



**Universidad de Oviedo**

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica

Programa de Doctorado: Síntesis y Reactividad Química

**SÍNTESIS DE HETEROCICLOS NITROGENADOS MEDIANTE  
LA COMBINACIÓN DE ESTRATEGIAS QUÍMICAS Y  
ENZIMÁTICAS. APLICACIÓN DE LA BIOCATÁLISIS EN  
PROCESOS NO CONVENCIONALES**

**Tesis Doctoral**

**María López Iglesias**





**Universidad de Oviedo**

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica  
Programa de Doctorado: Síntesis y Reactividad Química

**SÍNTESIS DE HETEROCICLOS NITROGENADOS  
MEDIANTE LA COMBINACIÓN DE  
ESTRATEGIAS QUÍMICAS Y ENZIMÁTICAS.  
APLICACIÓN DE LA BIOCATÁLISIS EN  
PROCESOS NO CONVENCIONALES**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Química  
por María López Iglesias







preparación de un precursor del fármaco levofloxacino.

Por último, el **Bloque III** se centra en el empleo de transaminasas, un tipo de biocatalizadores cuyo potencial está siendo ampliamente desarrollado en los últimos años. En el **Capítulo 5** se consideran dos familias de piridinas halogenadas para la síntesis de las correspondientes aminas enantiopuras, lo que ocurre con excelentes conversiones y estereoselectividades. Además, se llevan a cabo estudios de actividad en relación con variaciones en la estructura de las piridinas.

Algunos de estos resultados han sido publicados en los siguientes artículos:

- *“Use of protease from Bacillus licheniformis as promiscuous catalyst for organic synthesis. Applications in C-C and C-N bond formation reactions.”* M. López-Iglesias, E. Busto, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2345-2353.
- *Stereoselective synthesis of 2,3-disubstituted indoline diastereoisomers by chemoenzymatic processes.* M. López-Iglesias, E. Busto, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 8049-8055.
- *“Chemoenzymatic Asymmetric Synthesis of 1,4-Benzoxazine Derivatives: Application in the Synthesis of a Levofloxacin Precursor”* M. López-Iglesias, E. Busto, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 3815-3824.

### RESUMEN (en Inglés)

Nowadays, Biocatalysis plays a relevant role in the development of sustainable and selective chemical processes, with interesting application in the academia and industry. In this PhD Thesis, we have taken full advantages of using enzymes for synthetic purposes, dividing its contents in three differentiated sections.

In the **Section I** the reactivity of protease of *Bacillus licheniformis* has been studied for non conventional processes such as C-C and C-N bond formation reactions. Several parameters have been analyzed for each reaction type (aldol addition, Henry, Bayllis-Hillman, Mannich or aza-Michael) searching for the optimal conditions. The action of the active site is confirmed by denaturation and inhibition control experiments.

In the **Section II** different chemoenzymatic routes are developed for the preparation of optical active nitrogenated heterocycles. This part is divided in three chapters depending on the considered structure. In **Chapter 2** indole syntheses and their diastereoselective hydrogenation are combined to latter perform enzymatic



kinetic resolution for the preparation of a family of enantioenriched indolines. Chapter 3 emerges as a research collaboration with Zaragoza's University, aiming the synthesis and enzymatic kinetic resolution of two kind of phosphorylated indolines. In Chapter 4 four chemoenzymatic routes for enantiopure benzoxazines synthesis are proposed. Thus, lipases are employed in both hydrolysis and acylation reactions of nitro acetates and nitro alcohols, respectively; oxidoreductases in nitro alcohols bioreduction; and transaminases in the transamination of brominated ketones. Of special interest is the application of the so-obtained intermediates in the synthesis of a levofloxacin precursor.

Finally, Section III deals with the use of transaminases, class of biocatalysts that have attracted great attention in recent years. In Chapter 5 two halogenated pyridine families are considered for the corresponding enantiopure amines synthesis. Besides, a comparative study has been carried out in relation with variations in the pyridine core.

Part of the results obtained along this PhD Thesis have been published in:

- *"Use of protease from Bacillus licheniformis as promiscuous catalyst for organic synthesis. Applications in C-C and C-N bond formation reactions."* M. López-Iglesias, E. Busto, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* 2011, 353, 2345-2353.
- *Stereoselective synthesis of 2,3-disubstituted indoline diastereoisomers by chemoenzymatic processes.* M. López-Iglesias, E. Busto, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *J. Org. Chem.* 2012, 77, 8049-8055.
- *"Chemoenzymatic Asymmetric Synthesis of 1,4-Benzoxazine Derivatives: Application in the Synthesis of a Levofloxacin Precursor"* M. López-Iglesias, E. Busto, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *J. Org. Chem.* 2015, 80, 3815-3824.



# **ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**



<b>[α]</b>	Rotación específica
<b>ΔΔG</b>	Diferencia de energía libre de Gibbs
<b>δ</b>	Desplazamiento químico
<b>μL</b>	Microlitros
<b>v</b>	Frecuencia
<b>Ac</b>	Acetilo
<b>Ac<sub>2</sub>O</b>	Anhídrido acético
<b>ADH</b>	Alcohol deshidrogenasa
<b>ADH-A</b>	Alcohol deshidrogenasa de <i>Rhodococcus ruber</i>
<b>ADH-CP</b>	Alcohol deshidrogenasa de <i>Candida parapsilosis</i>
<b>ADH-LB</b>	Alcohol deshidrogenasa de <i>Lactobacillus brevis</i>
<b>ADH-LK</b>	Alcohol deshidrogenasa de <i>Lactobacillus kefir</i>
<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>AcOVin</b>	Acetato de vinilo
<b>AlaDH</b>	Alanina deshidrogenasa
<b>AMP</b>	Proteasa de <i>Aspergillus melleus</i>
<b>AnGA</b>	Glucoamilasa de <i>Aspergillus niger</i>
<b>APCI</b>	Ionización química a presión atmosférica
<b>API</b>	Intermedio farmacéutico activo (del inglés, <i>active pharmaceutical ingredient</i> )
<b>Ar</b>	Arilo
<b>Asn</b>	Aspargina
<b>Asp</b>	Ácido aspártico
<b>At</b>	<i>Aspergillus terreus</i>
<b>ATP</b>	Adenosina-5'-trifosfato
<b>AUAP</b>	Proteasa ácida de <i>Aspergillus usamii</i>
<b>BBE</b>	Enzima del puente de la berberina (del inglés, <i>berberine bridge enzyme</i> )
<b>BINAP</b>	2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftilo
<b>BLAP</b>	Proteasa de <i>Bacillus licheniformis</i>
<b>Bn</b>	Bencilo
<b>BNPPA</b>	1,1'-binaftaleno-2,2'-diil-hidrogenofosfato
<b>Boc</b>	<i>tert</i> Butoxicarbonilo
<b>BPL</b>	Lipasa de páncreas bovino

## *Abreviaturas y Acrónimos*

---

<b>BSA</b>	Albúmina de suero bovino
<b>Bu</b>	Butilo
<b>BuLi</b>	Butil litio
<b>BY</b>	Levadura de panadería (del inglés, <i>baker's yeast</i> )
<b>°C</b>	Grado(s) Celsius
<b>c</b>	Conversión
<b>CAL-A</b>	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> de tipo A
<b>CAL-B</b>	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> de tipo B
<b>Cbz</b>	Benciloxicarbonilo
<b>CLEA</b>	Agregados de enzimas por entrecruzamiento (del inglés, <i>cross-linked enzyme aggregates</i> )
<b>cm</b>	Centímetros
<b>CRL</b>	Lipasa de <i>Candida rugosa</i>
<b>CG</b>	Cromatografía de Gases
<b>Cv</b>	<i>Chromobacterium violaceum</i>
<b>Cy</b>	Ciclohexilo
<b>Cys</b>	Cisteína
<b>d</b>	Doblete
<b>DC</b>	Dicroísmo circular
<b>dd</b>	Doble doblete
<b>ddd</b>	Doble doblete de dobletes
<b>DEAD</b>	Azodicarboxilato de dietilo
<b>DEPT</b>	Aumento de distorsión por transferencia de polarización (del inglés, <i>distorsion enhancement by polarization transfer</i> )
<b>DES</b>	Disolventes eutécticos profundos (del inglés, <i>deep eutectic solvents</i> )
<b>DKR</b>	Resolución cinética dinámica (del inglés, <i>dynamic kinetic resolution</i> )
<b>DIBAL-H</b>	Hidruro de diisobutilaluminio
<b>dquint</b>	Doble quintuplete
<b>DMAP</b>	Dimetilaminopiridina
<b>DMF</b>	( <i>N,N</i> )-dimetilformamida

<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>dt</b>	Doble triplete
<b>EC</b>	Clasificación enzimática
<b>E</b>	Enzima
<b><i>E</i></b>	Razón enantiomérica o enantioselectividad
<b><math>E_a</math></b>	Energía de activación
<b><i>ed</i></b>	Exceso diastereomérico
<b><i>ee</i></b>	Exceso enantiomérico
<b><i>ee<sub>s</sub></i></b>	Exceso enantiomérico de sustrato
<b><i>ee<sub>p</sub></i></b>	Exceso enantiomérico de producto
<b>ESI<sup>+</sup></b>	Ionización por electrospray
<b>Et</b>	Etilo
<b>equiv</b>	Equivalente(s)
<b>FAD</b>	Flavina adenina dinucleótido
<b>FDH</b>	Formiato deshidrogenasa
<b>G6P</b>	Glucosa-6-fosfato
<b>G6PDH</b>	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
<b>GDH</b>	Glucosa deshidrogenasa
<b>GP</b>	Grupo Protector
<b>His</b>	Histidina
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés, <i>high performance liquid chromatography</i> )
<b>HRMS</b>	Espectrometría de masas de alta resolución (del inglés, <i>high resolution mass spectrometry</i> )
<b>h</b>	Horas
<b>Hz</b>	Hertzios
<b>IL</b>	Líquido iónico (del inglés, <i>ionic liquid</i> )
<b>IT</b>	Intermedio tetraédrico
<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamiento
<b><math>K_M</math></b>	Constante de Michaelis Menten
<b>KR</b>	Resolución cinética (del inglés, <i>kinetic resolution</i> )
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>M</b>	Molar
<b>m</b>	Multiplete

## Abreviaturas y Acrónimos

---

<b>MBH</b>	Morita-Baylis-Hillman
<b>Me</b>	Metilo
<b>MeCN</b>	Acetonitrilo
<b>mg</b>	Miligramo(s)
<b>min</b>	Minuto(s)
<b>mL</b>	Militro(s)
<b>mmol</b>	Milimol(es)
<b>MW</b>	Microondas (del inglés, <i>microwaves</i> )
<b>MTPA-Cl</b>	Cloruro de (S)-(+)- $\alpha$ -metoxi- $\alpha$ -trifluorometilfenilacetilo
<b>NAD(H)</b>	Dinucleótido de nicotinamida-adenina
<b>NBS</b>	<i>N</i> -Bromosuccinimida
<b>P</b>	Producto
<b>PDC</b>	Piruvato descarboxilasa
<b>PF</b>	Punto de fusión
<b>Ph</b>	Fenilo
<b>PLE</b>	Esterasa de hígado de cerdo (del inglés, <i>pig liver esterase</i> )
<b>PLP</b>	Piridoxal-5'-fosfato
<b>PPL</b>	Lipasa de páncreas porcino
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>PQQ</b>	Pirroloquinolina quinona
<b>Pr</b>	Propilo
<b>PSL</b>	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i>
<b>py</b>	Piridina
<b>q</b>	Cuatriplete
<b>rdto</b>	Rendimiento
<b>RML</b>	Lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i>
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>S</b>	Sustrato
<b>s</b>	Singlete
<b>sa</b>	Singlete ancho

*Abreviaturas y Acrónimos*

---

<b>SED</b>	Desimetrización enzimática estereoselectiva (del inglés, <i>stereoselective enzymatic desymmetrization</i> )
<b>Ser</b>	Serina
<b>SGP</b>	Proteasa de <i>Streptomyces griseus</i>
<b>SIDA</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>t.a.</b>	Temperatura ambiente
<b>TA</b>	Transaminasa
<b>TBME</b>	<i>tert</i> -Butil metil éter
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>TLC</b>	Cromatografía de capa fina (del inglés, <i>thin layer chromatography</i> )
<b>TLL</b>	Lipasa de <i>Thermomyces lanuginose</i>
<b><math>t_R</math></b>	Tiempo de retención
<b>Tris ·HCl</b>	Hidrocloreuro de tris(hidroximetil)aminometano
<b>Ts</b>	Tosilo (4-metilbenceno-1-sulfonilo)
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>Vf</b>	<i>Vibrio fluvialis</i>
<b>VIH</b>	Virus de inmunodeficiencia humana



# ÍNDICE



<b><i>INTRODUCCIÓN</i></b> .....	1
0.1. Química Sostenible y Biocatálisis.....	3
0.1.1. Pasado, Presente y Futuro de la Biocatálisis.....	6
0.1.2. Clasificación Enzimática .....	8
0.1.3. Medio de Reacción .....	9
0.2. Inmovilización Enzimática .....	12
<b><i>BLOQUE I. DESARROLLO DE TRANSFORMACIONES SINTÉTICAS MEDIANTE PROCESOS ENZIMÁTICOS NO CONVENCIONALES CATALIZADOS POR HIDROLASAS</i></b> .....	
<b><i>INTRODUCCIÓN</i></b> .....	17
I.1. Hidrolasas.....	19
I.1.1. Proteasas.....	19
I.1.2. Proteasa de <i>Bacillus licheniformis</i> .....	22
I.1.2.1. Procesos no Estereoselectivos .....	23
I.1.2.2. Procesos Estereoselectivos .....	29
<b><i>CAPÍTULO 1. APLICACIONES DE LA PROTEASA DE BACILLUS LICHENIFORMIS EN REACCIONES NO CONVENCIONALES</i></b> .....	
<b><i>ANTECEDENTES</i></b> .....	35
1.1. Promiscuidad Biocatalítica .....	37
1.2. Reacciones de Formación de Enlaces Carbono-Carbono.....	38
1.2.1. Reacción de Adición Aldólica.....	39
1.2.2. Reacción de Henry (Nitroaldólica) .....	49
1.2.3. Reacción de Baylis-Hillman .....	52
1.2.4. Reacción de Mannich.....	53

## Índice

---

1.3. Reacciones de Formación de Enlaces Carbono-Nitrógeno (Adiciones Tipo Michael).....	56
<i>OBJETIVOS</i> .....	61
<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i> .....	65
1.4. Reacciones de Formación de Enlaces C-C .....	67
1.4.1. Reacción de Adición Aldólica .....	67
1.3.2. Reacción de Henry (Nitroaldólica).....	71
1.4.3. Reacción de Baylis-Hillman.....	74
1.4.4. Reacción de Mannich .....	75
1.5. Reacciones de Formación de Enlaces C-N (Adiciones Tipo Michael).....	78
<i>CONCLUSIONES</i> .....	83
<i>PARTE EXPERIMENTAL</i> .....	87
1.6. General.....	89
1.7. Técnicas de Análisis .....	89
1.7.1. Cromatografía en Gel de Sílice.....	89
1.7.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) .....	89
1.7.3. Espectroscopía Infrarroja (IR).....	90
1.7.4. Espectrometría de Masas (EM) .....	90
1.7.5. Puntos de Fusión .....	91
1.7.6. Resonancia Magnética Nuclear (RMN) .....	91
1.7.7. Cromatografía de Gases (CG).....	91
1.7.8. Rotación Óptica Específica .....	92
1.8. Procedimientos Sintéticos .....	92
1.8.1. Adición Aldólica entre 4-Nitrobenzaldehído ( <b>1</b> ) y Acetona ( <b>2</b> ) .....	92

1.8.2. Reacción de Henry entre 4-Nitrobenzaldehído (1) y Nitrometano (5) .....	92
1.8.3. Reacción de Baylis-Hillman entre 4-Nitrobenzaldehído (1) y Metil Vinil Cetona (9).....	93
1.8.4. Reacción de Mannich entre 4-Nitrobenzaldehído (1), Acetona (2) y Anilina (11) .....	93
1.8.5. Reacción de Aza-Michael entre Aminas Secundarias 13-15 y Acrilonitrilo (16) .....	94
1.8.6. Procesos de Desnaturalización.....	94
1.8.6.1. Desnaturalización de la Alcalasa-CLEA® con H <sub>2</sub> O .....	94
1.8.6.2. Desnaturalización de la Alcalasa-CLEA® con Urea .....	94
1.8.6.3. Inhibición de la Alcalasa-CLEA® con PMSF .....	95
1.9. Datos Experimentales.....	95

***BLOQUE II. DESARROLLO DE PROCESOS QUIMIOENZIMÁTICOS ASIMÉTRICOS PARA LA SÍNTESIS DE HETEROCICLOS NITROGENADOS.....***

***INTRODUCCIÓN.....***

II.1. Otras Hidrolasas: Lipasas .....	103
II.1.1. Aspectos Cinéticos .....	105
II.1.2. Lipasas como Biocatalizadores: Principales Procesos Asimétricos .....	107
II.1.3. Reconocimiento Quiral .....	111
II.2. Oxidorreductasas: Alcohol Deshidrogenasas.....	113
II.2.1. Reconocimiento Quiral .....	115
II.2.2. Cofactores y Estrategias de Regeneración .....	117
II.3. Aminas: Actividad y Aplicabilidad .....	121

II.3.1. Biocatálisis Aplicada a la Síntesis Selectiva de Aminas	122
<b>CAPÍTULO 2. SÍNTESIS ESTEREOSELECTIVA DE INDOLINAS 2,3-DISUSTITUIDAS</b> .....	127
<i>ANTECEDENTES</i> .....	129
2.1. Importancia de las Indolinas .....	131
2.2. Síntesis Convencional de Indolinas 2,3-Disustituidas Ópticamente Activas.....	132
2.2.1. Reducción Asimétrica de Indoles.....	133
2.2.2. Resolución Cinética de Indolinas .....	135
2.2.3. Metodologías Convergentes.....	137
2.3. Resolución Cinética Enzimática .....	139
2.3.1. N-Acilaciones .....	140
2.3.2. N-Alcoxicarbonilaciones .....	144
<i>OBJETIVOS</i> .....	149
<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i> .....	153
2.4. Síntesis y Resolución de <i>trans</i> -2,3-Dimetilindolina .....	155
2.5. Síntesis y Resolución de <i>cis</i> -2,3-Dimetilindolina.....	157
2.6. Síntesis y Resolución de <i>cis</i> -Indolinas Sustituidas .....	160
2.6.1. Síntesis y Resolución de <i>cis</i> -2,3-Dimetilindolinas con Distintas Funcionalidades en el Anillo Aromático .....	160
2.6.2. Síntesis y Resolución de Derivados de <i>cis</i> -Indolinas Disustituidas en las Posiciones C-2 y C-3.....	163
<i>CONCLUSIONES</i> .....	167
<i>PARTE EXPERIMENTAL</i> .....	171
2.7. General.....	173

2.8. Técnicas de Análisis.....	173
2.8.1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) .....	173
2.8.2. Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRMS) ....	174
2.9. Procedimientos Sintéticos.....	175
2.9.1. Procedimiento General para la Síntesis de los Indoles <b>20b-i</b> .....	175
2.9.2. Síntesis de la <i>trans</i> -2,3-Dimetilindolina Racémica ( <i>trans</i> - <b>21a</b> ) .....	175
2.9.3. Procedimiento General para la Síntesis de la <i>cis</i> -Indolinas <b>21a-h</b> .....	176
2.9.4. Síntesis de la <i>cis</i> -2-Fenil-3-metilindolina Racémica ( <i>cis</i> - <b>21i</b> ) .....	176
2.9.5. Procedimiento General para la Síntesis de los Carbamatos Racémicos <i>trans</i> - <b>23a</b> y <i>cis</i> - <b>23a-i</b> .....	177
2.9.6. Procedimiento General para la Resolución Cinética Enzimática de las Indolinas Racémicas <i>cis</i> - <b>21a-i</b> .....	177
2.10. Datos Experimentales.....	178
<b><i>CAPÍTULO 3. DESARROLLO DE PROCESOS ENZIMÁTICOS PARA LA SÍNTESIS DE AMINOFOSFONATOS ÓPTICAMENTE ACTIVOS</i></b> .....	
<b><i>ANTECEDENTES</i></b> .....	205
3.1. Importancia de los Ácidos $\alpha$ -Aminofosfónicos .....	207
3.2. Síntesis de Ácidos $\alpha$ -Aminofosfónicos .....	210
3.3. Síntesis Asimétrica mediante Biocatálisis de Derivados de Prolina.....	218
3.3.1. Resolución Cinética de Indolinas Carboxiladas.....	218
3.3.2. Resolución Cinética de Isoindolinas Carboxiladas .....	219

<i>OBJETIVOS</i> .....	221
<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i> .....	225
3.4. Síntesis y Resolución Cinética Enzimática de Derivados de Fosfoinfolinas .....	227
3.4.1. Síntesis del Indolin-2-ilfosfonato de Dimetilo Protegido .	227
3.4.2. Resolución Cinética Enzimática del Indolin-2-ilfosfonato de Dimetilo .....	228
3.5. Síntesis y Resolución Cinética Enzimática de Derivados de Fosfoisoindolinas.....	234
3.5.1. Síntesis del Isoindolin-1-ilfosfonato de Dimetilo Protegido .....	234
3.5.2. Resolución Cinética Enzimática del Isoindolin-1-ilfosfonato de Dimetilo.....	235
3.5.3. Determinación de la Configuración Absoluta .....	238
<i>CONCLUSIONES</i> .....	241
<i>PARTE EXPERIMENTAL</i> .....	245
3.6. General.....	247
3.7. Técnicas de Análisis .....	247
3.7.1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) .....	247
3.8. Procedimientos Sintéticos .....	248
3.8.1. Síntesis de la Fosfoindolina Racémica <b>31</b> .....	248
3.8.2. Procedimiento General para la Síntesis de los Carbamatos Racémicos <b>30b</b> y <b>30c</b> .....	248
3.8.3. Procedimiento General para la Resolución Cinética Enzimática por Alcoxicarbonilación del Aminofosfonato Racémico <b>31</b> .....	248
3.8.4. Síntesis de la Fosfoisoindolina Racémica <b>36</b> .....	249

3.8.5. Procedimiento General para la Síntesis de los Carbamatos Racémicos <b>35b</b> y <b>35c</b> .....	249
3.8.6. Procedimiento General para la Resolución Cinética Dinámica Enzimática por Alcoxycarbonilación de la Amina Racémica <b>36</b> .....	250
3.8.7. Procedimiento General para la Desprotección del Carbamato Ópticamente Activo <b>35b</b> .....	250
<b>3.8.8.</b> Procedimiento General para la Síntesis del Derivado de Mosher Ópticamente Activo ( <i>R,S</i> )- <b>38</b> .....	250
3.9. Datos Experimentales.....	251
<b><i>CAPÍTULO 4. SÍNTESIS ASIMÉTRICA DE BENZOXAZINAS. APLICACIÓN A LA PREPARACIÓN DE UN PRECURSOR DEL LEVOFLOXACINO</i></b> .....	
<i>ANTECEDENTES</i> .....	259
4.1. Importancia de las Benzoxazinas .....	261
4.2. Síntesis Química de 1,4-Benzoxazinas.....	262
4.2.1. Aproximaciones No Quirales.....	262
4.2.2. Aproximaciones Quirales .....	264
4.2.2.1. Catálisis Asimétrica.....	264
4.2.2.2. Resolución Cinética.....	266
4.2.3. Aproximaciones a la Síntesis Química del Levofloxacino.....	269
4.3. Síntesis Enzimática de 1,4-Benzoxazinas .....	271
<i>OBJETIVOS</i> .....	273
<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i> .....	277
4. 4. Resolución Cinética Enzimática de Benzoxazinas .....	279
4.5. Resolución Cinética Enzimática de los Alcoholes Precursores de Benzoxazinas .....	280

4.5.1. Extensión a Otros Sustratos.....	283
4.6. Hidrólisis Enzimática de Acetilos para la Obtención de Alcoholes Precursores de Benzoxazinas .....	285
4.7. Biorreducción .....	286
4.7.1. Optimización.....	287
4.7.2. Extensión a Otros Sustratos.....	288
4.8. Aplicación al Precursor del Levofloxacino .....	290
4.9. Nueva Aproximación Empleando Transaminasas .....	293
4.9.1. Optimización.....	294
4.9.2. Extensión a Otros Sustratos.....	299
4.9.3. Aplicación al Precursor del Levofloxacino.....	303
<i>CONCLUSIONES</i> .....	305
<i>PARTE EXPERIMENTAL</i> .....	309
4.10. General.....	311
4.11. Técnicas de Análisis .....	311
4.11.1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) .....	312
4.11.2. Cromatografía de Gases (CG).....	314
4.12. Procedimientos Sintéticos .....	316
4.12.1. Procedimiento General para la Síntesis de las Nitrocetonas <b>41a-e</b> .....	316
4.12.2. Procedimiento General para la Síntesis de los Nitroalcoholes Racémicos ( $\pm$ )- <b>43a-d</b> .....	316
4.12.3. Síntesis del Nitroabromofenolcohool Racémico ( $\pm$ )- <b>43e</b> ..	317
4.12.4. Procedimiento General para la Síntesis de los Aminoalcoholes Racémicos y Ópticamente Activos <b>44a-e</b> .....	317

---

4.12.5. Procedimiento General para la Síntesis de las Sulfonamidas Racémicas y Ópticamente Activas <b>45a-e</b> .....	317
4.12.6. Procedimiento General para la Síntesis de las Benzoxazinas Tosiladas Racémicas y Ópticamente Activas <b>46a-e</b> .....	318
4.12.7. Procedimiento General para la Síntesis de los Acetatos Racémicos <b>47a-e</b> .....	318
4.12.8. Procedimiento General para la Síntesis de las Benzoxazinas Racémicas y Ópticamente Activas <b>42a</b> y <b>42e</b> .....	319
4.12.9. Biorreducción de 1-(2-Nitrofenoxi)propan-2-ona ( <b>41a</b> ) con ADH-LK.....	319
4.12.10. Biorreducción de 1-(2-Nitrofenoxi)propan-2-ona ( <b>41a</b> ) con ADH-CP.....	319
4.12.11. Biorreducción de 1-(2-Nitrofenoxi)propan-2-ona ( <b>41a</b> ) con Levadura de Panadería (BY).....	320
4.12.12. Procedimiento General para la Biorreducción de las Cetonas <b>41a-e</b> con ADH-LB .....	320
4.12.13. Procedimiento General para la Biorreducción de las Cetonas <b>41a-e</b> con ADH-A.....	321
4.12.14. Procedimiento General para la Biorreducción de las Cetonas <b>41a-e</b> con evo-1.1.200 .....	321
4.12.15. Procedimiento General para el Escalado de la Biorreducción de las Cetonas <b>41a-e</b> con ADH-A.....	322
4.12.16. Procedimiento General para el Escalado de la Biorreducción de las Cetonas <b>41a-e</b> con evo-1.1.200 .....	322
4.12.17. Procedimiento General para la Resolución Cinética Enzimática por Acilación de los Alcoholes Racémicos <b>43a-e</b> .....	323
4.12.18. Procedimiento General para la Resolución Cinética Enzimática por Hidrólisis de los Acetatos Racémicos <b>47a-e</b> .....	323
4.12.19. Síntesis del Bromofenol <b>50e</b> .....	324

4.12.20. Síntesis del Bromofenol <b>56</b> .....	324
4.12.21. Procedimiento General para la Síntesis de las Bromocetonas <b>51a-e</b> y <b>57</b> .....	324
4.12.22. Procedimiento General para la Síntesis de las Bromoaminas Racémicas <b>52a-e</b> y <b>58</b> .....	325
4.12.23. Procedimiento General para la Síntesis de las Benzoxazinas Racémicas o Enantiopuras 42a-c y 42e a Partir de las Bromoaminas <b>52a-c</b> y <b>57</b> .....	325
4.12.24. Procedimiento General para la Transaminación de las Cetonas <b>51a-f</b> Empleando el Sistema de Regeneración de la Alanina Deshidrogenasa .....	326
4.12.25. Procedimiento General para la Transaminación de las Cetonas <b>51a-f</b> Empleando Isopropilamina.....	326
4.12.26. Procedimiento General para la Transaminación de las Cetonas <b>51a-f</b> Empleando el Sistema de Regeneración de la Lactato Deshidrogenasa .....	327
4.12.27. Procedimiento General para el Escalado de la Transaminación de las Cetonas <b>51a-f</b> Empleando Isopropilamina .....	327
4.13. Datos Experimentales .....	328
<b>BLOQUE III. ESTUDIOS DE TRANSAMINACIÓN</b> .....	367
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	369
III.1. $\omega$ -Transaminasas: Biocatalizadores para la Síntesis de Aminas Quirales .....	371
III.2. Aspectos Mecanísticos de las $\omega$ -Transaminasas .....	374
III.3. Sistemas de Regeneración. Desplazando el Equilibrio. ....	376

III.4. Nuevas Transaminasas. Evolución Dirigida e Inmovilización .....	379
<b><i>CAPÍTULO 5. DESARROLLO DE PROCESOS DE TRANSAMINACIÓN DE PIRIDINAS HALOGENADAS.....</i></b>	
<b><i>ANTECEDENTES.....</i></b>	<b>385</b>
5.1. Importancia de las Piridinas .....	387
5.2. Biotocatálisis Aplicada a la Síntesis de Derivados de Piridina..	389
5.2.1. Uso de Hidrolasas.....	390
5.2.2. Uso de Oxidorreductasas.....	396
5.2.2.1. Alcohol Deshidrogenasas .....	396
5.2.2.2. Oxigenasas .....	398
5.2.2.3. Otros Procesos Redox Enzimáticos .....	399
5.2.3. Uso de Liasas.....	401
5.3. Aplicación de $\omega$ -Transaminasas en la Preparación de Estructuras Relacionadas.....	403
<b><i>OBJETIVOS .....</i></b>	<b>407</b>
<b><i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</i></b>	<b>411</b>
5.4. Piridinas Cloradas.....	413
5.4.1. Síntesis Química de Piridinas Cloradas .....	413
5.4.2. Estudios de Transaminación .....	415
5.4.3. Estudios de Reactividad .....	420
5.4.3.1. Efecto de la Longitud de la Cadena Alquílica .....	421
5.4.3.2. Efecto de la Sustitución y la Posición del Grupo Acetilo .....	423
5.4.3.3. Equilibrio con la ArRmut 11.....	427
5.4.4. Determinación de la Configuración Absoluta .....	428

5.5. Piridinas Fluoradas.....	428
5.5.1. Síntesis Química de Piridinas Fluoradas.....	429
5.5.2. Estudios de Transaminación .....	430
5.5.3. Determinación de la Configuración Absoluta.....	435
<i>CONCLUSIONES</i> .....	439
<i>PARTE EXPERIMENTAL</i> .....	443
5.6. General.....	445
5.7. Técnicas de Análisis .....	445
5.7.1. Cromatografía de Gases (CG).....	445
5.7.2. Dicroísmo Circular (DC) .....	446
5.8. Procedimientos Sintéticos .....	447
5.8.1. Síntesis de las Aminas Racémicas <b>64a-d</b> .....	447
5.8.2. Procedimiento General para las Reacciones de Transaminación de las Cetonas <b>63a-d</b> Empleando el Sistema de Regeneración de la Alanina Deshidrogenasa.....	447
5.8.3. Procedimiento General para las Reacciones de Transaminación de las Cetonas <b>63a-d</b> y Empleando Isopropilamina.....	448
5.8.4. Procedimiento General para la Aminación Reductiva con Transaminasas a Escala Preparativa de las Cetonas <b>63a</b> y <b>63b</b> Empleando el Sistema de Regeneración de la Alanina Deshidrogenasa .....	448
5.8.5. Aminación Reductiva a Escala Preparativa de la Cetona <b>63c</b> Catalizada por la ArRmut 11 Semipurificada .....	449
5.8.6. Síntesis de la Cetona Trifluorometilada <b>68a</b> .....	449
5.8.7. Procedimiento General para la Síntesis de los Alcoholes Fluorados <b>71a</b> y <b>71b</b> .....	450

5.8.8. Procedimiento General para la Síntesis de las Cetonas Fluoradas <b>68b</b> y <b>68c</b> .....	450
5.8.9. Procedimiento General para la Síntesis de las Aminas Racémicas <b>69a-c</b> .....	451
5.8.10. Procedimiento General para las Reacciones de Transaminación de las Cetonas <b>68a-c</b> Empleando el Sistema de Regeneración de la Alanina Deshidrogenasa .....	451
5.8.11. Procedimiento General para las Reacciones de Transaminación de las Cetonas <b>68a-c</b> Empleando Isopropilamina .....	452
5.8.12. Procedimiento General para la Aminación Reductiva con Transaminasas a Escala Preparativa de las Cetonas <b>68a-c</b> Empleando el Sistema de Regeneración de la Alanina Deshidrogenasa .....	452
5.9. Datos Experimentales.....	453
<b>REFERENCIAS</b> .....	459



# 0. INTRODUCCIÓN



En la introducción general de esta Tesis Doctoral se ubicará el papel que la Biocatálisis desempeña en la actualidad dentro del marco de la Química Sostenible y sus principales características. Posteriormente, se desglosarán los cinco capítulos agrupados en tres bloques, en los que se considerarán diversos procesos biocatalíticos.

## 0.1. Química Sostenible y Biocatálisis

Históricamente, el éxito de un proceso químico era evaluado casi exclusivamente en función del rendimiento del producto obtenido y los costes derivados de la transformación. Sin embargo, la crítica situación medioambiental actual ha sido el detonante para la creación de una tendencia que promueva el desarrollo de procesos sintéticos en condiciones benignas con el medio. Esta nueva disciplina, que afecta tanto a la industria farmacéutica como a la industria química, se denomina *Química Verde* o *Química Sostenible* y engloba una serie de principios que han sido recogidos intencionadamente bajo el término inglés *productively* (de manera productiva, Tabla 1).<sup>1</sup>

**Tabla 1.** Doce principios de la Química Verde.

<b>P</b>	<i>Prevent wastes</i>	Minimizar residuos
<b>R</b>	<i>Renewable materials</i>	Empleo de materiales renovables
<b>O</b>	<i>Omit derivatization steps</i>	Evitar pasos de protección/desprotección
<b>D</b>	<i>Degradable chemical products</i>	Uso de productos químicos degradables
<b>U</b>	<i>Use safe synthetic methods</i>	Minimizar la peligrosidad del proceso
<b>C</b>	<i>Catalytic reagents</i>	Uso de catalizadores
<b>T</b>	<i>Temperature, pressure ambient</i>	Condiciones suaves de reacción
<b>I</b>	<i>In-process monitoring</i>	Análisis en tiempo real
<b>V</b>	<i>Very few auxiliary substances</i>	Minimizar el uso de auxiliares
<b>E</b>	<i>E-factor, maximise feed in product</i>	Procesos eficaces, E-factor = Residuos(kg)/Producto(kg)
<b>L</b>	<i>Low toxicity of chemical products</i>	Sintetizar productos de baja toxicidad
<b>Y</b>	<i>Yes, it is safe</i>	Química segura

<sup>1</sup> P. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301-312.

## Introducción

---

En este contexto, la Biocatálisis, definida como el empleo de sistemas biológicos para llevar a cabo transformaciones químicas, es, cada vez más, un referente de los procesos que operan en consonancia con los principios de la sostenibilidad. De hecho, las enzimas han evolucionado de forma natural para llevar a cabo las reacciones en condiciones suaves de reacción, eludiendo las elevadas temperaturas y presiones que son muchas veces necesarias para otros catalizadores y, por tanto, disminuyendo de forma significativa el gasto energético. Así pues, las condiciones en las que trabajan las enzimas se sitúan en el marco de la Química Sostenible, pero más aún, lo que prevalece después del proceso enzimático también contribuye a la sostenibilidad, ya que estos biocatalizadores ofrecen una inherente biodegradabilidad, evitando el impacto negativo debido a la acumulación de metales pesados u otro tipo de residuos tóxicos.

Además de las ventajas medioambientales, la aportación más característica de la Biocatálisis es su capacidad para catalizar procesos de forma regio-, quimio- y estereoselectiva. Esta excepcional habilidad ha sido, sin duda, determinante para la aplicación de las biotransformaciones en síntesis orgánica.<sup>2</sup> Así, la superficie de contacto entre una enzima y un sustrato permite controlar la unión de tal manera que sólo un área (regiocontrol) y una cara (estereocontrol) del sustrato se sitúan en la posición adecuada para la catálisis. Como resultado, en un sustrato en el que se encuentran presentes varios grupos con reactividad similar solo estará favorecida la conversión de uno de ellos (quimioselectividad).<sup>3</sup> La estricta selectividad puede ser fuente de desventajas en algún caso, en particular para aquellas enzimas que aceptan un tipo de sustratos muy específico. No obstante, se han desarrollado distintas técnicas para subsanar tal limitación.

---

<sup>2</sup> a) T. Hudlicky, J. W. Reed, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3117-3132; b) S. Friedrich, F. Hahn, *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1473-1508; c) H. Lechner, D. Pressnitz, W. Kroutil, *Biotechnol. Adv.* **2015**, doi:10.1016/j.biotechadv.2015.01.012; d) L. E. Iglesias, E. S. Lewkowicz, R. Medici, P. Bianchi, A. M. Iribarren, *Biotechnol. Adv.* **2015**, doi:10.1016/j.biotechadv.2015.03.009.

<sup>3</sup> C. M. Clouthier, J. N. Pelletier, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585-1605.

