaO_3)^+$ $(M+Na)^+$ calculada 324.0206; encontrada 324.0204

Rotación óptica: (*R*)**-9a** $[\alpha]_D^{20}$ = + 35.4 (c = 1, EtOH) con 93% *ee*

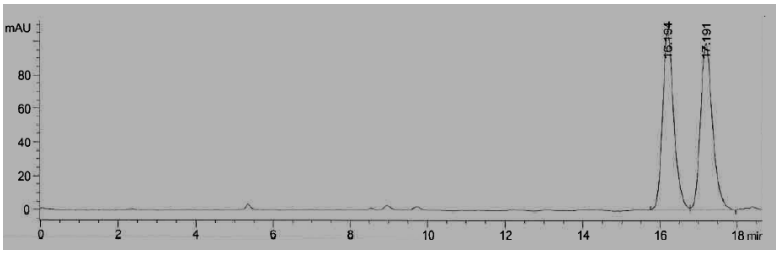
Separación analítica de la metoxiacetamida (±)-9a (HPLC):

Columna: Chiralpak AD-H Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 95:5

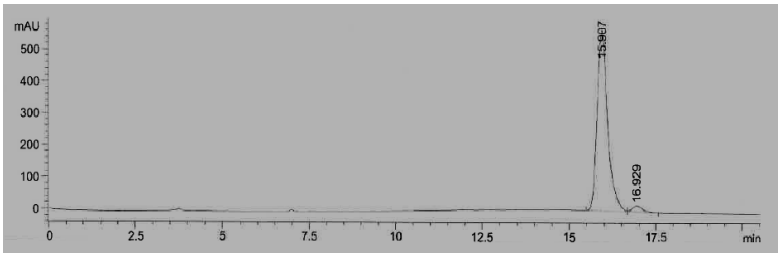
Flujo: 0.8 mL/min Temperatura: 30 °C

Tiempos de retención: t_R = 15.9 y 16.8 min

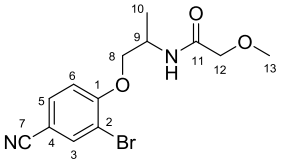
Separación por HPLC de ambos enantiómeros del compuesto (±)-9a:



Compuesto (*R*)-9a con un 93% *ee*:



1-(2-Bromo-4-cianofenoxi)propan-2-metoxiacetamida (9b)



Fórmula molecular: $C_{13}H_{15}BrN_2O_3$ **Peso molecular:** 302.17 g/mol

Aspecto físico: sólido blanco ***R_f*** (10% MeOH/CH_2Cl_2)**:** 0.63

T_{fus}: 102-103 °C

IR (KBr): ν 3417, 3012, 2182, 1696, 1669, 1605, 1510, 1456, 1298, 1267, 965, 868, 852 cm^{-1}

^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 1.42 (d, $^3J_{HH}$ = 6.9 Hz, 3H, H_{10}), 3.43 (s, 3H, H_{13}), 3.85-3.97 (m, 2H, H_{12}), 4.07-4.16 (m, 2H, H_8), 4.45-4.53 (m, 1H, H_9), 6.97 (d, $^3J_{HH}$ = 8.5 Hz, 1H, H_6), 7.60 (dd, $^3J_{HH}$ = 8.5, $^4J_{HH}$ = 2.1 Hz, 1H, H_5), 7.85 (d, $^4J_{HH}$ = 2.1 Hz, 1H, H_3) ppm

^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 17.5 (C_{10}), 23.4 (C_9), 44.3 (C_{13}), 53.5 (C_8), 71.8 (C_{12}), 105.32 (C_4), 112.8 (C_2), 113.0 (C_6), 117.7 (C_7), 133.2-136.7 (C_3 + C_5), 158.4 (C_1), 169.3 (C_{11}) ppm

HRMS (ESI^+, m/z): $(C_{13}H_{16}BrN_2O_3)^+$ $(M+H)^+$ calculada 327.0339; encontrada 327.0335;
$(C_{13}H_{15}BrN_2NaO_3)^+$ $(M+Na)^+$ calculada 349.0158; encontrada 349.0164

Rotación óptica: (*R*)-**9b** $[\alpha]_D^{20}$ = + 36.4 (c = 1, EtOH) con 93% *ee*

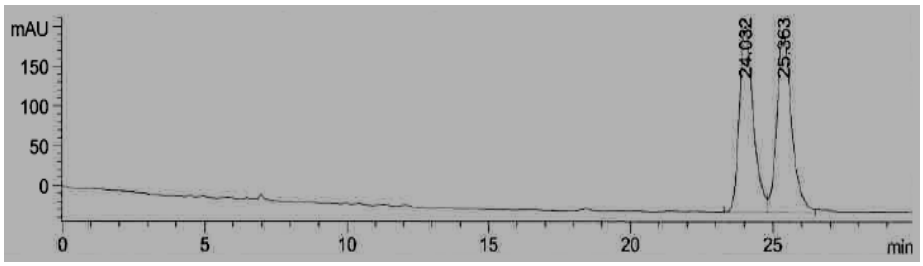
Separación analítica de la metoxiacetamida (±)-9b (HPLC):

Columna: Chiralpak AD-H Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

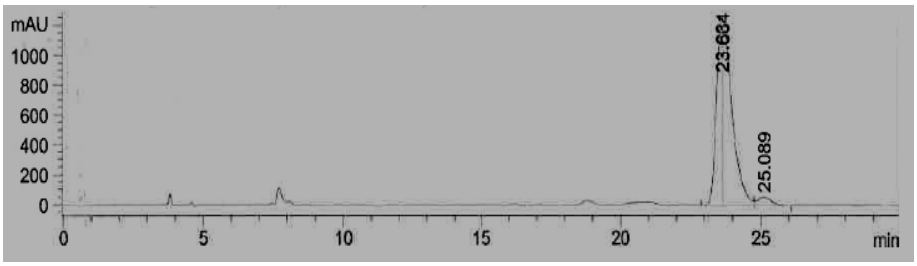
Flujo: 0.8 mL/min Temperatura: 30 °C

Tiempos de retención: t_R = 23.7 y 25.2 min

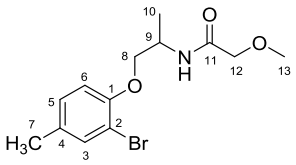
Separación por HPLC de ambos enantiómeros del compuesto (±)-9b:



Compuesto (*R*)-9b con un 93% *ee*:



1-(2-Bromo-4-metilfenoxi)propan-2-metoxiacetamida (9c)



Fórmula molecular: $C_{13}H_{18}BrNO_3$ **Peso molecular:** 316.20 g/mol

Aspecto físico: sólido blanco ***R_f*** (10% MeOH/CH_2Cl_2): 0.67

T_{fus}: 64-65 °C

IR (KBr): ν 3419, 3093, 2345, 2177, 1698, 1623, 1597, 1419, 1265, 896, 751, 706 cm^{-1}

^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 1.41 (d, $^3J_{HH}$ = 6.8 Hz, 3H, H_{10}), 3.43 (s, 3H, H_{13}), 3.85-3.97 (m, 2H, H_{12}), 4.00-4.04 (m, 2H, H_8), 4.58-4.35 (m, 1H, H_9), 6.80 (d, $^3J_{HH}$ = 8.3 Hz, 1H, H_6), 7.13-7.00 (m, 1H, H_5), 7.37 (d, $^4J_{HH}$ = 2.0 Hz, 1H, H_3) ppm

^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): 17.7 (C_{10}), 20.2 (C_9), 44.0 (C_{13}), 59.3 (C_7), 71.8-71.9 (C_8 + C_{12}), 112.1 (C_2), 113.5 (C_6), 128.9 (C_5), 132.1 (C_4), 133.7 (C_3), 152.8 (C_1), 169.1 (C_{11}) ppm

HRMS (ESI^+, m/z) $(C_{13}H_{19}BrNO_3)^+$ $(M+H)^+$: calculada 316.0543, encontrada: 316.0532;
$(C_{13}H_{18}BrNNaO_3)^+$ $(M+Na)^+$: calculada 338.0362, encontrada: 338.0360

Rotación óptica: (*R*)-**9c** $[\alpha]_D^{20}$ = + 31.8 (c = 1, EtOH) con 96% *ee*

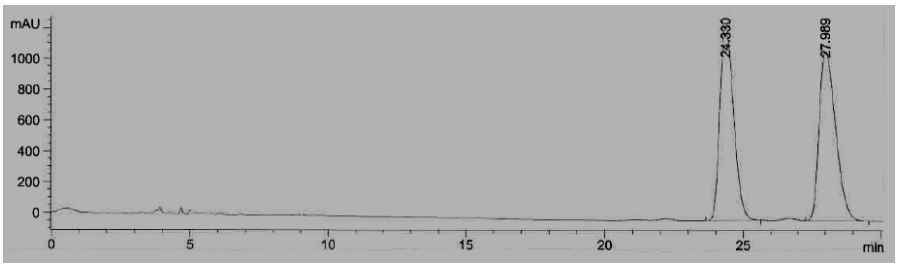
Separación analítica de la metoxiacetamida (±)-9c (HPLC):

Columna: Chiralpak IC Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

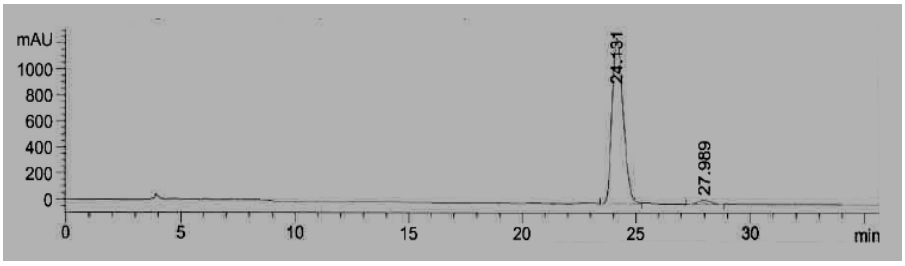
Flujo: 0.8 mL/min Temperatura: 30 °C

Tiempos de retención: t_R = 24.3 y 27.9 min

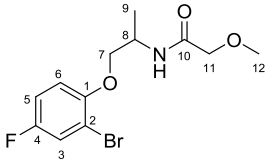
Separación por HPLC de ambos enantiómeros del compuesto (±)-9c:



Compuesto (*R*)-9c con un 96% *ee*:



1-(2-Bromo-4-fluorofenoxi)propan-2-metoxiacetamida (9d)



Fórmula molecular: $C_{12}H_{15}BrFNO_3$ **Peso molecular:** 320.16 g/mol

Aspecto físico: sólido blanco ***R_f*** (10% MeOH/CH_2Cl_2): 0.64

T_{fus}: 80-81 °C

IR (KBr): ν 3409, 3054, 2986, 1733, 1678, 1527, 1492, 1265, 985, 909, 896, 865, 748, 705 cm^{-1}

^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 1.41 (d, $^3J_{HH}$ = 6.8 Hz, 3H, H_{12}), 3.43 (s, 3H, H_9), 3.91 (m, 2H, H_{11}), 4.01 (m, 2H, H_7), 4.38-4.54 (m, 1H, H_8), 6.86 (dd, $^3J_{HH}$ = 9.1, $^4J_{HF}$ = 4.7 Hz, 1H, H_6), 6.99 (m, $^3J_{HH}$ = 9.1, $^3J_{HF}$ = 7.8, $^4J_{HH}$ = 3.0 Hz, 1H, H_5), 7.26-7.34 (m, 1H, H_3) ppm

^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 17.6 (C_9), 44.0 (C_8), 59.2 (C_{12}), 71.9 (C_7) ,72.4 (C_{11}), 112.5 (d, $^3J_{FC}$ = 9.5 Hz, C_2), 114.0 (d, $^3J_{FC}$ = 8.5 Hz, H_6), 114.8 (d, $^2J_{FC}$ = 22.6 Hz, C_5), 120.4 (d, $^2J_{FC}$ = 26.3 Hz, C_3), 151.5 (C_1), 158.5 (C_4), 169.2 (C_{10}) ppm