Todas estas particularidades conllevan un gran esfuerzo invertido en el diseño de procesos que cumplan con los intereses de los investigadores en la obtención de nuevos productos de calidad, con la demanda industrial hacia una eficiencia mejorada y, por último, con las presiones gubernamentales y sociales para el uso de tecnologías *verdes*. Para una correcta estructuración del proceso, el primer elemento que debe valorarse es la elección del tipo de biocatalizador, lo que depende de varios factores como el tipo de reacción, la necesidad de utilizar cofactores y la escala a la que se pretende realizar el proceso. Por ejemplo, mediante el uso de microorganismos o células enteras es posible evitar etapas de producción y purificación que son laboriosas, costosas y necesarias en el caso de utilizar enzimas aisladas. Además, dentro de la célula la enzima actúa en su ambiente natural, lo que maximiza su actividad a la vez que la protege de factores ambientales que podrían degradarla. Otra importante ventaja, en caso de requerir un cofactor el proceso, es que éstos se encuentran integrados dentro del microorganismo o la célula, lo que disminuye el gasto económico global de la biotransformación. En contrapartida, la presencia de otras enzimas dentro de una misma célula puede dar lugar a reacciones indeseadas, generando mezclas de productos, en cuyo caso las enzimas aisladas serían una mejor opción. Lo mismo ocurre en procesos en los que el sustrato, producto o ambos no sean adecuados para atravesar la membrana celular, o bien sean tóxicos para la célula. Otras ventajas asociadas con el uso de enzimas aisladas son la mejora en la selectividad del proceso, mayor facilidad para el control de la reacción y un aumento de la tolerancia a la concentración. Recientemente, el uso de células enteras con enzimas superficiales ha permitido vencer algunas de las limitaciones observadas en biocatalizadores convencionales, ya sean células enteras o enzimas aisladas.<sup>4</sup>

---

<sup>4</sup> J. Schüürmann, P. Quehl, G. Festel, J. Jose, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 8031-8046.

### **0.1.1. Pasado, Presente y Futuro de la Biocatálisis**

En un contexto histórico, la aplicación de la Biocatálisis se remonta a milenios atrás, bajo la forma en la que se controlaba la fermentación para la preparación del etanol y, más adelante, en procesos de fabricación del pan y desarrollo de productos lácteos. En esta ciencia naciente convertida en saber popular se hacía uso de células enteras, donde bacterias y levaduras componían la fuente de la que eran obtenidos los biocatalizadores.

El pasado siglo trajo consigo innumerables avances en la química convencional, donde la imponente evolución de los catalizadores clásicos derivó en procesos sintéticos robustos, eficientes y altamente selectivos. Paralelamente, la Biocatálisis quedó relegada a un segundo plano hasta mediados del siglo XX, cuando los primeros estudios bioquímicos de caracterización sacaron de su letargo al poder catalítico de las enzimas, estableciéndose las primeras estructuras proteicas y comenzando un desarrollo exponencial de los procesos biocatalíticos.<sup>3</sup>

Durante esas primeras etapas de la Biocatálisis actual, la mayoría de las enzimas aisladas tenían su origen en tejidos de plantas o en órganos de animales, si bien en poco tiempo se observó un cambio de tendencia hacia la obtención de enzimas de fuentes microbianas. Actualmente, el uso de microorganismos como fuente tanto de células enteras como de enzimas aisladas ha permitido el desarrollo de nuevos biocatalizadores con distintivas actividades, algo que ocupa una parte importante de la investigación en este campo.<sup>5</sup>

El funcionamiento de las enzimas y su capacidad para acelerar reacciones llevándolas a velocidades de hasta  $10^{20}$  veces por encima del proceso en ausencia de catalizador sigue siendo un reto por entender en algunos casos, si bien en los últimos años la comunidad investigadora ha realizado grandes progresos en esta dirección, habiendo sido definidos los mecanismos de diversos procesos biocatalíticos. Sin

---

<sup>5</sup> G. Yang, Y. Ding, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5604-5612.

embargo, aunque el centro activo de cada enzima haya sido diseñado originariamente para desempeñar una función concreta, su operatividad puede abarcar diversas áreas. Esta habilidad puede ser desarrollada a través de la catálisis de procesos no convencionales, en lo que se conoce como *promiscuidad catalítica*,<sup>6</sup> que se discutirá con detalle más adelante; pero también las cepas naturales de las enzimas pueden ser modificadas creando nuevos y mejorados biocatalizadores.<sup>7</sup> Las mutaciones en la secuencia de aminoácidos pueden ser introducidas mediante dos técnicas básicas: el diseño racional y la evolución dirigida.

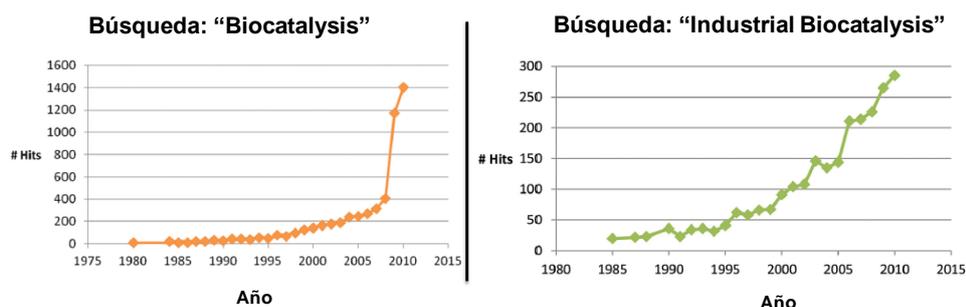
El diseño racional conlleva la alteración de un aminoácido específico produciendo un cambio en la selectividad de la enzima, mientras que en la evolución dirigida se generan librerías de catalizadores modificados a través de la mutación aleatoria y posterior selección de aquellas mutantes que posean características específicas para un criterio concreto. En este contexto, muchas son las ventajas que han sido alcanzadas a escala de laboratorio y muchos los procesos diseñados para paliar distintas necesidades, si bien la integración de una gran parte de esos procesos a un nivel industrial se encuentra todavía en un estadio de desarrollo. No obstante, cada vez más investigadores han ido tomando conciencia del potencial biocatalítico, algo reflejado en las estadísticas de búsqueda de distintas bases de datos (Figura 1).<sup>8</sup>

---

<sup>6</sup> a) Y. Miao, M. Rahimi, E. M. Geertsema, G. J. Poelarends, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *25*, 115-123; b) C. Pandya, J. D. Farelli, D. Dunaway-Mariano, K. N. Allen, *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 30229-30236.

<sup>7</sup> a) Y. Li, P. C. Cirino, *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *111*, 1273-1287; b) K. B. Otte, B. Hauer, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *35*, 16-22; c) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185-194; d) H. Renata, Z. J. Wang, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 3351-3367.

<sup>8</sup> H.-J. Federsel, *Green Chem.* **2013**, *15*, 3105-3115.



**Figura 1.** Búsquedas realizadas en la base de datos Scifinder (hasta octubre de 2011) en las que se refleja el creciente interés de la comunidad investigadora por la Biocatálisis (izquierda) y, en los últimos años en particular, por su aplicación industrial.

### 0.1.2. Clasificación Enzimática

La asignación de una única función que permita establecer una clasificación enzimática no es una tarea fácil debido a la gran diversidad de reacciones biocatalíticas que tienen lugar en la naturaleza. Tradicionalmente, la funcionalidad de cada enzima resultaba tan clara como lo era el proceso que había llevado a su descubrimiento. A partir de mediados del siglo pasado el número de enzimas identificado se había incrementado hasta el punto de evidenciar la necesidad de realizar una agrupación que permitiese una visión conjunta de estas funcionalidades. Como resultado, las enzimas se clasifican actualmente en seis categorías, en función del tipo de reacción que catalizan (Figura 2).<sup>9</sup> Los números de clasificación enzimática (EC) siguen un sistema jerárquico que puede ser ejemplificado con un caso particular. Así, la proteasa tripéptido aminopeptidasa con número EC 3.4.11.4 es una hidrolasa (EC 3) que actúa sobre los enlaces peptídicos (EC 3.4) y provoca la escisión de los aminoácidos del extremo amino (EC 3.4.11), empleando tripéptidos como sustratos (EC 3.4.11.4).

---

<sup>9</sup> W. Aehle, J. Eck, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2012, pp. 67-87.



**Figura 2.** Clasificación de las enzimas en función de la reacción que catalizan. De izquierda a derecha: clase, tipo de reacción, subclases importantes.

En lo que respecta a aplicaciones sintéticas, prácticamente todas las clases de enzimas han desarrollado, en mayor o menor medida, un importante papel en química orgánica. Como salvedad podrían considerarse las ligasas pertenecientes a la clase EC 6, cuya dependencia del cofactor ATP ha limitado su aplicación por no encontrarse disponible aún una metodología eficiente para la regeneración del mismo.

A pesar de ser la clasificación más exacta que existe en concordancia con las funciones enzimáticas, no debe olvidarse que, como se ha comentado anteriormente, la catálisis de procesos no convencionales a través de la promiscuidad catalítica y el diseño de nuevos biocatalizadores por medio de la evolución dirigida han expandido la capacidad de actuación de las enzimas hasta una complejidad difícil de abarcar en un único criterio de clasificación.

### 0.1.3. Medio de Reacción

Un factor que ha contribuido a la expansión del potencial de aplicación de las enzimas es su capacidad para trabajar tanto en medios

acuosos como orgánicos.<sup>10</sup> Por una parte, la posibilidad de desarrollar procesos biocatalíticos en disolventes orgánicos facilita la preparación de diversos productos de interés industrial que presentan escasa solubilidad en agua. Desde un punto de vista biotecnológico, los sistemas orgánicos presentan una serie de ventajas frente a los convencionales medios acuosos, como son el incremento en la actividad, selectividad y, consecuentemente, rendimiento de los procesos, la mayor solubilidad del sustrato, la sencillez de recuperación de los productos, especialmente con enzimas inmovilizadas, y la facilidad para desplazar el equilibrio hacia la dirección sintética, minimizando las reacciones laterales. La baja solubilidad enzimática en estos disolventes hace decrecer las pérdidas enzimáticas por desorción del material de soporte, lo que hace posible aplicar técnicas de inmovilización, de las que se hablará más adelante. En cualquier caso, la presencia de agua no es trivial, y no debe olvidarse que las enzimas necesitan retener una pequeña cantidad para mantener su estructura tridimensional y proporcionar las interacciones hidrofóbicas entre los residuos polares que, de otra manera, podrían dar lugar a conformaciones incorrectas. No obstante, esta agua esencial puede estar integrada en la propia estructura enzimática, y el hecho de que sea una cantidad mínima es algo beneficioso, ya que provoca una mayor rigidez que puede evitar problemas de desnaturalización.

Por otra parte, en los últimos años se ha experimentado un interés creciente por los procesos enzimáticos en los que se potencia el uso del agua como medio de reacción, más acorde con los principios de la sostenibilidad.<sup>11</sup> Además de su nula toxicidad y bajo coste, el agua es el medio natural de las enzimas, por lo que es posible desarrollar reacciones en agua con todos los biocatalizadores disponibles. El problema de la solubilidad de los sustratos ha sido amortiguado en muchos de los casos gracias al empleo de cosolventes. Así, aunque con mayores limitaciones, la *ingeniería del medio* representa una

---

<sup>10</sup> A. Zaks, A. M. Klivanov, *Science* **1984**, *224*, 1249-1251.

<sup>11</sup> H. Gröger, W. Hummel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 171-179.

alternativa más sencilla para alterar el comportamiento enzimático frente a las técnicas de mutación.

De hecho, la diversidad es tal que es posible adaptar la elección del medio de reacción a la necesidad del proceso, especialmente cuando se utilizan células enteras, que son lo suficientemente robustas para trabajar en medio acuoso, incluir cosolventes o aceptar medios bifásicos. En este sentido, la búsqueda de las condiciones más favorables ha dado lugar a la creación de nuevos sistemas de reacción en los que se tienen en cuenta factores tanto de productividad como medioambientales.<sup>12</sup> Entre ellos, destaca el uso de líquidos iónicos (ionic liquids, IL), fluidos supercríticos<sup>13</sup> o mezclas eutécticas (deep eutectic solvents, DES).<sup>14</sup> Posiblemente los más estudiados hasta la fecha sean los ILs, que normalmente están compuestos por un catión orgánico como imidazolio, pirrolidinio, piridinio, amonio, guanidinio, etc, y un anión inorgánico como haluros, tetrafluoroborato, hexafluorofosfato, etc.<sup>15</sup> Por tanto, son sales y, normalmente, líquidos viscosos que se caracterizan por presentar propiedades únicas como una baja presión de vapor, un excepcional potencial de solvatación, no son inflamables y tienen una elevada estabilidad química y térmica. Los ILs tienen capacidad para actuar como buenos disolventes, pudiendo reemplazar disolventes orgánicos tanto para sustratos no polares como hidrofóbicos.

---

<sup>12</sup> a) G. Sumbita, *Res. J. Chem. Sci.* **2014**, *4*, 103-116; b) M. J. Hernáiz, A. R. Alcántara, J. I. García, J. V. Sinisterra, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 9422-9437.

<sup>13</sup> Z. J. Dijkstra, R. Merchant, J. T. F. Keurentjes, *J. Supercrit. Fluids* **2007**, *41*, 102-108.

<sup>14</sup> a) A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed, V. Tambyrajah, *Chem. Commun.* **2003**, 70-71; b) P. Domínguez de María, *Environmentally Friendly Syntheses Using Ionic Liquids*, Eds. J. Dupont, T. Itoh, P. Lozano, S. Malhotra, Taylor & Francis Group, **2015**, pp. 67-86.

<sup>15</sup> a) W.-W. Gao, F.-X. Zhang, G.-X. Zhang, C.-H. Zhou, *Biochem. Eng. J.* **2015**, *99*, 67-84; b) J. V. Rodrigues, D. Ruivo, A. Rodríguez, F. J. Deive, J. M. S. S. Esperança, I. M. Marrucho, C. M. Gomes, L. P. N. Rebelo, *Green Chem.* **2014**, *16*, 4520-4523; c) S. P. M. Ventura, L. D. F. Santos, J. A. Saraiva, J. A. P. Coutinho, *Green Chem.* **2012**, *14*, 1620-1625.

## 0.2. Inmovilización Enzimática

A lo largo de esta introducción se han venido destacando ciertas cualidades que sitúan a las enzimas como catalizadores privilegiados. Sin embargo, la estabilidad no es su mejor característica, lo cual puede suponer un obstáculo para posibles aplicaciones industriales. Por ello, existen distintas estrategias para avanzar hacia la obtención de biocatalizadores más estables, siendo éste el objetivo principal que pretende proporcionar la inmovilización, no solo para su uso sino también para su almacenaje. Además, esta técnica permite una reducción del coste global del proceso gracias a la posibilidad de reutilización del biocatalizador, siempre y cuando éste sea capaz de mantener su actividad durante varios ciclos de reacción.<sup>16</sup>

Entre otras ventajas, la mayor rigidez estructural hace a las enzimas inmovilizadas más resistentes a distintos aspectos de su entorno en el sentido, por ejemplo, de experimentar una mayor tolerancia al pH, a cambios en la temperatura o de mejorar su actividad en disolventes orgánicos. Desde un punto de vista práctico, la inmovilización facilita también el manejo de los biocatalizadores, tanto para la puesta a punto de una reacción por tratarse de sólidos, como para su separación del medio de reacción, lo que es posible hacer por simple filtración, evitando además la contaminación del producto. Mediante el uso de esta técnica, la selectividad de un proceso es potencialmente modulable gracias a ciertas distorsiones que pueden incluso cambiar la estructura secundaria de la enzima, si bien existe también la posibilidad de que dichas modificaciones provoquen la desnaturalización o pérdida de la actividad enzimática.<sup>17</sup>

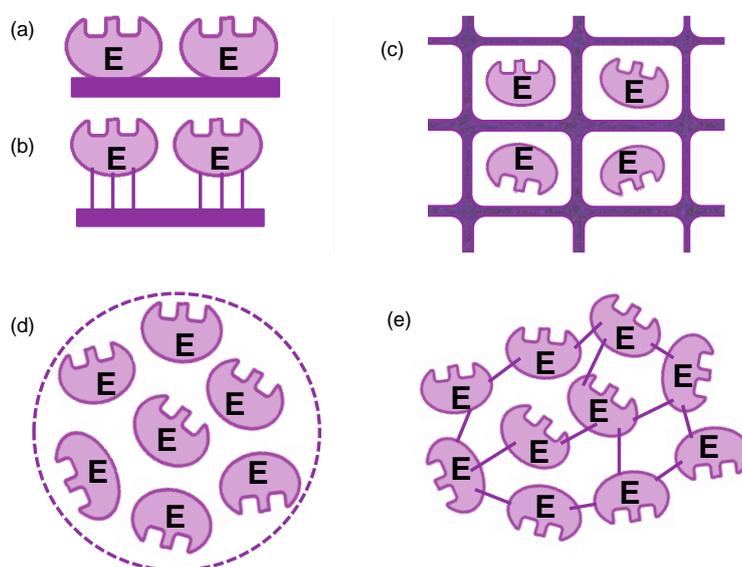
El material sobre el que se inmoviliza la enzima suele ser inerte y, aunque facilite la separación física del medio de reacción, debe ser

---

<sup>16</sup> R. A. Sheldon, A. van Pelt, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223-6235.

<sup>17</sup> a) J. M. Palomo, *Curr. Org. Synth.* **2009**, *6*, 1-14; b) R. C. Rodrigues, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernández-Lafuente, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6290-6307; c) F. Secundo, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6250-6261.

permeable a todas las especies moleculares reactantes. En este contexto, existen diferentes metodologías de inmovilización, que, básicamente, se dividen en tres categorías: enlace a un soporte, encapsulamiento y entrecruzamiento (Figura 3).<sup>16,18</sup>



**Figura 3.** Diferentes metodologías para la inmovilización enzimática: (a) adsorción; (b) unión covalente; (c) atrapamiento en geles poliméricos; (d) encapsulamiento en membranas; (e) entrecruzamiento.

La unión a un soporte puede ser de naturaleza física, por adsorción a la superficie del mismo mediante interacciones débiles que minimizan la pérdida de actividad (Figura 3a), iónica o covalente. Esta última ocurre generalmente a través de grupos amino o carboxilato, siendo una unión irreversible, lo que evita una posible desorción de la superficie (Figura 3b). Por su parte, el soporte, puede ser tanto biológico (polímeros naturales o resinas), como sintético (orgánicos e inorgánicos, como sílicas o zeolitas).

El encapsulamiento se da por la inclusión de la enzima en una red, típicamente en matrices poliméricas orgánicas o inorgánicas en las que el sustrato puede acceder, reaccionar y ser expulsado (Figura 3c), pero también membranas impermeables para otras enzimas y

<sup>18</sup> S. Datta, L. R. Christena, Y. R. S. Rajaram, *3 Biotech* **2013**, *3*, 1-9.

macromoléculas y a su vez permeables a productos de bajo peso molecular (Figura 3d).

En particular, el método de inmovilización mediante agregados de enzimas por entrecruzamiento (*cross-linked enzyme aggregates*, CLEAs, Figura 3c) ha cobrado especial importancia en los últimos años.<sup>19</sup> En los primeros estudios, esta estrategia era llevada a cabo mediante la cristalización del biocatalizador, lo que suponía un procedimiento costoso y laborioso donde era necesaria una elevada pureza de la enzima. El proceso de cristalización fue reemplazado por el de precipitación, basado en la agregación de la enzima libre a una disolución acuosa que contiene un agente precipitante (sales, polímeros no iónicos o disolventes orgánicos miscibles en agua), seguida del entrecruzamiento de los agregados formados empleando un agente de entrecruzamiento bifuncional, generalmente el glutaraldehído debido a su bajo precio y disponibilidad comercial. Al no tratarse de enlaces covalentes, el entrecruzamiento no provoca ninguna perturbación en la estructura terciaria de la proteína, de modo que los agregados insolubles mantienen su superestructura y, en consecuencia, su actividad catalítica intacta. Frente a otros métodos de inmovilización, éste presenta una serie de ventajas, como la sencillez en el procedimiento de preparación, alta actividad enzimática del catalizador, estabilidad elevada, y bajos costes de producción ya que no se requiere purificación previa de la enzima. Tampoco es necesario un soporte adicional que, además de encarecer el proceso, provocaría la dilución de la actividad enzimática.

---

<sup>19</sup> a) R. A. Sheldon, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 213-223; b) G.-W. Zheng, H.-L. Yu, C.-X. Li, J. Pan, J.-H. Xu, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *70*, 138-143.

# **BLOQUE I**

**DESARROLLO DE TRANSFORMACIONES  
SINTÉTICAS MEDIANTE PROCESOS  
ENZIMÁTICOS NO CONVENCIONALES  
CATALIZADOS POR HIDROLASAS**



# INTRODUCCIÓN



En la introducción de este bloque se incluirá una breve descripción de las características generales de las proteasas, por ser una de ellas la empleada como biocatalizador en este trabajo. De un modo más concreto, se comentarán las aplicaciones más destacadas en síntesis orgánica de la proteasa de *Bacillus licheniformis*.

## **I.1. Hidrolasas**

La elevada estabilidad y actividad frente a un amplio número de sustratos y procesos, la no dependencia de cofactores y la alta tasa de eficiencia en la catálisis han hecho de las hidrolasas los biocatalizadores más empleados en aplicaciones industriales. Además, tienen la capacidad de catalizar reacciones orgánicas sintéticas no convencionales, como la formación de enlaces carbono-carbono o carbono-heteroátomo. Dentro de esta clase de enzimas destacan por su aplicabilidad las esterasas, lipasas y proteasas, cuya función natural consiste en la hidrólisis de ésteres, triglicéridos y péptidos, respectivamente.

### **I.1.1. Proteasas**

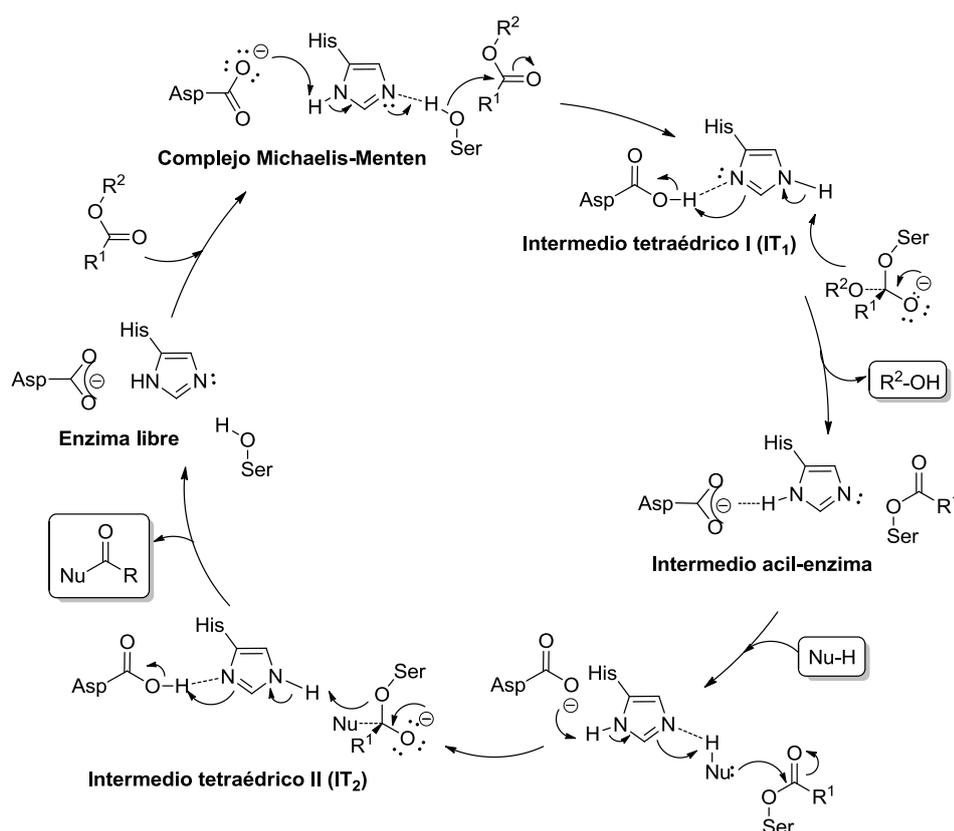
Después de las lipasas, las proteasas son una de las familias de enzimas hidrolíticas más utilizadas en síntesis orgánica. También se denominan peptidasas (endo y exopeptidasas) debido a su función natural de catalizar la hidrólisis de péptidos.<sup>20</sup> Aproximadamente el 2% de los genes de la mayoría de organismos son proteasas, y están involucradas en prácticamente todos los procesos biológicos.

---

<sup>20</sup> F. Bordusa, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4817-4867.

Existen cuatro tipos diferentes de proteasas<sup>21</sup> que se comentan brevemente a continuación:

- *Proteasas serínicas*. Son las más comunes y coinciden con las lipasas en los aspectos mecanísticos, por lo que se comentarán más detalladamente. Estas hidrolasas contienen en el centro activo la tríada catalítica compuesta por un residuo de aspartato (Asp), histidina (His) y serina (Ser), y su mecanismo de actuación se recoge en el Esquema 1.



**Esquema 1.** Mecanismo de actuación de las serín-hidrolasas.

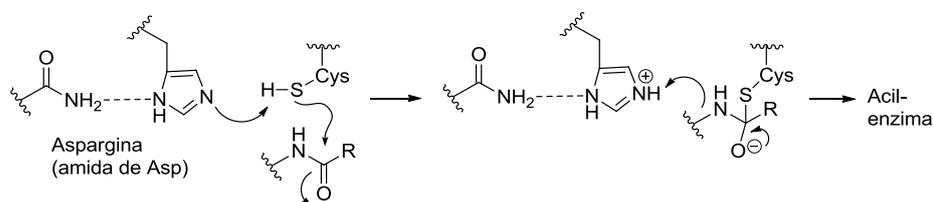
En un primer paso tiene lugar la formación del intermedio tetraédrico I (IT1), para lo cual enzima y sustrato se asocian de forma

<sup>21</sup> L. Hedstrom, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501-4523; b) F. Lecaille, J. Kaleta, D. Brömme, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4459-4488; c) W. T. Lowther, B. W. Matthews, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4581-4607; d) B. M. Dunn, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4431-4458.

no covalente. El aspartato facilita la desprotonación de la serina a través de los protones de la histidina, produciéndose así el ataque del grupo hidroxilo de la serina al grupo carbonilo del sustrato. A continuación, dicho intermedio tetraédrico evoluciona, eliminando la molécula de alcohol, hacia el intermedio acil-enzima a través de la donación de un protón de la histidina al heteroátomo del grupo saliente. La última etapa fundamental de este mecanismo es la formación del intermedio tetraédrico **II** (**IT2**), que tiene lugar a través del ataque del nucleófilo sobre el carbonilo del intermedio acil-enzima. El ciclo se completa por descomposición de este último intermedio tetraédrico, liberándose el producto y regenerándose el catalizador, es decir, la enzima libre.

En la mayoría de los casos la enantioselectividad la determina el intermedio tetraédrico **II**, en el que se encuentran diferenciados un hueco para el nucleófilo y otro para el acilo.

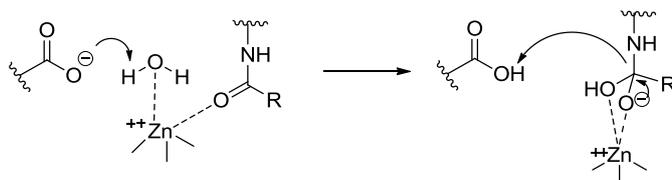
- *Proteasas cisteínicas*. Se diferencian de las anteriores en los aminoácidos que se encuentran presentes en el centro activo, pero su mecanismo de actuación involucra los mismos pasos de formación de intermedios. En este caso, los residuos que estas proteasas contienen en el centro activo son asparagina, histidina y cisteína (Esquema 2).



**Esquema 2.** Mecanismo de actuación de las cisteín-hidrolasas.

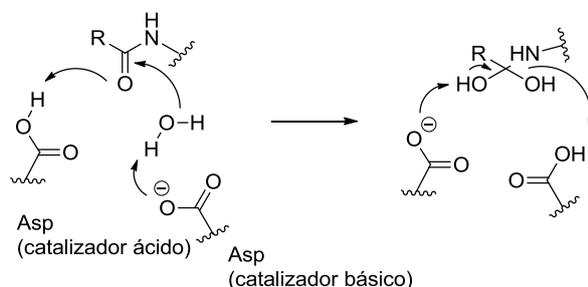
- *Metaloproteasas*. En el centro activo se encuentra presente un átomo de  $Zn^{2+}$  que actúa como ácido de Lewis participando activamente en la catálisis (Esquema 3). Este catión provoca un aumento en la electrofilia del carbonilo y en la acidez del  $H_2O$ , facilitando así la transferencia del protón al carboxilato del ácido glutámico, y

aumentando también la nucleofilia del H<sub>2</sub>O. Por tanto, el mecanismo de esta reacción no ocurre a través de un intermedio covalente.



**Esquema 3.** Mecanismo de actuación de las metaloproteasas.

- *Proteasas aspárticas.* El centro activo de la enzima contiene dos unidades de ácido aspártico (Esquema 4), una de las cuales actúa como catalizador ácido y la otra como catalizador básico. Al igual que sucedía en el caso anterior, el mecanismo de estas proteasas tampoco tiene lugar a través de un intermedio covalente.



**Esquema 4.** Mecanismo de actuación de las proteasas aspárticas.

### I.1.2. Proteasa de *Bacillus licheniformis*

Las proteasas microbianas son unas de las enzimas hidrolíticas comerciales más importantes, y han sido extensamente aplicadas en distintos sectores de la industria, como el de la alimentación, cuero, farmacéutico o la industria de detergentes, en esta última en particular como aditivos de limpieza. Dentro de este grupo de enzimas, las subtilasas son las responsables de iniciar el ataque nucleófilo en un enlace peptídico (amida) a través de un residuo de serina del centro activo. En concreto, la proteasa de *Bacillus licheniformis* (BLAP) o subtilisina Carlsberg (EC 3.4.21.62) es una proteasa alcalina

extracelular que ha sido ampliamente utilizada como catalizador en transformaciones convencionales de síntesis orgánica, mostrando altos valores de actividad enzimática, así como una elevada estereopreferencia frente a un gran número de sustratos. Entre sus propiedades destaca su estabilidad, tolerando distintas condiciones de pH y temperatura tanto en disolventes orgánicos polares como en no polares, e incluso es conocida por ser estable frente a detergentes y tensioactivos (compuestos que rebajan la tensión superficial entre dos líquidos).<sup>22</sup>

A continuación, se comentan algunas de las biotransformaciones más representativas que han sido llevadas a cabo mediante la acción de esta enzima. Por claridad, se han dividido en dos apartados en función de la estereoselectividad o no del proceso.

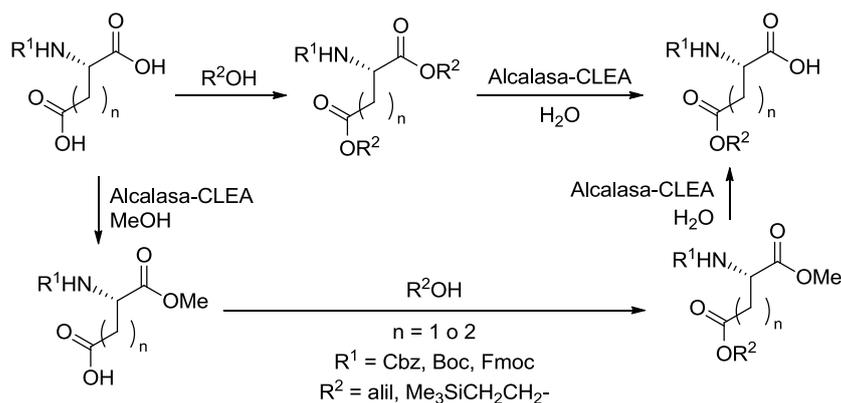
#### I.1.2.1. Procesos no Estereoselectivos

La mayor versatilidad de la proteasa de *Bacillus licheniformis* en su versión inmovilizada CLEA® (Alcalasa-CLEA®) se ha encontrado en su aplicación en la síntesis de derivados de aminoácidos y péptidos. Por ejemplo, se ha descrito una ruta quimioenzimática en la que esta enzima cataliza la síntesis de  $\beta$ -aminoésteres derivados del ácido aspártico, y  $\gamma$ -aminoésteres del ácido glutámico  $\alpha$ -protegidos mediante la hidrólisis selectiva de los correspondientes diésteres.<sup>23</sup> Alternativamente, los mismos compuestos pueden prepararse a través de un protocolo de tres pasos que implica la formación enzimática del éster de  $\alpha$ -metilo seguido de una  $\beta$ -esterificación química y una hidrólisis  $\alpha$ -selectiva (Esquema 5).

---

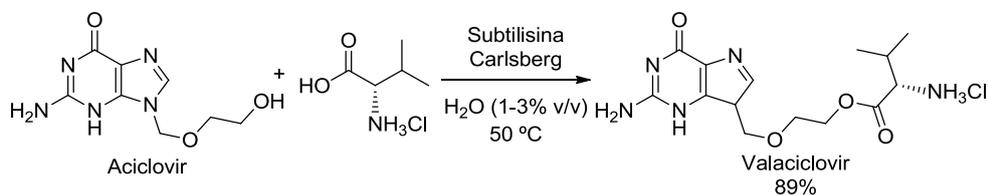
<sup>22</sup> a) K. Jellouli, O. Ghorbel-Bellaaj, H. B. Ayed, L. Manni, R. Agrebi, M. Nasri, *Process Biochem.* **2011**, *46*, 1248-1256; b) W. Rachadech, A. Navacharoen, W. Ruangsit, T. Pongtharangkul, A. S. Vangnai, *Microbiology* **2010**, *79*, 620-629.

<sup>23</sup> T. Nuijens, J. A. W. Kruijtzter, C. Cusan, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, P. J. L. M. Quaedflieg, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2719-2721.



**Esquema 5.** Síntesis quimioenzimática de ésteres de ácido aspártico y glutámico protegidos.

En algunos casos la limitada solubilidad de sustrato y producto en el medio de reacción puede dar lugar a biotransformaciones en fase sólida. Un ejemplo de ello es la preparación biocatalítica del valaciclovir, el ingrediente activo del Valtrex<sup>®</sup>, a partir del éster de metilo de la L-valina y el aciclovir, un inhibidor de la transcriptasa inversa del virus de inmunodeficiencia humana (VIH, Esquema 6).<sup>24</sup> La reacción alcanza conversiones elevadas cuando se lleva a cabo a 50 °C y con un pequeño contenido de agua (1-3% v/v) necesario para preservar la estabilidad de la proteasa de *Bacillus licheniformis*, también conocida como subtilisina Carlsberg.

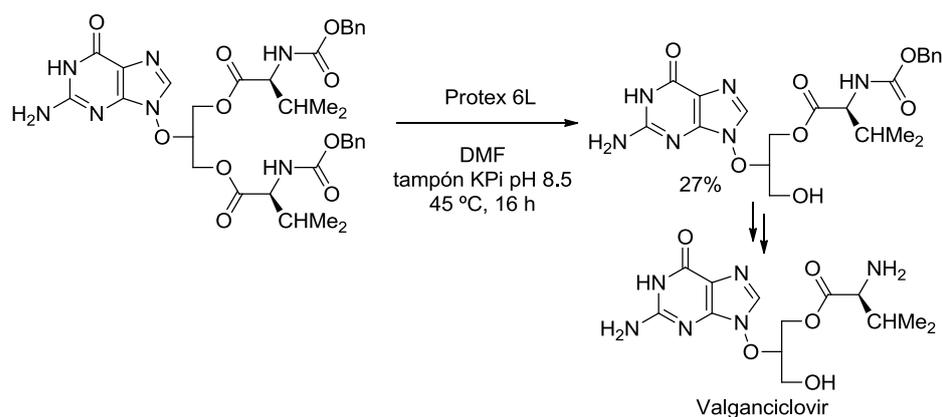


**Esquema 6.** Acilación enzimática del aciclovir para la síntesis del valaciclovir catalizada por la subtilisina Carlsberg.

El hidrocloreto del valganciclovir es un intermedio farmacéutico activo (API) antivírico que se aplica en el tratamiento de la infección por

<sup>24</sup> K. McClean, C. Preston, D. Spence, P. W. Sutton, J. Whittall, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 215-218.

citomegalovirus, asociada con la enfermedad del SIDA. Estructuralmente, es un monoéster del ganciclovir que existe como una mezcla de diastereoisómeros (Esquema 7). Su síntesis se ha llevado a cabo a través de la preparación de un intermedio obtenido mediante un proceso de hidrólisis catalizado por una proteasa bacteriana alcalina, la Protex 6L, que deriva de una cepa de *Bacillus licheniformis*.<sup>25</sup> Tras la adecuada optimización de la fuente y carga de Protex 6L, temperatura, disolvente y tiempo de reacción, la desprotección hidrolítica tuvo lugar de manera selectiva en una mezcla de (*N,N*)-dimetilformamida (DMF) y una disolución reguladora pH 8.5 (3:2) a 45 °C, aislándose el monoéster de la L-valina deseado con un 27% de rendimiento.



**Esquema 7.** Síntesis de un intermedio del valganciclovir a través de una reacción de hidrólisis catalizada por una proteasa derivada de la *Bacillus licheniformis*.

Por otra parte y como se ha comentado previamente, también la síntesis de péptidos se ha descrito en varias ocasiones empleando como catalizador la proteasa en su forma Alcalasa-CLEA®.<sup>26</sup> Un gran número

<sup>25</sup> M. K. Sethi, S. R. Bhandya, R. Shukla, A. Kumar, N. Maddur, V. S. N. J. Mittapalli, V. S. Rawat, R. K. Yerramalla, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2014**, *108*, 77-81.