HRMS (ESI^+, m/z): $(C_{12}H_{16}BrFNO_3)^+$ $(M+H)^+$ calculada 320.0292; encontrada 320.0287
$(C_{12}H_{15}BrFNNaO_3)^+$ $(M+Na)^+$: calculada 342.0112, encontrada: 342.0117

Rotación óptica: (*R*)-**9d** $[\alpha]_D^{20}$ = + 25.3 (c = 0.5, EtOH) con 93% *ee*

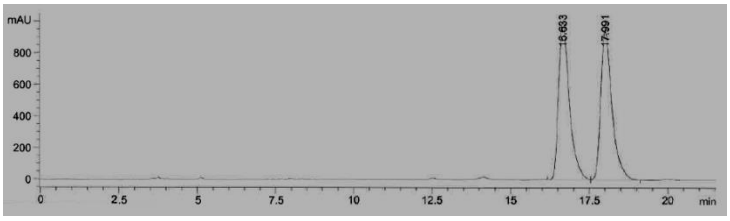
Separación analítica de la metoxiacetamida (±)-9d (HPLC):

Columna: Chiralpak AD-H Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 95:5

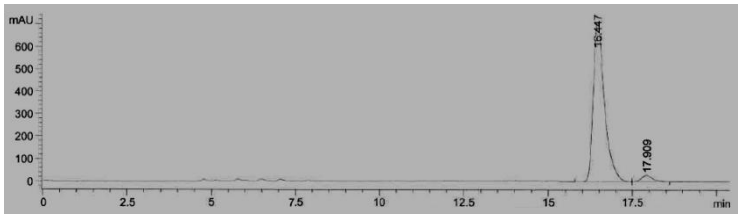
Flujo: 0.8 mL/min Temperatura: 30 °C

Tiempos de retención: t_R = 16.6 y 17.9 min

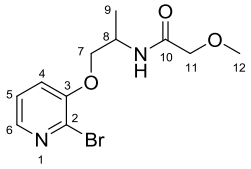
Separación por HPLC de ambos enantiómeros del compuesto (±)-9d:



Compuesto (*R*)-9d con un 93% *ee*:



1-((2-Bromopiridin-3-il)oxi)propan-2-metoxiacetamida (9e)



Fórmula molecular: $C_{11}H_{15}BrN_2O_3$ **Peso molecular:** 303.16 g/mol

Aspecto físico: sólido blanco ***R_f*** (10% MeOH/CH_2Cl_2)**:** 0.57

T_{fus}: 70-80 °C

IR (KBr): ν 3400, 2933, 1667, 1651, 1563, 1530, 1447, 1418, 1294, 796, 727 cm^{-1}

^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 1.43 (d, $^3J_{HH}$ = 6.8 Hz, 3H, H_9), 3.44 (s, 3H, H_{12}), 3.85-3.97 (m, 2H, H_{11}), 4.03-4.12 (m, 2H, H_7), 4.44-4.54 (m, 1H, H_8), 7.27-7.15 (m, 2H, H_4 e H_5), 8.02 (dd, $^3J_{HH}$ = 4.4, $^4J_{HH}$ = 1.8 Hz, 1H, H_6) ppm

^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 17.6 (C_9), 43.7 (C_8), 59.3 (C_{12}), 71.6 (C_7), 71.9 (C_{11}), 119.9 (C_4), 123.5 (C_5), 133.2 (C_2), 141.7 (C_6), 152.0 (C_3), 169.3 (C_{10}) ppm

HRMS (ESI^+, m/z): $(C_{11}H_{16}BrN_2O_2)^+$ $(M+H)^+$ calculada 303.0339; encontrada 303.0145
$(C_{11}H_{15}BrN_2N\ aO_3)^+$ $(M+Na)^+$: calculada 325.0158, encontrada: 325.0145

Rotación óptica: (*R*)-**9e** $[\alpha]_D^{20}$ = + 19.8 (c = 1, EtOH) con 99% *ee*

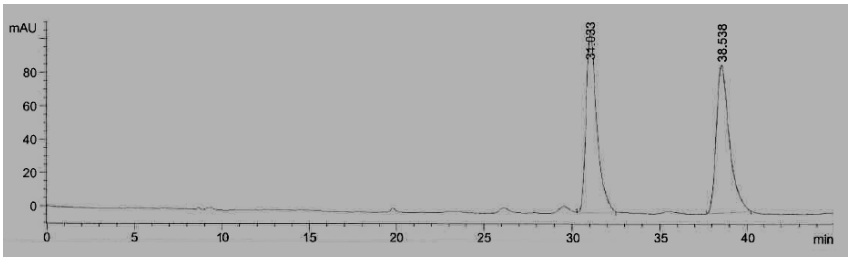
Separación analítica de la metoxiacetamida (±)-9e (HPLC):

Columna: Chiralpak AD-H Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

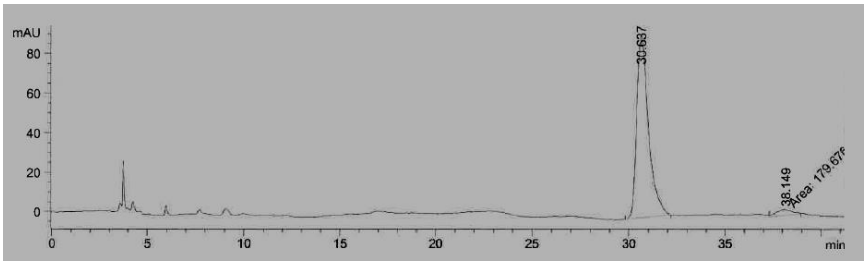
Flujo: 0.8 mL/min Temperatura: 30 °C

Tiempos de retención: t_R = 15.6 y 18.2 min

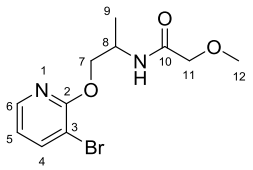
Separación por HPLC de ambos enantiómeros del compuesto (±)-9e:



Compuesto (*R*)-9e con un 99% *ee*:



1-((3-Bromopiridin-2-il)oxi)propan-2-metoxiacetamida (9f)



Fórmula molecular: $C_{11}H_{15}BrN_2O_3$ **Peso molecular:** 303.16 g/mol

Aspecto físico: sólido blanco ***R_f*** (10% $MeOHCH_2Cl_2$): 0.65

T_{fus}: 138-139 °C

IR (KBr): ν 3478, 3319, 2922, 1649, 1596, 1537, 1494, 1378, 1297, 975, 848, 760, 657 cm^{-1}

^{1}H-RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 1.30 (d, $^3J_{HH}$ = 6.2 Hz, 3H, H_9), 3.39 (s, 3H, H_{13}), 3.86-3.96 (m, 2H, H_{11}), 3.97-4.08 (m, 2H, H_7), 4.21-4.39 (m, 1H, H_8), 6.10 (t, $^3J_{HH}$ = 7.2 Hz, 1H, H_5), 7.25-7.37 (m, 1H, H_6), 7.73 (dd, $^3J_{HH}$ = 7.2, $^4J_{HH}$ = 1.9 Hz, 1H, H_4) ppm

^{13}C-RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 18.1 (C_9), 45.9 (C_8), 53.9 (C_7), 59.4 (C_{12}), 71.8 (C_{11}), 106.2 (C_5), 116.6 (C_3), 137.3 (C_6), 141.8 (C_4), 159.6 (C_2), 169.9 (C_{10}) ppm

HRMS (ESI^+, m/z): $(C_{11}H_{16}BrN_2O_3)^+$ $(M+H)^+$ calculada 303.0339; encontrada 303.0342
$(C_{11}H_{15}BrN_2NaO_3)^+$ $(M+Na)^+$: calculada 325.0158, encontrada: 325.0165

Rotación óptica: (*R*)-**9f** $[\alpha]_D^{20}$ = -50.6 (c = 1, EtOH) con 83% *ee*

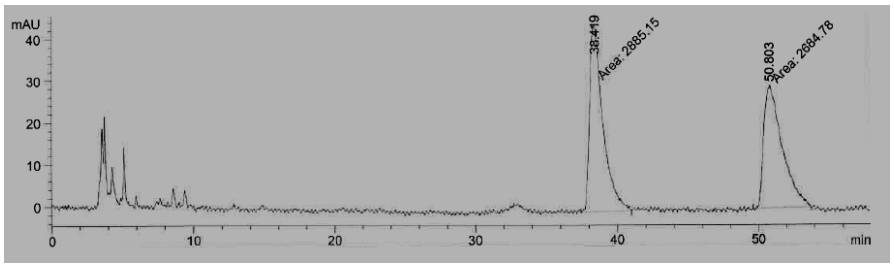
Separación analítica de la metoxiacetamida (±)-9f (HPLC):

Columna: Chiralpak AD-H Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 95:5

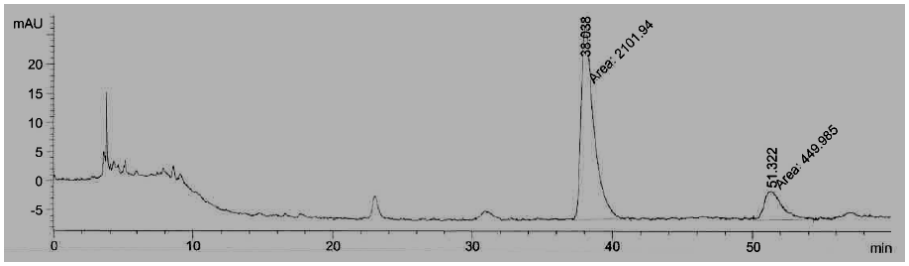
Flujo: 0.8 mL/min Temperatura: 30 °C

Tiempos de retención: t_R = 38.4 y 50.8 min

Separación por HPLC de ambos enantiómeros del compuesto (±)-9f:



Compuesto (*R*)-9f con un 83% *ee*:



REFERENCIAS

1 M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Kesseler, R. Stuermer, T. Zelinski, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 788-824.

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

3 (a) C. M. Clouthier, J. N. Pelletier, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585-1605; (b) M. T. Reetz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12480-12496.

4 (a) K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231-238; (b) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504-4523; (c) Q. Wu, B.-K. Liu, X.-F. Lin, *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 1966-1968.; (d) M. S. Humble, P. Berglund, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3391-3401; (e) M. Kapoor, M. N. Gupta, *Process Biochem.* **2012**, *47*, 555-569.

5 (a) M. Widesten, *Curr. Opin, Chem. Biol.* **2014**, *21*, 42-47; (b) M. D. Lane, B. Seelig, *Curr. Opin, Chem. Biol.* **2014**, *22*, 129-136; (c) C. G. Acevedo-Rocha, R. Agudo, M. T. Reetz, *J. Biotechnol.* **2014**, *191*, 3-10.

6 (a) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185-194; (b) S. Wallace, E. P. Balskus, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2014**, *30*, 1-8.

7 Hans-Peter Meyer, E. Eichhorn, S. Hanlon, S. Lütz, M. Schürmann, R. Wohlgemuth, R. Coppolecchia, *Catal. Sci. Technol.* **2013**, *3*, 29-40.

8 J. D. Mortison, D. H. Sherman, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7041-7051.

9 (a) S. L. Y. Tang, R. L. Smith, M. Poliakoff, *Green Chem.* **2005**, *7*, 761-762; (b) P. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301-312.

10 K. Drauz, H. Gröger, O. May, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis;* Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2012**.

11 (a) R. A. Sheldon, S. van Pelt, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223-6235; (b) A. Liese, H. Hilterhaus, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6236-6249.

12 (a) H. Wu, C. Tian, X. Song, C. Liu, D. Yang, Z. Jiang, *Green Chem.* **2013**, *15*, 1773-1789; M. Richter, *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 1324-1345; (b) S. Kara, J. H. Schrittwieser, F. Hollmann, *Appl. Microbiol Biotechnol.* **2014**, *98*, 1517-1529.

13 T. C. Nugent. *Chiral Amine Synthesis: Methods, Developments and Applications*; Wiley-VCH: Weinheim (Alemania), **2010**.

14 M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42-51.

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

16 (a) A. Ghanem, H. Y. Aboul-Enein, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3331-3351; (b) A. Ghanem, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1721-1754.

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

18 O. Verho, J. -E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3996-4009.

19 D. Ghislieri, N. J. Turner, *Top. Catal.* **2014**, *57*, 284-300.

20 (a) J. H. Lee, K. Han, M.-J. Kim, J. Park, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 999-1015; (b) Y. Kim, J. Park; M.-J Kim, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 271-277; (c) P. Hoyos, V. Pace, A. R. Alcántara, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 2585-2611.

21 F. Balkenhohl, K. Ditrich, B. Hauer, W. Ladner, *J. Prakt. Chem.* **1997**, *339*, 381-384.

22 (a) M. Alexeeva, A. Enright, M. J. Dawson, M. Mahmoudian, N. J. Turner; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3177-3180; (b) R. Carr, M. Alexeeva, A. Enright, T. S. C. Eve, M. J. Dawson, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4807-4810.

23 (a) R. Carr, M. Alexeeva, M. J. Dawson, V. Gotor-Fernandez, C. E. Humphrey, N. J. Turner, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 637-639; (b) K. R. Bailey, A. J. Ellis, R. Reiss, T. J. Snape, N. J. Turner, *Chem. Commun.* **2007**, 3640-3642.

24 D. Ghislieri, A. P. Green, M. Pontini, S. C. Willies, I. Rowles, A. Frank, G. Grogan, N. J. Turner, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10863-10869.

25 (a) D. Gamenara, P. Domínguez de María, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 2989-2992; (b) J. H. Schrittwieser, S. Velikogne, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1655-1685.

26 (a) S. Mathew, H. Yun, *ACS Catal.* **2012**, *2*, 993-1001; (b) W. Kroutil, E.-M. Fischereder, C. S. Fuchs, H. Lechner, F. G. Mutti, D. Pressnitz, A. Rajagopalan,

J. H. Sattler, R. C. Simon, E. Siirola, *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 751-759; (c) R. C. Simon, N. Richter, E. Busto, W. Kroutil, *ACS Catal*. **2014**, *4*, 129-143.

27 D. Wiktelius, *Synlett* **2005**, 2113-2114.

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

29 R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665.

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

31 M. López-Iglesias, V. Gotor-Fernández, *Chem. Rec.* **2015**, en prensa, doi/10.1002/tcr.201500008.

32 N. Siddiqui, R. Ali, M. S. Alam, W. Ashan, *J. Chem. Pharm. Res.* **2010**, *2*, 309-316.

33 J. Ilaš, P. Š. Anderluh, M. S. Dolenc, D. Kikelj, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 1325-1348.

34 B. Achari, S. B. Mandal, P. K. Dutta, C. Chowdhury, *Synlett* **2004**, *14*, 2449-1467.

35 S. K. Singh, A. K. Bajpai, R. Saini, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 7132-7135.

36 J. G. de Vries, N. Mršić, *Catal. Sci. Technol.* **2011**, *1*, 727-735.

37 M. Rueping, M. Stoeckel, E. Sugiono, T. Theissmann, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 6565-6568.

38 K. Satoh, M. Inenaga, K. Kanai, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 2657-2662.

39 Y. Zhang, R. Zhao, R. Li-Yuan Bao, L. Shi, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 3344-3351.

40 D. S. Kundu, J. Schmidt, C. Bleschke, A. Thomas, S. Blechert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5456-5459.

41 K. Gao, C. B. Yu, D. S. Wang, Y. G. Zhou, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 483-488.

42 Y. Jiang, L. X. Liu, W. C. Yuan, X. M. Zhang, *Synlett* **2012**, *23*, 1797-1800.

43 X. W. Liu, C. Wang, Y. Yan, Y. Q. Wang, J. Sun, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 6276-6280.

44 J. F. Bower, P. Szeto, T. Gallagher, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3283-3286.

45 M. K. Parai, G. Panda, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4703-4705.

46 V. P. Krasnov, G. L. Levit, I. M. Bukrina, I. N. Andreeva, L. S. Sadretdinova, M. A. Korolyova, M. I. Kodess, V. N. Charushin, O. N. Chupakhin, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 1985-1988.

47 (a) V. N. Charushin, V. P. Krasnov, G. L. Levit, M. A. Korolyova, M. I. Kodess, O. N. Chupakhin, M. H. Kim, H. S. Lee, Y. J. Park, K. C. Kim, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 2691-2702; (b) V. P. Krasnov, G. L. Levit, M. I. Kodess, V. N. Charushin, O. N. Chupakhin, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 859-862.

48 V. P. Krasnov, G. L. Levit, M. A. Korolyova, I. M. Bukrina, L. S. Sadretdinova, I. N. Andreeva, V. N. Charushin, O. N. Chupakhin, *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.* **2004**, *53*, 1253-1256.

49 D. A. Gruzdev, G. L. Levit, V. P. Krasnov, *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 1640-1646.

50 D. A. Gruzdev, E. N. Chulakov, G. L. Levit, M. A. Ezhikova, M. I. Kodess, V. P. Krasnov, *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24*, 1240-1246.

51 S. A. Vakarov, D. A. Gruzdev, L. Sh. Sadretdinova, E. N. Chulakov, M. G. Pervova, M. A. Ezhikova, M. I. Kodess, G. L. Levit, V. P. Krasnov, *Tetrahedron: Asymmetry* **2015**, *26*, 312-319.

52 R. K. Rao, G. Sekar, *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 948-954.

53 E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3998-4035.

54 M. Breznik, V. Hrast, A. Mrcina, D. Kikelj, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 153-167.

55 S. B. Kang, E. J. Ahn, Y. Kim, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 9317-9320.

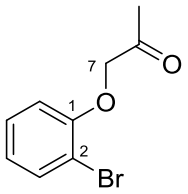
56 (a) S. Y. Lee, B. H. Min, S. H. Hwang, Y. M. Koo, C. K. Lee, S. W. Song, S. Y. Oh, S. M. Lim, S. L. Kim, D. I. Kim, *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 1033-1037; (b) S. Y. Lee, B. H. Min, S. W. Song, S. Y. Oh, S. M. Lim, D. I. Kim, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2001**, *6*, 179-182.

57 M. López-Iglesias, E. Busto, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 3815-3824.

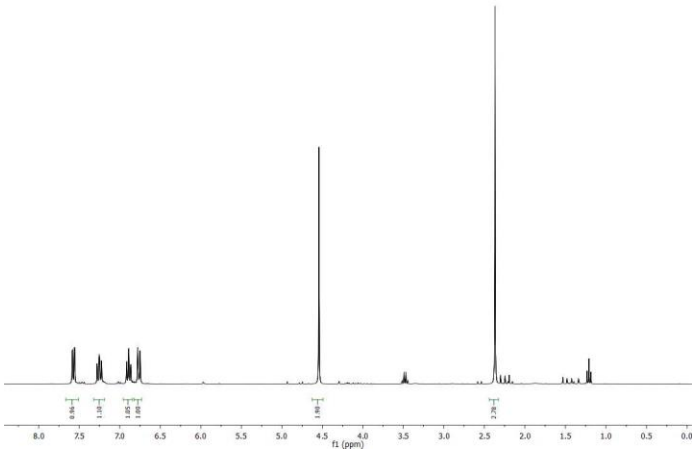
58 (a) J. González-Sabín, V. Gotor, F. Rebolledo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 1515-1520; (b) O. Torre, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1481-1488; (c) M. Rodríguez-Mata, V. Gotor-Fernández, J. González-Sabín, F. Rebolledo, V. Gotor, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 2274-2278.

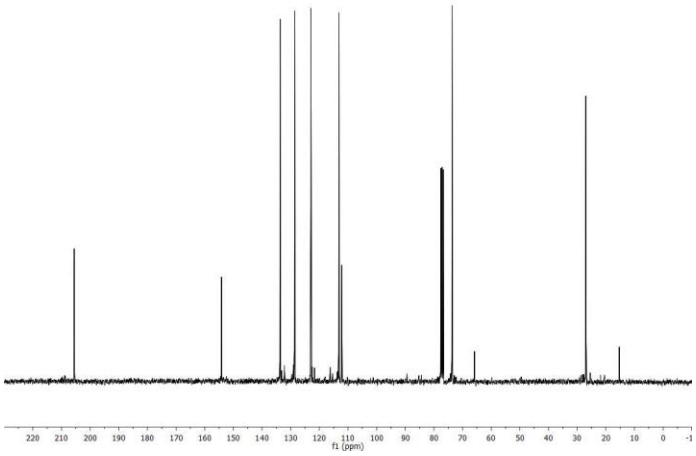
59 Tesis Doctoral de María López Iglesias, **2015**, Universidad de Oviedo: "Síntesis de heterociclos nitrogenados mediante la combinación de estrategias químicas y enzimáticas. Aplicación de la biocatálisis en procesos no convencionales".