<sup>26</sup> Algunos ejemplos: a) P. Vossenbergh, H. H. Beeftink, T. Nuijens, P. J. L. M. Quaedflieg, M. A. C. Stuart, J. Tramper, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *78*, 24-31; b) T. Nuijens, C. Cusan, A. C. H. M. Schepers, J. A. W. Kruijtzter, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, P. J. L. M. Quaedflieg, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *71*, 79-84; c) T. Nuijens, E. Piva, J. A. W. Kruijtzter, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, P. J. L. M. Quaedflieg, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 1039-1044; d) P. Vossenbergh, H. H. Beeftink, T. Nuijens, M. A. C. Stuart, J. Tramper, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *75*, 43-49.

de péptidos se usan desde hace décadas con fines terapéuticos, nutricionales o como ingredientes de cosméticos y productos de belleza.<sup>27</sup> Los métodos químicos empleados para su síntesis plantean una serie de inconvenientes, bien por su elevado coste, lo que dificulta la síntesis a gran escala, o bien al producirse racemización y reacciones laterales en el extremo C-terminal. El uso de biocatalizadores ofrece una alternativa en la que estas limitaciones no son tales gracias a la elevada quimio- y regioselectividad de las reacciones enzimáticas y a la posibilidad de utilizar condiciones suaves de reacción.

La síntesis de péptidos parte muchas veces de la carboxamida del extremo C-terminal, continuando el ensamblaje de aminoácidos en la dirección  $C \rightarrow N$ . La amidación de los aminoácidos de este extremo ha sido descrita a partir de los correspondientes ácidos carboxílicos empleando la Alcalasa-CLEA<sup>®</sup>, obteniéndose las amidas deseadas en rendimientos muy elevados al llevar a cabo el proceso enzimático en sales de amonio de los ácidos  $\alpha$ -carboxílicos.<sup>28</sup>

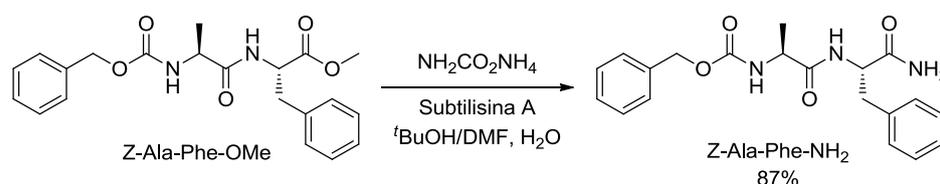
Por su parte, Boeriu y colaboradores efectuaron la síntesis de amidopéptidos en el extremo C-terminal por amonólisis de los correspondientes ésteres metílicos, catalizada por la subtilisina A de *Bacillus licheniformis*.<sup>29</sup> La máxima formación de la amina y mínima del producto secundario de hidrólisis (Z-Ala-Phe-OH) se obtuvo en una mezcla de disolventes orgánicos (<sup>t</sup>BuOH/DMF, 82.5:17.5 v/v) con un bajo contenido en agua (0.2%).

---

<sup>27</sup> P. Vlieghe, V. Lisowski, J. Martinez, M. Khrestchatisky, *Drug Discovery Today* **2010**, *15*, 40-56.

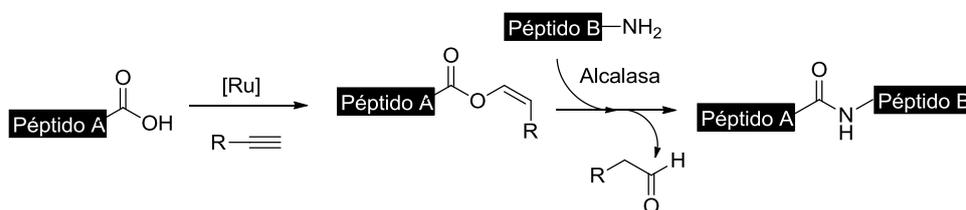
<sup>28</sup> T. Nuijens, E. Piva, J. A. W. Kruijtzter, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, P. J. L. M. Quaedflieg, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 3777-3779.

<sup>29</sup> C. G. Boeriu, A. E. Frissen, E. Boer, K. van Kekem, D.-J. van Zoelen, I. F. Eggen, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *66*, 33-42.



**Esquema 8.** Síntesis biocatalítica de Z-Ala-Phe-NH<sub>2</sub> a través de un proceso de amonólisis catalizado por la subtilisina A.

Un ejemplo elegante y relativamente reciente es el descrito por Breinbauer y colaboradores, quienes combinaron la catálisis homogénea empleando metales de transición con la catálisis enzimática para la preparación de péptidos.<sup>30</sup> En un primer paso catalizado por complejos de rutenio, los autores llevan a cabo la síntesis de enol ésteres por adición del ácido carboxílico del extremo C-terminal a un grupo alquino en condiciones suaves de reacción, lo que requiere una minuciosa optimización para evitar la indeseada racemización (Esquema 9). Los enol ésteres preparados son excelentes dadores en reacciones de acilación enzimáticas, de tal manera que en un segundo paso actúan como sustratos para dar el acoplamiento entre péptidos catalizado por la Alcalasa-CLEA. En este paso enzimático también se tuvieron en cuenta ciertas consideraciones, como la introducción de grupos amida en los enol ésteres para un mejor reconocimiento por parte de la proteasa, minimizando así la formación de productos laterales.



**Esquema 9.** Síntesis de péptidos quimioenzimática a través de la preparación de enol ésteres catalizada por rutenio y el subsiguiente ensamblaje catalizado por la Alcalasa-CLEA®.

La caracterización de la actividad de una proteasa a menudo comienza por establecer los valores de pH y temperatura óptimos. En

<sup>30</sup> H. Schröder, G. A. Strohmeier, M. Leybold, T. Nuijens, P. J. L. M. Quaedflieg, R. Breinbauer, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 1799-1807.

este contexto, la influencia del pH en la hidrólisis de péptidos catalizada por la proteasa de *Bacillus licheniformis*<sup>31</sup> se ha analizado desde el punto de vista de la selectividad, identificada ésta como la velocidad relativa a la que cada zona individual susceptible de escindirse es hidrolizada.<sup>32</sup> Paralelamente, los autores también han descrito estudios para la determinación de la influencia de la concentración de sustrato en la selectividad de la hidrólisis, considerando este parámetro para la descripción de los aspectos mecanísticos del proceso.<sup>33</sup>

La familia de los ácidos 2-arilpropiónicos destaca por sus propiedades antiinflamatorias, como ocurre con el ibuprofeno o el ketoprofeno, a pesar de que su aplicación se ha visto dificultada por la baja solubilidad en agua que presentan estos compuestos. En este contexto, merece la pena comentar un último ejemplo en el que la proteasa de *Bacillus licheniformis* no cataliza el paso estereoselectivo de resolución del éster, sino un paso posterior de transesterificación. Así, Yu y colaboradores desarrollaron la síntesis secuencial de siete conjugados de ketoprofeno-sacárido a través de un procedimiento en dos pasos basado en una primera resolución del éster de vinilo del ketoprofeno racémico empleando Lipozyme® inmovilizada de la lipasa de *Mucor miehei* (MML, Esquema 10).<sup>34</sup> La proteasa de *Bacillus licheniformis* cataliza un segundo paso de transesterificación del éster de vinilo del (*S*)-ketoprofeno con una serie de sacáridos en medio orgánico. Los ketoprofenos conjugados obtenidos mediante esta estrategia presentan mayor solubilidad que el ketoprofeno de partida, lo que favorece una posible aplicación farmacéutica de los mismos.

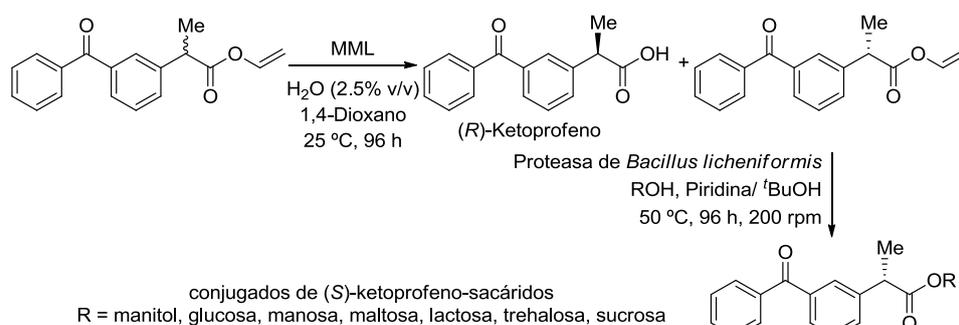
---

<sup>31</sup> C. I. Butré, S. Sforza, P. A. Wierenga, H. Gruppen, *Int. Dairy J.* **2015**, *44*, 44-53.

<sup>32</sup> C. I. Butré, S. Sforza, H. Gruppen, P. A. Wierenga, *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 5827-5841.

<sup>33</sup> C. I. Butré, S. Sforza, H. Gruppen, P. A. Wierenga, *J. Agric. Food. Chem.* **2014**, *62*, 10230-10239.

<sup>34</sup> H.-Y. Wang, C. Li, N. Wang, K. Li, X.-W. Feng, T. He, X.-Q. Yu, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1905-1910.



**Esquema 10.** Síntesis enzimática de derivados conjugados de ketoprofeno-sacáridos mediante una estrategia en dos pasos.

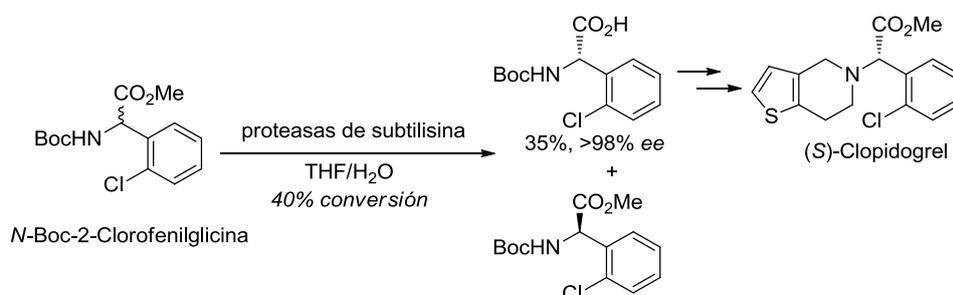
#### I.1.2.2. Procesos Estereoselectivos

Aunque no tan estudiados como las transformaciones de péptidos, diferentes grupos de investigación han destacado la actividad de la proteasa de *Bacillus licheniformis* en procesos estereoselectivos a través de la aplicación de metodologías de resolución cinética, por una parte empleando como sustratos aminoácidos y derivados, y por otra en resoluciones de alcoholes o ésteres.

La importancia de los derivados de aminoácidos es ampliamente conocida por su actividad biológica y su consecuente aplicación como precursores en la síntesis de fármacos. En este campo la quiralidad es una cualidad esencial, por lo que la preparación estereoselectiva de estos compuestos es de gran interés. Así, existen distintos ejemplos en la bibliografía en los que se realiza una resolución catalizada por proteasas para la síntesis quimioenzimática de determinadas moléculas con actividad farmacológica. Este es el caso del clopidogrel (Esquema 11), un medicamento antitrombótico y antiagregatorio que se administra para la reducción de ciertos males causados por la aterosclerosis, y en el que únicamente el enantiómero (*S*) tiene aplicaciones terapéuticas.<sup>35</sup> Así, mientras que la resolución de la 2-clorofenilglicina ocurre con excesos enantioméricos entre bajos y moderados, con el correspondiente metiléster *N*-protegido se obtuvieron

<sup>35</sup> P. Ferraboschi, M. De Mieri, F. Galimberti, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 2136-2141.

excelentes enantioselectividades en el proceso de hidrólisis enzimática, tanto utilizando la proteasa de *Bacillus licheniformis* como la de *Bacillus subtilis*. Cabe destacar que el empleo de la proteasa en su forma inmovilizada como agregados entrecruzados (Alcalasa-CLEA®) disminuyó el tiempo de reacción notablemente sin observarse cambios en los valores de conversión y selectividad.



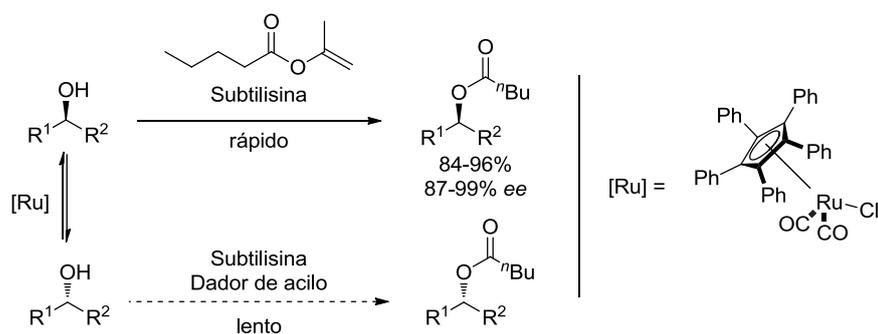
**Esquema 11.** Resolución cinética de sintones precursores del clopidogrel catalizada por proteasas de subtilisina.

Zhao y colaboradores estudiaron el efecto del acetato de 1-etil-3-metilimidazolio ( $\text{CH}_3\text{COO}[\text{EMIM}]$ ) en la resolución cinética del éster de metilo de la fenilalanina catalizada por la proteasa de *Bacillus licheniformis* liofilizada, llegando a obtener mejoras en la enantioselectividad del proceso al elevar hasta 4 M de concentración de IL, si bien a partir de 2 M la actividad enzimática decrecía notablemente.<sup>36</sup> Los autores extendieron las condiciones óptimas (2 M) a distintos aminoácidos, observando la misma tendencia que para el sustrato modelo y definiendo, por tanto, el IL como un posible *disolvente verde*.

Como se ha comentado previamente, también existen ejemplos en los que la enzima que nos ocupa se aplicó a la resolución de alcoholes. Por ejemplo, el uso de la subtilisina de *B. licheniformis* ha permitido preparar (*S*)-ésteres a partir de alcoholes secundarios racémicos a través de procesos de DKR donde la proteasa se combina con el uso de

<sup>36</sup> H. Zhao, L. Jackson, Z. Song, O. Olubajo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2491-2498.

un catalizador de rutenio, obteniéndose los productos finales con buenos rendimientos y excelentes enantioselectividades cuando el dador de acilo fue el valerato de isopropenilo (Esquema 12).<sup>37</sup>



**Esquema 12.** Resolución cinética dinámica (*S*)-selectiva de alcoholes secundarios empleando un catalizador de rutenio y la subtilisina de *Bacillus licheniformis*.

<sup>37</sup> L. Borén, B. Martín-Matute, Y. Xu, A. Córdova, J.-E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 225-232.



# CAPÍTULO 1

APLICACIONES DE LA PROTEASA DE  
*BACILLUS LICHENIFORMIS* EN REACCIONES NO  
CONVENCIONALES



# **ANTECEDENTES**



En la introducción de este bloque se han comentado algunos aspectos de las hidrolasas, destacando el papel de la Biocatálisis en transformaciones sintéticas selectivas y su aplicación particular en biotransformaciones catalizadas por la proteasa de *Bacillus licheniformis*. A continuación, se abordarán distintas posibilidades biocatalíticas que ofrecen algunas enzimas hidrolíticas relacionadas con el concepto de *promiscuidad biocatalítica*, de origen relativamente reciente y que ha sido utilizado en este capítulo con la intención de ampliar las aplicaciones sintéticas de la proteasa de *Bacillus licheniformis*.

### 1.1. Promiscuidad Biocatalítica

Más allá de las transformaciones que las hidrolasas han catalizado tradicionalmente (hidrólisis, esterificación, amidación, acilación...), la reciente aparición de una serie de actividades catalíticas no convencionales por parte de las enzimas ha abierto una vía al desarrollo de nuevas aplicaciones sintéticas.<sup>38</sup> Este descubrimiento se ha agrupado en el término *promiscuidad enzimática*, que hace referencia a la capacidad de un único centro activo de una enzima para catalizar distintos tipos de transformaciones, un concepto que ha estado ligado a definiciones más amplias como la de *promiscuidad catalítica*.<sup>39</sup> En este punto es importante hacer la necesaria distinción entre la actividad del centro activo de una proteína, que trabaja de manera orquestal para catalizar una determinada transformación, de la acción de uno o varios

---

<sup>38</sup> a) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504-4523; b) Q. Wu, B.-K. Liu, X.-F. Lin, *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 1966-1968; c) M. S. Humble, P. Berglund, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3391-3401; d) M. Kapoor, M. N. Gupta, *Process Biochem.* **2012**, *47*, 555-569; e) Z. Guan, L.-Y. Li, Y.-H. He, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 16801-16814.

<sup>39</sup> K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231-238.

residuos de aminoácidos ajenos al centro activo de la enzima con capacidad, en algunos casos, para acelerar una reacción, algo que se conoce comúnmente como catálisis inespecífica.

Es conveniente resaltar el hecho de que las cepas naturales de diversas enzimas han mostrado niveles significativos de actividad en distintas transformaciones. Pero, además, en los últimos años se ha producido un desarrollo exponencial de técnicas de evolución dirigida e ingeniería de proteínas que ha potenciado la eficiencia de las enzimas en procesos no convencionales, proporcionando nuevos biocatalizadores evolucionados que presentan propiedades catalíticas mejoradas.<sup>40</sup>

A continuación, se hará un resumen de las contribuciones más relevantes publicadas en los últimos años sobre procesos catalizados por hidrolasas de forma no convencional y, en particular, se resaltarán aquellos ejemplos relacionados con las reacciones que serán objeto de estudio de este capítulo, clasificadas en función del tipo de enlace formado.

## 1.2. Reacciones de Formación de Enlaces Carbono-Carbono

Las reacciones de formación de enlaces carbono-carbono (C-C) son una de las transformaciones fundamentales de la química orgánica. Si se hace una comparativa con los procedimientos no enzimáticos, el empleo de la Biocatálisis en estos procesos ofrece una serie de ventajas claras al dar acceso a moléculas estructuralmente complejas con elevado grado de quimio-, regio- y, especialmente, estereoselectividad hacia la formación de múltiples estereocentros con la esteroquímica deseada bajo condiciones suaves de reacción (sistemas acuosos, pH neutro y

---

<sup>40</sup> a) A. S. Bommarius, J. K. Blum, M. J. Abrahamson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 194-200; b) M. Wang, T. Si, H. Zhao, *Bioresour. Technol.* **2012**, *115*, 117-125; c) M. T. Reetz, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7530-7548; d) U. T. Bornscheuer, *Synlett* **2013**, *24*, 150-156.

temperatura ambiente).<sup>41</sup> De un modo tradicional, las reacciones enzimáticas para la formación de enlaces carbono-carbono comprometen varias subdivisiones de enzimas, todas ellas ubicadas dentro de las liasas (EC.4). Entre ellas destacan las aldolasas, hidroxinitrilo liasas o enzimas dependientes de tiamino difosfato.<sup>42</sup> Sin embargo, en los últimos años las posibilidades sintéticas de las enzimas han experimentado cierta expansión<sup>43</sup> debido, por una parte, al descubrimiento de nuevas enzimas como ciclasas, Diels-Alderasas o Pictet-Spenglerasas<sup>44</sup> y, por otra, al uso de la evolución dirigida que ha permitido el diseño de enzimas más eficientes.<sup>45</sup> A continuación, se resaltarán los hallazgos más recientes y destacables concernientes a las reacciones aldólica, Henry, Baylis-Hillman y Mannich catalizadas por hidrolasas de forma no convencional.

### 1.2.1. Reacción de Adición Aldólica

Desde que la reacción aldólica fue descubierta, allá por el año 1872, esta estrategia sintética ha emergido como una de las metodologías más robustas para la formación de enlaces C-C. La química convencional ha sido empleada en numerosas ocasiones para la preparación de nuevos compuestos  $\beta$ -hidroxicarbonílicos activos a través de reacciones aldólicas asimétricas. También la organocatálisis se ha aplicado de manera eficiente para llevar a cabo estas transformaciones generando moléculas complejas con elevados rendimientos y selectividades, si bien en los últimos tiempos ha tomado gran relevancia la búsqueda de estrategias alternativas en las que se tenga en cuenta la sostenibilidad del proceso. En este contexto, las aldolasas han servido como catalizadores en

---

<sup>41</sup> a) M. Müller, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 3161-3174; b) K. Fresko, M. Gruber-Khadjawi, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 1248-1272.

<sup>42</sup> a) P. Clapés, W.-D. Fressner, G. A. Sprenger, A. K. Samland, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 154-167; b) M. Dadashipour, Y. Asano, *ACS Catal.* **2011**, *1*, 1121-1149; c) M. Müller, G. A. Sprenger, M. Pohl, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 261-270.

<sup>43</sup> Y. Miao, M. Rahimi, E. M. Geertsema, G. J. Poelarends, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *25*, 115-123.

<sup>44</sup> V. Resch, J. H. Schrittwieser, E. Siirola, W. Kroutil, *Curr. Opin. Chem. Biotechnol.* **2011**, *22*, 783-799.

<sup>45</sup> C. L. Windle, M. Müller, A. Nelson, A. Berry, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 25-33.

reacciones aldólicas estereoselectivas ofreciendo una opción medioambientalmente aceptable que, sin embargo, se encuentra limitada por el elevado coste de estos biocatalizadores y la escasez de sustratos que pueden ser aceptados por estas enzimas, lo que ha llevado a considerar otras que presenten, además, una mayor estabilidad.

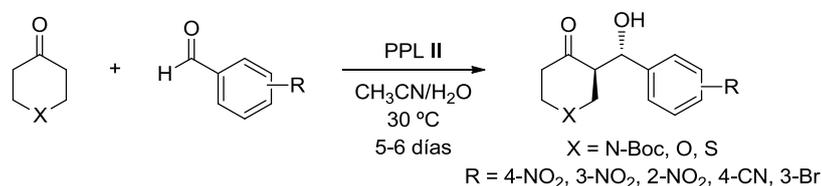
Frente a las moderadas actividades y selectividades mostradas en los primeros estudios en los que participaban hidrolasas de forma no convencional, en años más recientes se han desarrollado procesos enzimáticos promiscuos con mayor eficiencia de la catálisis en reacciones aldólicas asimétricas. En dichos estudios ha sido habitual la selección del acoplamiento entre 4-nitrobenzaldehído o 4-cianobenzaldehído con acetona o ciclohexanona como transformación modelo. Una vez optimizadas las condiciones de reacción se ha extendido, generalmente con éxito, a una familia de sustratos más amplia. En todos los casos que se discutirán a continuación, la participación del centro activo del biocatalizador se ha demostrado a través de experimentos de control que incluyen la inhibición o desnaturalización de las enzimas, de manera que se obviarán aquellos ejemplos en los que la aceleración de la reacción proviene de algún tipo de catálisis inespecífica o es debida a la presencia de impurezas en el preparado enzimático.<sup>46</sup>

Las lipasas son las hidrolasas que más comúnmente empleadas como biocatalizadores en síntesis orgánica, un hecho en el que ha tenido gran influencia su capacidad para trabajar tanto en medios acuosos como en medios orgánicos sin necesidad de incorporar cofactores para su correcto funcionamiento. La lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B) es la hidrolasa que más recurrentemente se ha utilizado en el desarrollo de procesos de formación de enlaces carbono-carbono. No obstante, otras lipasas han actuado también con buenos niveles de actividad en estas reacciones. Recientemente, Guan y He describieron la

---

<sup>46</sup> N. Sharma, U. K. Sharma, R. Kumar, N. Katoch, R. Kumar, A. K. Sinha, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 871-878.

primera reacción aldólica directa asimétrica entre cetonas heterocíclicas y aldehídos catalizada por la lipasa de páncreas porcino de tipo II (PPL II).<sup>47</sup> Como sustratos modelo se escogieron la piperidin-4-ona *N*-Boc protegida y el 4-nitrobenzaldehído, y se analizaron una serie de parámetros de reacción (disolvente, contenido de agua, relación molar entre la cetona y el aldehído y concentración de enzima). Bajo las condiciones de reacción optimizadas se hicieron reaccionar distintos aldehídos aromáticos y cetonas heterocíclicas en cantidades equimoleculares (Esquema 13), alcanzándose, tras tiempos de reacción prolongados, estereoselectividades moderadas (hasta 87% *ee*) hacia los correspondientes diastereoisómeros *anti* (diastereoselectividades hasta 83/17), que se aislaron tras cromatografía de columna en gel de sílice (rendimientos aislados de 31-56%).



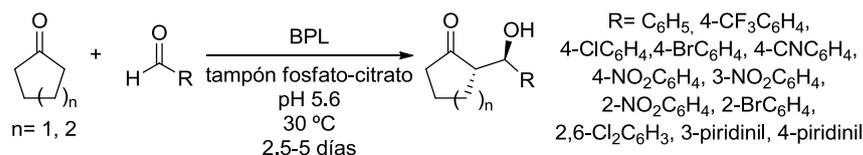
**Esquema 13.** Reacción aldólica asimétrica catalizada por la PPL entre aldehídos aromáticos sustituidos y cetonas heterocíclicas.

Más adelante, los mismos autores expandieron la aplicabilidad de la PPL II a la reacción aldólica directa asimétrica de cetonas cíclicas con aldehídos aromáticos y heteroaromáticos,<sup>48</sup> consiguiendo en algunos casos mejores resultados en términos de actividad, diastereo- y enantioselectividad (rendimientos de 10-98%; 48/52 a 87/13 *dr*; relación *anti/syn*; 53-94% *ee*). Entre otros factores, se investigaron los beneficios que los impedimentos estéricos ejercían en los excesos enantioméricos de los productos y el efecto positivo en los rendimientos aislados al emplear sustituyentes electronattractores, obteniendo los mejores resultados empleando un gran exceso de cetona (20 equiv).

<sup>47</sup> Z. Guan, J.-P. Fu, Y.-H. He, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 4959-4961.

<sup>48</sup> J. Zheng, B.-H. Xie, Y.-L. Chen, J.-F. Cao, Y. Yang, Z. Guan, Y.-H. He, *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **2014**, *69c*, 170-180.

También Yu y colaboradores emplearon la PPL en la reacción aldólica cruzada entre aldehídos aromáticos y cetonas alifáticas cíclicas, donde estas últimas resultaron ser el mejor disolvente posible.<sup>49</sup> Los autores demostraron la influencia del contenido de agua sobre la actividad catalítica y la selectividad, en tanto que desempeña un papel principal como “lubricante molecular”, encontrando que las mejores propiedades catalíticas tenían lugar al añadir un 5% de agua (v/v). Además, se observó un elevado grado de similitud entre la PPL y la lipasa de páncreas bovino (BPL), atribuyendo a la homología entre sus conformaciones espaciales el hecho de que ambas mostrasen valores de actividad comparables. En línea con lo anterior, los mismos autores publicaron la primera reacción aldólica catalizada por la BPL entre cetonas alifáticas cíclicas (20 equiv) y aldehídos (hetero)aromáticos en una disolución reguladora de fosfatos-citratos pH 5.6 a 30 °C, en la que la formación de los diastereoisómeros *anti* se vio ligeramente favorecida, si bien los excesos enantioméricos fueron de bajos a moderados (Esquema 14).<sup>50</sup>



**Esquema 14.** Reacción aldólica asimétrica catalizada por la BPL entre cetonas alifáticas cíclicas y aldehídos (hetero)aromáticos en tampón ácido.

Más recientemente, Gupta y colaboradores describieron la reacción catalizada por lipasas entre 4-nitrobenzaldehído y 2-ciclohexen-1-ona en sistemas compuestos por dimetilsulfóxido (DMSO) y agua, en la que se obtuvieron mezclas del aducto aldólico y del producto de Morita-Baylis-Hillman.<sup>51</sup> En términos de conversión global, los mejores resultados se consiguieron con la lipasa de *Pseudomonas cepacia*, mientras que la

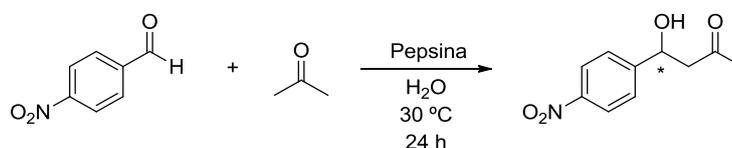
<sup>49</sup> Z.-B. Xie, N. Wang, L.-H. Zhou, F. Wang, T. He, Z.-G. Le, X.-Q. Yu, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 1935-1940.

<sup>50</sup> Z.-B. Xie, N. Wang, G.-F. Jiang, X.-Q. Yu, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 945-948.

<sup>51</sup> M. Kapoor, A. B. Majumder, M. N. Gupta, *Catal. Lett.* **2015**, *145*, 527-532.

lipasa de *Mucor javanicus* mostró las estereoselectividades más elevadas para el aldol.

Además de las lipasas, otras hidrolasas han manifestado buenos niveles de actividad al actuar como biocatalizadores en reacciones aldólicas promiscuas, entre las cuales destacan algunas proteasas. Por ejemplo, la pepsina, una proteinasa aspártica gástrica, actuó con una estereoselectividad superior a la de la PPL en la reacción aldólica cruzada entre acetona y 4-nitrobenzaldehído en presencia de agua (Esquema 15).<sup>52</sup> A pesar de que el ambiente natural de la pepsina es comparable al de una reguladora ácida de pH 2.2, los autores detectaron que esta enzima se mantenía convenientemente plegada y estable bajo condiciones neutras, óptimas para el proceso en el que el medio de reacción consiste en una mezcla agua/acetona (10% v/v). El reciclaje de la enzima dio lugar a una importante pérdida de actividad (23-54% para los primeros tres ciclos de reciclaje), aunque la selectividad se mantuvo de manera satisfactoria. En la extensión del proceso a otros sustratos, los mayores niveles de reactividad se alcanzaron utilizando aldehídos con grupos funcionales electronattractores (NO<sub>2</sub>) y cetonas con mínimos impedimentos estéricos (acetona), aún cuando los rendimientos fueron de bajos a moderados (5-69%).

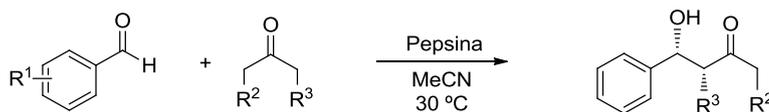


**Esquema 15.** Reacción aldólica catalizada por pepsina entre 4-nitrobenzaldehído y acetona en medio acuoso.

La pepsina de mucosa gástrica porcina se ha aplicado recientemente en la catálisis asimétrica de la reacción aldólica directa para obtener selectivamente *syn*-1,2-dioles, empleando 1-hidroxipropan-2-ona como dador y una serie de aldehídos aromáticos sustituidos como aceptores

<sup>52</sup> C. Li, Y.-J. Zhou, N. Wang, X.-W. Feng, K. Li, X.-Q. Yu, *J. Biotechnol.* **2010**, *150*, 539-545.

(Esquema 16).<sup>53</sup> Tras la pertinente optimización de los parámetros de reacción relevantes como el medio de reacción, la temperatura, la relación molar de los sustratos y la carga de enzima, se llevó a cabo el proceso en acetonitrilo sin agua adicional, y se extendió a cetonas de gran variedad estructural como cíclicas o heterocíclicas, aislándose los productos aldólicos con rendimientos de hasta el 87%, diastereo-selectividades de hasta >99/1 *dr* y excesos enantioméricos inferiores al 75% *ee*.

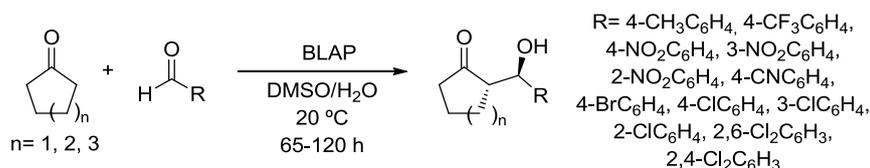


**Esquema 16.** Reacción aldólica asimétrica catalizada por pepsina entre aldehídos aromáticos y cetonas acíclicas y cíclicas en acetonitrilo.

Guan y colaboradores describieron también una serie de ejemplos de adiciones aldólicas catalizadas por proteasas. Entre ellas, la proteasa de *Bacillus licheniformis* catalizó de manera eficiente la reacción entre el 4-cianobenzaldehído y la ciclohexanona, en un proceso en el que se obtuvo el rendimiento más alto (59%) en compromiso con la mejor estereoselectividad (51% *ee*) a 20 °C y empleando DMSO hidratado (0.15% agua) como disolvente.<sup>54</sup> La especificidad de sustrato mostrada por la enzima fue un tanto amplia hacia aldehídos aromáticos y cetonas cíclicas, aislándose en la mayoría de los casos los diastereoisómeros favorecidos *anti* con rendimientos aislados de 28-92% y selectividades de moderadas a altas (Esquema 17).

<sup>53</sup> L.-Y. Li, D.-C. Yang, Z. Guan, Y.-H. He, *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1659-1667.

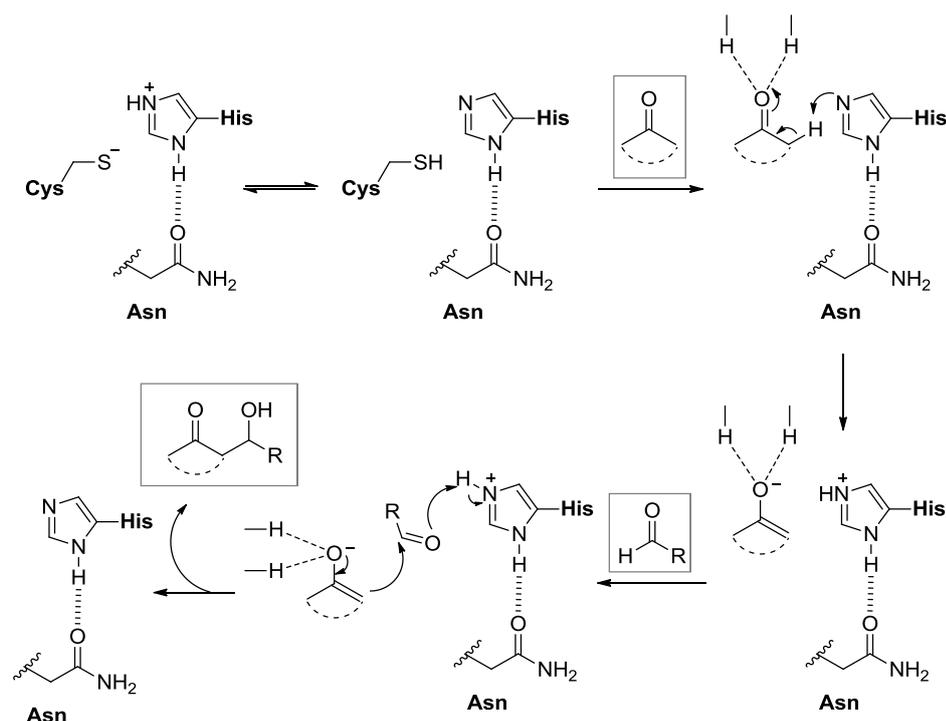
<sup>54</sup> H.-H. Li, Y.-H. He, Z. Guan, *Catal. Commun.* **2011**, *12*, 580-582.



**Esquema 17.** Reacción aldólica catalizada por la proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* entre aldehídos aromáticos y cetonas alifáticas cíclicas en DMSO hidratado.

Análogamente, los mismos autores hicieron uso de la quimopapaína, una proteinasa de cisteína aislada del látex de las frutas inmaduras de *Carica papaya*, para catalizar la misma reacción modelo entre 4-cianobenzaldehído y ciclohexanona.<sup>55</sup> Tras realizar un detallado estudio de distintos parámetros de reacción como el disolvente, la temperatura, el pH y el tiempo de reacción, se observaron estereoselectividades aceptables, si bien el rendimiento del producto final no fue del todo satisfactorio, una limitación atribuida a la desactivación y desestabilización de la enzima. Así, una disolución de acetonitrilo (MeCN) con un contenido del 0.12% de agua a pH 4.91 condujo al producto aldólico con un 45% de rendimiento, 72/28 *dr* y 78% *ee*. Estas condiciones se extendieron posteriormente a otros aldehídos aromáticos, así como a una serie de cetonas alifáticas cíclicas. El mecanismo de reacción propuesto involucra la acción coordinada de la tríada catalítica de la quimopapaína, compuesta por residuos de cisteína (Cys), histidina (His) y aspargina (Asn) (Esquema 18). En primer lugar, el grupo carbonilo de la cetona se coordina a la díada Asn-His y al hueco del oxianión en el centro activo de la enzima. A continuación, se transfiere un protón desde la cetona a la His formándose el enolato. Por último, una molécula de aldehído acepta el protón del catión imidazolío, interactuando con la cetona para formar un nuevo enlace carbono-carbono. Una vez formado el producto aldólico, éste se libera del hueco del oxianión separándose del centro activo de la quimopapaína.

<sup>55</sup> Y.-H. He, H.-H. Li, Y.-L. Chen, Y. Xue, Y. Yuan, Z. Guan, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 712-719.



**Esquema 18.** Mecanismo propuesto para la reacción aldólica catalizada por la quimopapaína.

Otra proteasa, la proteasa ácida de *Aspergillus usarii* No. 537 (AUAP) también ha intervenido en reacciones asimétricas aldólicas.<sup>56</sup> El producto aldol derivado de la reacción entre ciclohexanona y 4-nitrobenzaldehído en una mezcla MeCN/H<sub>2</sub>O (90:10) a 25 °C se obtuvo con buen rendimiento (63%) y buena estereodiscriminación hacia el diastereoisómero *anti* (83/17 *dr* y 82% *ee*). Las condiciones optimizadas se extendieron a una gran variedad de sustratos, para los que se alcanzaron enantioselectividades hasta de un 88% *ee* y diastereoselectividades hasta 92/8 (*anti/syn*). De forma semejante, el mismo grupo de investigación estudió la aplicabilidad de la tripsina de páncreas porcino en la reacción aldólica asimétrica en ausencia de disolvente, empleando 10 equivalentes de cetona y una cantidad de agua mínima con la intención de prevenir una posible desactivación de la

<sup>56</sup> B.-H. Xie, W. Li, Y. Liu, H.-H. Li, Z. Guan, Y.-H. He *Tetrahedron* **2012**, *68*, 3160-3164.

enzima.<sup>57</sup> En consonancia con lo propuesto para la reacción aldólica catalizada por la quimopapaína, se planteó un mecanismo de reacción en el que se identificó la acción de la tríada catalítica compuesta, en este caso, por tres residuos distintos: histidina (His-57), ácido aspártico (Asp-102) y serina (Ser-195). Con la proteinasa de *Aspergillus melleus* tipo XXIII (AMP) se obtuvieron valores de actividad en la catálisis de reacciones aldólicas similares a los discutidos previamente para otras proteasas.<sup>58</sup> En un análisis comparativo de los resultados obtenidos con AMP, AUAP, BLAP y quimopapaína se encontró que, generalmente, los mejores resultados correspondían a la AMP.

Después de una lectura en profundidad de todos estos estudios pueden identificarse algunas tendencias comunes. En general, los aldehídos con sustituyentes electronattractores reaccionan más rápidamente, y aquellos con sustituyentes más impedidos estéricamente dan lugar a enantio- y diastereoselectividades más elevadas. Por otra parte, la ciclohexanona parece actuar como mejor dador de acilo frente a la acetona, la ciclopentanona y la cicloheptanona. Los diastereoisómeros *anti* son, en la mayor parte de los casos, los productos mayoritarios, mientras que para los que se forman los isómeros *syn* de forma minoritaria se observan bajas selectividades.

La ficina, una proteinasa cisteínica aislada del látex de las higueras, ha catalizado de manera promiscua la reacción aldólica asimétrica entre cetonas heterocíclicas y aldehídos en medio orgánico estando presente una mínima cantidad de agua (0.15%).<sup>59</sup> Tras la optimización de ciertos parámetros de reacción como la temperatura (30 °C), la relación molar entre los sustratos (2:1 aldehído frente a cetona) y concentración de enzima (75 mg/mL), se alcanzaron rendimientos entre 21-44% y hasta un 81% *ee* para la reacción entre una amplia variedad de cetonas heterocíclicas que contienen nitrógeno,

---

<sup>57</sup> Y.-L. Chen, W. Li, Y. Liu, Z. Guan, Y.-H. He, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *87*, 83-87.

<sup>58</sup> Y. Yuan, Z. Guan, Y.-H. He, *Sci. China Chem.* **2013**, *56*, 939-944.

<sup>59</sup> J.-P. Fu, N. Gao, Y. Yang, Z. Guan, Y.-H. He, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *97*, 1-4.

oxígeno y azufre y distintos benzaldehídos sustituidos. Cuando el agua del medio de reacción se sustituyó por una disolución reguladora no se obtuvieron mejoras notables en cuanto a rendimientos o selectividades, algo que contrasta con lo observado en los experimentos con *Carica papaya*.<sup>55</sup>

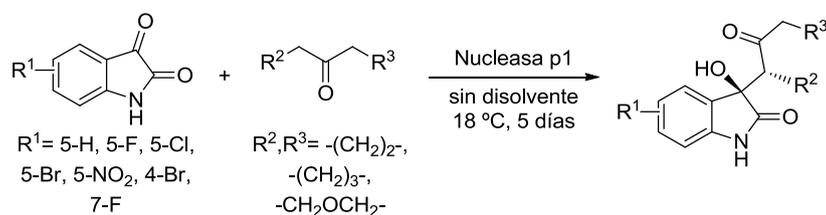
Dejando a un lado las proteasas, la adición aldólica asimétrica de 2-butanona y 4-nitrobenzaldehído en disolvente orgánico ha sido catalizada por una nueva esterasa termofílica aislada de arquea *Aeropyrum pernix* K1 (APE1547).<sup>60</sup> En el estudio se investigaron los efectos del disolvente orgánico, la temperatura, el contenido de agua y la concentración de sustrato, aislándose el correspondiente producto de configuración (*S*)- con un rendimiento del 69% y 71% *ee* después de 120 h a 65 °C. Por otro lado, se ha descrito que la nucleasa p1 de *Penicillium citrinum*, una endonucleasa dependiente de zinc, ha catalizado diferentes reacciones aldólicas asimétricas.<sup>61</sup> Guan y colaboradores optimizaron la adición aldólica de 4-cianobenzaldehído y ciclohexanona para, posteriormente, extender la metodología a un gran número de benzaldehídos sustituidos y cetonas cíclicas de cinco, seis y siete miembros, que hicieron las veces de dador y disolvente.<sup>61a</sup> En general, se alcanzaron rendimientos moderados pero selectividades de buenas a excelentes, encontrándose las mejores estereoselectividades a 15 °C, mientras que fue necesario un aumento de temperatura hasta 45 °C para conseguir la mejor actividad catalítica de la nucleasa. Al mismo tiempo, Lin y colaboradores emplearon esta misma nucleasa como catalizador en la síntesis de 3-alkil-3-hidroxiindolin-2-onas a través de una reacción aldólica entre derivados de isatina y cetonas cíclicas en presencia de una mínima cantidad de agua desionizada (Esquema 19).<sup>61b</sup> Pasados 5 días a 18 °C, se aislaron los productos finales con buenos rendimientos (70-95%) y selectividades de moderadas a

---

<sup>60</sup> W. Haoran, W. Zhi, Z. Hong, C. Ge, Y. Hong, W. Lei, *Green Chem. Lett. Rev.* **2014**, *7*, 145-149.

<sup>61</sup> a) H.-H. Li, Y.-H. He, Z. Guan, *Green. Chem.* **2011**, *13*, 185-189; b) Z. Q. Liu, Z.-W. Xiang, Z. Shen, Q. Wu, X.-F. Lin, *Biochemie* **2014**, *101*, 156-160.

excelentes (57/43 a >99/1 *dr*; 27-82% *ee*). En esta adición aldólica asimétrica intermolecular entre cetonas, los autores detectaron que, mientras que el tamaño y la naturaleza electrónica de los sustituyentes del anillo de fenilo de la isatina no mostraban una gran influencia, el tamaño de la cetona cíclica sí que ejercía un efecto importante en la actividad y la selectividad.



**Esquema 19.** Reacción aldólica asimétrica entre derivados de isatina y cetonas cíclicas catalizada por la nucleasa p1 de *Penicillium citrinum*.

### 1.2.2. Reacción de Henry (Nitroaldólica)

La reacción de Henry o nitroaldólica es uno de las transformaciones más clásicas y útiles de formación de enlaces carbono-carbono en química orgánica.<sup>62</sup> Esta estrategia, en la cual la economía atómica es una ventaja característica, proporciona acceso a  $\beta$ -nitroalcoholes racémicos y ópticamente activos, que actúan como precursores clave en la síntesis de compuestos bioactivos y con aplicación farmacológica. Se ha aplicado la Biocatálisis de manera no convencional y eficiente en la reacción entre aldehídos y 1-nitroalcanos, haciendo uso mayormente de hidroxinitrilo liasas e hidrolasas.<sup>63</sup>

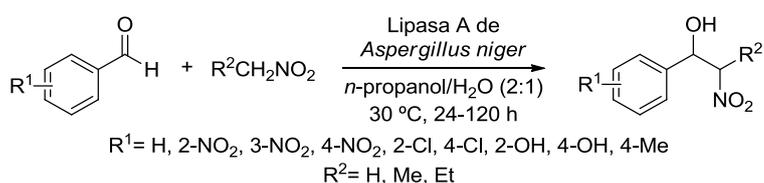
Por ejemplo, es posible llevar a cabo la reacción de Henry entre aldehídos aromáticos y un gran exceso de nitroalcanos (26 equiv) empleando la lipasa A de *Aspergillus niger* en un medio orgánico/agua (Esquema 20).<sup>64</sup> Así, se obtuvieron los correspondientes  $\beta$ -nitroalcoholes con rendimientos hasta del 95% a 30 °C, mientras que el proceso

<sup>62</sup> Y. Alvarez-Casao, E. Marques-Lopez, R. P. Herrera, *Symmetry* **2011**, *3*, 220-245.

<sup>63</sup> S. E. Milner, T. S. moody, A. R. Maguire, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 3059-3067.

<sup>64</sup> Z.-G. Le, L.-T. Guo, G.-F. Jiang, X.-B. Yiang, H.-Q. Liu, *Green Chem. Lett. Rev.* **2013**, *6*, 277-281.

transcurrió con conversiones bajas en las reacciones catalizadas por la enzima desnaturalizada o por la la proteína albúmina de suero bovino (BSA).



**Esquema 20.** Reacción nitroaldólica entre aldehídos aromáticos y nitroalcanos catalizada por la lipasa A de *Aspergillus niger*.

En nuestro grupo de investigación se describió que la PPL era activa en la catálisis de la reacción entre nitrometano y 4-nitrobenzaldehído en un sistema bifásico compuesto por el propio nitrometano y agua (4:1 w/w) a 30 °C, obteniendo un 65% de conversión tras 48 h a 250 rpm.<sup>65</sup> Es importante destacar que la PPL desnaturalizada también fue activa con un 31% de conversión, lo que podría sugerir algún tipo de catálisis inespecífica por parte de la enzima. Esta hipótesis se corroboró por el hecho de que la reacción catalizada por la BSA alcanzó un 91% de conversión bajo las mismas condiciones de reacción.

De forma similar, otras dos lipasas ampliamente conocidas como son la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PSL) y la CAL-B catalizaron la reacción de Henry, aunque se estableció que el mecanismo de acción no estaba asociado al centro activo de la correspondiente enzima.<sup>66</sup> No obstante, se demostró mediante una serie de experimentos espectroscópicos que los protocolos de inmovilización tenían una influencia significativa en la acción promiscua enzimática, debida a la contribución de los mismos a una variación en la estructura secundaria de la enzima que tiene como consecuencia la mejora de los valores de conversión.

<sup>65</sup> E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 236-240.

<sup>66</sup> D. F. Izquierdo, O. Barbosa, M. I. Burguete, P. Lozano, S. V. Luis, R. Fernández-Lafuente, E. García-Verdugo, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 6219-6225.

Además, otras hidrolasas han catalizado la reacción de Henry, como la glucoamilasa de *Aspergillus niger* (AnGA)<sup>67</sup> o la D-aminoacilasa.<sup>68</sup> En el caso de la reacción de Henry catalizada por AnGA se emplearon una serie de aldehídos (hetero)aromáticos y distintos nitroalcanos (5 equiv) como nitrometano, nitroetano y nitropropano en una mezcla de etanol y agua (85:15 v/v) a una temperatura óptima de 30 °C.<sup>67</sup> La actividad catalítica específica de la glucoamilasa AnGA en el proceso quedó ampliamente demostrada por medio del diseño racional de experimentos de control, incluyendo la presencia de posibles inhibidores como iones metálicos (Ag<sup>+</sup> y Cu<sup>2+</sup>) o miglitol, pero también reactivos desnaturalizantes como urea o guanidina. De otra manera, también es posible llevar a cabo la reacción de Henry en un único disolvente orgánico, como ocurre con la D-aminoacilasa de *Escherichia coli* como biocatalizador promiscuo, donde el DMSO fue el mejor disolvente para el proceso a 50 °C.<sup>68</sup> A pesar de demostrarse la actividad catalítica específica, la estereodiscriminación observada fue despreciable en ambos casos.

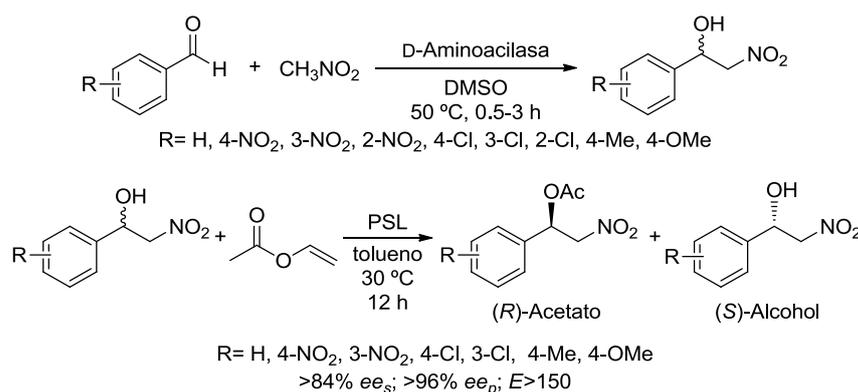
Un ejemplo interesante es la estrategia en dos pasos de reacción en la cual se sintetizan una serie de β-nitroalcoholes por combinación de una reacción nitroaldólica catalizada por la D-aminoacilasa con la resolución cinética de los nitroaldoles racémicos obtenidos catalizada por la PSL (Esquema 21).<sup>69</sup> Tanto los alcoholes como los correspondientes acetatos se obtuvieron con buenos rendimientos y excesos enantioméricos elevados (>84% *ees*; >96% *eeP*; *E*>150), en un proceso solamente limitado para aldehídos *orto*-sustituídos, que resultaron inertes en el segundo paso de resolución cinética enzimática.

---

<sup>67</sup> N. Gao, Y.-L. Chen, Y.-H. He, Z. Guan, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 16850-16856.

<sup>68</sup> J.-L. Wang, X. Li, H.-Y. Xie, B.-K. Liu, X.-F. Lin, *J. Biotechnol.* **2010**, *145*, 240-243.

<sup>69</sup> F. Xu, J. Wang, B. Liu, Q. Wu, X. Lin, *Green. Chem.* **2011**, *13*, 2359-2361.



**Esquema 21.** Metodología para la obtención de β-nitroalcoholes y los acetatos derivados en dos pasos de reacción: reacción nitroaldólica catalizada por la D-aminoacilasa y resolución cinética catalizada por la PSL empleando acetato de vinilo como dador de acilo.

### 1.2.3. Reacción de Baylis-Hillman

La reacción de Morita-Baylis-Hillman (MBH) identifica la reacción de formación de enlaces carbono-carbono entre la posición α de un compuesto carbonílico α,β-insaturado activado y el carbono electrófilo de un aldehído para obtener alcoholes alílicos. Este se efectuó de forma biocatalítica promiscua por primera vez por Reetz y colaboradores.<sup>70</sup> El estudio enzimático se realizó tomando como transformación modelo la reacción estándar en la química de Morita-Baylis-Hillman entre ciclohex-2-enona y 4-nitrobenzaldehído, obteniéndose bajas conversiones con lipasas y esterasas (menores del 10%) y valores moderados con la BSA (35% de conversión, Esquema 22). Estos resultados podrían sugerir una catálisis no específica por parte de los restos de histidina de la proteína, lo que además resulta lógico, ya que a menudo se emplean derivados de imidazoles como catalizadores para este tipo de reacciones.<sup>71</sup> En el caso de las enzimas, solo la lipasa de páncreas de cerdo indujo cierta enantioselectividad, obteniéndose el producto con una conversión del 7% y un 2% ee.

<sup>70</sup> M. T. Reetz, R. Mondière, J. D. Carballeira, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1679-1681.

<sup>71</sup> K. Asano, S. Matsubara, *Synthesis* **2009**, 3219-3226.



**Esquema 22.** Reacción de Morita-Baylis-Hillman catalizada por lipasas o esterasas.

No fue hasta este mismo año cuando aparecieron nuevos estudios de la reacción promiscua de MBH. Como ya se ha comentado para la reacción aldólica, Gupta y colaboradores obtuvieron mezclas del producto de MBH y del aducto aldólico al llevar a cabo la reacción entre ciclohex-2-enona y 4-nitrobenzoaldehído en mezclas de DMSO y agua.<sup>51</sup> La variación tanto de la relación entre las concentraciones de los reactivos como de la cantidad de DMSO añadido provocaron la obtención de distintas proporciones del aldol o del producto de MBH, si bien no se observó en ningún caso una clara preferencia hacia la formación del producto de MBH. La lipasa de *Pseudomonas cepacia* dio lugar al mejor exceso enantiomérico (65% ee), formándose el enantiómero (*R*) del producto MBH (21% conversión) al emplear un 30% de DMSO (v/v), no obstante la conversión dirigida a la formación de este aducto fue mayor con la lipasa de *Mucor javanicus*, con la que se obtuvo un 33% del producto MBH con un 63% ee.

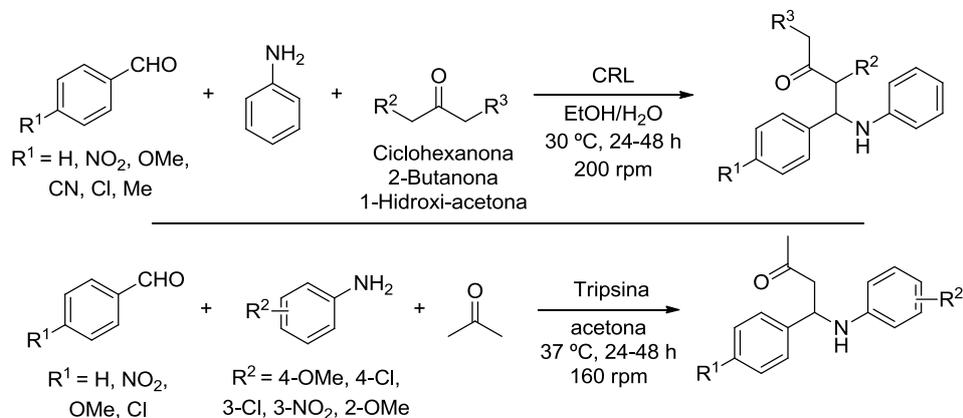
#### 1.2.4. Reacción de Mannich

Las reacciones multicomponente de tipo *one-pot* son herramientas muy interesantes para la preparación de compuestos orgánicos de alto valor añadido o precursores farmacéuticos, evitando el aislamiento y la purificación de intermedios de reacción, y proporcionando beneficios destacables en términos de tiempo y económicos. Un ejemplo típico es la reacción de Mannich que, de forma tradicional, requiere del uso de complejos metálicos de transición quirales u organocatalizadores para la formación de compuestos  $\beta$ -aminocarbonílicos de manera asimétrica.<sup>72</sup>

<sup>72</sup> X.-h. Cai, B. Xie, *Arkivoc* **2013**, i, 264-293.

En los últimos años, distintas hidrolasas han permitido el desarrollo de este tipo de transformaciones, lo que ha sido útil para la fabricación de compuestos heterocíclicos de elevada complejidad y con altos rendimientos.

Se ha identificado a la lipasa de *Candida rugosa* (CRL) como la más activa en la reacción entre 4-nitrobenzaldehído (1.0 mmol), anilina (1.1 mmol) y ciclohexanona (30 mmol) en un sistema medioambientalmente benigno como es etanol con un contenido de agua del 5%.<sup>73</sup> El proceso optimizado se extendió a otros aldehídos aromáticos y cetonas alifáticas, dando lugar a la formación de 12 productos de Mannich que se aislaron, tras cromatografía de columna en sílica gel, con rendimientos entre 20-94% y diastereoselectividad moderada (Esquema 27).



**Esquema 23.** Reacción de Mannich directa catalizada por la CRL (arriba) o la tripsina (abajo) entre aldehídos aromáticos, anilina sin sustituir o sustituida y cetonas alifáticas o acetona.

Análogamente, se ha descrito la tripsina de páncreas de cerdo como catalizador activo en la formación, con rendimientos de 45-93%, de los aductos de Mannich derivados de la reacción entre aldehídos aromáticos, anilinas sustituidas y un gran exceso de acetona, que actúa como reactivo y disolvente (Esquema 23).<sup>74</sup> Por otra parte, Wu, Lin y

<sup>73</sup> T. He, K. Li, M.-Y. Wu, X.-W. Feng, N. Wang, H.-Y. Wang, C. Li, X.-Q. Yu, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *67*, 189-194.

<sup>74</sup> S.-J. Chai, Y.-F. Lai, H. Zheng, P.-F. Zhang, *Helv. Chim. Acta* **2010**, *93*, 2231-2236.

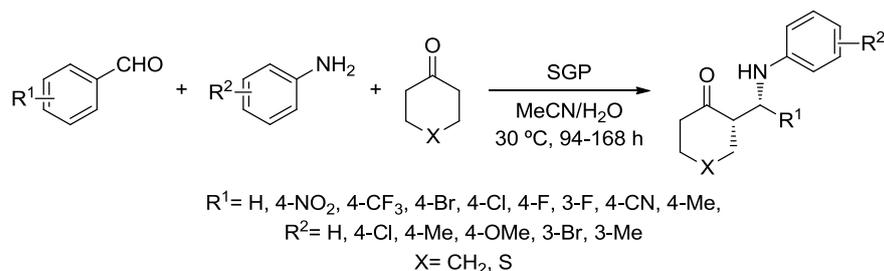
colaboradores demostraron los beneficios del empleo de acetamida como co-catalizador en la reacción de Mannich entre (*E*)-*N*-(4-nitrobenciliden)anilina y ciclohexanona catalizada por la CAL-B, en la que consiguieron incrementar el rendimiento de 25 a 38%.<sup>75</sup>

La primera reacción de Mannich directa asimétrica utilizando enzimas fue descrita por He, Guan y colaboradores, quienes para ello emplearon la proteasa de *Streptomyces griseus* tipo XIV (SGP), obteniendo rendimientos hasta del 92%, enantioselectividades hasta un 88% *ee* y diastereoselectividades hasta 92/8 hacia la formación del isómero *syn*.<sup>76</sup> Para la reacción entre 4-nitrobenzaldehído, anilina y un amplio exceso de ciclohexanona se llevaron a cabo los pertinentes estudios de optimización, estableciendo la mezcla MeCN/H<sub>2</sub>O (9:1 v/v) como mejor disolvente para el proceso (Esquema 24). La reacción catalizada por la SGP dio lugar al producto con un 66% de rendimiento, 82% *ee* y 85/15 *dr*, una selectividad en cierta manera sorprendente ya que tanto la reacción en ausencia de enzima como la reacción con albúmina de los experimentos de control transcurrieron en cierta extensión (21-28% rendimiento). Más aún, al emplear la SGP desnaturalizada se obtuvo el producto de Mannich con un considerable rendimiento aislado del 87%, no obstante la pureza óptica experimentó una importante pérdida (8% *ee*). Todos estos datos referentes a la selectividad sugieren que, efectivamente, la enzima es responsable de la acción catalítica al dirigir la reacción de forma estereoselectiva. El alcance del proceso se demostró para una variedad de cetonas, aldehídos y anilinas, observando una dependencia clara en la reactividad y selectividad en función de la naturaleza del patrón de sustitución.

---

<sup>75</sup> X.-Y. Chen, G.-J. Chen, J.-L. Wang, Q. Wu, X.-F. Lin, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 864-868.

<sup>76</sup> Y. Xue, L.-P. Li, Y.-H. He, Z. Guan, *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 761.



**Esquema 24.** Reacción de Mannich directa asimétrica entre aldehídos aromáticos, anilinas y cetonas cíclicas catalizada por SGP.

El mismo grupo de investigación ha descrito, recientemente, un proceso muy similar en el que emplean la acilasa I de *Aspergillus melleus* en la reacción asimétrica de Mannich de los mismos sustratos, para los que se consiguen enantioselectividades hasta del 89% *ee*, diastereoselectividades *syn/anti* hasta un 90/10 y rendimientos de hasta un 82% en una mezcla de MeCN y tampón de fosfatos pH 8.1 (85:15 v/v) a 30 °C.<sup>77</sup>

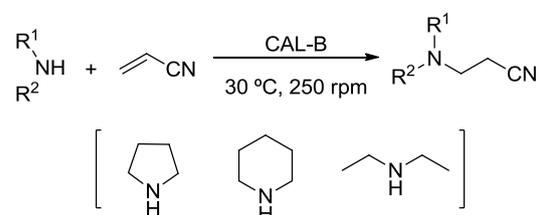
### 1.3. Reacciones de Formación de Enlaces Carbono-Nitrógeno (Adiciones Tipo Michael)

Las adiciones tipo Michael son transformaciones fundamentales en síntesis orgánica que dan lugar a la formación de enlaces carbono-heteroátomo con una economía atómica perfecta. En este contexto, las adiciones tipo Michael biocatalíticas promiscuas ofrecen alternativas respetuosas con el medio ambiente frente a los métodos químicos tradicionales de formación de enlaces C-N y C-S. A continuación, se discutirá el papel de las hidrolasas en reacciones de aza-Michael.

Nuestro grupo de investigación fue pionero en este tipo de procesos promiscuos, describiendo por primera vez la reacción aza-Michael catalizada por lipasas de adición de una serie de aminas secundarias como pirrolidina, piperidina y dietilamina a acrilonitrilo (Esquema

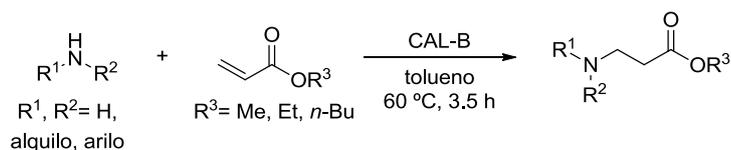
<sup>77</sup> Z. Guan, J. Song, Y. Xue, D.-C. Yang, Y.-H. He, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, *111*, 16-20.

25).<sup>78</sup> En el estudio de la reacción se consideraron diferentes preparaciones de la CAL-B, observándose que en todos los casos se producía la transformación. Sin embargo, la enzima que dio lugar a los mejores resultados fue la Chirazyme L2 comercializada por Roche, con la que la reacción se aceleró hasta 100 veces más que en ausencia de la misma.



**Esquema 25.** Adición tipo Michael de aminas secundarias a acrilonitrilo catalizada por la CAL-B.

Más recientemente, la reacción aza-Michael regioselectiva entre aminas primarias y secundarias con acrilatos alquílicos ha sido catalizada eficientemente por la CAL-B, formándose los correspondientes  $\beta$ -aminoésteres con rendimientos de 31-94% después de tiempos cortos de reacción en tolueno a 60 °C (Esquema 26).<sup>79</sup>



**Esquema 26.** Reacción de aza-Michael entre aminas y acrilatos catalizada por la CAL-B.

Castillo y colaboradores han desarrollado, recientemente, una estrategia basada en la ingeniería del medio de reacción para controlar la quimioselectividad de las adiciones aza-Michael catalizadas por la CAL-B entre bencilamina y diferentes ésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados de alquilo y acrilato de fenilo, de tal manera que la formación de los aductos de

<sup>78</sup> O. Torre, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Commun.* **2004**, 1724-1725.

<sup>79</sup> K. P. Dhake, P. J. Tambade, R. S. Singhal, B. M. Bhanage, *Tetrahedron Lett.* **2011**, 67, 2681-2688.

aza-Michael o de los productos de aminólisis se explica en función de interacciones termodinámicas.<sup>80</sup> Así, el uso de disolventes no polares dirige la reacción hacia la formación de los aductos aza-Michael, mientras que los productos de aminólisis están favorecidos en disolventes polares, observándose una elevada quimioselectividad con rendimientos bajos para este segundo proceso.

La lipasa de *Rhizomucor miehei* (RML) cataliza eficientemente la reacción de aza-Michael entre acrilatos de alquilo y alquilaminas, alcanolaminas y diaminas, originando 22  $\beta$ -aminoésteres *N*-sustituidos con rendimientos entre 45-100%.<sup>81</sup> Se estudió el efecto de unos pocos disolventes orgánicos como hexano, tolueno o éter diisopropílico, observando una fuerte dependencia de este parámetro con la naturaleza del nucleófilo. Es destacable la formación del aducto derivado de la doble Michael, obtenido como único producto al llevar a cabo la reacción de Michael catalizada por la RML con etanolamina en hexano. Los autores atribuyen este caso particular de doble adición a la baja solubilidad del aminoalcohol en hexano, lo que provocaría un importante exceso de acrilato en el medio de reacción y, por tanto, conduciría a la formación inesperada del producto di-aza-Michael. Por otra parte, al actuar las diaminas como nucleófilos (1,3-propanodiamina y 1,12-dodecilamina) la lipasa catalizó la adición a uno de los grupos amino exclusivamente.

Cabe destacar los valores de actividad mostrados por la lipasa de *Chromobacterium viscosum* y la lipasa de *Pseudomonas stutzeri* en la reacción entre aminas primarias, secundarias o aminoalcoholes lineales y una serie de acrilatos como el acrilato de metilo, acrilato de etilo, acrilato de butilo, crotonato de metilo o metacrilato de metilo (Esquema 27).<sup>82</sup> En el proceso se observó una preferencia clara hacia la síntesis quimioselectiva de los productos de adición 1,4-aza-Michael, aunque en

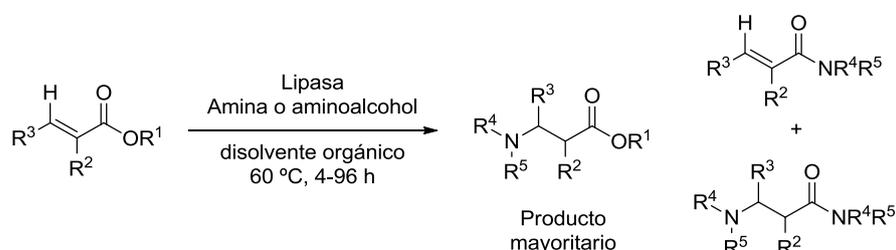
---

<sup>80</sup> J. D. Rivera-Martínez, J. Escalante, A. López-Munguía, A. Marty, E. Castillo, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, *112*, 76-82.

<sup>81</sup> L. N. Monsalve, F. Gillanders, A. Baldessari, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 1164-1170.

<sup>82</sup> P. Steunenbergh, M. Sijm, H. Zuilhof, J. P. M. Sanders, E. L. Scott, M. C. R. Franssen, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 3802-3813.

algunos casos la reacción de aminólisis tuvo lugar en una extensión significativa, observándose incluso la formación del producto derivado de la reacción secuencial de adición 1,4 y la sucesiva aminólisis (hasta un 29%). La correcta elección de la enzima, la concentración de sustrato y el disolvente permitió, tras un exhaustivo estudio, la modulación de la quimioselectividad del proceso.



**Esquema 27.** Competencia entre la adición 1,4-aza-Michael, la reacción de aminólisis y la secuencia adición 1,4-aza-Michael—aminólisis en la reacción catalizada por lipasas entre derivados aminados y distintos acrilatos.

Del mismo modo, en la reacción entre aminas alifáticas y propiolato de etilo se observó esta competición entre la adición aza-Michael y la aminólisis.<sup>83</sup> La relación de los productos obtenidos en las biotransformaciones catalizadas por la CRL, CAL-B, PPL, PSL y RML tuvo una gran dependencia del medio de reacción, advirtiéndose que el producto mayoritario cambiaba simplemente al emplear distintos disolventes, entre otros 1,4-dioxano, isooctano, MeCN, tolueno o *tert*-butil metil éter (TBME). La preferencia hacia la formación de las propiolamidas *N*-sustituidas fue excelente cuando la CAL-B actuó como biocatalizador, para lo cual también tuvo una influencia significativa el modo de agitación, alcanzándose conversiones completas con agitación magnética mientras que se observaron cinéticas de reacción más lentas al utilizar agitación orbital. El proceso se extendió a otros nucleófilos como alcohol bencílico y mercaptano de bencilo, donde la adición 1,2 hacia la formación de los correspondientes éster y tioéster, respectivamente, estuvo favorecida en ambos casos.

<sup>83</sup> S. Bonte, I. O. Guinea, I. Baussanne, J.-P. Xuereb, R. Dinica, M. Demeunynck, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 5495-5500.



## **OBJETIVOS**



En la introducción de este bloque se ha puesto de manifiesto la creciente importancia de las biotransformaciones en aplicaciones sintéticas orgánicas, las cuales transcurren con elevada eficiencia catalítica y siguiendo los doce principios básicos de la Química Sostenible. Asimismo, se ha descrito la capacidad de ciertas enzimas para catalizar procesos que difieren de su función natural. Por ello, nos hemos planteado explorar nuevas posibilidades sintéticas de la proteasa de *Bacillus licheniformis*, comercialmente accesible en su forma inmovilizada como un agregado enzimático de enlaces entrecruzados (Alcalasa-CLEA®).

Los procesos que se abordarán serán aquellos para la formación de enlaces:

- Carbono-carbono como la reacción aldólica, Baylis-Hillman, Henry o Mannich
- Carbono-nitrógeno como adiciones tipo Michael

En el caso de llevar a cabo con éxito el descubrimiento de nuevas actividades catalíticas de la enzima mencionada, se realizaría una optimización de los parámetros de reacción más importantes que afecten a los distintos procesos de manera individual.



## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



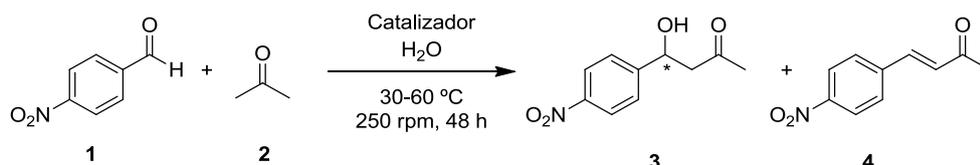
Habiendo quedado patente la importancia de la catálisis enzimática en síntesis orgánica, así como el creciente interés en procesos de promiscuidad catalítica, se detallará a continuación el estudio realizado en reacciones de formación de enlaces C-C y C-heteroátomo, en las que se ha usado por primera vez como catalizador la proteasa de *Bacillus licheniformis* en su forma inmovilizada Alcalasa-CLEA®. Así, se discutirá la actividad de la enzima mediante experimentos de control, comparando los resultados obtenidos en las reacciones catalizadas por la proteasa con aquellas reacciones que transcurren en ausencia de catalizador o con la enzima en su forma desnaturalizada o inhibida, analizando también otros factores como la influencia de la temperatura en la eficiencia catalítica de la proteasa. Los resultados obtenidos se encuentran agrupados en función del tipo de reacción estudiada.

## **1.4. Reacciones de Formación de Enlaces C-C**

Inicialmente, se planteó el estudio del comportamiento de la Alcalasa-CLEA® en reacciones de formación de enlaces carbono-carbono como la reacción de adición aldólica, Henry, Baylis-Hillman o Mannich, todos ellos procesos de gran interés desde un punto de vista sintético.

### **1.4.1. Reacción de Adición Aldólica**

En primer lugar, se evaluó el carácter promiscuo de la Alcalasa-CLEA® en la adición aldólica entre un aldehído aromático como el 4-nitrobenzaldehído (**1**) y una cetona alifática como la acetona (**2**), una de las transformaciones más empleadas para la preparación de  $\beta$ -hidroxicetonas (Esquema 28).



**Esquema 28.** Reacción aldólica entre 4-nitrobenzaldehído y acetona.

Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo con acetona como reactivo y disolvente al mismo tiempo, añadiendo agua como aditivo en algunos casos y a diferentes temperaturas comprendidas entre 30 y 60 °C. Los datos experimentales se han recogido en la Tabla 2 y se discuten a continuación. Mientras que la formación del producto en ausencia de catalizador no tuvo lugar (entrada 1), la Alcalasa-CLEA<sup>®</sup> catalizó la formación de un 24% de la β-hidroxicetona (*R*)-**3** aislada con un 7% *ee* (entrada 2). La presencia de agua en el medio provocó un aumento de la conversión hasta un 45% (20% de agua como cosolvente, entrada 3), incrementándose ligeramente en estas condiciones la inducción quiral para la formación de (*R*)-**3** (11% *ee*). Estos resultados reflejan la clara influencia que el medio de reacción y, en particular, el agua ejerce tanto en la actividad catalítica como en la estabilidad de la proteína.<sup>84</sup>

Con el fin de demostrar la actividad catalítica promiscua de la proteína y descartar la posibilidad de una catálisis inespecífica o bien de un mecanismo de reacción no promiscuo, se diseñaron una serie de experimentos de control (entradas 4-8, Tabla 2).

<sup>84</sup> a) G. Carrea, S. Riva, *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Medium*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2008**; b) P. Lozano, *Green Chem.* **2010**, *12*, 555-569; c) M. J. Hernáiz, A. R. Alcántara, J. I. García, J. V. Sinisterra, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 9422-9437.

**Tabla 2.** Adición aldólica entre 4-nitrobenzaldehído (**1**) y acetona (**2**) tras 48 h a 250 rpm.

Entrada	Catalizador	T (°C)	H <sub>2</sub> O (%)	c (%) <sup>a,b</sup>	<b>3</b> (%) <sup>a,c</sup>	<b>4</b> (%) <sup>a</sup>
1	--	30	--	<3	<3	--
2	Alcalasa	30	--	24	24 (7)	--
3	Alcalasa	30	20	45	45 (11)	--
4	Ácido 4-nitrobenzoico (5% en peso)	30	20	<3	<3	--
5	BSA	30	--	<3	<3	--
6	Alcalasa desnat. <sup>d</sup>	30	--	28	28 (8)	--
7	Alcalasa desnat. <sup>e</sup>	30	--	4	4	--
8	Alcalasa inhibida <sup>f</sup>	30	--	5	5	--
9	--	45	--	4	4	--
10	Alcalasa	45	--	33	30 (8)	<3
11	Alcalasa	45	20	72	68 (13)	4
12	--	60	--	3	3	--
13	Alcalasa	60	--	43	39 (5)	4
14	Alcalasa	60	20	97	84 (12)	13

<sup>a</sup> Porcentajes de los productos determinados por <sup>1</sup>H-RMN del crudo de reacción.