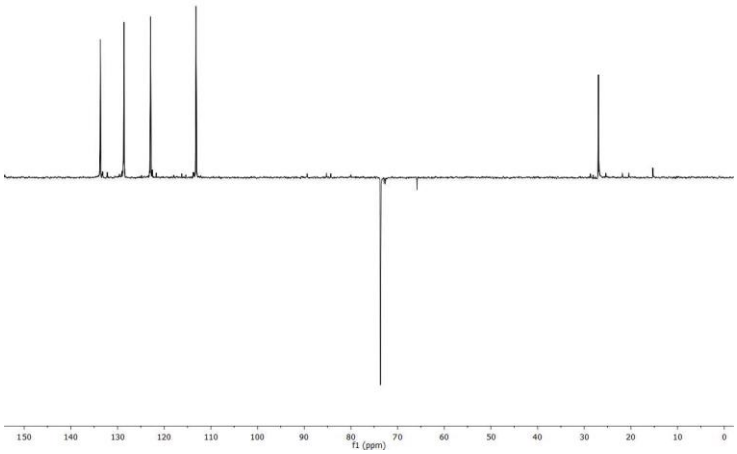
APÉNDICE DE ESPECTROS

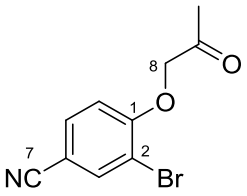


3a

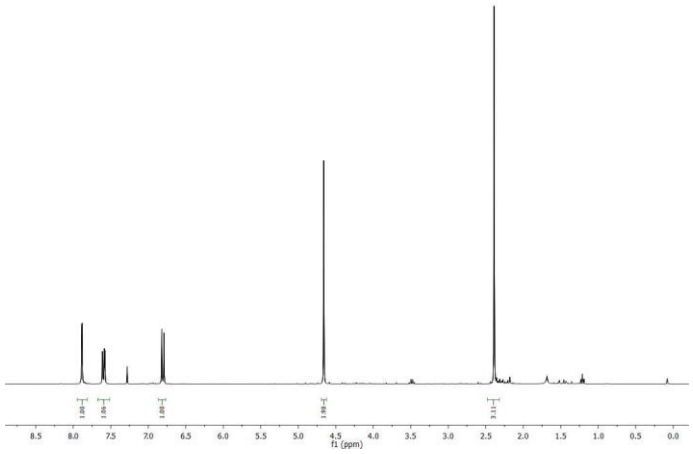


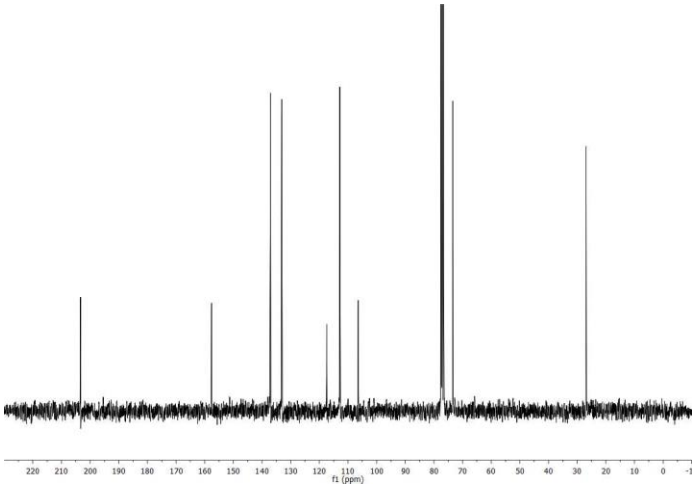


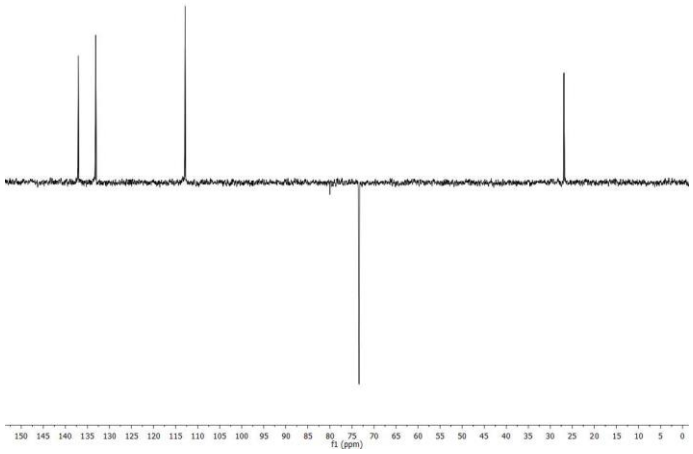


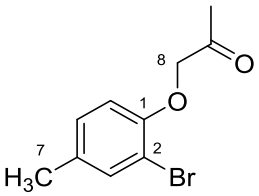

8
O
1
O
7
2
NC
Br

3b

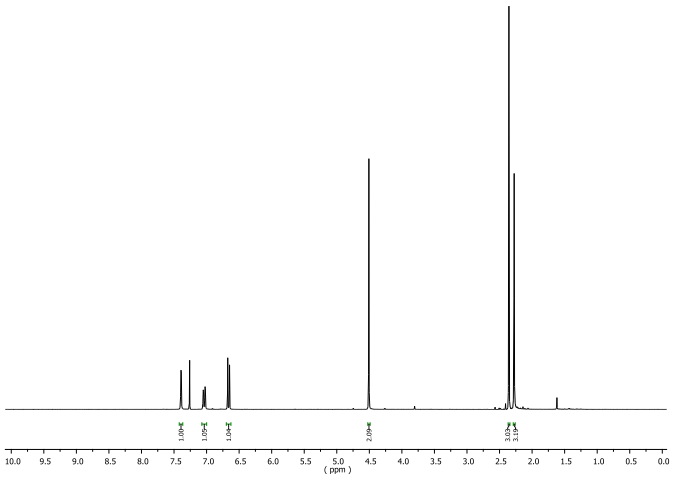

8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
f1 (ppm)

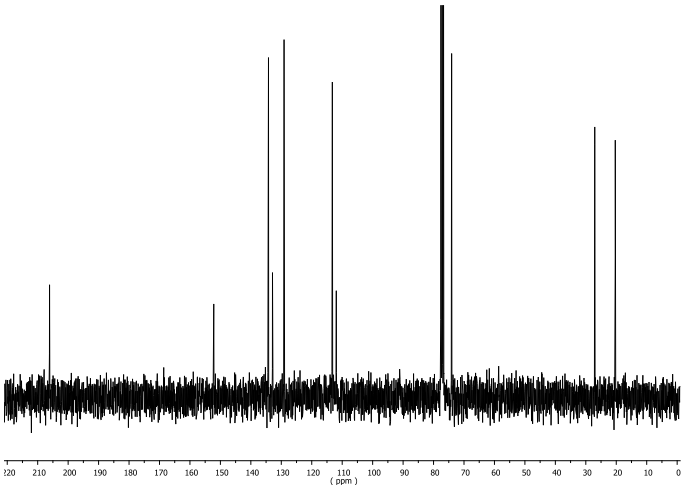

220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 -1
f1 (ppm)

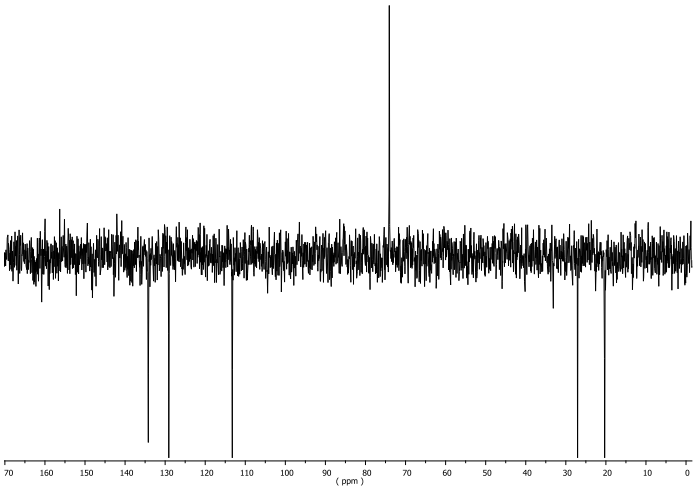

150 145 140 135 130 125 120 115 110 105 100 95 90 85 80 75 70 65 60 55 50 45 40 35 30 25 20 15 10 5 0
f1 (ppm)

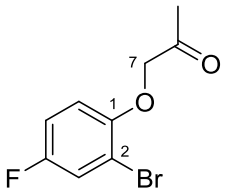

8
O
1
O
7
2
H3C
Br

3c

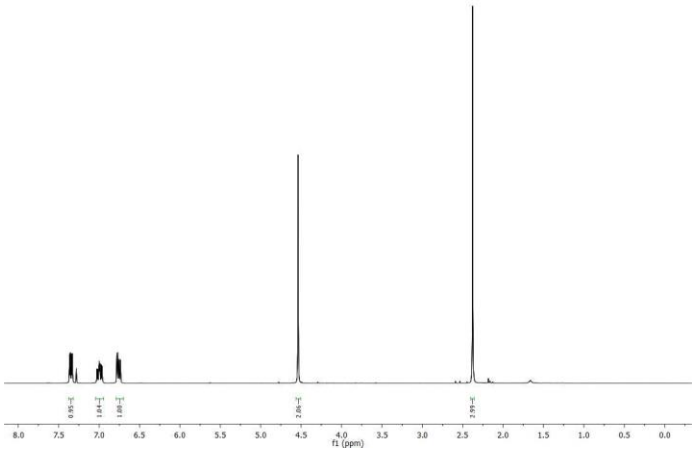

10.0 9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)