<sup>b</sup> Conversión referida a la concentración de **3+4** en comparación con **1**.

<sup>c</sup> Entre paréntesis se indica el exceso enantiomérico del alcohol **3**, determinado por HPLC. No se han medido los *ee* para valores de conversión inferiores al 5%.

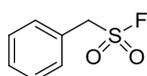
<sup>d</sup> Enzima desnaturalizada, tratada previamente con H<sub>2</sub>O durante 1 h a 150 °C.

<sup>e</sup> Enzima desnaturalizada, tratada previamente con urea en H<sub>2</sub>O durante 72 h a 150 °C.

<sup>f</sup> Enzima inhibida, tratada previamente con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante 16 h a 30 °C.

Debido a la facilidad que presentan los aldehídos para oxidarse a ácidos carboxílicos en medios acuosos, se efectuó la reacción en presencia de un 5% en peso de ácido 4-nitrobenzoico, para descartar una posible influencia del mismo en la catálisis de la reacción. El producto no se detectó en el crudo de reacción (entrada 4), por lo que se descartó que la reacción pudiera transcurrir a través de la oxidación química del aldehído, quedando excluida la posibilidad de que el correspondiente ácido carboxílico fuera el responsable de la reacción aldólica. Seguidamente, se realizaron una serie de experimentos con la intención de confirmar la especificidad catalítica de la proteasa. En ellos se emplearon:

- ✓ la albúmina de suero bovino (BSA, entrada 5)
- ✓ la Alcalasa-CLEA® desnaturalizada por calentamiento durante 1 h a 150 °C (entrada 6); o por tratamiento con urea durante 72 h a 150 °C (entrada 7)
- ✓ la Alcalasa-CLEA® inhibida por tratamiento durante 16 h a 30 °C con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, entrada 8), inhibidor comúnmente utilizado para las proteasas serínicas y cuya estructura se muestra a continuación (Figura 4).<sup>85</sup>



**Figura 4.** Estructura del PMSF.

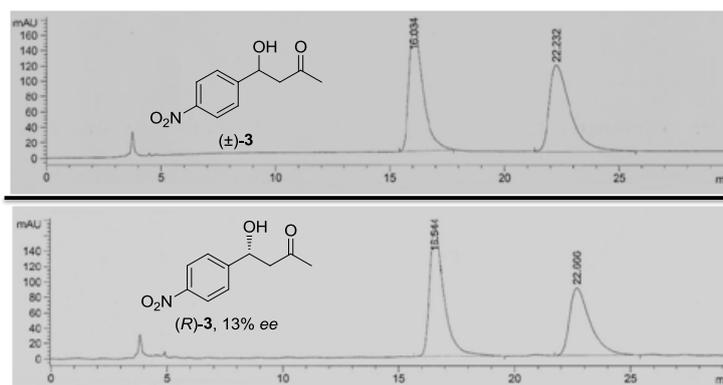
Por una parte, al emplear la BSA en sustitución de la proteasa sólo se observaron los productos de partida en el crudo de reacción, mientras que, por otra, con el biocatalizador desnaturalizado en condiciones suaves las conversiones fueron muy similares a las obtenidas con la enzima (entrada 6). Este último resultado supone que el tratamiento de desnaturalización no fue efectivo y la proteína conservó su estructura, necesaria para la catálisis de la adición aldólica. Al forzar las condiciones de desnaturalización añadiendo urea y aumentando el tiempo de calentamiento solo se obtuvieron trazas del producto final (4%, entrada 7), resultado que se repitió al llevar a cabo la reacción con la enzima inhibida (5%, entrada 8), lo que sugiere que la estructura terciaria de la proteasa es necesaria para realizar la reacción aldólica promiscua de manera eficiente. De esta forma quedó demostrado de forma inequívoca el carácter promiscuo de la Alcalasa-CLEA® proveniente de la proteasa de *Bacillus licheniformis*.

A continuación, se estudió el efecto de la temperatura en la velocidad de reacción, para lo cual las biotransformaciones se realizaron a 45 y 60 °C. Contrariamente a lo que ocurría a 30 °C, en ausencia de enzima se formaron pequeñas cantidades del producto racémico **3**

---

<sup>85</sup> B. Johnvesly, G.R. Naik, *Process Biochem.* **2001**, *37*, 139-144.

(entradas 9 y 12). Sin embargo, al actuar la proteasa como catalizador se produjo un incremento notable en la formación del producto ópticamente activo (*R*)-**3** (entradas 10 y 13), que fue mayor a 60 °C (30-39%), temperatura cercana a la temperatura óptima de la enzima (65 °C). En todo caso, la actividad óptica del aldol **3** fue baja en ambas pruebas (5-8% *ee*). Finalmente, se estudió el efecto de la temperatura en condiciones húmedas (20% de agua, entradas 11 y 14), observando una mayor formación del aldol (*R*)-**3** tanto a 45 °C como a 60 °C (68-84% y 12-13% *ee*, Figura 5), acompañada de la aparición de cantidades apreciables del producto **4** de deshidratación química (4-13%).

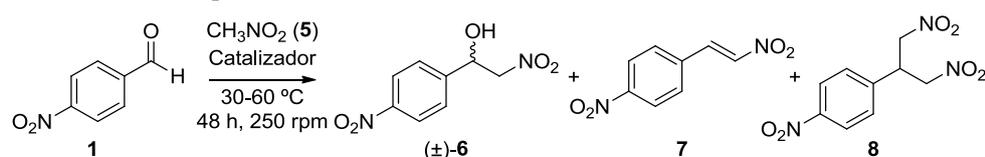


**Figura 5.** Cromatogramas de HPLC empleando columnas de relleno quiral para el aldol **3** racémico y ópticamente activo (13% *ee*).

### 1.3.2. Reacción de Henry (Nitroaldólica)

El segundo proceso en el que se estudió el posible carácter promiscuo de la Alcalasa-CLEA<sup>®</sup> fue la reacción de Henry entre 4-nitrobenzaldehído (**1**) y nitrometano (**5**), usando el propio nitrometano seco como disolvente de la reacción. Los resultados se recogen en la Tabla 3 y se discuten a continuación.

**Tabla 3.** Reacción de Henry entre 4-nitrobenzaldehído (**1**) y nitrometano (**5**) tras 48 h a 250 rpm.



Entrada	Catalizador	T (°C)	H <sub>2</sub> O (%)	c (%) <sup>a,b</sup>	6 (%) <sup>a</sup>	7 (%) <sup>a</sup>	8 (%) <sup>a</sup>
1	--	30	--	<3	<3	--	--
2	Alcalasa	30	--	34	27	7	--
3	BSA	30	--	<3	<3	--	--
4	BSA	30	20	93	88	5	--
5	Alcalasa desnat. <sup>c</sup>	30	--	12	8	4	--
6	Alcalasa desnat. <sup>d</sup>	30	--	<3	<3	--	--
7	Alcalasa inhibida <sup>e</sup>	30	--	8	8	--	--
8	--	45	--	<3	<3	--	--
9	Alcalasa	45	--	67	50	13	4
10	Alcalasa <sup>f</sup>	45	--	97	70	10	17
11	--	60	--	<3	<3	--	--
12	Alcalasa	60	--	84	60	14	10
13	--	80	--	<3	<3	--	--
14	Alcalasa	80	--	95	61	12	22

<sup>a</sup> Porcentajes de los productos determinados por <sup>1</sup>H-RMN del crudo de reacción. En todos los casos se aisló el producto racémico identificado por análisis de HPLC.

<sup>b</sup> Conversión referida a la concentración de los productos **6+7+8** en comparación con **1**.

<sup>c</sup> Enzima desnaturalizada, tratada previamente con H<sub>2</sub>O durante 1 h a 150 °C.

<sup>d</sup> Enzima desnaturalizada, tratada previamente con urea en H<sub>2</sub>O durante 72 h a 150 °C.

<sup>e</sup> Enzima inhibida, tratada previamente con PMSF durante 16 h a 30 °C.

<sup>f</sup> Se empleó doble cantidad de enzima.

Análogamente a lo ocurrido en la reacción aldólica, no se observó la formación de ningún producto de reacción en ausencia de catalizador (entrada 1), mientras que la proteasa promovió la reacción hacia la formación del nitroalcohol racémico **6** con un 27% de conversión tras 48 h de reacción (entrada 2). Para excluir la posibilidad de una catálisis inespecífica, se empleó la proteína BSA sin observarse reacción alguna (entrada 3). Cabe destacar que en este caso no fue posible utilizar pequeñas cantidades de agua debido a que la propia BSA cataliza la

reacción de Henry de manera no específica en disolventes acuosos (entrada 4).<sup>65</sup>

A continuación, se empleó la Alcalasa-CLEA® desnaturalizada en condiciones suaves (entrada 5), la Alcalasa-CLEA® desnaturalizada en condiciones más agresivas (entrada 6) y la Alcalasa-CLEA® inhibida con PMSF (entrada 7). En el primer caso, en el que se utilizó la proteasa desnaturalizada en condiciones suaves, se alcanzó un 12% de conversión formándose una pequeña cantidad del nitroalcohol racémico **6** (8%) y del producto de deshidratación **7** (4%, entrada 5), mientras que no se observó conversión alguna al extremar las condiciones de desnaturalización (entrada 6), lo que indica que el tratamiento de desnaturalización elimina la actividad nitroaldólica y confirma la actividad catalítica de la proteasa. Finalmente, al utilizar la Alcalasa-CLEA® inhibida como biocatalizador en la reacción de Henry la actividad catalítica de la proteína se redujo considerablemente (8% del producto racémico **6**, entrada 7), lo que concuerda una vez más con la catálisis de la reacción por parte del centro activo de la enzima.

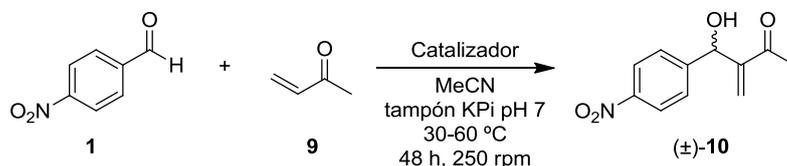
Pretendiendo facilitar la formación del producto final se incrementó la temperatura del proceso, observándose que en ausencia de enzima no se obtenían cantidades apreciables del nitroalcohol **6** (45-80 °C, entradas 8, 11 y 13). Por el contrario, en presencia de enzima se produjo un aumento muy significativo de la conversión (67-95%, entradas 9, 12 y 14). Desafortunadamente, los experimentos de <sup>1</sup>H-RMN de los crudos de reacción confirmaron la presencia de dos subproductos, la olefina **7** y el dinitrocompuesto **8**, estando la formación de este último especialmente favorecida a altas temperaturas (entrada 14). Las condiciones óptimas de reacción se establecieron, por tanto, a una temperatura de 45 °C y empleando el doble de cantidad de enzima (entrada 10), obteniéndose un 70% del producto deseado (±)-**6**. La naturaleza racémica de **6** no es sorprendente pues apenas existen en la literatura procesos asimétricos en la reacción de Henry promiscua, hecho que debería ser abordado con

un estudio de modelización molecular más extenso que el objeto de este trabajo.

### 1.4.3. Reacción de Baylis-Hillman

La eficiencia catalítica de la proteasa de *Bacillus licheniformis* se evaluó para la reacción de Baylis-Hillman entre el 4-nitrobenzaldehído (**1**) y la metil vinil cetona (**9**, Tabla 4), un proceso para el que nunca se había estudiado la acción catalítica de una proteasa. Así, mientras que no se observó reacción alguna en ausencia de enzima (entrada 1), el proceso en presencia de la proteasa dio lugar al producto con una conversión baja (7% después de 48 h de reacción, entrada 2).

**Tabla 4.** Reacción de Baylis-Hillman entre 4-nitrobenzaldehído (**1**) y metil vinil cetona (**9**) tras 48 h a 250 rpm.



Entrada	Catalizador	T (°C)	c (%) <sup>a</sup>
1	--	30	<3
2	Alcalasa	30	7
3	Alcalasa desnaturalizada <sup>b</sup>	30	7
4	Alcalasa desnaturalizada <sup>c</sup>	30	6
5	Alcalasa inhibida <sup>d</sup>	30	6
6	--	45	2
7	Alcalasa	45	16
8	Alcalasa desnaturalizada <sup>c</sup>	45	16
9	--	60	13
10	Alcalasa	60	23
11	Alcalasa desnaturalizada <sup>c</sup>	60	30

<sup>a</sup> Porcentajes de los productos determinados por <sup>1</sup>H-RMN del crudo de reacción. En todos los casos se aisló el producto racémico identificado por análisis de HPLC.

<sup>b</sup> Enzima desnaturalizada, tratada previamente con H<sub>2</sub>O durante 1 h a 150 °C.

<sup>c</sup> Enzima desnaturalizada, tratada previamente con urea en H<sub>2</sub>O durante 72 h a 150 °C.

<sup>d</sup> Enzima inhibida, tratada previamente con PMSF durante 16 h a 30 °C.

De un modo similar a lo descrito por Reetz y colaboradores,<sup>70</sup> los cuales encontraron valores de actividad semejantes para ciertas lipasas y albúminas de distintos tipos en la reacción de Morita-Baylis-Hillman, se observó que la enzima desnaturalizada o inhibida promovía la reacción en una magnitud similar a la de la proteasa (6-7%, entradas 2-5), lo que concuerda con la hipótesis que plantea que la reacción de Baylis-Hillman tiene lugar a través de una catálisis inespecífica más que por promiscuidad catalítica. Finalmente, la reacción se efectuó a mayores temperaturas, observándose un aumento de la contribución química, especialmente a 60 °C (2-13%, entradas 6 y 9).

Como era de esperar, en el proceso catalizado por la proteasa se obtuvieron mayores velocidades de reacción, tanto a 45 °C (16%, entrada 7) como a 60 °C (23%, entrada 10), resultados similares a los observados con la enzima desnaturalizada (entradas 8 y 11) y que se ajustan una vez más a la idea de una catálisis inespecífica para la formación del producto final en forma racémica.

#### **1.4.4. Reacción de Mannich**

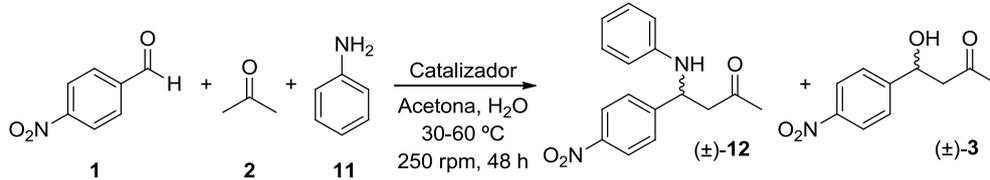
Con la intención de ampliar las aplicaciones sintéticas de la proteasa de *Bacillus licheniformis*, se estudió su eficiencia catalítica en la reacción de Mannich de tres componentes (4-nitrobenzaldehído, acetona y anilina), donde la propia acetona se utilizó como disolvente. Formalmente, el proceso es comparable a la adición aldólica previamente estudiada en la sección 1.4.1, empleando adicionalmente anilina (**11**). Los resultados se han recogido en la Tabla 5 y la interpretación de los valores experimentales obtenidos se expone a continuación.

En primer lugar, se llevó a cabo la reacción en ausencia de enzima (entrada 1), observándose la formación de una mínima cantidad de la amina secundaria **12** (3%), pero de cantidades significativas de la  $\beta$ -hidroxicetona **3** (18%) producto de la reacción aldólica entre la acetona (**2**) y el 4-nitrobenzaldehído (**1**). La contribución química de la anilina en

## Capítulo 1

la formación de **3** queda confirmada una vez analizados los resultados obtenidos en la correspondiente reacción aldólica sin presencia de anilina, donde en ausencia de catalizador no se observaba la formación de ningún producto de reacción (entrada 1 de la Tabla 2).

**Tabla 5.** Reacción de Mannich entre 4-nitrobenzaldehído (**1**), acetona (**2**) y anilina (**11**) tras 48 h a 250 rpm.



Entrada	Catalizador	T (°C)	c (%) <sup>a,b</sup>	3 (%) <sup>a</sup>	12 (%) <sup>a</sup>
1	--	30	21	18	3
2	Alcalasa	30	64	35	29
3	Alcalasa <sup>c</sup>	30	58	35	23
4	BSA	30	57	57	--
5	Alcalasa desnaturalizada <sup>d</sup>	30	66	54	12
6	Alcalasa desnaturalizada <sup>e</sup>	30	52	38	14
7	Alcalasa inhibida <sup>f</sup>	30	81	31	50
8	PMSF <sup>g</sup>	30	84	19	75
9	--	45	74	66	8
10	Alcalasa	45	97	51	46
11	--	60	91	87	4
12	Alcalasa	60	>97	71	29

<sup>a</sup> Porcentajes de los productos determinados por <sup>1</sup>H-RMN del crudo de reacción.

<sup>b</sup> Conversión referida a la concentración de **3+12** en comparación con **1**.

<sup>c</sup> La anilina fue añadida en tres veces (1/3 de la cantidad final cada 16 h).

<sup>d</sup> Enzima desnaturalizada, tratada previamente con H<sub>2</sub>O durante 1 h a 150 °C.

<sup>e</sup> Enzima desnaturalizada, tratada previamente con urea en H<sub>2</sub>O durante 72 h a 150 °C.

<sup>f</sup> Enzima inhibida, tratada previamente con PMSF durante 16 h a 30 °C.

<sup>g</sup> Se han añadido 0.25 equiv de PMSF (0.08 mmol).

A continuación, se empleó la Alcalasa-CLEA<sup>®</sup> como catalizador de la reacción de Mannich, proceso para el cual la enzima mostró una actividad elevada en la formación del aldol (35%) y del aducto Mannich (29%), ambos en su forma racémica (entrada 2). Por tanto, es destacable la catálisis de la proteasa en la reacción de Mannich, ya que en ausencia

de la misma apenas se había observado la formación de **12** (entrada 1). Se proyectaron los esfuerzos entonces en aumentar la selectividad hacia el producto de Mannich **12** añadiendo la anilina por partes en un intento de minimizar la formación química de **3**, sin embargo el aducto de Mannich se aisló con un rendimiento ligeramente menor (entrada 3). Se estudió también la especificidad catalítica de la proteasa, la cual quedó demostrada en la reacción con la proteína BSA, donde se obtuvo la  $\beta$ -hidroxicetona racémica **3** como único producto de reacción (57%, entrada 4). Este hecho confirma nuevamente las observaciones previas en las que se establecía que la anilina promovía la reacción de adición aldólica (comparar con la entrada 5 de la Tabla 2).

Posteriormente, se desnaturizó la Alcalasa-CLEA® de distintas formas y se evaluaron las enzimas desnaturizadas como posibles catalizadores (entradas 5 y 6), observándose que en ambos casos se favorecía la formación del aldol **3** (38-54%) en detrimento del aducto de Mannich (12-14%), y demostrando así que la proteasa comercialmente disponible provoca la formación de cantidades mayores del producto Mannich **12**. Estos resultados están en armonía con el hecho de que la formación del aldol como subproducto de la reacción transcurre a través de una catálisis inespecífica o incluso una reacción no enzimática facilitada por la presencia de anilina, mientras que, por el contrario, la proteasa está directamente involucrada en el mecanismo de la reacción de Mannich. Sorprendentemente, cuando la enzima se inhibió con PMSF se obtuvieron cantidades muy elevadas del aducto Mannich (50%, entrada 7). Para explicar este singular resultado, se llevó a cabo la reacción empleando como catalizador de PMSF (0.25 equiv, entrada 8), reacción en la que se aisló el producto **12** con un 75% de rendimiento, lo que demuestra que el PMSF cataliza químicamente la adición de Mannich.

Por último, se comprobó la eficiencia catalítica de la proteasa a diferentes temperaturas (entradas 9-12). En ausencia de enzima se obtuvo la  $\beta$ -hidroxicetona **3** derivada de la adición aldólica como

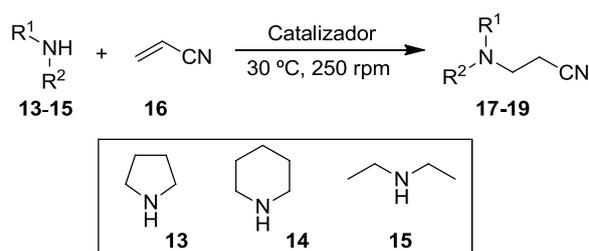
producto mayoritario tanto a 45 °C como a 60 °C (66-87%, entradas 9 y 11), mientras que la formación del aducto Mannich **12** aumentó considerablemente al emplear la Alcalasa-CLEA® como biocatalizador (29-46%, entradas 10 y 12), quedando así demostrado el papel catalítico de la enzima en la reacción de Mannich.

### 1.5. Reacciones de Formación de Enlaces C-N (Adiciones Tipo Michael)

Una vez demostrada la utilidad de la Alcalasa-CLEA® en la formación de enlaces C-C, se investigó su comportamiento en reacciones de formación de enlaces carbono-nitrógeno (C-N) para expandir sus posibilidades catalíticas.

Sobre la base de la experiencia de nuestro grupo de investigación en este campo,<sup>78</sup> se ha estudiado la actividad catalítica de la proteasa en las adiciones tipo Michael entre una serie de aminas secundarias cíclicas (pirrolidina y piperidina, **13** y **14**, respectivamente) y lineales (dietilamina, **15**) con acrilonitrilo (**16**). Los resultados experimentales obtenidos se muestran en la Tabla 6 y en las Figura 6, 7 y 8.

En primer lugar, se utilizó la pirrolidina (**13**), compuesto heterocíclico nitrogenado de cinco eslabones, comprobando que su reacción con acrilonitrilo (**16**) catalizada por la Alcalasa-CLEA® tenía lugar 28 veces más rápidamente que en ausencia de biocatalizador (entradas 1 y 2). Estos datos se pueden apreciar visualmente en la Figura 6a donde se muestra el grado de conversión frente al tiempo de reacción, o bien en la Figura 6b en la que se han representado la concentración del producto formado **17** frente al tiempo. De esta manera, la conversión alcanza el 44% después de 70 min de reacción (Figura 6a).

**Tabla 6.** Velocidades de reacción en la adición tipo Michael entre las aminas secundarias **13-15** y acrilonitrilo (**16**).

Entrada	Amina	Catalizador	$V_0$ ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	$V_{\text{rel}}^a$
1	<b>13</b> <sup>b</sup>	---	14.3	1
2	<b>13</b> <sup>b</sup>	Alcalasa	393.1	28
3	<b>13</b> <sup>b</sup>	Alcalasa inhibida <sup>d</sup>	28.4	2
4	<b>14</b> <sup>b</sup>	----	4.0	1
5	<b>14</b> <sup>b</sup>	Alcalasa	39.7	10
6	<b>14</b> <sup>b</sup>	Alcalasa inhibida <sup>d</sup>	8.0	2
7	<b>15</b> <sup>c</sup>	---	0.8	1
8	<b>15</b> <sup>c</sup>	Alcalasa	236.2	298
9	<b>15</b> <sup>c</sup>	Alcalasa inhibida <sup>d</sup>	4.1	5

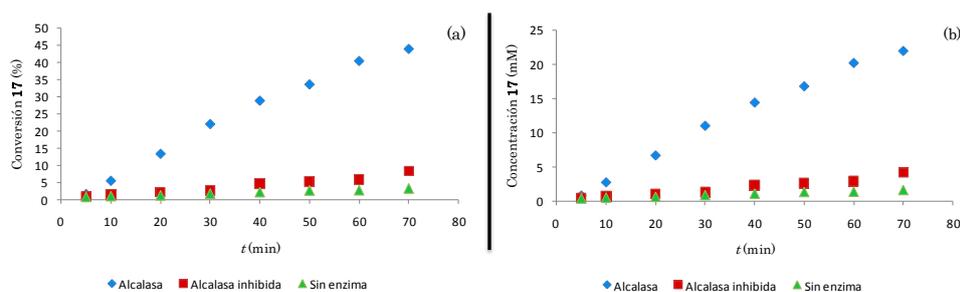
<sup>a</sup> Velocidades iniciales relativas de la reacción de la amina (**13-15**) con acrilonitrilo (**16**) en comparación con la velocidad en ausencia de catalizador.

<sup>b</sup> Adición tipo Michael entre pirrolidina o piperidina (0.05 M) y acrilonitrilo (0.1 M).

<sup>c</sup> Adición tipo Michael entre dietilamina (0.3 M) y acrilonitrilo (0.3 M).

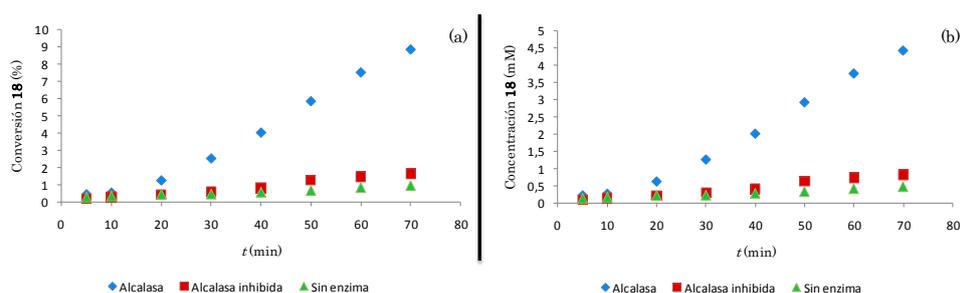
<sup>d</sup> Enzima tratada previamente con PMSF a 30 °C durante 16 h.

Para descartar la posibilidad de una catálisis inespecífica, se inhibió la proteasa con PMSF, observándose que la velocidad de reacción entre **13** y **16** era sólo ligeramente mayor a la del blanco de reacción (entrada 3,  $V_{\text{rel}} = 2$ ), y por tanto considerablemente menor al compararla con la reacción catalizada por la proteasa. Estos hechos demuestran, sin ningún tipo de duda, que la estructura terciaria de la enzima es esencial para catalizar la reacción de adición tipo Michael.



**Figura 6.** Formación del aducto de tipo Michael **17** representando la conversión (a) o la concentración (b) frente al tiempo de reacción.

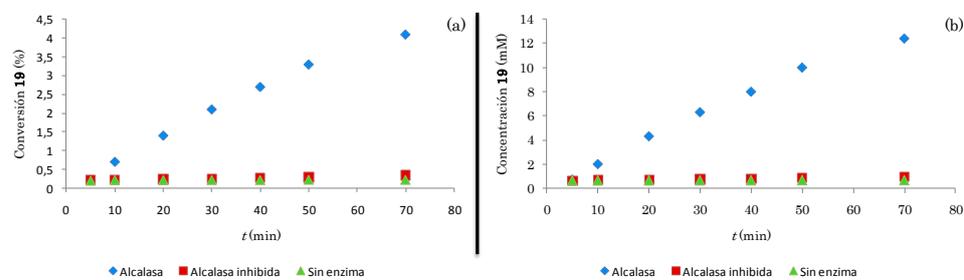
Los resultados obtenidos con la piperidina (**14**) siguieron la misma tendencia (entradas 4-6), aunque con una menor reactividad de la misma al formarse el aducto de tipo Michael **18** con concentraciones menores en comparación con las obtenidas en la reacción con pirrolidina ( $V_0 = 39.7$  frente a 393.1, entradas 2 y 5). Como en el caso anterior, se ha representado la formación del correspondiente compuesto de adición tipo Michael **18** frente al tiempo, empleando la amina en concentración 0.05 M y el acrilonitrilo (**16**) en 0.1 M (Figura 7), alcanzándose una conversión del 9% tras 70 minutos de reacción.



**Figura 7.** Formación del aducto de tipo Michael **18** representando la conversión (a) o la concentración (b) frente al tiempo de reacción.

Por último, se estudió la adición tipo Michael entre dietilamina (**15**) y acrilonitrilo (**16**, Figura 8) para la formación del aducto de tipo Michael **19**. Debido a la menor nucleofilia de las aminas lineales frente a las aminas cíclicas, fue necesario efectuar la reacción a mayores concentraciones tanto de dietilamina (**15**, 0.3 M) como de acrilonitrilo

(**16**, 0.3 M) para obtener valores de conversión apreciables (Figura 8). La Alcalasa-CLEA® exhibió una eficiencia catalítica notable al acelerar la reacción 298 veces más que en ausencia de enzima (entradas 7 y 8), mientras que la proteasa inhibida solo aceleró el proceso en cinco órdenes de magnitud cuando se comparó con la reacción en ausencia de enzima (entrada 9).



**Figura 8.** Formación del aducto de tipo Michael **19** representando la conversión (a) o la concentración (b) frente al tiempo de reacción.



## **CONCLUSIONES**

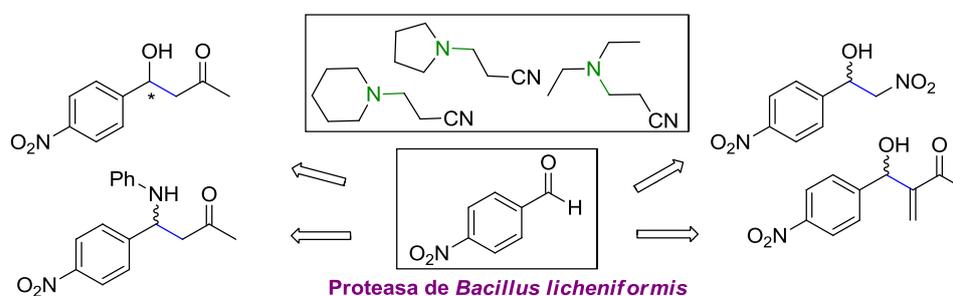


✓ En este capítulo se ha demostrado por primera vez el carácter promiscuo de la proteasa de *Bacillus licheniformis* en reacciones de formación de enlaces carbono-carbono, confirmando que la catálisis tiene lugar en el centro activo de la enzima para las reacciones de adición aldólica, Henry y Mannich. Únicamente en la reacción aldólica se ha observado cierta inducción asimétrica, siendo el enantiómero (*R*) el que se forma preferentemente.

✓ Se ha demostrado también la capacidad de la Alcalasa-CLEA® para catalizar la reacción de Baylis-Hillman con conversiones similares a las obtenidas cuando la BSA actúa como biocatalizador, por lo que se ha determinado que en este caso la formación de enlaces C-C ocurre a través de una catálisis inespecífica.

✓ Se ha ampliado el estudio de promiscuidad a reacciones de formación de enlaces carbono-nitrógeno, analizando la eficiencia catalítica de la enzima en la reacción aza-Michael de adición de aminas secundarias tanto cíclicas como lineales a acrilonitrilo, observándose importantes diferencias entre la reacción catalizada por la proteasa y aquellas llevadas a cabo en ausencia de enzima o promovidas por catálisis inespecífica, siendo la velocidad de reacción altamente dependiente de la estructura de la amina.

✓ En resumen, se ha demostrado la versatilidad de la proteasa de *Bacillus licheniformis* en su forma comercial Alcalasa-CLEA® como catalizador enzimático, ampliándose sus aplicaciones en síntesis orgánica conocidas hasta la fecha.





# **PARTE EXPERIMENTAL**



## **1.6. General**

Los reactivos químicos proceden de distintas casas comerciales como Sigma-Aldrich, Acros o Fluka. La proteasa de *Bacillus licheniformis* (Alcalasa-CLEA®, 5.81 U/g) fue suministrada por Sigma.

El tolueno utilizado en la reacción aza-Michael se secó sobre sodio, empleando como indicador la benzofenona, se destiló y se almacenó bajo atmósfera de nitrógeno para su uso.

Los reactivos empleados en las reacciones enzimáticas de formación de enlaces C-N, así como la anilina y la metil vinil cetona empleadas en las reacciones de Mannich y Baylis-Hillman, respectivamente, se destilaron antes de su uso. El resto de reactivos y disolventes (grado HPLC) se utilizaron sin tratamientos previos.

## **1.7. Técnicas de Análisis**

### **1.7.1. Cromatografía en Gel de Sílice**

Para la cromatografía en capa fina se han utilizado cromatofolios de gel de sílice POLYGRAM SIL G/UV<sub>254</sub> (0.25 mm de espesor), los cuales llevan incorporado un revelador ultravioleta, comercializados por Merck. Como revelador se utilizó una disolución acuosa formada por un 1% de KMnO<sub>4</sub> (2 g), un 5% de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (10 g) y un 5% de NaOH (8 lentejas) en 200 mL de H<sub>2</sub>O, siendo todas las proporciones en peso:volumen.

Para las cromatografías de columna se utilizó gel de sílice 60 (230-240 Mesh) adquirida a Merk.

### **1.7.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)**

Los análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) empleados para la separación analítica de los enantiómeros de los

compuestos **3**, **6**, **10** y **12** se realizaron en un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100, utilizando distintas columnas quirales como Daicel Chiralpak AS, Chiralcel OJ-H, Chiralcel OB-H o Chiralpak IA (25 x 0.46 cm I.D.). Se empleó un detector visible-ultravioleta trabajando a una longitud de onda de 210 y 215 nm, siendo la fase móvil mezclas hexano/2-propanol.

Las condiciones de HPLC y los tiempos de retención para los distintos compuestos estudiados se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Separación analítica por HPLC de los productos de las reacciones enzimáticas promiscuas de formación de enlaces C-C.<sup>a</sup>

Compuesto	Columna	$t_R$ (min) <sup>b</sup>	$R_S$ <sup>c</sup>
<b>3</b>	Chiralpak AS	<b>16.0</b> (R) y 22.2 (S)	2.1
<b>6</b>	Chiralcel OJ-H	31.9 y 34.5	1
<b>10</b>	Chiralcel OB-H	16.5 y 19.6	1.1
<b>12</b>	Chiralpak IA	10.4 y 13.1	3.2

<sup>a</sup> Todos los análisis se efectuaron con un eluyente del 20% *n*-hexano/2-propanol, un flujo de 0.8 mL/min y a 30 °C.

<sup>b</sup> Se destaca en negrita el enantiómero mayoritario obtenido tras la transformación enzimática.

<sup>c</sup> Factor de resolución:  $R_S = 2x[t_R(S) \cdot t_R(R)]/w_{b1}(S) + w_{b2}(R)$

### 1.7.3. Espectroscopía Infrarroja (IR)

Los espectros de IR se registraron en un espectrómetro Varian 1000 FT-IR empleando placas de NaCl (muestras líquidas) o una dispersión del producto en una pastilla de KBr (muestras sólidas). Las bandas de tensión se indican en valores de  $\nu$  máxima y se expresan en  $\text{cm}^{-1}$ .

### 1.7.4. Espectrometría de Masas (EM)

Los experimentos APCI<sup>+</sup> (ionización química a presión atmosférica en modo positivo) y ESI<sup>+</sup> (ionización por electrospray en modo positivo) se determinaron en un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 acoplado a un detector de masas. Los valores se obtuvieron en ambos casos a unidades de masa atómica (uma).

### 1.7.5. Puntos de Fusión

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

### 1.7.6. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN y secuencia de pulsos DEPT se adquirieron en espectrómetros Bruker AV-300 y DPX-300 (300.13 MHz para  $^1\text{H}$  y 75.5 MHz para  $^{13}\text{C}$ ). Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en Hertzios (Hz).

Los calibrados se realizaron sobre la señal del  $\text{CDCl}_3$  ( $^{13}\text{C}$ , 76.16 ppm), o del  $\text{CHCl}_3$  residual ( $^1\text{H}$ , 7.26 ppm).

### 1.7.7. Cromatografía de Gases (CG)

Los análisis de cromatografía de gases (CG) para las reacciones aza-Michael promiscuas entre aminas secundarias y acrilonitrilo se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6860 con un detector de ionización de llama utilizando una columna HP-1 (30 m x 0.320 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ) para la medida del valor de la conversión de reacción.

Las condiciones de CG y los tiempos de retención para los aductos aza-Michael **17-19** y para el anisol que actúa de patrón interno se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Separación analítica por CG del patrón interno (anisol) y de los aductos tipo Michael **17-19**.<sup>a</sup>

Compuesto	<i>t</i> (min)
Anisol (patrón interno)	1.8
<b>17</b>	3.1
<b>18</b>	3.7
<b>19</b>	2.4

<sup>a</sup> Ti (60 °C)//tiempo (0 min)//rampa (20 °C/min)//Tf (260 °C)//tiempo (0 min).

### 1.7.8. Rotación Óptica Específica

Las rotaciones ópticas específicas se han medido con un polarímetro Perkin-Elmer 241 a 590 nm (unidades  $10^{-1} \text{ cm}^2 \times \text{grado} \times \text{g}^{-1}$ ), empleando la lámpara de sodio (D).

## 1.8. Procedimientos Sintéticos

### 1.8.1. Adición Aldólica entre 4-Nitrobenzaldehído (1) y Acetona (2)

Una suspensión de Alcalasa-CLEA® (55 mg) y 4-nitrobenzaldehído (1, 50 mg, 0.33 mmol) en acetona (2, 3.3 mL, 45 mmol) y se agita a 30-60 °C y 250 rpm durante 48 h. En algunos casos especificados en la Tabla 2 se adicionó un 20% de H<sub>2</sub>O a la suspensión. La enzima se filtra y se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 5 mL). El disolvente se elimina por evaporación a presión reducida y el crudo de reacción resultante se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (40% AcOEt/hexano), aislándose la β-hidroxicetona **3** como un sólido amarillento (ver Tabla 2).