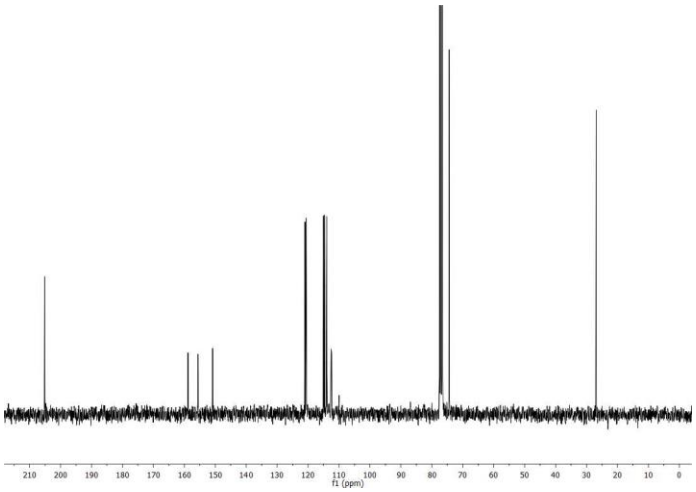

220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

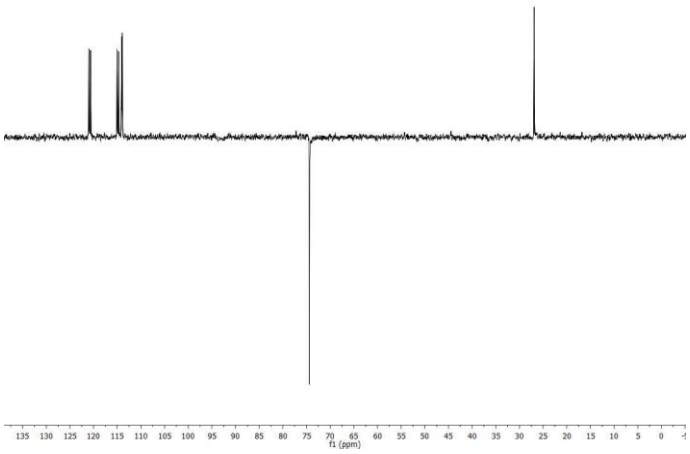

170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

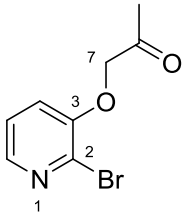


3d

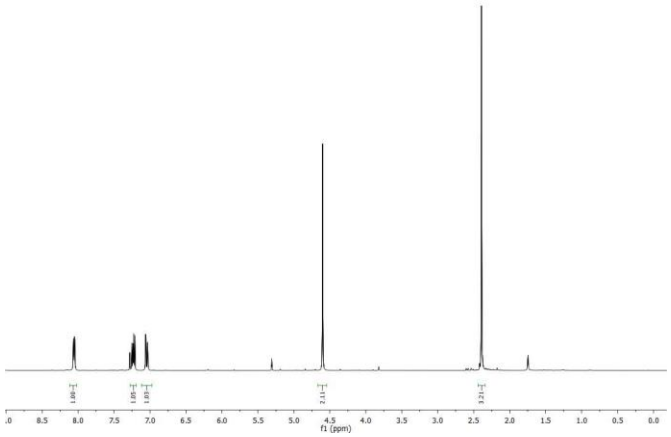


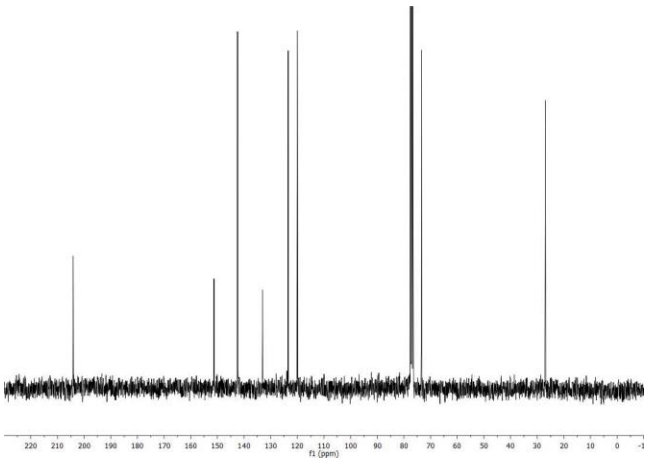


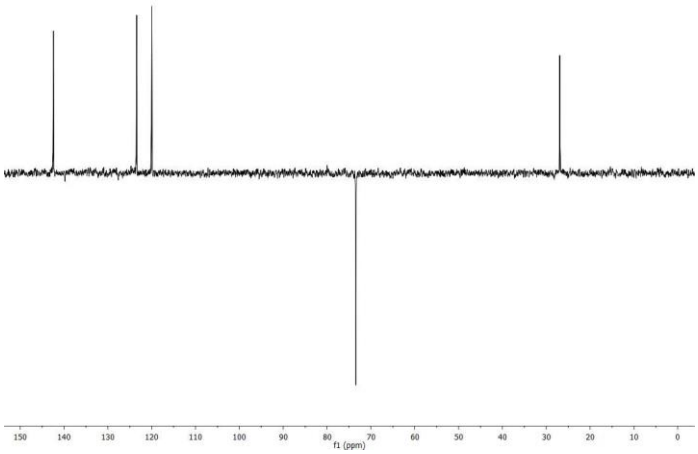


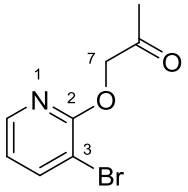


3e

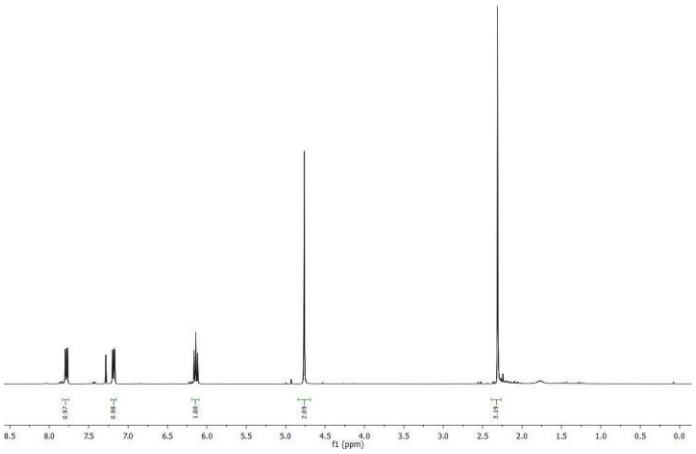


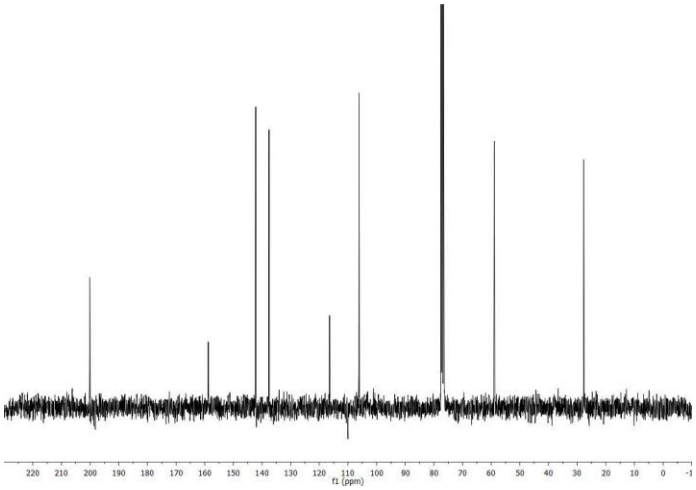


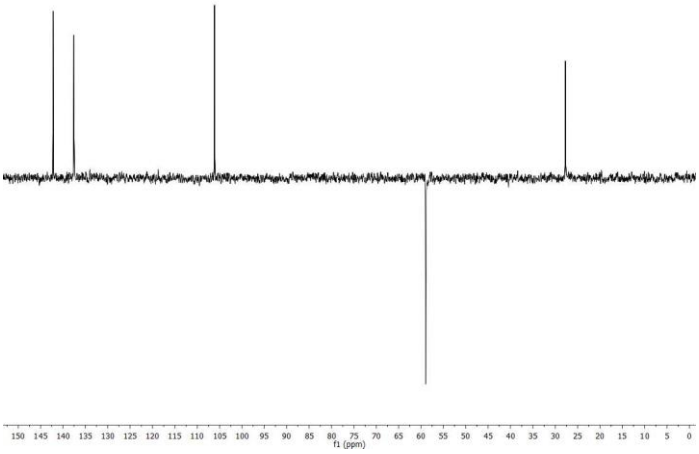


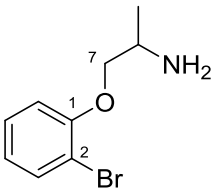


3f

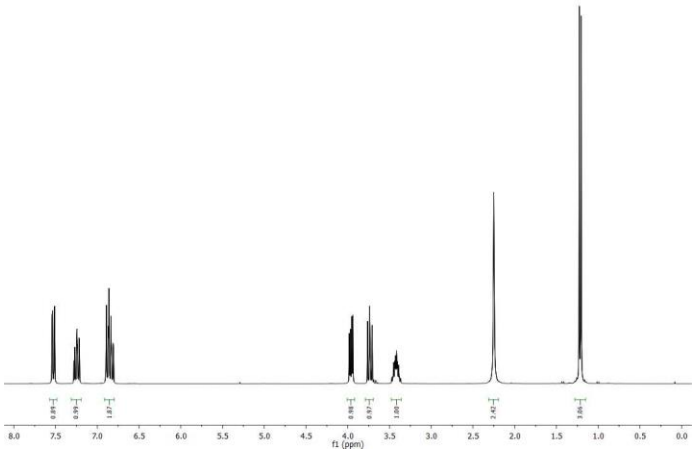


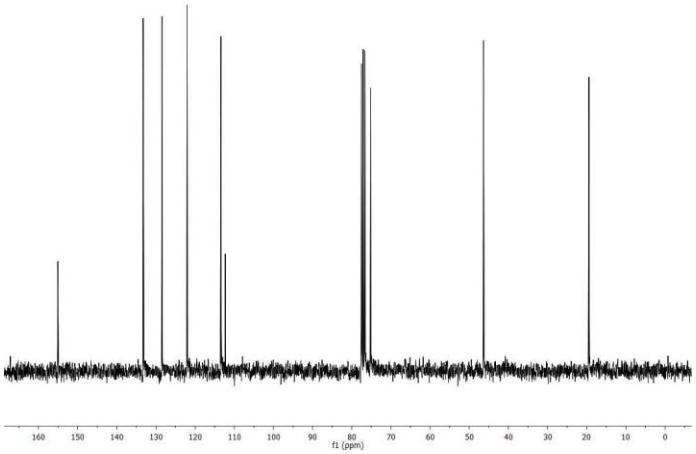


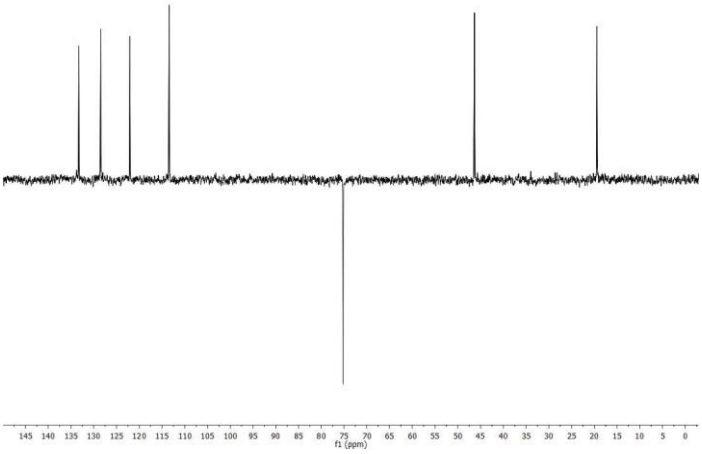


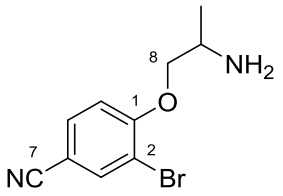


4a

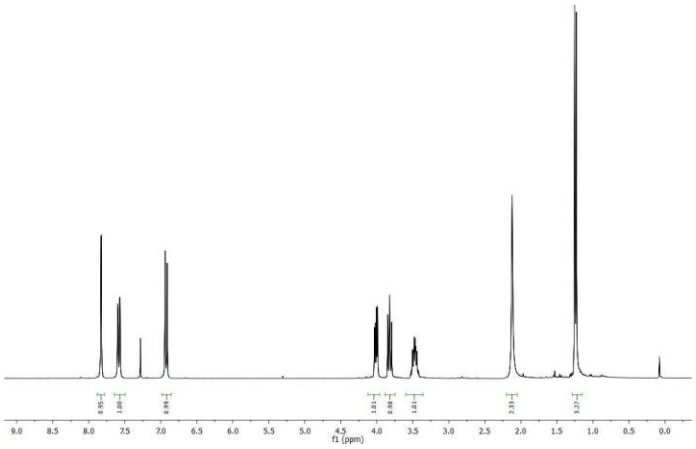


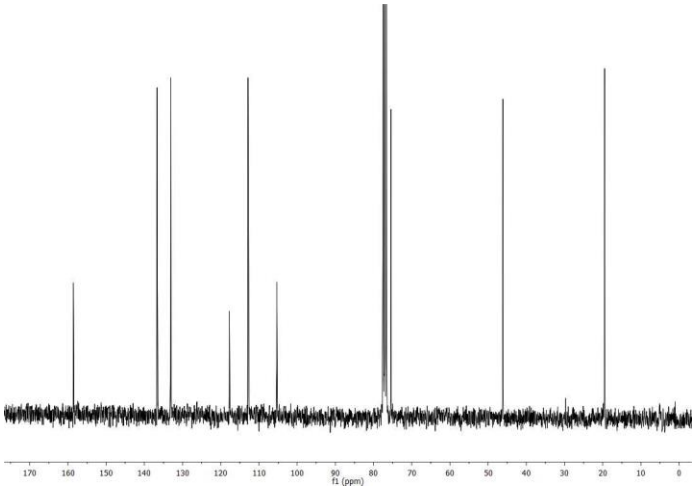


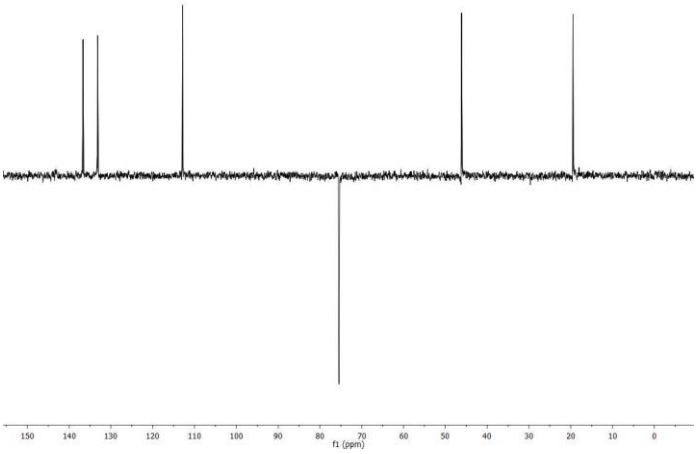


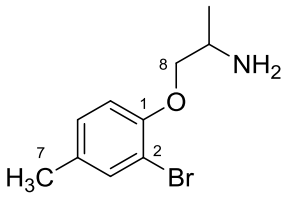


4b

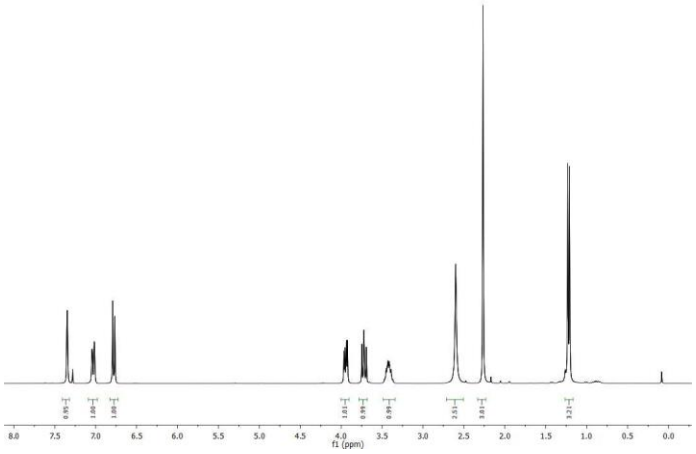


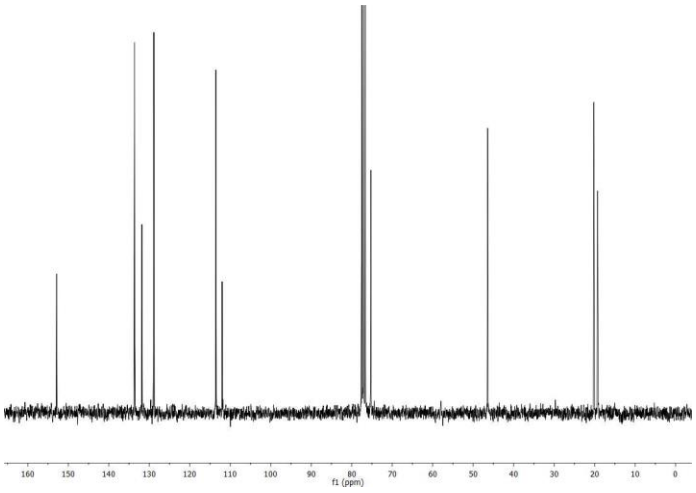


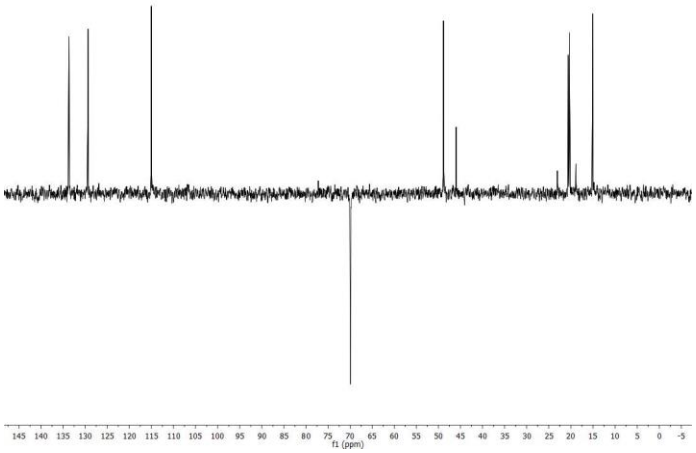


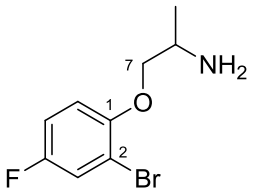


4c

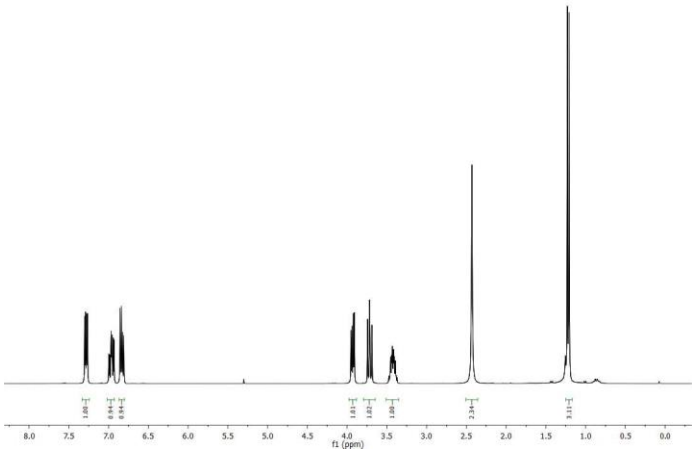


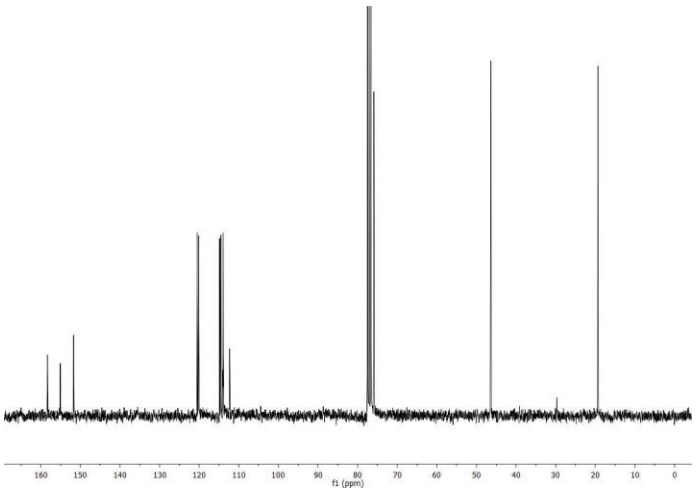


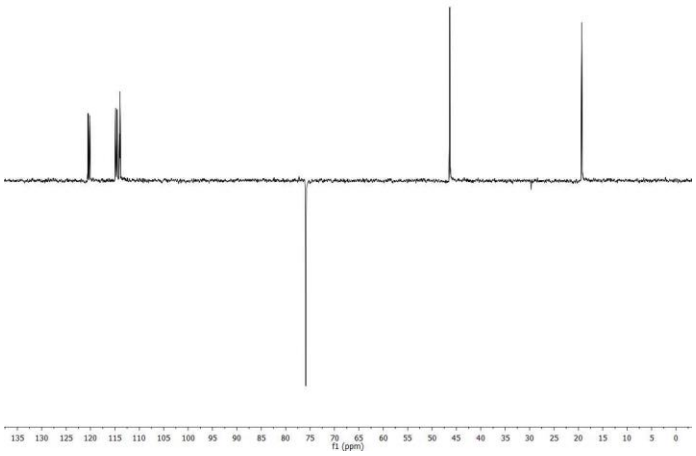


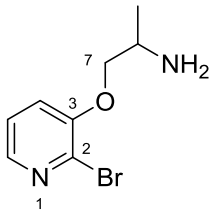


4d

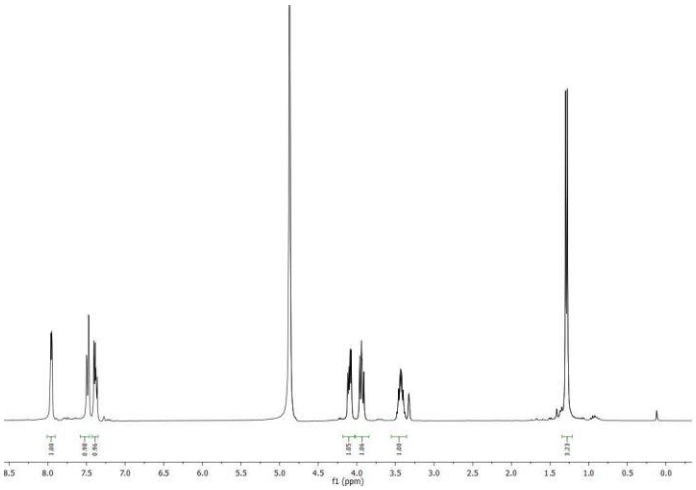


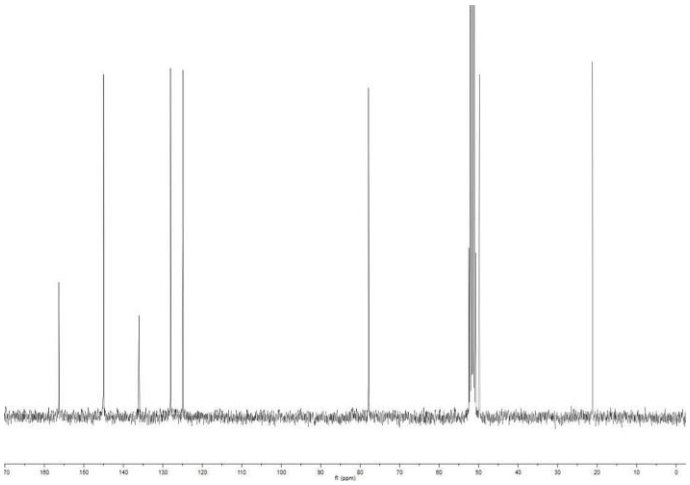


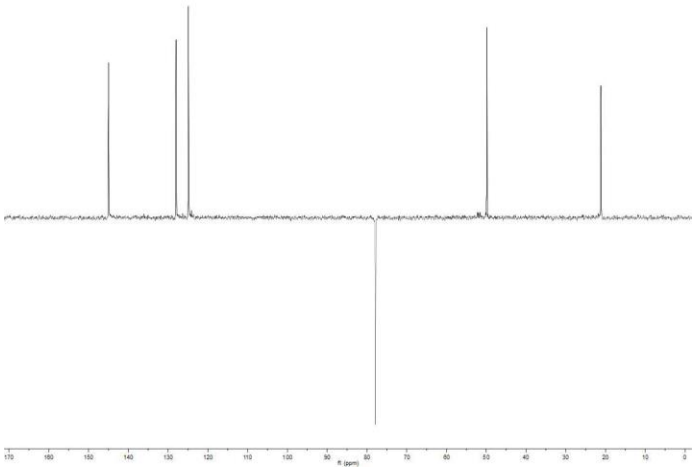