### 1.8.2. Reacción de Henry entre 4-Nitrobenzaldehído (1) y Nitrometano (5)

Una suspensión de Alcalasa-CLEA® (55 mg) y 4-nitrobenzaldehído (1, 50 mg, 0.33 mmol) en nitrometano (5, 3.3 mL, 61.5 mmol) se agita a 30-60 °C y 250 rpm durante 48 h bajo atmósfera de nitrógeno. La enzima se filtra y se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 5 mL). El disolvente se elimina por evaporación a presión reducida y el crudo de reacción resultante se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (30% AcOEt/hexano), aislándose el nitroalcohol racémico **6** como un sólido amarillento y producto mayoritario. Dependiendo de las condiciones de reacción, se observa la formación de los nitrocompuestos **7** y **8** como subproductos (ver Tabla 3).

### **1.8.3. Reacción de Baylis-Hillman entre 4-Nitrobenzaldehído (1) y Metil Vinil Cetona (9)**

Sobre una mezcla formada por una disolución reguladora de fosfatos pH 7 (1 mL), 4-nitrobenzaldehído (1, 15 mg, 0.10 mmol) y MeCN (0.5 mL) se añaden, sucesivamente, la Alcalasa-CLEA® (55 mg) y una disolución de metil vinil cetona (9, 8.2  $\mu$ L, 0.10 mmol) en MeCN (0.5 mL). La mezcla se agita a 30-60 °C y 250 rpm durante 48 h, tiempo tras el cual se filtra la enzima. El acetonitrilo se elimina por evaporación a presión reducida y la fase acuosa resultante se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 10 mL). Las fases orgánicas se combinan, se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose un crudo de reacción donde está presente el aducto Baylis-Hillman 10 (ver Tabla 4).

### **1.8.4. Reacción de Mannich entre 4-Nitrobenzaldehído (1), Acetona (2) y Anilina (11)**

A una disolución de anilina (11, 33  $\mu$ L, 0.363 mmol) en acetona (2, 3.3 mL, 45 mmol) se añaden, sucesivamente, agua (3.3 mL), 4-nitrobenzaldehído (1, 50 mg, 0.33 mmol) y la Alcalasa-CLEA® (33 mg). La reacción se agita a 30-60 °C y 250 rpm durante 48 h y, pasado ese tiempo, se filtra la enzima. La acetona se elimina por evaporación a presión reducida y la fase acuosa resultante se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 10 mL). Las fases orgánicas se combinan, se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el disolvente se elimina por evaporación a presión reducida, obteniéndose un crudo de reacción que se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (20-40% AcOEt/hexano), aislándose el aducto de Mannich 12 como un aceite coloreado y la  $\beta$ -hidroxicetona 3 como un sólido amarillento (ver Tabla 5).

### 1.8.5. Reacción de Aza-Michael entre Aminas Secundarias 13-15 y Acrilonitrilo (16)

Una suspensión de la Alcalasa-CLEA® (100 mg) y la correspondiente amina **13-15** (0.15 mmol para pirrolidina y piperidina y 0.30 mmol para dietilamina) en tolueno seco (3 mL para **13** y **14** o 1 mL para **15**) se agita a 250 rpm durante 5 min. Después de ese tiempo se añaden 25 µL de una disolución formada por anisol (403.9 mg, 3.88 mmol) y acrilonitrilo (**16**, 10 mL, 152.66 mmol) y se agita orbitalmente a 30 °C y 250 rpm. A continuación, se hace un seguimiento periódico de los procesos enzimáticos tomando alícuotas que se inyectan en el CG con el fin de calcular la conversión del proceso (ver Figura 6, 7 y 8).

### 1.8.6. Procesos de Desnaturalización

#### 1.8.6.1. Desnaturalización de la Alcalasa-CLEA® con H<sub>2</sub>O

Una suspensión de la Alcalasa-CLEA® (300 mg) en H<sub>2</sub>O (15 mL) se calienta a 150 °C con agitación magnética durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se deja enfriar la muestra a temperatura ambiente, filtrando el catalizador que se seca a presión reducida, y de esta manera puede ser utilizado para los experimentos que implican el uso de la enzima desnaturalizada.

#### 1.8.6.2. Desnaturalización de la Alcalasa-CLEA® con Urea

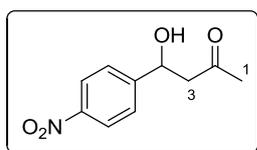
Una suspensión de la Alcalasa-CLEA® (300 mg) y urea (50 mg, 0.83 mmol) en H<sub>2</sub>O (15 mL) se calienta a 150 °C con agitación magnética durante 72 h. Transcurrido ese tiempo se deja enfriar la muestra a temperatura ambiente, filtrando el catalizador que se seca a presión reducida, y de esta manera puede ser utilizado para los experimentos que implican el uso de la enzima desnaturalizada.

### 1.8.6.3. Inhibición de la Alcalasa-CLEA® con PMSF

Una suspensión de la Alcalasa-CLEA® (150 mg) y PMSF (65 mg, 0.375 mmol) en hexano (15 mL) se agita orbitalmente a 30 °C y 250 rpm durante 16 h. Transcurrido ese tiempo, se filtra la enzima, se lava con hexano y, posteriormente, se seca a vacío, pudiendo de esta manera ser utilizado para los experimentos que implican el uso de la enzima inhibida.

## 1.9. Datos Experimentales

### 4-Hidroxi-4-(4-nitrofenil)butan-2-ona (3)



**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>

**Aspecto Físico:** Sólido amarillento

**R<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.20

**Peso Molecular:** 209.20 g/mol

**Pf:** 60-62 °C

**IR** (KBr):  $\nu$  3440, 1711, 1518, 1347 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.22 (s, 3H, H<sub>1</sub>), 2.84-2.87 (m, 2H, H<sub>3</sub>), 3.63 (sa, 1H, OH), 5.26 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.4 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.56 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, 2H, Ar), 8.21 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.0 Hz, 2H, Ar) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  31.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>), 51.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>), 69.3 (CH, C<sub>4</sub>), 124.2 (2CH, Ar), 126.8 (2CH, Ar), 147.7 (C, Ar), 150.4 (C, Ar), 208.9 (C, C<sub>2</sub>) ppm

**EM** (APCI<sup>+</sup>, m/z): 232 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = +12.1$  (*c* 1, CHCl<sub>3</sub>) [para (*R*)-3 en 13% *ee*] [lit.  $[\alpha]_D^{20} = +58.6$  (*c* 1, CHCl<sub>3</sub>) para (*R*)-3 en 74% *ee*]<sup>86</sup>

#### Separación analítica quiral de 3 (HPLC):

Columna: Chiralpak AS

Temperatura: 30 °C

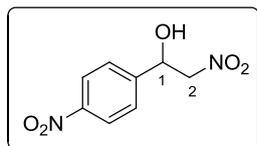
Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 80:20

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*R*) = 16.0 min, *t<sub>R</sub>* (*S*) = 22.2 min

<sup>86</sup> H. Inoue, M. Kikuchi, J.-i. Ito, N. Nishiyama, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 493-499.

### 2-Nitro-1-(4-nitrofenil)etanol (6)



**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

**Aspecto Físico:** Sólido amarillento

**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt/hexano): 0.25

**Peso Molecular:** 212.16 g/mol

**Pf:** 84-85 °C

**IR** (KBr):  $\nu$  3512, 1558, 1519, 1350 cm<sup>-1</sup>

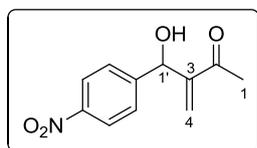
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  3.31 (sa, 1H, OH), 4.58-4.61 (m, 2H, H<sub>2</sub>), 5.63-5.68 (m, 1H, H<sub>1</sub>), 7.64 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 2H, Ar), 8.26 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.0 Hz, 2H, Ar) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  70.4 (CH, C<sub>1</sub>), 81.0 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 125.5 (2CH, Ar), 127.4 (2CH, Ar), 145.5 (C, Ar), 148.5 (C, Ar) ppm

**EM** (APCI<sup>+</sup>, m/z): 195 [(M-H<sub>2</sub>O+H)<sup>+</sup>, 100%]

---

### 3-[Hidroxi(4-nitrofenil)metil]but-3-en-2-ona (10)



**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt/hexano): 0.12

**Peso Molecular:** 221.21 g/mol

**Pf:** 67-69 °C

**IR** (KBr):  $\nu$  3438, 1675, 1522, 1348 cm<sup>-1</sup>

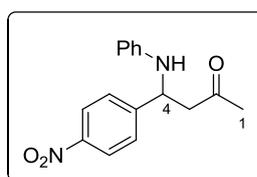
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.34 (s, 3H, H<sub>1</sub>), 3.46 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.5 Hz, 1H, OH), 5.67 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.0 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 6.05 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 6.27 (s, 1H, H<sub>4</sub>), 7.53 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.8 Hz, 2H, Ar), 8.15 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.0 Hz, 2H, Ar) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  26.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>), 72.6 (CH, C<sub>1</sub>), 124.0 (2CH, Ar), 127.7 (2CH, Ar), 128.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>), 147.7 (C, Ar), 149.4 (2C, Ar y C<sub>3</sub>), 200.5 (C, C<sub>2</sub>) ppm

**EM** (APCI<sup>+</sup>, m/z): 314 (100%), 244 [(M+Na)<sup>+</sup>, 45%]

---

### 4-(4-Nitrofenil)-4-(fenilamino)butan-2-ona (12)



**Fórmula empírica:** C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**Aspecto Físico:** Aceite amarillento

**R<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.44

**Peso Molecular:** 284.31 g/mol

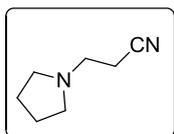
**IR** (NaCl):  $\nu$  3055, 1715, 1603, 1524, 1348, 1265  $\text{cm}^{-1}$

**$^1\text{H}$ -RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 300.13 MHz):  $\delta$  2.17 (s, 3H,  $\text{H}_1$ ), 3.00 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.2$  Hz, 2H,  $\text{H}_3$ ), 4.61 (sa, 1H, NH), 4.95 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 6.2$  Hz, 1H,  $\text{H}_4$ ), 6.52 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 8.8$  Hz, 2H, Ar), 6.74 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 7.3$  Hz, 1H, Ar), 7.10-7.16 (m, 2H, Ar), 7.58 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 8.8$  Hz, 2H, Ar), 8.20 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 8.9$  Hz, 2H, Ar) ppm

**$^{13}\text{C}$ -RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 75.5 MHz):  $\delta$  30.6 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_1$ ), 50.5 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_3$ ), 53.7 (CH,  $\text{C}_4$ ), 113.7 (2CH, Ar), 118.5 (CH, Ar), 124.0 (2CH, Ar), 127.3 (2CH, Ar), 129.2 (2CH, Ar), 146.0 (C, Ar), 147.2 (C, Ar), 150.3 (C, Ar), 205.9 (C,  $\text{C}_3$ ) ppm

**EM** (APCI<sup>+</sup>, m/z): 307 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

**3-(Pirrolidin-1-il)propanonitrilo (17)**



**Fórmula empírica:**  $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{N}_2$

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**$R_f$**  (Acetona): 0.31 **Peso Molecular:** 124.18 g/mol

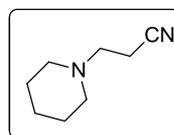
**IR** (NaCl):  $\nu$  2936, 2801, 2248, 1462  $\text{cm}^{-1}$

**$^1\text{H}$ -RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 300.13 MHz):  $\delta$  1.45-1.55 (m, 4H), 2.20-2.29 (m, 6H), 2.46 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 7.2$  Hz, 2H) ppm

**$^{13}\text{C}$ -RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 75.5 MHz):  $\delta$  17.7 ( $\text{CH}_2$ ), 23.7 (2 $\text{CH}_2$ ), 51.4 ( $\text{CH}_2$ ), 53.8 (2 $\text{CH}_2$ ), 119.2 (C) ppm

**EM** (APCI<sup>+</sup>, m/z): 147 [(M+Na)<sup>+</sup>, 40%], 125 [(M+H)<sup>+</sup>, 100%]

**3-(Piperidin-1-il)propanonitrilo (18)**



**Fórmula empírica:**  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2$

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**$R_f$**  (Acetona): 0.63

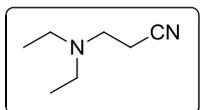
**Peso Molecular:** 138.21 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  2937, 2739, 2249, 1469, 1443  $\text{cm}^{-1}$

**$^1\text{H}$ -RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 300.13 MHz):  $\delta$  1.19-1.25 (m, 2H), 1.33-1.40 (m, 4H), 2.21 (t,  $^3J_{\text{HH}} = 5.2$  Hz, 4H), 2.26-2.46 (m, 4H) ppm

**$^{13}\text{C}$ -RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 75.5 MHz):  $\delta$  15.9 ( $\text{CH}_2$ ), 24.4 ( $\text{CH}_2$ ), 26.1 (2 $\text{CH}_2$ ), 54.2 (2 $\text{CH}_2$ ), 54.3 ( $\text{CH}_2$ ), 119.3 (C) ppm

**EM** (APCI<sup>+</sup>, m/z): 161 [(M+Na)<sup>+</sup>, 60%], 139 [(M+H)<sup>+</sup>, 100%]



**3-(Dietilamino)propanonitrilo (19)**

**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

***R<sub>f</sub>*** (Acetona): 0.47

**Peso Molecular:** 126.12 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  2972, 2875, 2248, 1468 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  0.84 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, 6H), 2.24 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, 2H), 2.35 (c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, 4H), 2.58 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, 2H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  12.2 (2CH<sub>3</sub>), 16.5 (CH<sub>2</sub>), 47.0 (2CH<sub>2</sub>), 48.6 (CH<sub>2</sub>), 119.4 (C) ppm

**EM** (APCI<sup>+</sup>, m/z): 149 [(M+Na)<sup>+</sup>, 30%], 127 [(M+H)<sup>+</sup>, 100%]

## **BLOQUE II**

DESARROLLO DE PROCESOS  
QUIMIOENZIMÁTICOS ASIMÉTRICOS PARA LA  
SÍNTESIS DE HETEROCICLOS NITROGENADOS



# INTRODUCCIÓN



## II.1. Otras Hidrolasas: Lipasas

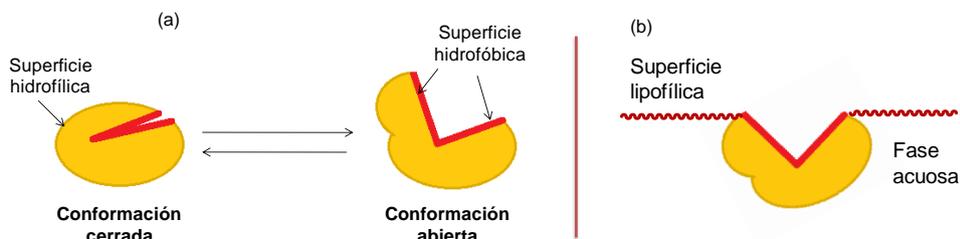
Las lipasas (EC 3.1.1.x, triacilglicerol hidrolasas) son enzimas pertenecientes a la familia de las serín-hidrolasas que catalizan la conversión de triglicéridos en ácidos grasos y glicerol o sus derivados. En la naturaleza, estos biocatalizadores se distribuyen en animales, plantas y microorganismos como enzimas digestivas que facilitan el transporte, deposición y movilización de grasas. En humanos y animales superiores desempeñan un papel esencial en el proceso nutricional, encargándose de hidrolizar los triacilglicéridos ingeridos en la dieta, y que no pueden atravesar las paredes intestinales para su posterior aprovechamiento en la producción de energía química.

Mientras que las esterasas son enzimas que hidrolizan todo tipo de ésteres, la subfamilia de lipasas evolucionó específicamente hacia la hidrólisis de lípidos, lo que ha hecho que muchos autores consideren lipasas y esterasas como dos tipos distintos de enzimas. Además de haber encontrado aplicación en diversas áreas como la industria alimentaria, farmacéutica o tecnológica,<sup>87</sup> las lipasas son las hidrolasas más utilizadas en síntesis orgánica para la producción de compuestos ópticamente activos. Entre otras ventajas, su elevada estabilidad, su capacidad para aceptar una amplia variedad de sustratos y el hecho de no necesitar cofactor para su correcto funcionamiento, han sido determinantes para facilitar su extenso desarrollo.

---

<sup>87</sup> a) R. D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608-1633; b) A. Pandey, S. Benjamin, C. R. Soccol, P. Nigam, N. Krieger, V. T. Soccol, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1999**, *29*, 119-131; c) K.-E. Jaeger, T. Eggert, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 390-397; d) V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *40*, 111-120; e) B. Joseph, P. W. Ramteke, G. Thomas, *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 457-470; f) S. D. Schreck, A. M. Grunden, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 1011-1021.

Los aspectos mecanísticos de las reacciones catalizadas por lipasas convergen con los correspondientes de las proteasas serínicas, por lo que no se redundará en este apartado en los detalles ya explicados relativos a la naturaleza y actuación de la tríada catalítica del centro activo. Por el contrario, las propiedades fisicoquímicas de las lipasas son una característica fundamental de este tipo de enzimas que las diferencia de otras esterasas y que es el resultado de su función natural de hidrólisis de lípidos.<sup>87a,88</sup> Así, las lipasas presentan una superficie hidrofílica que provoca que, en un primer momento, el centro activo se encuentre bloqueado por residuos no polares de la cadena polipeptídica. Cuando la concentración de sustrato sobrepasa el límite de solubilidad (concentración micelar crítica) y comienza a formarse una segunda fase lipofílica, se produce un cambio conformacional que permite el acceso al centro activo, observándose un acusado aumento en la actividad de la enzima (Figura 9a).



**Figura 9.** Activación interfacial de las lipasas. (a) Cambio conformacional del centro activo para la catálisis; (b) orientación de la lipasa en la que el centro activo se dirige a la superficie lipofílica (disolvente orgánico o elevadas concentraciones de sustrato).

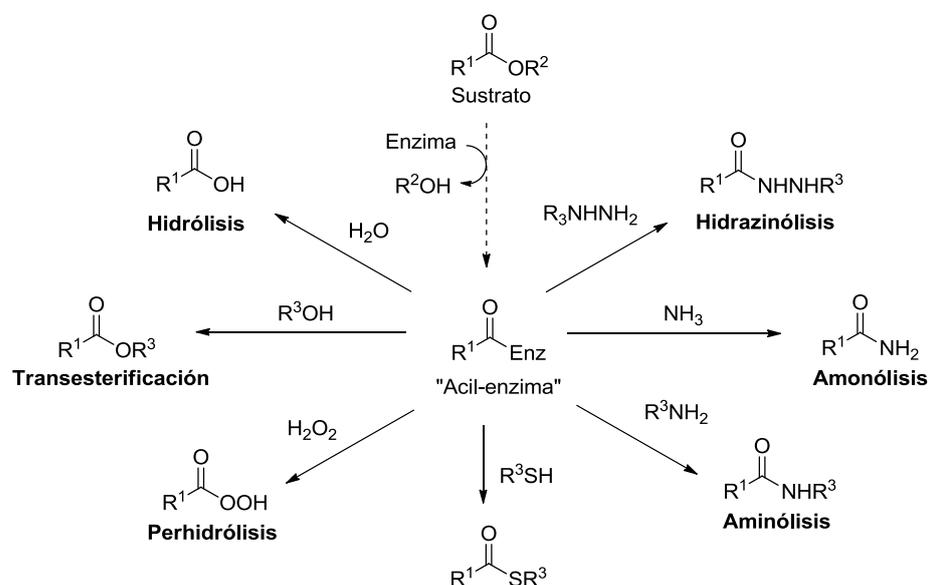
Este proceso de reorganización estructural en las inmediaciones del centro activo es conocido como activación interfacial, y es la causa de la actividad distintiva que presentan las lipasas en mezclas bifásicas. De hecho, la superficie lipofílica puede derivar no solo de las altas concentraciones de sustrato, sino que puede ser el propio disolvente

---

<sup>88</sup> a) A. M. Klibanov, *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 141-144; b) M. Paravidino, P. Böhm, H. Gröger, U. Hanefeld, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 251-362.

orgánico, de tal manera que el centro activo se orienta hacia esta fase tras producirse la retirada de los residuos que lo mantienen bloqueado (Figura 9b).

Gracias a esta orientación, es posible reemplazar el nucleófilo natural de las lipasas (agua) por una gran variedad de nucleófilos orgánicos como aminas, amoníaco, tioles, peróxidos, hidrazinas, etc (Esquema 29).<sup>89</sup> El hecho de que las lipasas actúen en la interfase agua-lípido tiene la ventaja añadida de que no requieren sustratos especialmente solubles en agua e incluso algunas de ellas presentan afinidad por medios hidrofóbicos.<sup>90</sup>



**Esquema 29.** Transformaciones catalizadas por lipasas.

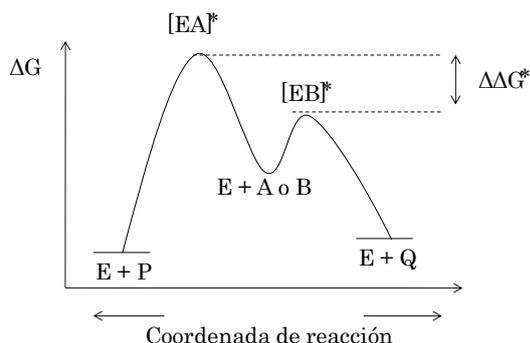
### II.1.1. Aspectos Cinéticos

En los procesos biocatalíticos, una enzima (E) acelera la reacción disminuyendo la barrera energética entre el sustrato (S) y el producto

<sup>89</sup> a) V. Gotor, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 2189-2197; b) S. M. Roberts, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2001**, 1475-1499.

<sup>90</sup> S. Sharma, S. S: Kanwar, *Sci. World J.* **2014**, 625258/1-625258/16.

(P), conocida como energía de activación ( $E_a$ ). La capacidad enzimática para acelerar la reacción ha sido atribuida a la estabilización del estado de transición por parte de la enzima. En un proceso enantioselectivo, cada enantiómero (A y B) forma un complejo enzima-sustrato en el estado de transición diferenciado debido al entorno quiral del centro activo ( $[EA]^\ddagger$  y  $[EB]^\ddagger$ ), lo que se conoce como estados de transición diastereoméricos, cada uno de los cuales presenta una energía libre particular (Figura 10). Esto deriva en una diferencia de energía entre ambos estados ( $\Delta\Delta G^\ddagger$ ) que permite la discriminación enantiomérica hacia la transformación más favorable de uno de los enantiómeros.<sup>91</sup>



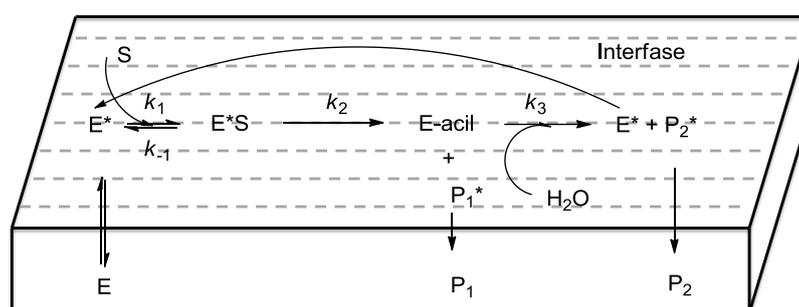
**Figura 10.** Diagrama de energía para una reacción enzimática estereoselectiva.

Actualmente, está ampliamente aceptado que las reacciones catalizadas por lipasas pueden describirse mediante un sistema ping-pong bi-bi donde se establece que los sustratos se unen a través de la formación del intermedio acil-enzima, así como la secuencia con que lo hacen.<sup>92</sup> Sin embargo, cuando la catálisis con lipasas tiene lugar en sistemas multifásicos se emplean modelos cinéticos alternativos basados en el de Michaelis-Menten (Figura 11). En un enfoque típico en dos dimensiones, la lipasa se sitúa en una interfase agua/disolvente orgánico dando lugar a la enzima en un estado energético más favorable ( $E^*$ ), que

<sup>91</sup> K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 5<sup>th</sup> Ed., Springer, New York, 2004, pp. 1-28.

<sup>92</sup> P.-Y. Stergiou, A. Foukis, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L. G. Theodorou, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, E. M. Papamichael, *Biotechnol. Adv.* 2013, 31, 1846-1859.

se une al sustrato formando el complejo E\*S. Tras la subsiguiente descomposición de dicho complejo, los productos P<sub>1</sub>\* y P<sub>2</sub>\* formados difunden hasta la fase acuosa.<sup>93</sup>



**Figura 11.** Esquema modelo de una reacción de hidrólisis en la interfase lipofílica siguiendo un mecanismo de Michaelis-Menten.

### II.1.2. Lipasas como Biocatalizadores: Principales Procesos Asimétricos

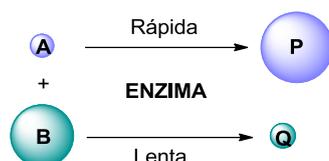
En este apartado, se comentarán brevemente los principales procesos estereoselectivos que han sido desarrollados empleando lipasas como catalizadores por su conexión con las reacciones estudiadas en este Bloque, si bien cabe mencionar que estas biotransformaciones genéricas serían extensibles a otras hidrolasas, e incluso a otras enzimas no hidrolíticas.<sup>94</sup>

Las **resoluciones cinéticas** (*kinetic resolutions*, KRs) tienen como fundamento las diferencias de velocidad en la transformación de ambos enantiómeros de un sustrato racémico (A y B) en los correspondientes enantiómeros de los productos (P y Q, Figura 12). En un caso ideal, la presencia del enantiómero minoritario (Q) sería nula, obteniéndose tras

<sup>93</sup> A. Aloulou, J. A. Rodríguez, S. Fernandez, D. van Oosterhout, D. Puccinelli, F. Carrière, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, 1761, 995-1013.

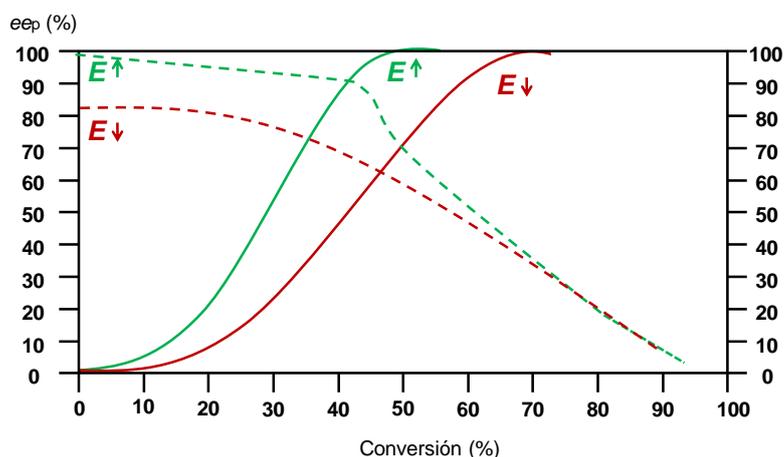
<sup>94</sup> a) E. García-Urdiales, I. Lavandera, V. Gotor, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 43-66; b) R. L. O. R. Cunha, E. A. Ferreira, C. S. Oliveira, A. T. Otori, *Biotechnol. Adv.* **2015**, en prensa, 10.1016/j.biotechadv.2014.12.009; c) M. Rachwalski, N. Vermue, F. P. J. T. Rutjes, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, 42, 9268-9282.

la resolución un máximo del 50% de rendimiento tanto del producto mayoritario (P) enantiopuro como del sustrato remanente (B).



**Figura 12.** Representación esquemática de un proceso de KR.

El progreso del  $ee$  del producto ( $ee_p$ ) y del sustrato ( $ee_s$ ) frente al grado de conversión ( $c$ ) para una KR se recoge en la Figura 13. En la fase inicial de la reacción, el producto presenta un  $ee_p$  elevado, que va disminuyendo con el transcurso de la resolución a la par que el sustrato va enriqueciéndose en el enantiómero que reacciona más lentamente, lo que a su vez aumenta la probabilidad de que éste sea transformado. Así, el  $ee_s$  va incrementándose con el tiempo, siendo la velocidad de reacción cada vez menor.



**Figura 13.** Representación de la evolución de  $ee_s$  (líneas continuas) y  $ee_p$  (líneas discontinuas) en función de la conversión en una KR enzimática, para una  $E$  mayor (verde) o menor (roja).

La pureza óptica es, por tanto, función de la conversión. El parámetro que describe la estereoselectividad del proceso se denomina enantioselectividad o razón enantiomérica  $E$ , una variable adimensional

cuyo valor se define como la relación entre las constantes específicas de los dos enantiómeros (Ecuación 1).

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

**Ecuación 1.** Fórmula de la razón enantiomérica en función de la constante de velocidad ( $k_{cat}$ ) y la constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ).

En la práctica, el cálculo de la razón enantiomérica se realiza por combinación de las variables  $c$ ,  $ee_s$  y  $ee_p$  (Ecuación 2), cuya medida resulta más fácil y accesible empleando distintas técnicas experimentales (HPLC, CG o RMN). Es importante señalar que estas ecuaciones son válidas para procesos con cinéticas irreversibles y reacciones limpias, ya que los valores de conversión podrían ser engañosos en presencia de reacciones secundarias.

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

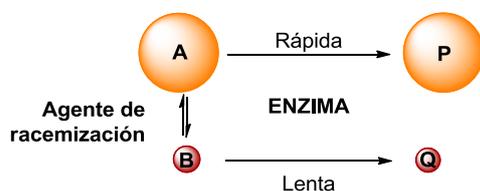
**Ecuación 2.** Fórmula de la razón enantiomérica en función de la conversión y los excesos enantioméricos de sustrato o de producto. Definición de la conversión en función de los excesos enantioméricos de sustrato y producto.

El umbral en el que una resolución cinética se considera “buena o mala” según la medida de la enantioselectividad es un poco difuso y dependiente de la valoración de los autores. En cualquier caso, conversiones próximas a la ideal del 50% implicarán buenos excesos enantioméricos, siendo excelentes aquellos procesos con  $E$  superiores a 200. Ese valor ha sido establecido como un máximo a partir del cual se consideran “ $E > 200$ ”, debido a que son posibles pequeños errores de medida que provocarían grandes cambios en la  $E$ .

Cuando los sustratos de una reacción son compuestos simétricos (proquirales o *meso*), las enzimas son capaces de introducir una modificación selectiva que elimine la simetría, permitiendo obtener un rendimiento teórico del 100% en un proceso conocido como **desimetrización** enzimática estereoselectiva (*stereoselective enzymatic*

*desymmetrization*, SED) encuadrado dentro del campo de la síntesis asimétrica.<sup>95</sup> Desde un punto de vista mecanístico, las KR y las SEDs son similares, pues a pesar de no existir enantiómeros en los sustratos simétricos, sus grupos o caras enantiotópicas presentan estados de transición diastereoméricos, que conceptualmente son idénticos a los enantiómeros de un racemato ( $[EA]^\ddagger$  y  $[EB]^\ddagger$ ).

Otra estrategia que potencia la eficiencia de las metodologías enzimáticas para la obtención de compuestos enantiopuros permitiendo alcanzar rendimientos teóricos del 100% son las **resoluciones cinéticas dinámicas** (*dynamic kinetic resolutions*, DKRs), en las que tiene lugar de manera simultánea la KR de la mezcla racémica y la racemización del sustrato remanente (Figura 14).<sup>96</sup>



**Figura 14.** Representación básica de un proceso de DKR.

Para conseguir un proceso de DKR eficiente son necesarios una serie de requisitos. En primer lugar, la KR debe ser suficientemente enantioselectiva ( $k_{\text{rápida}}/k_{\text{lenta}} \geq 20$ ). En cuanto al proceso de racemización, éste debe ser al menos 10 veces más rápido que la transformación del enantiómero desfavorecido (B) al producto (Q), sin dar lugar a reacciones secundarias en el proceso principal de resolución. La interconversión entre ambos enantiómeros del racemato puede ocurrir de forma espontánea, pero una gran mayoría de ejemplos emplean un agente de racemización que puede ser un catalizador metálico, orgánico o enzimático, pero que en cualquier caso debe ser

<sup>95</sup> E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, PR110-PR180.

<sup>96</sup> a) A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor, *Curr. Green Chem.* **2015**, *2*, 192-211; b) O. Verho, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3996-4009; c) A. S. de Miranda, L. S. M. Miranda, R. O. M. A. de Souza, *Biotechnol. Adv.* **2015**, en prensa, 10.1016/j.biotechadv.2015.02.015.

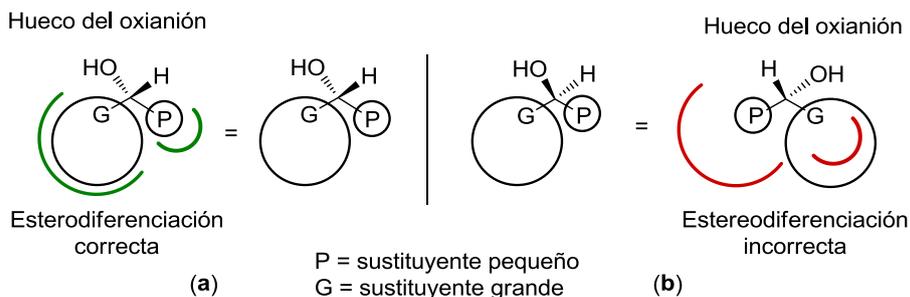
compatible con la KR enzimática, lo que generalmente es un punto crítico en el diseño del proceso.

### **II.1.3. Reconocimiento Quiral**

La capacidad de las lipasas para diferenciar entre ambos enantiómeros de un racemato ha sido recogida en distintos modelos y reglas empíricas con la intención de ayudar a predecir la estereopreferencia en los procesos de resolución. Entre ellos, el más utilizado fue descrito por Kazlauskas y colaboradores para alcoholes secundarios en reacciones catalizadas por lipasas, designando este comportamiento de un modo empírico, con una regla que lleva su nombre.<sup>97</sup> A pesar de ser una metodología relativa, en muchas ocasiones ha sido utilizada para la asignación de la configuración absoluta, bien por sí sola o complementando la información obtenida mediante otras técnicas. Así, la regla de Kazlauskas predice el enantiómero que reaccionará más rápido en función del tamaño de los sustituyentes, en relación con la capacidad de los huecos del centro activo de estas enzimas. Para un sustrato que posee un sustituyente grande y otro pequeño se asume que la disposición se corresponderá con el hueco grande y pequeño, respectivamente, del centro activo de la lipasa (Figura 15). La disposición contraria obligaría a acomodar el sustituyente grande en el hueco pequeño del oxianión, lo que originaría repulsiones estéricas significativas que impedirían la catálisis o, al menos, ralentizarían lo suficiente la reacción de ese enantiómero para observar la estereodiferenciación característica de las lipasas.

---

<sup>97</sup> a) R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665; b) Q. Jing, R. J. Kazlauskas, *Chirality* **2008**, *20*, 724-735.



**Figura 15.** Regla empírica de Kazlauskas para la predicción de la enantioselectividad de un proceso catalizado por lipasas. (a) Disposición aceptada por la enzima; (b) enantiómero que reacciona más lentamente.

Esta regla es útil también para la elección de los sustratos a la hora de diseñar un proceso, ya que como consecuencia del tamaño de los huecos del centro activo las conversiones para alcoholes secundarios con dos grupos relativamente grandes serán bajas al igual que su selectividad, mientras que alcoholes secundarios con dos sustituyentes relativamente pequeños reaccionarán rápido y, nuevamente, con baja enantioselectividad. Sin embargo, gracias a las técnicas de evolución dirigida estas limitaciones pueden superarse mediante modificaciones de los residuos de aminoácidos que forman el centro activo de las lipasas, dando lugar a la creación de nuevas enzimas adaptadas a las necesidades de cada proceso.<sup>98</sup>

Tanto para las reacciones químicas como enzimáticas, la pureza enantiomérica de un compuesto quiral se expresa en términos del valor de su exceso enantiomérico (Ecuación 3), donde  $[R]$  es la concentración del enantiómero de configuración  $R$ , y  $[S]$  la correspondiente al enantiómero  $S$ . Así, para un compuesto racémico el valor del  $ee$  es cero, mientras que para uno enantioméricamente puro el  $ee$  alcanza el 100%.

<sup>98</sup> a) M. T. Reetz, M. Puls, J. D. Carballeira, A. Vogel, K.-E. Jaeger, T. Eggert, W. Thiel, M. Bocola, N. Otte, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 106-112; b) B. Ravi, U. Banerjee, S. Mehrotra, R. Mehrotra, *Curr. Chem. Biol.* **2013**, *7*, 114-120.

$$\%ee_R = \frac{[R]-[S]}{[R]+[S]} \times 100$$

**Ecuación 3.** Medida del exceso enantiomérico de un producto para  $[R]>[S]$ .

## II.2. Oxidorreductasas: Alcohol Deshidrogenasas

Las oxidorreductasas constituyen la clase de enzimas EC 1 y se clasifican en cuatro grandes grupos: deshidrogenasas, oxigenasas, oxidasas y peroxidasas.<sup>99</sup> Como su nombre indica, las oxidorreductasas catalizan reacciones redox de transferencia de electrones, un tipo de proceso esencial para la vida y una parte fundamental del metabolismo por su participación en procesos como la respiración celular o la fotosíntesis. Un aspecto destacado de estas enzimas es su capacidad para catalizar la formación de productos enantioenriquecidos desde sustratos proquirales con un rendimiento teórico del 100%.

Las alcohol deshidrogenasas (ADHs, EC 1.1.1.X) son oxidorreductasas dependientes de un cofactor, generalmente nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP<sup>+</sup>), que catalizan la reducción reversible de un grupo carbonilo a través de la transferencia de electrones desde una molécula dadora a una molécula aceptora. La ganancia o pérdida de electrones va acompañada de la transferencia de un protón, lo que supone que durante el proceso puede incorporarse un hidruro al grupo carbonilo de una cetona o aldehído, o bien puede abstraerse de un alcohol.

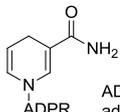
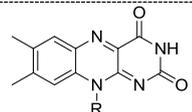
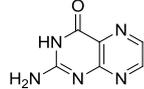
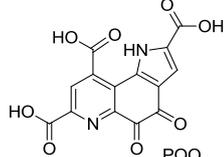
En función del grupo prostético de las deshidrogenasas, éstas pueden clasificarse en cinco categorías que se encuentran recogidas en la Tabla 9.<sup>99c</sup> Dentro de ellas, las ADHs dependientes de Zn son las más comúnmente empleadas con fines sintéticos, y se encuentran a su vez

<sup>99</sup> a) M. Hall, A. S. Bommarius, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4088-4110; b) D. Monti, G. Ottolina, G. Carrea, S. Riva, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4111-4140; c) D. Gaménara, G. A. Seoane, P. Saenz-Méndez, P. D. de María, *Redox Biocatalysis. Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons: Hoboken, 2012.

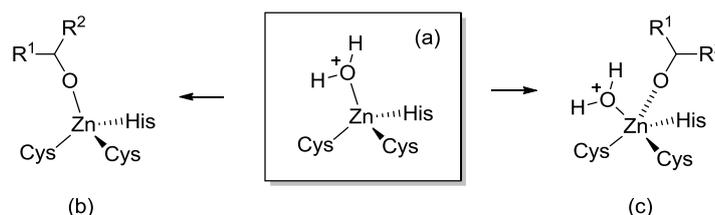
*Bloque II*

agrupadas en ADHs de cadena larga, media o corta de acuerdo con la estructura de los sustratos que aceptan.

**Tabla 9.** Clasificación de las ADHs en función del grupo prostético o cofactor.

Categoría	Grupo prostético/Cofactor	Estructura cofactor
ADHs dependientes de zinc	NAD(P)H	 ADPR: adenosina difosforribosa
Flavoproteína deshidrogenasas	Flavina adenina dinucleótido (FAD)	
ADHs dependientes de pterina	Pterina	
Quinoproteína deshidrogenasas	Aminoácido derivado de la o-quinona	 PQQ
ADHs sin cofactor	--	--

Estas enzimas dependientes de zinc son las responsables de catalizar la oxidación reversible de alcoholes primarios o secundarios formando los correspondientes aldehídos y cetonas, respectivamente. El cofactor NAD(P)H se sitúa en un dominio del centro activo de unión del nucleótido, mientras que en otro dominio catalítico poseen un ion  $Zn^{2+}$  tetracoordinado a tres residuos, dos de cisteína y uno de histidina, y a una molécula de agua (Figura 16a). Se ha propuesto que este intermedio evoluciona hacia los productos por desplazamiento de la molécula de agua por el grupo hidroxilo del alcohol (Figura 16b), o bien a través de un cambio en la coordinación del átomo de zinc dando lugar a especies pentacoordinadas (Figura 16c).



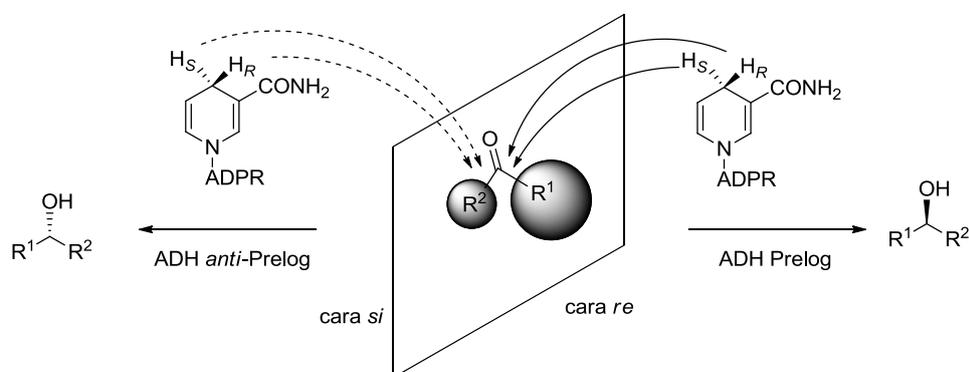
**Figura 16.** Coordinación del zinc propuesta para el mecanismo de las ADHs dependientes de zinc.

Las ADHs dependientes de flavina están involucradas en reacciones de activación con  $O_2$  (por ejemplo, oxidasas) y en ellas el FAD puede unirse de manera covalente o no covalente a la enzima. Las ADHs dependientes de pterina también pertenecen al grupo de enzimas hidroxilantes, utilizando en este caso agua como dador de electrones. Dentro de las distintas clases de cofactores empleados por las quinoproteína deshidrogenasas, la pirroloquinolina quinona (PQQ) es la única que participa en procesos redox, y actúa a través de una unión no covalente con la enzima. Por último, la formiato deshidrogenasa (FDH) es el ejemplo más destacado de ADHs en las que no es necesaria la presencia de metales o grupos prostéticos para la transferencia de electrones, una enzima ampliamente utilizada para la regeneración de cofactores, como se discutirá más adelante en esta sección.

### II.2.1. Reconocimiento Quiral

Las ADHs actúan con una estereoselectividad característica, de tal manera que la adición o abstracción del hidruro tiene lugar únicamente por una de las caras del sustrato y selectivamente a la posición C-4 del anillo de nicotinamida (Figura 17). La capacidad de discriminar entre la cara *re* y la cara *si* de la molécula aceptora ha sido definida dentro de las reglas de Prelog, que llevan el nombre del propio investigador por quien fueron establecidas y que permiten la predicción de la estereoquímica del proceso redox en función del tamaño de los sustituyentes unidos al grupo carbonilo. La enantio pureza del producto es generalmente mayor cuando un sustituyente es grande y otro pequeño, favoreciendo un mejor estereo-reconocimiento por parte de la

enzima. En la práctica, las ADHs que transfieren el átomo de hidrógeno desde la nicotinamida a la cara *re* del sustrato carbonílico son mayoritarias y se denominan ADHs de preferencia Prelog, mientras que aquellas que generan el alcohol de configuración contraria son consideradas de preferencia *anti*-Prelog.



**Figura 17.** Regla de Prelog para explicar la estereopreferencia de una ADH durante la transferencia de hidruro desde el NAD(P)H.  $R^1$ : sustituyente grande;  $R^2$ : sustituyente pequeño.

Esta regla tiene su origen en un modelo empírico. Así, Prelog propuso una estructura para el centro activo de las ADHs por comparación con la estructura de red del diamante,<sup>100</sup> incrementando el tamaño de los sustituyentes de las cetonas proquirales y determinando así la capacidad de aceptación de la enzima y estableciendo los límites en ambas direcciones del centro activo, es decir, midiendo la especificidad de sustrato de estos biocatalizadores. Un par de décadas más tarde, Jones y Jakovac propusieron un modelo más flexible para el centro activo de las ADHs basado en un modelo de sección de espacio cúbico, que validaba la aproximación de Prelog y actuaba satisfactoriamente para otras estructuras.<sup>101</sup> Con el desarrollo del conocimiento, se han determinado cada vez más estructuras por análisis de difracción de rayos X, dando una información más rigurosa acerca del tamaño y disposición del centro activo de estas enzimas.

<sup>100</sup> V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*, 119-130.

<sup>101</sup> J. B. Jones, I. J. Jakovac, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 19-28.

En los últimos años, el gran avance experimentado en las técnicas de modificación ha hecho de la mutagénesis una estrategia habitual para modular la especificidad de sustrato de las ADHs.<sup>102</sup> No solo eso, sino que la mutagénesis dirigida ha sido la metodología más comúnmente empleada para estudiar los mecanismos enzimáticos, para lo cual en muchas ocasiones la estructura cristalina ha servido de guía. Así, además de ayudar al estudio de la estructura y función de la proteína, es posible vislumbrar la acción natural de la misma y desarrollar nuevas capacidades en su modo de actuación.

### **II.2.2. Cofactores y Estrategias de Regeneración**

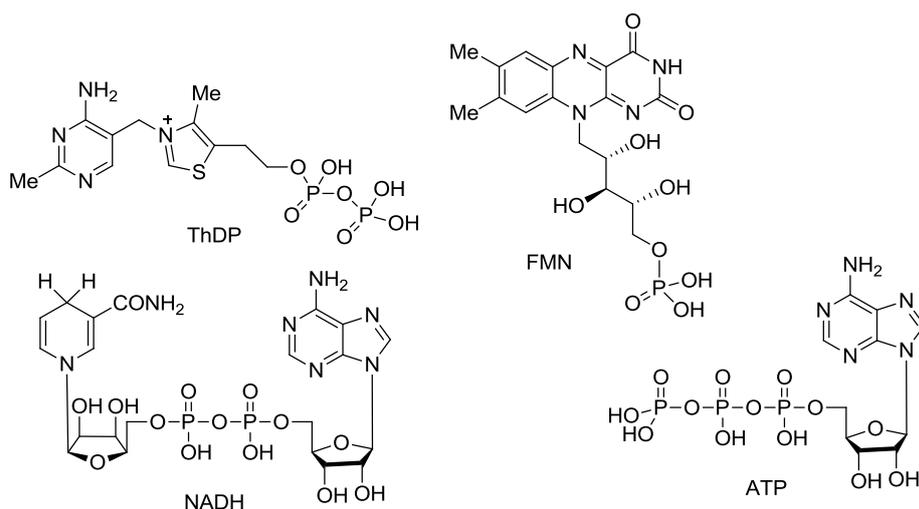
Los cofactores, generalmente coenzimas o iones metálicos, son moléculas de naturaleza no proteica necesarias para el desarrollo de la actividad catalítica de determinadas enzimas, a las cuales se puede unir de manera covalente o difundiendo libremente (Figura 18). En ocasiones, para diferenciar el tipo de unión se denomina grupo prostético a aquellas estructuras unidas covalentemente a la enzima.

Las ADHs son uno de los muchos tipos de enzimas que para su funcionamiento requieren del uso de cofactores, quienes actúan como verdaderos centros activos en los que tiene lugar la transferencia de electrones. De esta dependencia de NAD(P)H surge la necesidad de establecer estrategias de regeneración del cofactor, ya que su empleo en cantidades estequiométricas implicaría costes excesivos e inasumibles para una posible aplicación industrial.<sup>103</sup> De esta manera, lo que *a priori* se considera un inconveniente para las enzimas dependientes de cofactor, deja de ser una limitación si es posible encontrar un sistema de regeneración eficiente y flexible que permita minimizar la cantidad necesaria de dichos cofactores, sin dificultar el aislamiento de los productos y que posibilite, además, el reciclaje de las enzimas haciendo el proceso más económico.

---

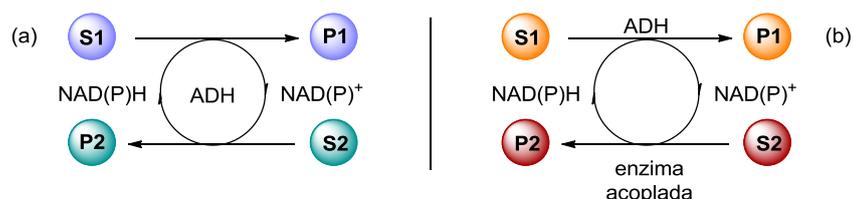
<sup>102</sup> C. M. Nealon, M. M. Musa, J. M. Patel, R. S. Phillips, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 2100-2114.

<sup>103</sup> V. Uppada, S. Bhaduri, S. B. Noronha, *Curr. Sci.* **2014**, *106*, 946-957.



**Figura 18.** Selección ilustrativa de ejemplos de cofactores enzimáticos.

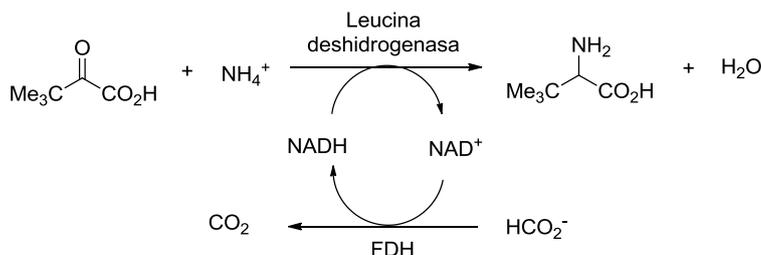
La regeneración ocurre en los organismos vivos mediante el acoplamiento de una complicada red de reacciones redox que mantiene constante el balance entre los cofactores oxidados y reducidos. Imitando a la naturaleza, en lo que se conoce como cascada paralela la formación del producto se acopla con una segunda reacción que trabaja en paralelo de manera que ambas tienen lugar simultáneamente (Figura 19). Esta segunda reacción puede estar catalizada por la enzima responsable de la formación del producto de interés (“metodología del sustrato acoplado”, Figura 19a) o puede darse el caso de que requiera un catalizador independiente (“metodología del enzima acoplado”, Figura 19b). En el primer caso, puesto que tanto la oxidación como la reducción tienen un carácter reversible, deben utilizarse grandes cantidades del cosustrato para desplazar el equilibrio hacia la formación del producto, por lo que lo habitual es emplear un compuesto fácilmente accesible como el 2-propanol o la acetona. Por su parte, en la estrategia del enzima acoplado para garantizar la *cuasi*-irreversibilidad del proceso de la reacción redox la reacción paralela debe encontrarse muy favorecida termodinámicamente.



**Figura 19.** Esquemas de cascadas paralelas que involucran el empleo de ADHs.

El hecho de que las enzimas trabajen en medios de reacción suaves también deriva del propio origen en el que desarrollan sus funciones naturales y que, muchas veces, constituye un entorno similar para distintos biocatalizadores. Por ello es posible hacer compatibles las funciones de distintas enzimas y combinarlas bajo unas condiciones de reacción determinadas, lo que resulta muy útil y determinante para crear sistemas de regeneración de los cofactores. Gracias al concepto, intrínsecamente “verde”, de cascadas enzimáticas en un solo paso desaparece también la necesidad de aislar intermedios, reduciendo los residuos generados en el proceso y aumentando notoriamente la eficiencia del mismo.

Una de las primeras enzimas empleadas para la regeneración del NADH fue la FDH, que utiliza un sustrato barato como es el formiato de sodio o amonio y genera CO<sub>2</sub>. Además de formarse un subproducto gaseoso y, por tanto, fácilmente eliminable del medio, el cambio de entropía positivo de la reacción acoplada hace que sea termodinámicamente favorable. Como ejemplo ilustrativo de la eficiencia catalítica de este sistema, cabe destacar su aplicación industrial a la preparación de la L-leucina trimetilada a partir del ácido trimetil pirúvico y amonio (Esquema 30).



**Esquema 30.** Síntesis industrial de la trimetil L-leucina empleando FDH para la regeneración del catalizador.

Otras enzimas como la glucosa deshidrogenasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, hidrogenasa o lactato deshidrogenasa también se han estudiado ampliamente en la regeneración de cofactores redox.<sup>99a,103</sup> Además, dentro de las estrategias biológicas también se han descrito novedosos ejemplos basados en la elevada eficiencia de biotransformaciones empleando células enteras en las que se lleva a cabo la sobreexpresión de la enzima y el sistema de regeneración en la misma célula huésped. No solo eso, sino que también otros conceptos relacionados con las cascadas enzimáticas, como la ingeniería de los cosustratos o el empleo de cofactores no naturales han experimentado un potente desarrollo en años recientes.<sup>104</sup>

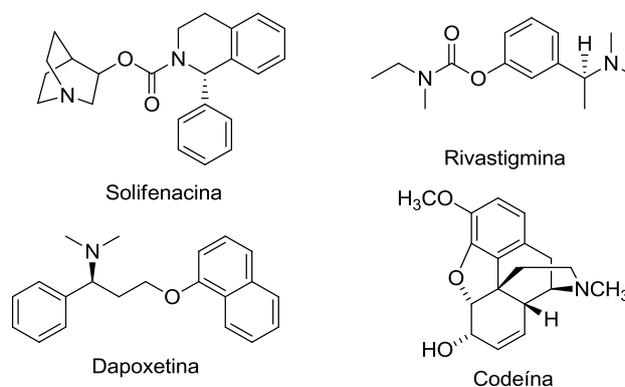
Aunque menos utilizadas, cabe destacar que existen otras metodologías descritas para la reducción u oxidación del NAD(P)<sup>+</sup> o NAD(P)H. En este contexto, los métodos electroquímicos emplean electrodos para proporcionar o aceptar electrones, bien directamente a través de los electrodos (métodos electroquímicos directos), bien mediante el uso de moléculas orgánicas u organometálicas que actúan como mediadores (métodos electroquímicos indirectos). Por último, las estrategias químicas y fotoquímicas utilizan una molécula de hidrógeno como dador de electrones final en vez de un electrodo, transportando los electrones al cofactor por medio de una o más moléculas mediadoras,

<sup>104</sup> S. Kara, J. H. Schrittwieser, F. Hollmann, M. B. Ansorge-Schumacher, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 1517-1529.

que suelen coincidir con las utilizadas en la regeneración electroquímica indirecta.

### II.3. Aminas: Actividad y Aplicabilidad

Las aminas ópticamente activas son compuestos precursores de diversas moléculas de interés para la industria farmacéutica y agroquímica, donde se requiere una elevada pureza química y óptica para relativamente grandes cantidades de producto. De hecho, aproximadamente el 40% de los fármacos que se comercializan actualmente contienen aminas quirales en su estructura (Figura 20).<sup>105</sup> Uno de los motivos para que estos compuestos sean considerados APIs es su gran densidad de información estructural, así como la inherente capacidad de formar puentes de hidrógeno.



**Figura 20.** Selección ilustrativa de ejemplos de fármacos en fase de desarrollo o en fase clínica que contienen aminas quirales en su estructura.

Desde un punto de vista sintético, la importancia de las aminas quirales se focaliza en su empleo como auxiliares quirales, catalizadores asimétricos o agentes de resolución quiral.<sup>106</sup>

<sup>105</sup> M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788-824.

<sup>106</sup> a) F. Andersson, E. Hedenström, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1952-1957; b) Z. Zhang, W. Wu, J. Liao, J. Li, H. Jiang, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 6708-6711; c) M. F. A. Adamo, V. K. Aggarwal, M. A. Sage, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8317-8318; d) X. Pan,

Las distintas estructuras que serán objeto de estudio en este bloque son aminas secundarias de la familia de las indolinas, fosfoindolinas, fosfoisindolinas y benzoxazinas. El interés particular que cada una de ellas presenta se destacará al inicio del correspondiente capítulo.

### **II.3.1. Biocatálisis Aplicada a la Síntesis Selectiva de Aminas**

La síntesis quiral de moléculas bioactivas alcanzó especial relevancia tras el descubrimiento de la diferente respuesta biológica producida por la interacción de los dos enantiómeros de un fármaco con sus biorreceptores.<sup>107</sup> A partir de ese momento, se introdujeron importantes restricciones en las empresas farmacéuticas en las que se exigía la síntesis de un único estereoisómero y la caracterización del efecto de cada enantiómero, comenzando así un incremento exponencial de desarrollo de metodologías de síntesis asimétrica.

La utilidad de las enzimas para sintetizar moléculas ópticamente activas puede extenderse a transformaciones a escala industrial de forma rutinaria para preparar compuestos enantiopuros.<sup>108</sup> De cara a procesos industriales, no solo la selectividad, sino también las condiciones suaves de reacción son una importante aportación de las enzimas frente a otros tipos de catalizadores. A pesar del significativo progreso experimentado desde los primeros estudios de reacciones biocatalíticas hasta el escenario actual de aplicación industrial de las enzimas, todavía existen algunas desventajas manifiestas como ciertas limitaciones en cuanto a estabilidad o carga de sustrato, lo que conlleva la necesidad de alcanzar un nivel de conocimiento y desarrollo superior para una completa integración de la Biocatálisis en la industria. En este

---

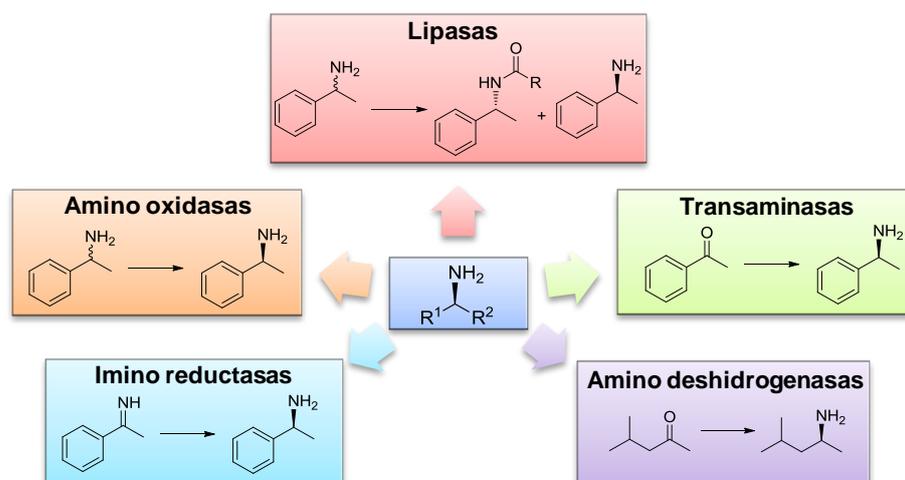
Z. Liu, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 4602-4610; e) J.-S. Yu, F.-M. Liao, W.-M. Gao, K. Liao, R.-L. Zuo, J. Zhou, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1-6.

<sup>107</sup> a) B. Kasprzyk-Hordern, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4466-4503; b) B. Testa, G. Vistoli, A. Pedretti, J. Caldwell, *Helv. Chim. Acta* **2013**, *96*, 747-798.

<sup>108</sup> a) P. Hoyos, V. Pace, M. J. Hernáiz, A. R. Alcántara, *Curr. Green Chem.* **2014**, *1*, 155-181; b) J.-M. Choi, S.-S. Han, H.-S. Kim, *Biotechnol. Adv.* **2015**, doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.014; c) S. Wenda, S. Illner, A. Mell, U. Kragl, *Green Chem.* **2011**, *13*, 3007-3047; d) N. Ran, L. Zhao, Z. Chen, J. Tao, *Green Chem.* **2008**, *10*, 361-372.

sentido, la interrelación de distintas disciplinas como ocurre en la combinación de catalizadores químicos y enzimáticos supone un reto a perseguir, donde las ventajas de unas y otras podrían ser aprovechadas para un fin común.<sup>11,109</sup>

Ya sea a nivel industrial o académico, la idoneidad del biocatalizador dependerá del tipo de proceso que se pretenda catalizar y de la disponibilidad del material de partida. En este contexto, se han utilizado distintas enzimas en la preparación de aminas enantioenriquecidas (Figura 21).<sup>110</sup>



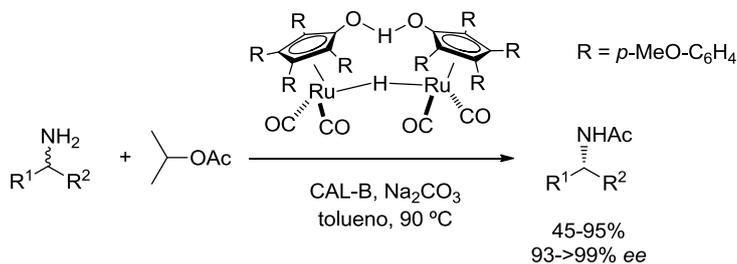
**Figura 21.** Distintos tipos de enzimas utilizados como biocatalizadores en la síntesis estereoselectiva de aminas.

Un ejemplo representativo utilizando lipasas es el descrito por Paetzold y Backvall, quienes llevaron a cabo la resolución cinética dinámica de distintas aminas primarias empleando la CAL-B como

<sup>109</sup> a) A. C. Marr, S. Liu, *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 199-204; b) C. A. Martinez, S. Hu, Y. Dumond, J. Tao, P. Kelleher, L. Tully, *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 392-398.

<sup>110</sup> a) D. Ghislieri, N. J. Turner, *Top. Catal.* **2014**, *57*, 284-300; b) H. Kohls, F. Steffen-Munsberg, M. Höhne, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 180-192; c) B. M. Nestl, S. C. Hammer, B. A. Nebel, B. Hauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3070-3095; d) N. J. Turner, M. D. Truppo, *Chiral Amine Synthesis*, Ed. T. C. Nugent, 1<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2010**, pp. 431-459.

biocatalizador, acetato de isopropilo como agente acilante y un complejo de rutenio como agente de racemización (Esquema 31).<sup>111</sup> El mecanismo de racemización consiste en la deshidrogenación de la amina sustrato y posterior re-adición de hidrógeno a la imina. La presencia de carbonato de sodio resultó necesaria para la neutralizar trazas de ácido que impedían la correcta racemización del sustrato. El proceso quimioenzimático transcurrió con excelentes estereoselectividades y, en general, muy buenos valores de actividad, tolerando aminas con sustituyentes metilo o etilo en una de las posiciones contiguas a la amina y distintos grupos tanto aromáticos de diversa naturaleza como alifáticos en la otra.

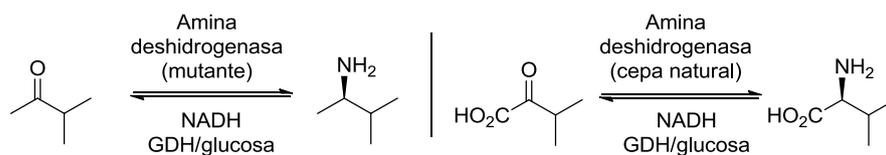


**Esquema 31.** DKR de aminas primarias empleando lipasas.

Otro ejemplo interesante es el desarrollo de una nueva variante de una amino deshidrogenasa obtenida por mutaciones a partir de la leucina deshidrogenasa de *Bacillus stearothermophilus* capaz de catalizar la aminación reductiva enantioselectiva de la metil isobutil cetona. De esta manera, los autores ampliaron la especificidad de sustrato de la cepa natural, que solo presentaba actividad para el correspondiente análogo carboxilado (Esquema 32).<sup>112</sup> En el proceso de síntesis asimétrica empleando amina deshidrogenasas se utilizó el sistema glucosa/glucosa deshidrogenasa (GDH) para la regeneración del cofactor, extendiendo la actividad de la variante enzimática a distintos sustratos.

<sup>111</sup> J. Paetzold, J. E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17620-17621.

<sup>112</sup> M. J. Abrahamson, E. Vázquez-Figueroa, N. B. Woodall, J. C. Moore, A. S. Bommarius, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3969-3972.



**Esquema 32.** Síntesis de aminas quirales a partir de cetonas proquirales empleando amina deshidrogenasas. Variación de la especificidad de sustrato mediante la creación de nuevas variantes.



# CAPÍTULO 2

## SÍNTESIS ESTEREOSELECTIVA DE INDOLINAS 2,3-DISUSTITUIDAS



# ANTECEDENTES



Las aminas secundarias cíclicas ópticamente activas son compuestos de gran interés que han sido ampliamente utilizados como precursores de moléculas con actividad biológica. Gran parte de las aproximaciones sintéticas que tradicionalmente se han empleado para su preparación están basadas en el uso de procesos de hidrogenación de iminas con catalizadores metálicos que actúan de forma estereoselectiva. Frente a ellos, la Biocatálisis se presenta como una ruta alternativa interesante, evitando ciertas desventajas asociadas a la toxicidad y coste de los complejos metálicos.

A continuación, se realizará un breve resumen de los métodos descritos para la síntesis de aminas secundarias cíclicas enantioenriquecidas, bien a través de metodologías sintéticas convencionales o bien empleando biocatalizadores, objetivo fundamental de este trabajo.

## 2.1. Importancia de las Indolinas

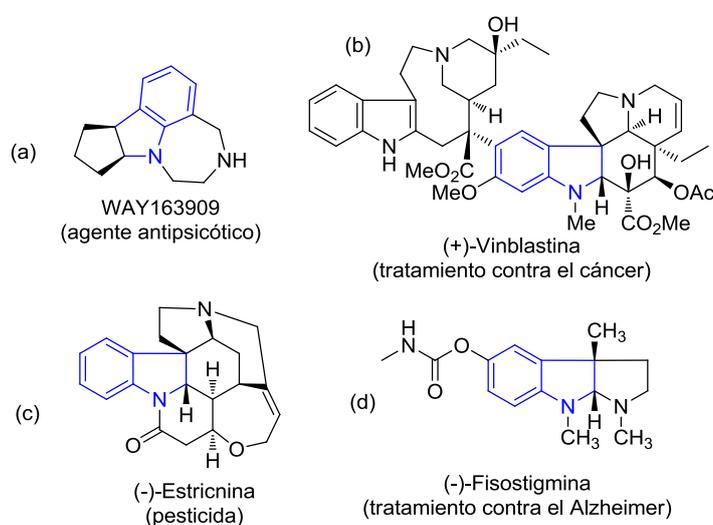
Dentro del grupo de las aminas cíclicas, las indolinas ocupan un lugar muy destacado tanto en química sintética como en química médica.<sup>113</sup> Su esqueleto se encuentra presente en un gran número de alcaloides con actividad biológica (Figura 22) y en compuestos farmacológicamente activos como el inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina pentopril, empleado en el tratamiento de la hipertensión.<sup>114</sup> En particular, las indolinas 2,3-disustituídas, con dos centros quirales en su estructura presentan un interés especial ya que

---

<sup>113</sup> a) D. Crich, A. Banerjee, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 151; b) A. A. Patchett, R. P. Nargund, *Annu. Rep. Med. Chem.* **2000**, *35*, 289-298.

<sup>114</sup> a) R. Neelamegam, T. Hellenbrand, F. A. Schroeder, C. Wang, J. M. Hooker, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1488-1494; b) R. Silvestri, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 625-627.

sus cuatro posibles diastereoisómeros pueden mostrar un comportamiento muy diferente desde un punto de vista químico, físico o biológico.



**Figura 22.** Selección ilustrativa de ejemplos de derivados de indolina con actividad biológica, ya sean sintéticos (a) o alcaloides naturales (b-d).

## 2.2. Síntesis Convencional de Indolinas 2,3-Disustituidas Ópticamente Activas

En la bibliografía existen un gran número de metodologías descritas para la síntesis de indolinas ópticamente activas, entre las que se incluyen reacciones de arilación amínica catalizadas por metales, hidrogenación catalítica de indoles, metodologías convergentes, resolución cinética no enzimática de indolinas e incluso reacciones radicalarias.<sup>115</sup> A continuación se muestran algunos ejemplos representativos de los métodos de síntesis más comúnmente empleados para la preparación de indolinas 2,3-disustituidas ópticamente activas.

<sup>115</sup> a) D. Liu, G. Zhao, L. Xiang, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3975-3984; b) S. Anas, H. B. Kagan, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 2193-2199; c) D. J. Triggle, J. M. Mitchell, R. Filler, *CNS Drug Reviews* **1998**, *4*, 87-136.

### 2.2.1. Reducción Asimétrica de Indoles

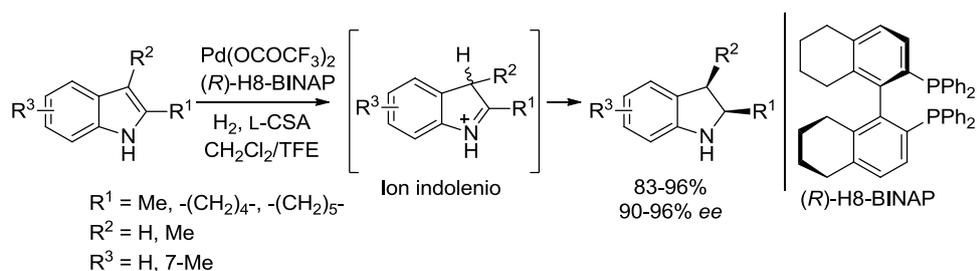
Dentro de los distintos métodos empleados para la obtención de indolinas ópticamente activas, la hidrogenación catalítica de indoles funcionalizados es una de las herramientas sintéticas más utilizadas.<sup>116</sup> Esta estrategia presenta una serie de ventajas en cuanto a sencillez y economía atómica, pero también plantea algunas dificultades como la necesidad de introducir pasos de protección y desprotección, o emplear condiciones drásticas de reacción como medios ácidos o altas presiones debido a la elevada estabilidad de los compuestos de partida.

En este contexto, Zhang, Zhou y colaboradores desarrollaron la hidrogenación de indoles catalizada por complejos de Pd derivados de ligandos difosfina enantioméricamente puros y empleando ácidos de Brønsted como activadores (Esquema 33).<sup>117</sup> La activación del indol transcurre a través de un equilibrio enamina-imina promovido por el ácido de Brønsted, rompiendo la aromaticidad del sustrato y obteniéndose las correspondientes indolinas con rendimientos y enantioselectividades elevados. Los mejores resultados se alcanzaron empleando el (*R*)-H8-BINAP como ligando quiral en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/trifluoroetanol (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFE, 1:1 v/v) y añadiendo ácido camforsulfónico (L-CSA) como aditivo.

---

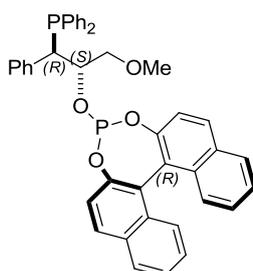
<sup>116</sup> Algunos ejemplos recientes: a) Y. Duan, L. Li, M.-W. Chen, C.-B. Yu, H.-J. Fan, Y.-G. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 7688-7700; b) C. Li, J. Chen, G. Fu, D. Liu, Y. Liu, W. Zhang, *Tetrahedron* **2013**, 6839-6844; c) Y. Duan, M.-W. Chen, Q.-A. Chen, C.-B. Yu, Y.-G. Zhou *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 1235-1238; d) Y.-C. Xiao, C. Wang, Y. Yao, J. Sun, Y.-C. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 10661-10664.

<sup>117</sup> D.-S. Wang, Q.-A. Chen, W. Li, C.-B. Yu, Y.-G. Zhou, X. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8909-8911.



**Esquema 33.** Hidrogenación catalítica asimétrica de indoles. Se muestran solo aquellos ejemplos en los que los productos son indolinas 2,3-disustituidas.

Recientemente, se ha comprobado que la hidrogenación asimétrica de indoles desprotegidos utilizando ácidos de Brønsted junto con complejos de iridio ópticamente activos derivados de ligandos P-OP también resulta eficaz (Figura 23).<sup>118</sup> Los autores observaron que el rendimiento obtenido se incrementaba en función de la fuerza del ácido de Brønsted, lo que es consistente con el mecanismo del proceso ya que a menor  $pK_a$  del ácido (mayor fuerza) el equilibrio se desplaza hacia la formación del ion iminio no aromático. Además, en esta ocasión se utiliza el CSA en forma racémica, confirmando que el aditivo no está involucrado en la estereodiscriminación del proceso.

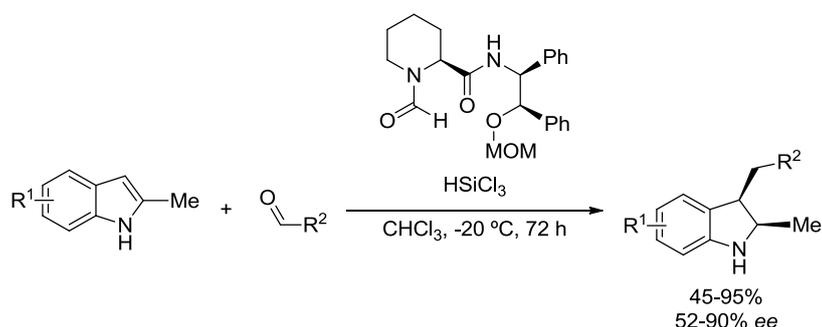


**Figura 23.** Ligando tipo P-OP empleado como ligando quiral en la hidrogenación asimétrica de indoles.

Uno de los problemas prácticos asociados a estas metodologías es que a menudo es necesaria la preparación de los indoles de partida a través de procedimientos complejos. Una forma elegante de evitar esta limitación es partir de un indol fácilmente disponible e introducir

<sup>118</sup> J. L. Núñez-Rico, H. Fernández-Pérez, A. Vidal-Ferran, *Green Chem.* **2014**, *16*, 1153-1157.

complejidad estructural mediante una reacción de Friedel-Crafts como primer paso de un proceso tándem en el que, seguidamente, se lleva a cabo la reducción de los aductos formados sin aislar estos intermedios.<sup>119</sup> Sun, Wang y colaboradores han utilizado esta estrategia incorporando el sistema reductor base de Lewis/ $\text{HSiCl}_3$ , que presenta la ventaja de ser benigno con el medio ambiente y de bajo coste.<sup>120</sup> El catalizador de tipo amida derivado del ácido L-2-pipecolínico y la 1,2-difenil-2-hidroxiethylamina quiral resultó ser efectivo para una amplia variedad de aldehídos (Esquema 34), excepto para sustratos con sustituyentes distinto de metilo en la posición C-2, o bien sustituidos con halógenos en la posición C-7.



**Esquema 34.** Preparación estereoselectiva de indolinas a través de un proceso tándem de reacción de alquilación y subsiguiente reducción asimétrica.