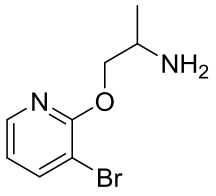


4e

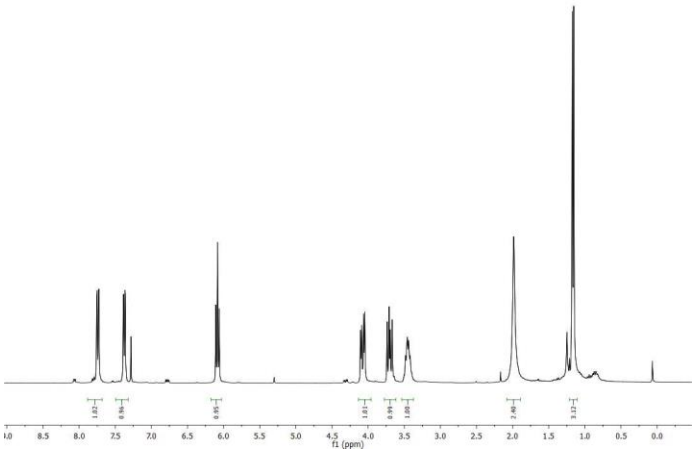


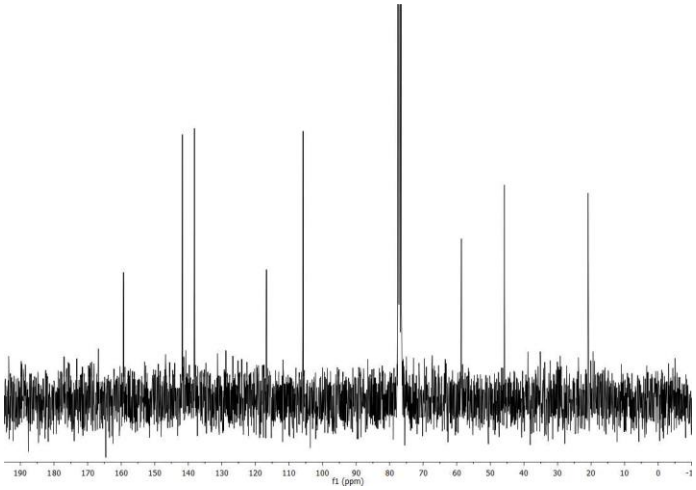


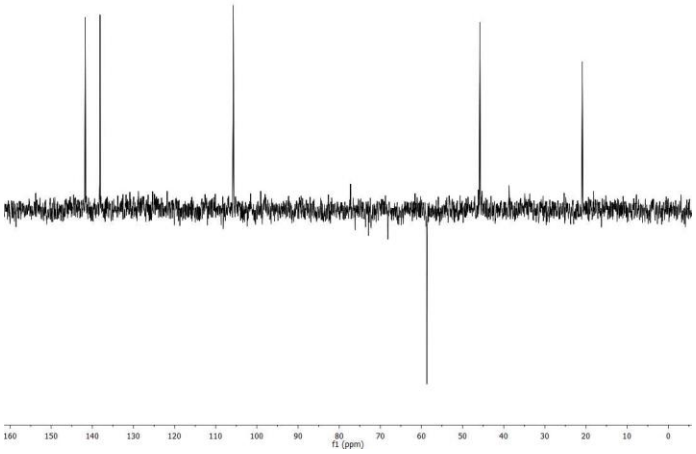


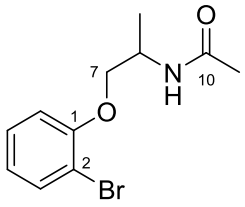


4f

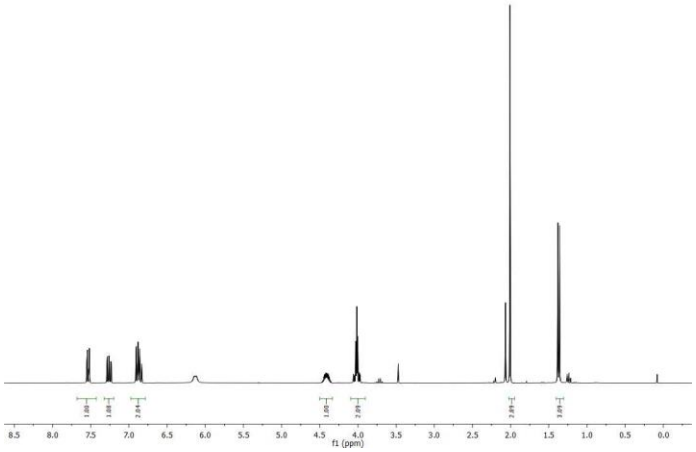


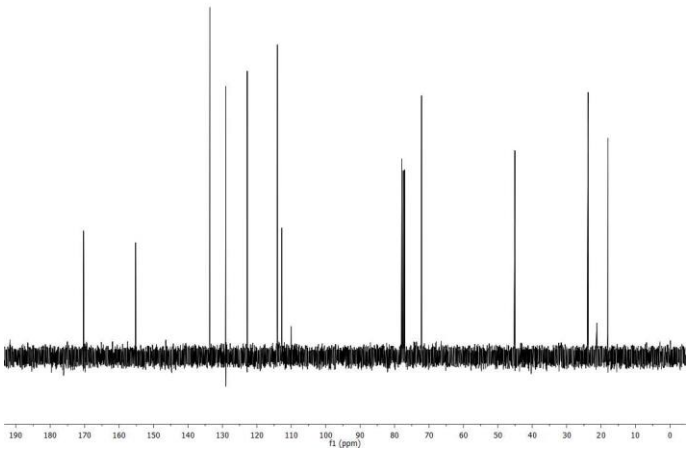


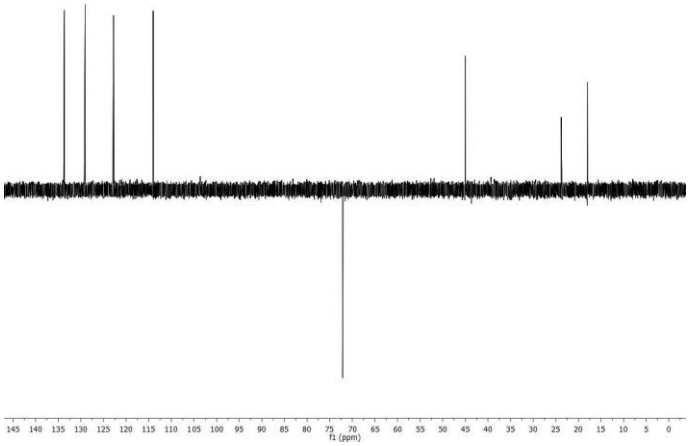


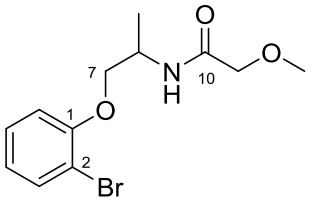


8a

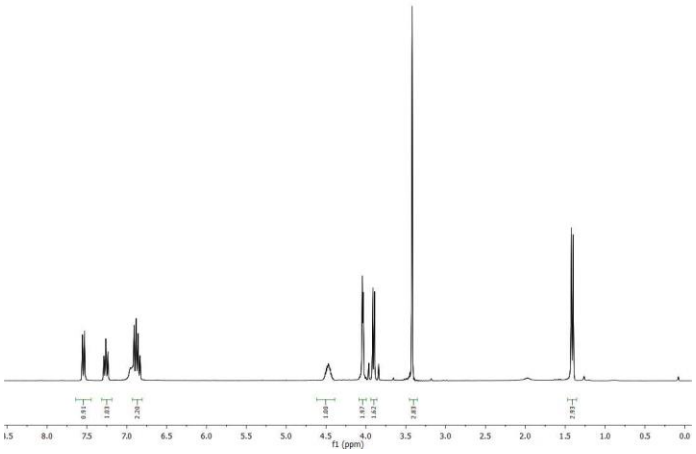


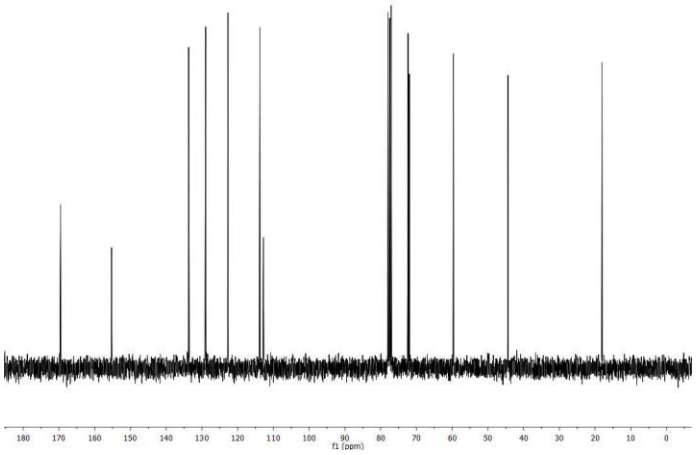


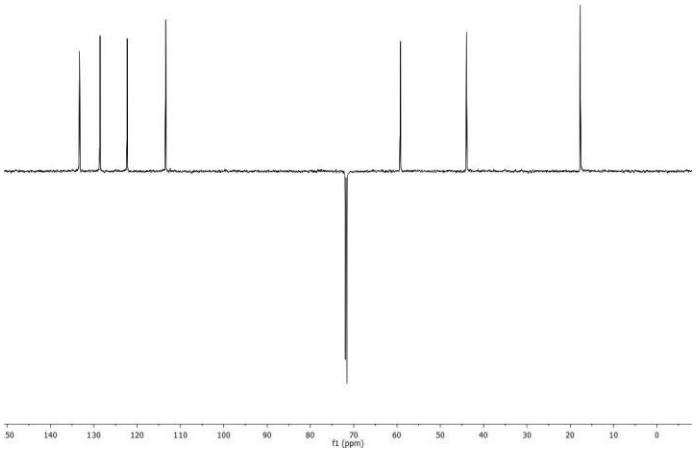


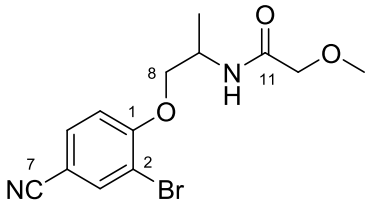


9a

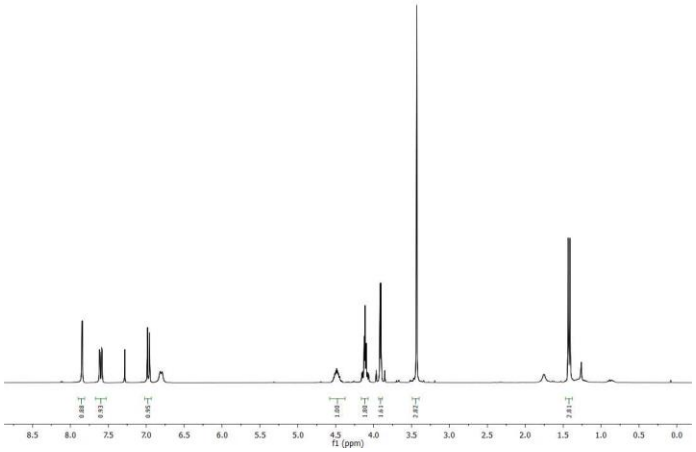


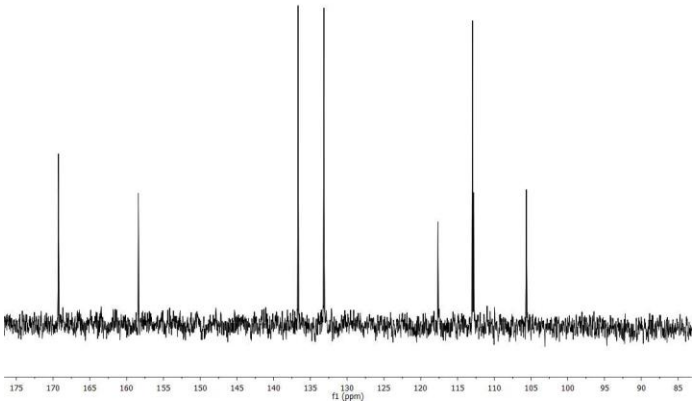


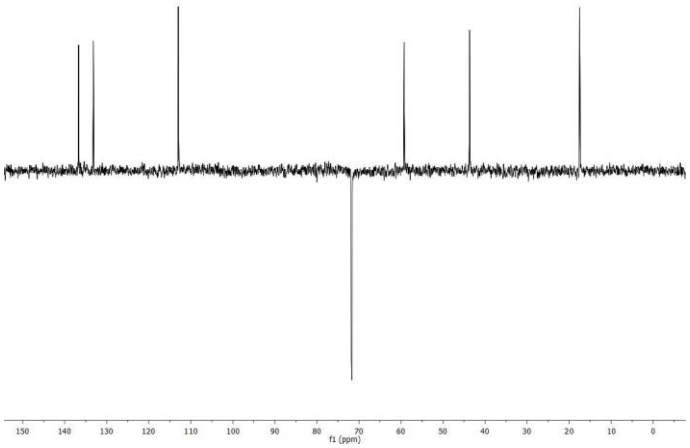


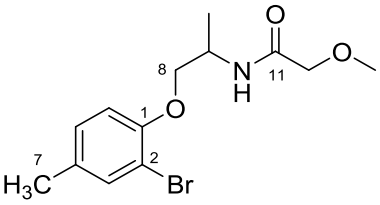


9b

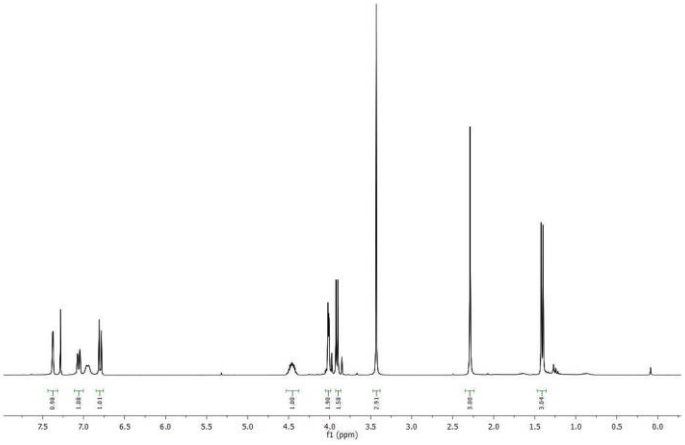


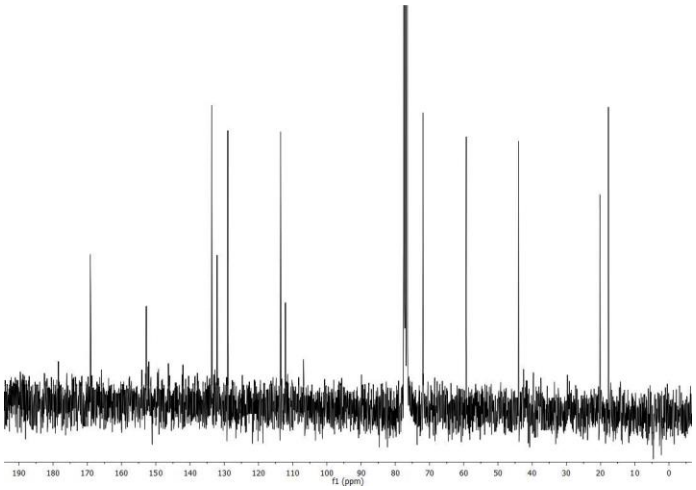


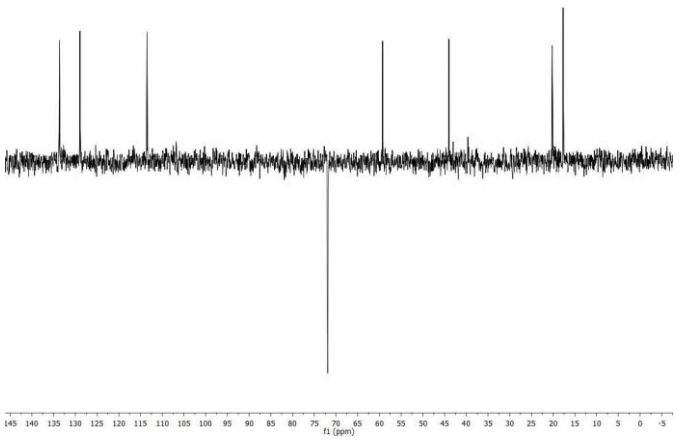


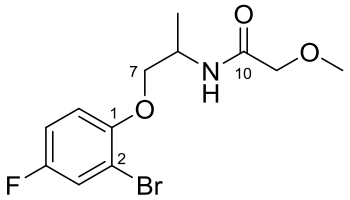


9c

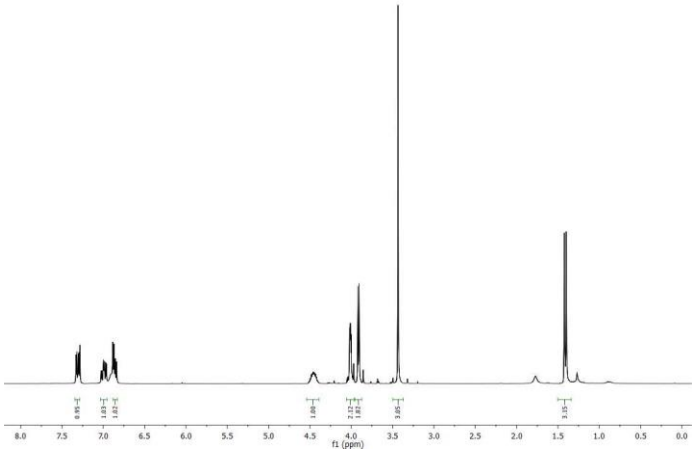


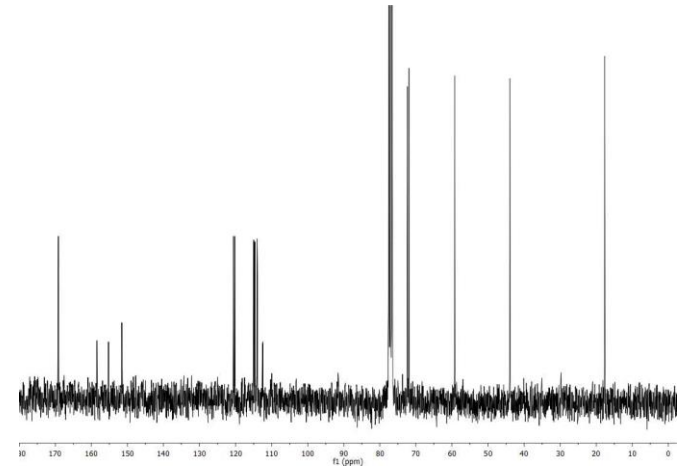


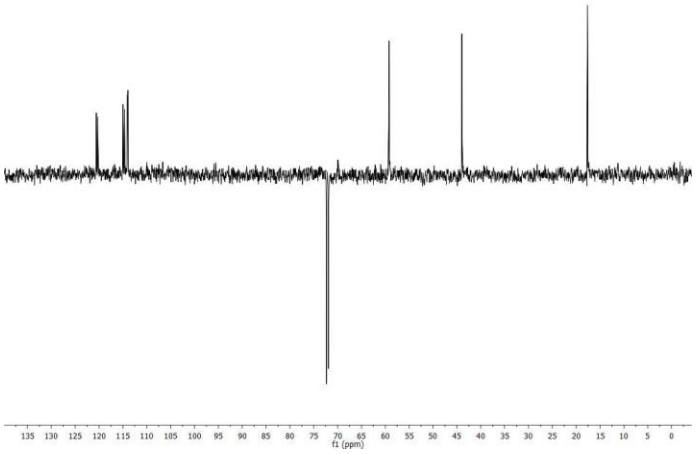


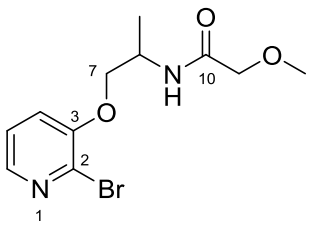


9d

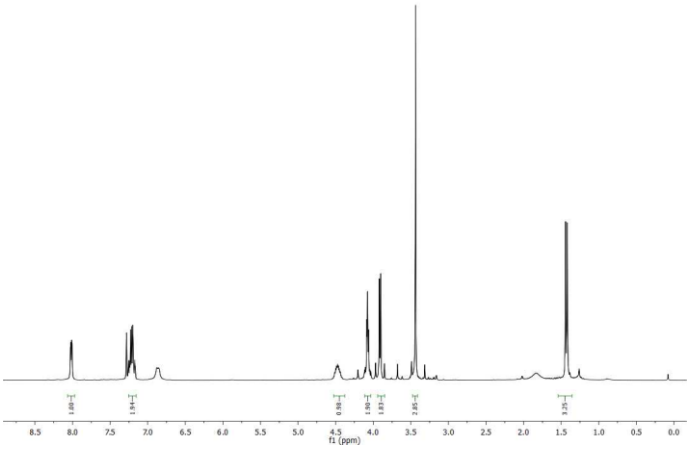


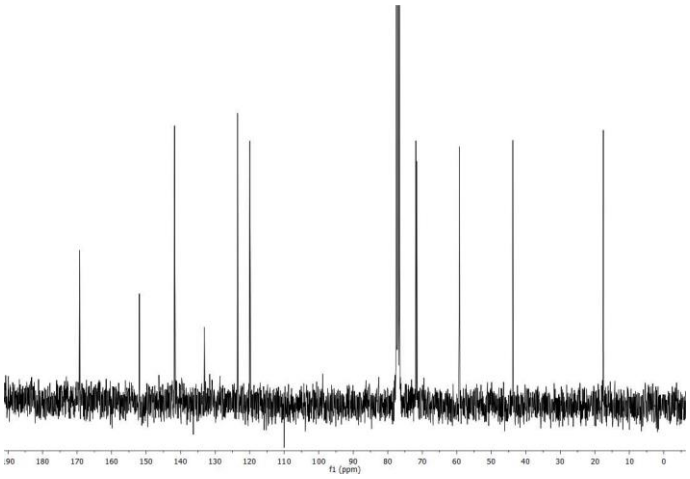


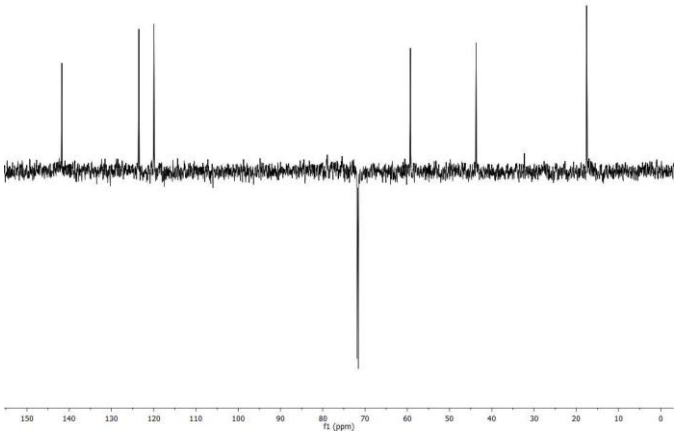


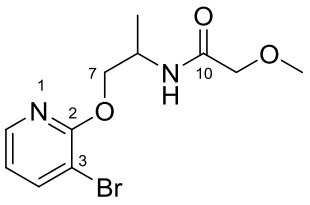
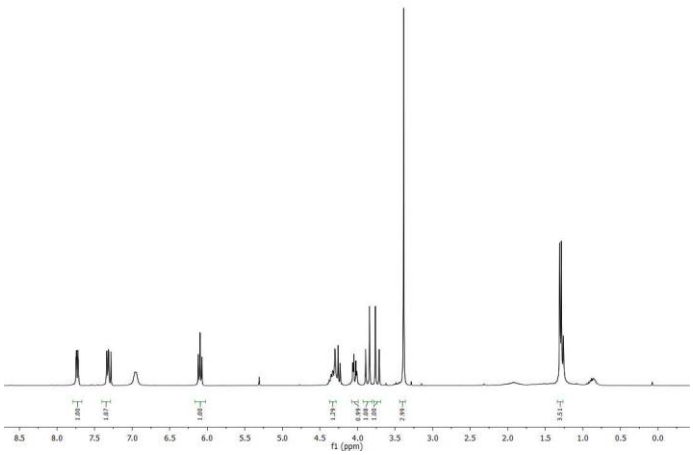
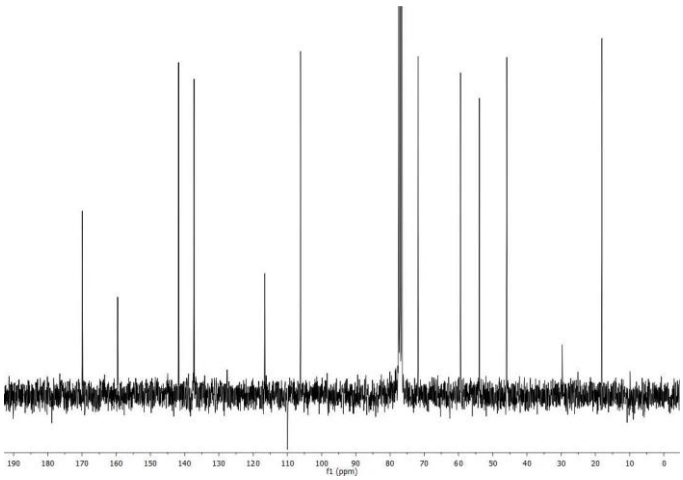
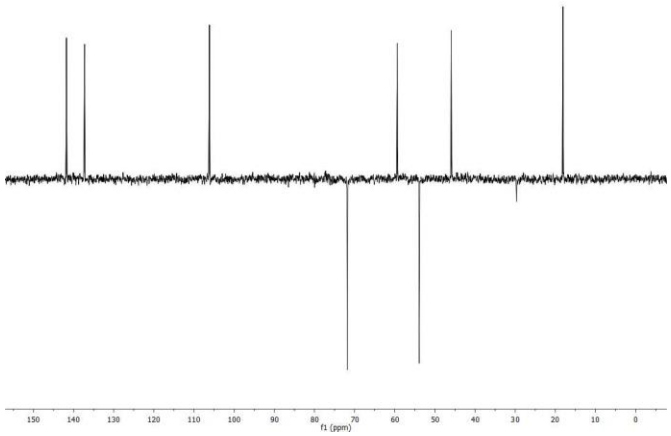


9e









9f