### 2.2.2. Resolución Cinética de Indolinas

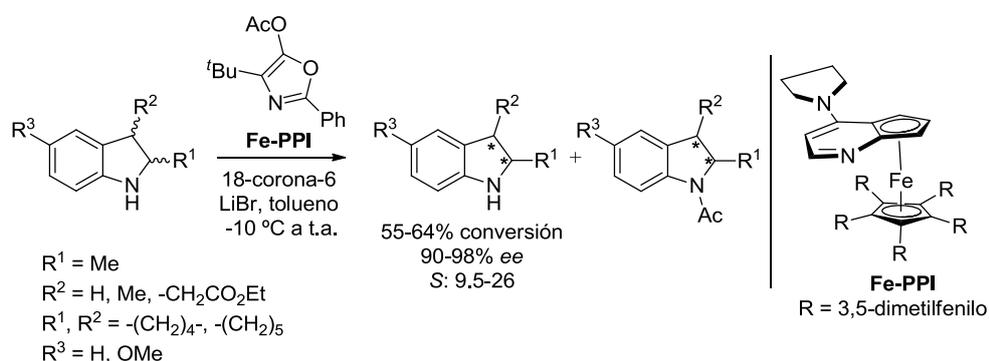
Aunque menos estudiada, la resolución cinética no-enzimática de las propias indolinas 2,3-disustituidas racémicas es una alternativa válida para obtener estos derivados en forma ópticamente activa. Esta metodología se aplicó por primera vez en una acilación catalítica de la amina libre de la indolina empleando acetatos voluminosos de oxazol y un complejo con quiralidad planar de pirrolidinopiridina (Fe-PPI) como catalizador quiral (Esquema 35).<sup>121</sup> Las selectividades observadas en

<sup>119</sup> Y. Duan, M.-W. Chen, Z.-S. Ye, D.-S. Wang, Q.-A. Chen, Y.-G. Zhou, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 7193-7197.

<sup>120</sup> L. Chen, C. Wang, L. Zhou, J. Sun, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 2224-2230.

<sup>121</sup> F. O. Arp, G. C. Fu, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14264-14265.

este primer estudio fueron de bajas a moderadas, obteniéndose los mejores valores en presencia de LiBr/18-corona-6 y para los derivados *cis* frente a los *trans*.

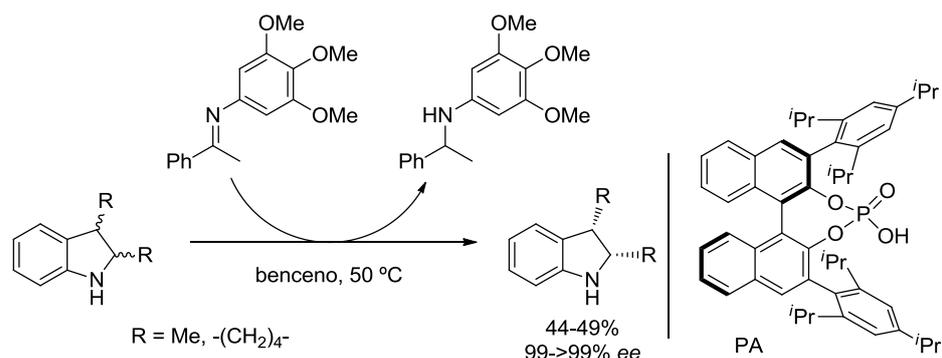


**Esquema 35.** Resolución cinética no enzimática de indolinas racémicas empleando complejos planos de pirrolidinpiridina.

Además de las estrategias de resolución cinética basadas en la funcionalización del átomo de nitrógeno,<sup>122</sup> también se ha desarrollado este proceso a través de la transferencia de hidrógeno desde la indolina a una imina mediada por un ácido fosfórico quirral (PA, Esquema 36).<sup>123</sup> Uno de los enantiómeros de la indolina participa en la transferencia de hidrógeno generando el correspondiente indol, mientras que el otro no reacciona y se aísla con excelente exceso enantiomérico, constituyendo el primer ejemplo descrito de resolución cinética oxidativa de aminas secundarias. El catalizador PA actúa como un activador bifuncional al poseer una parte ácida de Brønsted (P-OH) y una parte básica de Lewis (P=O). Además de las indolinas 2,3-disustituidas que se muestran en el Esquema 36, los autores aplicaron el sistema catalítico a una gran variedad de indolinas sustituidas en la posición C-2, obteniéndolas con buenos rendimientos y excesos enantioméricos.

<sup>122</sup> X. L. Hou, B. H. Zheng, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1789-1791.

<sup>123</sup> K. Saito, Y. Shibata, M. Yamanaka, T. Akiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11740-11743.

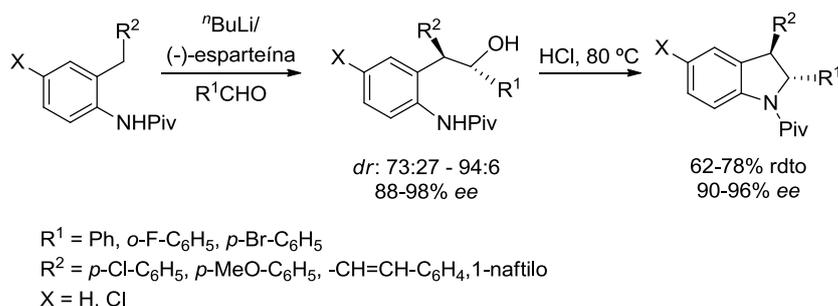


**Esquema 36.** Resolución cinética oxidativa de indolinas 2,3-disustituidas empleando un ácido fosfórico quiral como catalizador.

### 2.2.3. Metodologías Convergentes

Las metodologías convergentes para la preparación de indolinas son estrategias de gran interés desde el punto de vista de la economía atómica. En este sentido, se ha descrito la síntesis de indolinas *trans*-2,3-disustituidas mediante la sustitución electrófila asimétrica de 2-bencilanilinas con una serie de aldehídos, seguida de una sustitución nucleófila intramolecular empleando catálisis ácida (Esquema 37).<sup>124</sup> La sustitución electrófila ocurre con una inducción asimétrica excelente en la posición bencílica debido a la mediación en dicho paso de reacción del auxiliar quiral (–)-esparteína. A continuación, tiene lugar la sustitución estereoselectiva del alcohol secundario por la *N*-pivaloilamina, obteniéndose las *trans*-indolinas 2,3-disustituidas con elevadas purezas ópticas.

<sup>124</sup> K. H. Kang, J. Do, Y. S. Park, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 808-812.



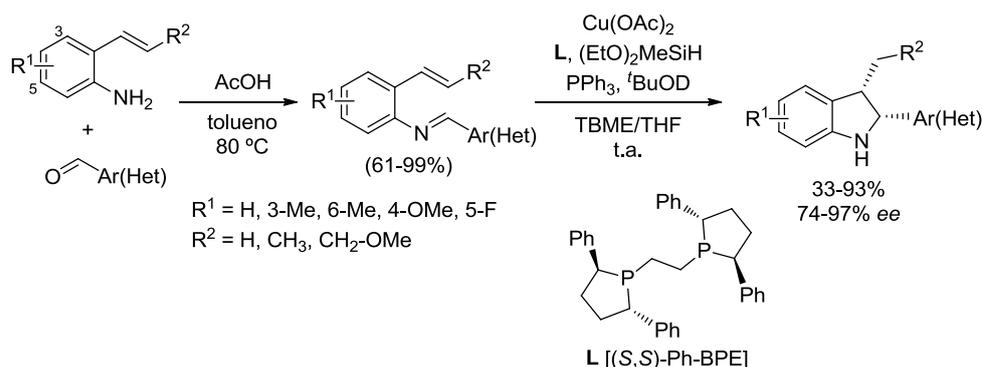
**Esquema 37.** Síntesis asimétrica de indolinas por sustitución electrófila seguida de ciclodeshidratación en medio ácido.

Poco tiempo después, los autores desarrollaron una metodología similar de síntesis de *trans*-indolinas 2,3-disustituidas a través de procesos de ciclodeshidratación del alcohol de *N*-pivaloil-2-aminofenilo.<sup>125</sup> En este caso y con la intención de ampliar el espectro de sustratos aceptados en el proceso, se emplearon las condiciones de Mitsunobu para la ciclación intramolecular, consiguiendo mejores valores de enantioselectividad en condiciones de reacción más suaves.

Recientemente, se ha logrado la síntesis de *cis*-indolinas 2,3-disustituidas enantioenriquecidas en dos pasos de reacción a partir de 2-alquenilanilinas y aldehídos aromáticos empleando una estrategia basada en la catálisis con CuH.<sup>126</sup> Tras una primera etapa de formación de la imina, el intermedio olefínico reacciona estereoselectivamente con la especie activa L\*CuH generada por reacción entre el Cu(OAc)<sub>2</sub> con el ligando quiral de bifosfina **L** y una cantidad estequiométrica del hidrosilano en una mezcla TBME/THF (19:1, Esquema 38). La reacción tiene lugar en presencia de trifenilfosfina como ligando secundario y un alcohol, minimizándose los procesos laterales al emplear <sup>t</sup>BuOD y obteniéndose selectivamente los isómeros *cis* con rendimientos y excesos enantioméricos de moderados a muy buenos.

<sup>125</sup> K.-H. Kang, Y. Kim, C. Im, Y.-S. Park, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 2542-2549.

<sup>126</sup> E. Ascic, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 4666-4669.



**Esquema 38.** Síntesis de *cis*-indolinas 2,3-sustituidas empleando CuH como especie catalítica.

### 2.3. Resolución Cinética Enzimática

Frente a los métodos químicos convencionales que frecuentemente requieren el empleo de condiciones fuertes de reacción o el uso de reactivos caros, los procesos biocatalíticos representan una interesante alternativa. A pesar de haber sido notablemente más abundantes los estudios relativos a la funcionalización enzimática de alcoholes,<sup>127</sup> la preparación biocatalítica estereoselectiva de aminas ocupa también un lugar destacado en la aplicación de la Biocatálisis.<sup>128</sup> En este campo las hidrolasas han sido ampliamente utilizadas,<sup>129</sup> si bien conviene resaltar que el uso de otros grupos de enzimas como aminooxidasas o transaminasas ha experimentado un importante desarrollo en los últimos tiempos.<sup>130</sup>

<sup>127</sup> Algunos ejemplos: a) E. Busto, L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 4057-4064; b) R. Lihammar, R. Millet, J.-E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 12114-12120; c) R. Amin, J.-X. Chen, I. C. Cotterill, D. Emrich, D. Ganley, Y. L. Khmel'nitsky, M. D. McLaws, P. C. Michels, C. E. Schwartz, D. Thomas, J. Yan, Q. Yang, *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 915-920.

<sup>128</sup> Algunos ejemplos recientes: a) T. Kida, T. Iwamoto, H. Asahara, T. Hinoue, M. Akashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 3371-3374; b) K. P. J. Gustafson, R. Lihammar, O. Verho, K. Engström, J.-E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3747-3751; c) D. Méndez-Sánchez, N. Ríos-Lombardía, S. García-Granda, J. Montejo-Bernardo, A. Fernández-González, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Tetrahedron: Asymmetry* **2014**, *25*, 381-386.

<sup>129</sup> E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3998-4035.

<sup>130</sup> H. Kohls, F. Steffen-Munsberg, M. Höhne, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 180-192.

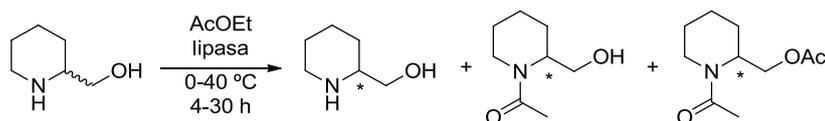
En lo relativo a las hidrolasas, la introducción de quiralidad en sistemas nitrogenados y, en concreto, en aminas secundarias se ha llevado a cabo a través de distintas estrategias, entre las que destacan la transformación directa del grupo amino, la alteración de diferentes posiciones en el anillo heterocíclico o la modificación de distintos grupos funcionales que puedan estar presentes en las aminas cíclicas. A continuación, se comentarán resumidamente algunos de los ejemplos descritos en la bibliografía para la modificación estereoselectiva del grupo amino de aminas secundarias cíclicas empleando hidrolasas en procesos de acilación o alcoxicarbonilación, temática que ha sido objeto de estudio en este capítulo.

### 2.3.1. *N*-Acilaciones

El primer ejemplo que se encuentra en la bibliografía referente a acilaciones enzimáticas de aminas secundarias cíclicas proviene de los estudios de G. Asensio y colaboradores sobre el ( $\pm$ )-2- y el ( $\pm$ )-3-piperidinilmetanol como sustratos y la PPL y la lipasa Amano P de *Pseudomonas fluorescens* como biocatalizadores (Esquema 39).<sup>131</sup> Los autores observaron que tanto los rendimientos como los excesos enantioméricos obtenidos, así como la tendencia hacia la *O* o *N* acilación del aminoalcohol mostraba una alta dependencia del tipo de sustrato, enzima utilizada, tiempos de reacción y temperatura. Así, la acilación en el grupo amino se encuentra favorecida cuando el alcohol se sitúa en la posición C-2 del anillo, obteniéndose el sustrato remanente con bajo exceso enantiomérico y elevado rendimiento en presencia de la PPL, mientras que el producto *N*acetilado se aísla con purezas ópticas entre moderadas y buenas dependiendo del grado de conversión de la reacción. Por su parte, la lipasa Amano P mostró peor regioselectividad, dando lugar a una mezcla compleja de productos en la que se detectó el compuesto *N,O*diacetilado.

---

<sup>131</sup> G. Asensio, C. Andreu, J. A. Marco, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4197-4198.



**Esquema 39.** Acilación enzimática del (±)-2-piperidinilmetanol.

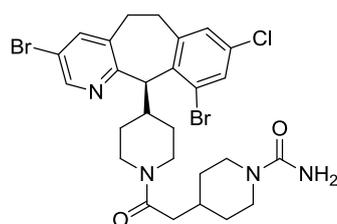
Poco tiempo después Herradón y Valverde llevaron a cabo por primera vez la reacción de acilación mediante el uso de una acilasa como catalizador,<sup>132</sup> un tipo de enzima que hasta ese momento sólo había sido utilizada en la reacción inversa de hidrólisis.<sup>133</sup> Además de una serie de alcoholes lineales y cíclicos, entre los sustratos estudiados se encuentran también aminas cíclicas, teniendo lugar la reacción a través de un proceso de *N*-acilación cuando se parte del (±)-3-piperidinilmetanol, si bien las enantioselectividades observadas fueron bajas para este sustrato.

Morgan y colaboradores desarrollaron la resolución cinética de un derivado de piperidina mediante procesos de acilación enantioselectiva catalizados por lipasas. A pesar de que la molécula no contiene ningún centro quiral, existe como un par de enantiómeros debido a la atropoisomería derivada del doble enlace exocíclico que restringe la movilidad conformacional del anillo de diaril[*a,d*]cicloheptano.<sup>134</sup> Dicho compuesto es un intermedio clave en la síntesis del SCH66336, un inhibidor de la proteína farnesil transferasa (Figura 24).

<sup>132</sup> B. Herradón, S. Valverde, *Synlett* **1995**, 599-602.

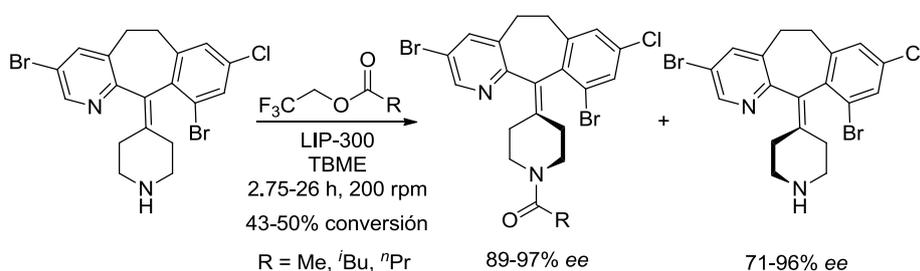
<sup>133</sup> H. K. Chenault, J. Dahmer, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6354-6364.

<sup>134</sup> B. Morgan, A. Zaks, D. R. Dodds, J. Liu, R. Jain, S. Megati, F. G. Njoroge, V. M. Girijavallabhan, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5451-5459.



**Figura 24.** Estructura del SCH66336.

Los autores realizaron una detallada optimización de distintos parámetros de reacción como el biocatalizador, agente acilante, grado de humedad de la reacción y disolvente utilizados. Combinando la lipasa Toyobo LIP-300 y el isobutirato de trifluoroetilo como agente acilante se alcanzó un 50% de conversión con una excelente enantioselectividad (Esquema 40). El catalizador se pudo reciclar y reutilizar sin pérdida aparente de actividad durante 15 ciclos.

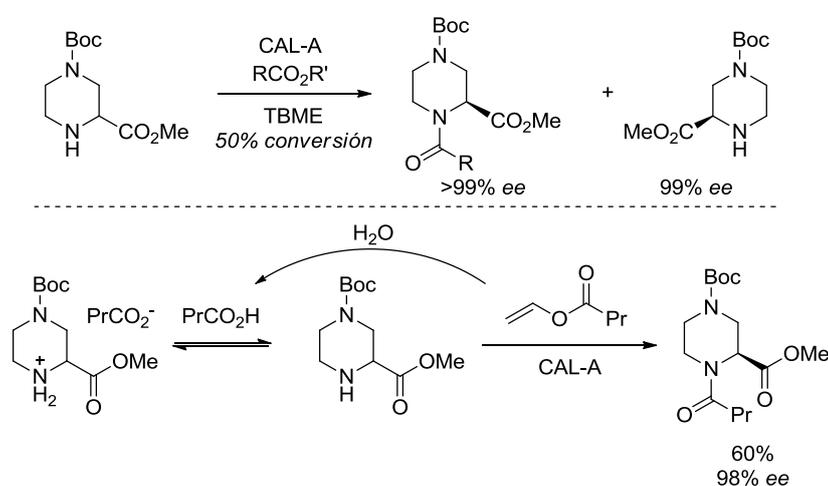


**Esquema 40.** Acilación enzimática del precursor del SCH6636.

La acilación enzimática del aminoéster de metilo derivado del ácido piperazin-2-carboxílico se ha descrito utilizando la CAL-A como biocatalizador.<sup>135</sup> La presencia de dos nitrógenos potencialmente reactivos en el producto de partida hizo necesaria la protección de uno de ellos para evitar mezclas de productos, oportunidad que los autores aprovecharon para estudiar ambos procesos. Se observó que la *N*-acilación se encontraba favorecida en términos de reactividad y enantioselectividad con la piperazina rica en electrones, es decir, aquella en la que el grupo amino libre estaba situado en posición  $\alpha$  al éster carboxílico (Esquema 41). Los mejores resultados se obtuvieron

<sup>135</sup> A. Hietanen, K. Lundell, L. Kanerva, A. Liljeblad, *Arkivoc* **2012**, v, 60-74.

empleando ésteres alquílicos activados como dadores de acilo (de vinilo o de trifluoroetilo), consiguiéndose una conversión del 50% con excelentes excesos enantioméricos al llevar el proceso a escala de gramo con butanoato de 2,2,2-trifluoroetilo en TBME.



**Esquema 41.** Resolución enzimática del aminoéster de metilo derivado del ácido piperazina-2-carboxílico catalizada por la CAL-A a través de un proceso de KR (arriba) o de DKR empleando aldehídos como agentes de racemización (abajo).

Como se ha comentado en la introducción de este bloque, una desventaja inherente a las resoluciones cinéticas clásicas radica en la limitación de obtener un rendimiento máximo del 50%, lo que tiene un considerable impacto económico de cara a posibles aplicaciones industriales. Sin embargo, con la resolución cinética dinámica es posible alcanzar un rendimiento teórico del 100%.<sup>96</sup> En este contexto, la resolución cinética de la piperazina también se estudió en condiciones de DKR.<sup>135</sup> Para ello, se utilizó butanoato de vinilo como agente acilante, considerando la opción de emplear un aldehído como agente de racemización. Dicho aldehído podría formarse a través de la isomerización a acetaldehído del alcohol vinílico liberado durante la KR, o bien mediante la hidrólisis del butanoato de vinilo por el agua residual de la enzima, que conduciría a la formación de ácido butanoico (Esquema 41). Los autores observaron distintos resultados en función del preparado enzimático de CAL-A utilizado, si bien los mejores

rendimientos no superaron el 60% hacia la formación de la amida de configuración (*S*), detectando en la mezcla de reacción una cantidad considerable de sustrato sin reaccionar.

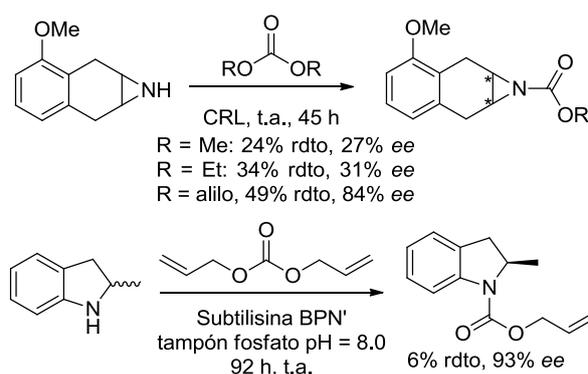
### 2.3.2. *N*-Alcoxicarbonilaciones

A diferencia de los procesos de acilación enzimática de aminas donde el producto resultante de la biotransformación es una amida, las reacciones enzimáticas de *N*-alcoxicarbonilación proporcionan carbamatos. Debido a su elevada estabilidad, los carbamatos no son sustratos adecuados para la reacción inversa de hidrólisis, un proceso lateral que sí se produce habitualmente en las acilaciones y que a menudo origina pérdidas de enantioselectividad en las amidas. Así, los fenómenos de hidrólisis competitiva no tienen lugar en las reacciones de alcoxicarbonilación, lo que permite obtener excelentes enantioselectividades y ha sido un motivo de peso para muchos autores a la hora de decantarse por esta estrategia frente a la acilación.

Las reacciones de alcoxicarbonilación enzimática se inician por Wong y colaboradores con la protección de aminas secundarias en forma estereoselectiva.<sup>136</sup> La aziridina racémica que se muestra en el Esquema 42 se hizo reaccionar con distintos homocarbonatos en presencia de la subtilisina BPN' y de la CRL, siendo esta última enzima la que condujo a los mejores resultados, aislándose el carbamato de alilo correspondiente con un rendimiento del 49% y un 84% *ee*. Los autores estudiaron también la alcoxicarbonilación de la ( $\pm$ )-2-metilindolina, que en la reacción con la subtilisina BPN' y carbonato de dialilo dio lugar al enantiómero (*R*) del correspondiente carbamato con muy buen exceso enantiomérico (93% *ee*) aunque con un rendimiento muy pobre (6%, Esquema 42).

---

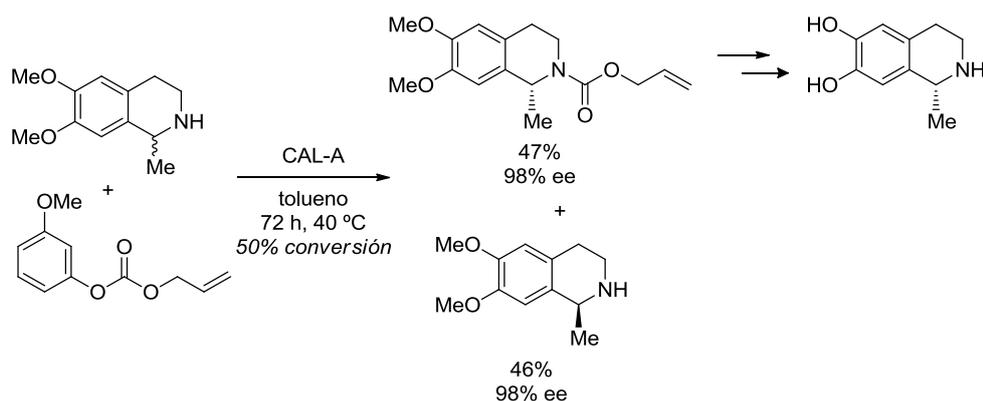
<sup>136</sup> B. Orsat, P. B. Alper, W. Moree, C.-P. Mak, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 712-713.



**Esquema 42.** Alcoxycarbonilación enzimática de la 3-metoxi-1a,2,7,7a-tetrahidro-1*H*-nafto[2,3-*b*]aziridina (arriba) y de la 2-metilindolina (abajo).

La 1-metil-6,7-dihidroxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina, también conocida como salsolinol, se ha detectado en la orina de pacientes con la enfermedad de Parkinson y se ha evidenciado que este compuesto y, en particular, el enantiómero (*R*) está involucrado en el mecanismo responsable de producir esta enfermedad. La preparación estereoselectiva del mismo se encuentra descrita a partir de la correspondiente tetrahidroisoquinolina dimetoxilada que, a su vez, se obtuvo en forma ópticamente activa mediante un proceso de alcoxycarbonilación de la 1-metil-6,7-dimetoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina racémica catalizado por la lipasa de *Candida antarctica* de tipo A (CAL-A, Esquema 43).<sup>137</sup> Tras una minuciosa optimización de las condiciones de reacción los autores aislaron tanto el carbamato como la amina remanente con excelentes excesos enantioméricos y elevados rendimientos, alcanzando el proceso la máxima conversión (50%). Cabe destacar que con otros carbonatos de fenilo y alilo también se obtuvieron resultados similares en cuanto a conversión y enantioselectividad, y lo mismo ocurrió al emplear otros disolventes no polares como distintos éteres, si bien el tolueno fue seleccionado por su menor volatilidad y, por tanto, mejor reproducibilidad.

<sup>137</sup> W. Ding, M. Li, R. Dai, Y. Deng, *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 1376-1379.



**Esquema 43.** Resolución cinética enzimática de la 1-metil-6,7-dimetoxi-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina racémica catalizada por CAL-A y empleando el carbonato de alilo y 3-metoxifenilo.

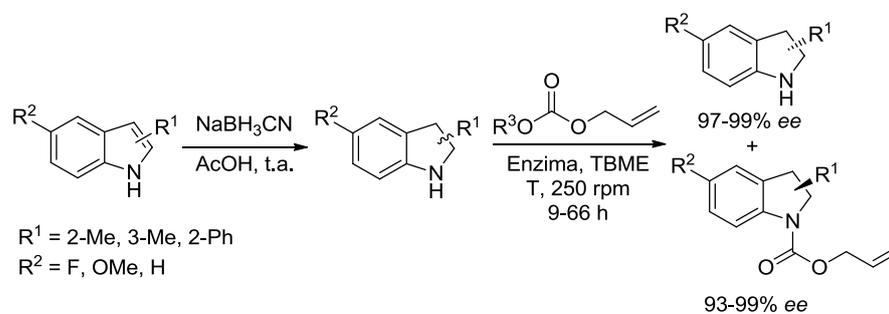
Una mejora de esta transformación consiste en efectuarla aplicando el concepto de DKR.<sup>138</sup> Los autores utilizaron la CRL como biocatalizador y un complejo de iridio como agente de racemización ( $[\text{IrCp}^*\text{I}_2]_2$ ) en condiciones de reacción suaves para evitar la desnaturalización de la enzima. Las etapas de resolución cinética y racemización se optimizaron de manera independiente, tras lo cual ambas se combinaron, formándose el carbamato de configuración (*R*) con una conversión del 90% y un excelente exceso enantiomérico (96% *ee*), incluso a escala multi-gramo. La principal limitación del proceso radica en el catalizador de racemización por la dificultad de su síntesis.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado la utilidad sintética de la resolución cinética enzimática de aminas secundarias cíclicas a través de una ruta quimioenzimática para la preparación de indolinas 2- o 3-monosustituidas ópticamente activas.<sup>139</sup> Para ello se emplearon una serie de lipasas y distintos agentes de alcoxicarbonilación, y se estudió la resolución enzimática de la 2-metilindolina, 2-fenilindolina y diferentes 2-metilindolinas funcionalizadas en la posición C-5. Se observó que la CAL-A en combinación con el carbonato mixto de alilo y

<sup>138</sup> M. Stirling, J. Blacker, M. I. Page, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1247-1250.

<sup>139</sup> V. Gotor-Fernández, P. Fernández-Torres, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2558-2564.

3-metoxifenilo ofrecía resultados óptimos para los derivados sustituidos en la posición C-2, mientras que aquellos sustituidos en la posición C-3 se resolvieron de manera eficiente combinando la CAL-B con el carbonato de dialilo (Esquema 44). Así, mediante una selección correcta de la lipasa, el carbonato y el disolvente, fue posible obtener en todos los casos el sustrato y el producto con elevados excesos enantioméricos.



**Esquema 44.** Resolución cinética enzimática de indolinas 2- y 3-sustituidas empleando carbonatos de alilo.

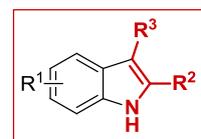


## **OBJETIVOS**

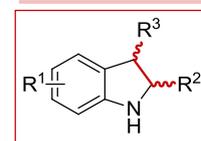


En los antecedentes de este trabajo de investigación se ha destacado la importancia de las indolinas 2,3-disustituidas en forma ópticamente activa, estructura que se encuentra presente en una gran variedad de productos naturales y en compuestos farmacológicamente activos. En este contexto, los objetivos planteados para la realización de este capítulo son:

- Poner a punto una metodología sintética para la obtención de indoles funcionalizados, precursores inmediatos de las indolinas.



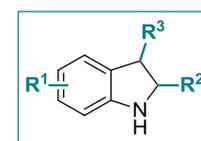
- Desarrollar procedimientos diastereoselectivos para la preparación de las indolinas racémicas de configuración relativa *cis* y *trans* a partir de los correspondientes indoles.



- Estudiar la resolución cinética de las indolinas a través de procesos de alcoxicarbonilación empleando hidrolasas.



- Analizar la influencia que tienen los diferentes patrones de sustitución y su estereoquímica relativa en la resolución enzimática.





## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



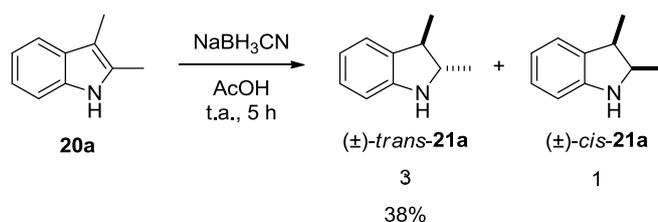
El trabajo recogido en este capítulo se ha realizado con la pretensión de desarrollar métodos de síntesis asimétrica de indolinas 2,3-disustituidas, aprovechando para ello las ventajas que la Biocatálisis ofrece en términos de sencillez y respeto con el medio ambiente. Así, mediante una combinación de procesos químicos y enzimáticos se ha diseñado una metodología sencilla y eficiente que permite la obtención de este tipo de aminas en forma ópticamente activa.

#### 2.4. Síntesis y Resolución de *trans*-2,3-Dimetilindolina

En primer lugar, se planteó el estudio de la resolución cinética enzimática de la *trans*-2,3-dimetilindolina (*trans*-**21a**). La selección de este sustrato como modelo se debe a su facilidad de preparación por reducción del 2,3-dimetil-1*H*indol (**20a**), disponible comercialmente. La reducción de **20a** con cianoborohidruro de sodio en ácido acético (Esquema 45)<sup>140</sup> condujo a una mezcla de isómeros *cis/trans* en una relación 1:3. Mediante la purificación del crudo de reacción por cromatografía de columna en gel de sílice se obtuvo la indolina *trans*-**21a** con un rendimiento moderado (38%).

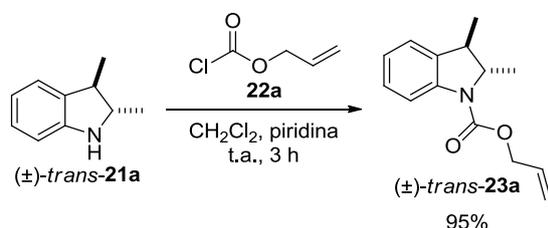
---

<sup>140</sup> a) G. W. Gribble, J. H. Hoffman, *Synthesis* **1977**, 849-860; b) F. Yamada, A. Kawanishi, A. Tomita, M. Somei, *Arkivoc* **2003**, *viii*, 102-111.



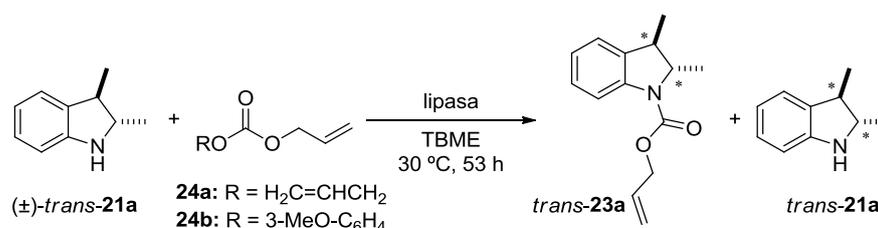
**Esquema 45.** Reducción del 2,3-dimetil-1*H*indol (**20a**) con NaBH<sub>3</sub>CN.

Con el objetivo de monitorizar las biotransformaciones por HPLC y determinar los excesos enantioméricos en caso de producirse la reacción enzimática, se llevó a cabo la síntesis del producto de la resolución *trans*-**23a** en su forma racémica. Con este fin, se utilizó la indolina *trans*-**21a** como material de partida en la síntesis del correspondiente carbamato por reacción de la misma con cloroformiato de alilo, obteniéndose (±)-*trans*-**23a** con un rendimiento excelente (Esquema 46).



**Esquema 46.** Síntesis del carbamato racémico *trans*-**23a**.

Seguidamente, se estudió la resolución cinética de (±)-*trans*-**21a**, para lo cual se consideraron una serie de lipasas como la CAL-A, CAL-B, CRL, PPL, la lipasa de *Thermomyces lanuginosa* (TLL), RML-IM y la AK de *Pseudomonas fluorescens*. Basándose en la experiencia de nuestro grupo de investigación en la resolución de derivados de indolina,<sup>139</sup> se abordó el proceso a través de reacciones de alcoxicarbonilación del grupo amino y se seleccionaron el carbonato de dialilo y el carbonato de alilo y 3-metoxifenilo como agentes de alcoxicarbonilación (Esquema 47). Desafortunadamente, ninguno de los biocatalizadores estudiados mostraron actividad alguna, aislándose exclusivamente el material de partida racémico.



**Esquema 47.** Resolución cinética enzimática de la *trans*-2,3-dimetilindolina (*trans*-**21a**) mediante un proceso de alcoxycarbonilación.

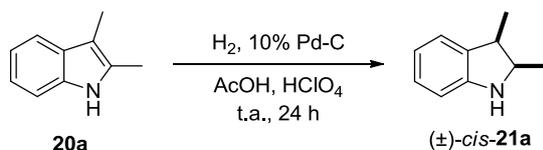
## 2.5. Síntesis y Resolución de *cis*-2,3-Dimetilindolina

Debido a la total ausencia de reactividad observada en la resolución de la indolina de configuración *trans*, se decidió modificar la configuración relativa de los grupos metilo y estudiar la resolución cinética de la *cis*-2,3-dimetilindolina racémica (*cis*-**21a**). Para ello, fue necesario desarrollar una metodología sintética dirigida hacia la formación diastereoselectiva del isómero *cis*, que suele estar favorecida en procesos de hidrogenación catalítica con catalizadores heterogéneos.<sup>141</sup> En una primera aproximación en la que se efectuó la hidrogenación del indol **20a** empleando el catalizador de Adams (PtO<sub>2</sub>), tuvo lugar la desaparición completa del producto de partida, aunque también se detectó la formación no deseada de grandes cantidades del isómero *trans* durante el proceso. En la búsqueda de otro catalizador heterogéneo más adecuado, se llevó a cabo la reacción con Pd-C en las condiciones descritas por Wee y colaboradores para la hidrogenación del 2-etil-3-metil-1*H*-indol.<sup>142</sup> Así, empleando 10% Pd-C como catalizador en combinación con una mezcla de ácido acético y un 5% (v/v) de ácido perclórico como medio de reacción (Tabla 10) se obtuvo la indolina racémica *cis*-**21a** de manera exclusiva, aunque con una conversión moderada (entrada 1).

<sup>141</sup> A. Kulkarni, W. Zhou, B. Török, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5124-5127.

<sup>142</sup> A. G. H. Wee, B. Liu, L. Zhang, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4404-4414.

**Tabla 10.** Optimización de la reacción de hidrogenación catalítica diastereoselectiva del 2,3-dimetilindol (20a) catalizada por Pd-C para la obtención de la *cis*-2,3-dimetilindolina (*cis*-21a).



Entrada	HClO <sub>4</sub> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>ed</i> (%) <sup>b</sup>
1	5	50	>97
2	10	56	>97
3	30	>97 (85)	>97

<sup>a</sup> Relación de v/v.

<sup>b</sup> Porcentajes determinados por <sup>1</sup>H-RMN del crudo de reacción. Se indican entre paréntesis los rendimientos aislados.

Con la finalidad de aumentar la conversión se incrementó la cantidad de HClO<sub>4</sub> hasta un 10% (v/v), observando un ligero aumento de la conversión (entrada 2), aunque todavía lejos de valores satisfactorios. Afortunadamente, al añadir un 30% (v/v) de HClO<sub>4</sub> la reacción alcanzó conversión completa hacia el diastereoisómero deseado, aislándose de esta manera la indolina racémica *cis*-21a con muy buen rendimiento (entrada 3).

Una vez optimizada la síntesis de la indolina racémica *cis*-21a se establecieron los métodos analíticos adecuados para el seguimiento de las reacciones por HPLC empleando columnas de relleno quirales, para lo cual se sintetizó con buen rendimiento el correspondiente carbamato racémico (78%) por reacción de la indolina (±)-*cis*-21a con cloroformiato de alilo en presencia de piridina y diclorometano seco.

A continuación, se procedió al estudio de la resolución cinética de la indolina racémica mediante un proceso de alcoxicarbonilación enzimática. Teniendo en cuenta nuevamente la experiencia de nuestro grupo de investigación, se consideró la CAL-A como biocatalizador más adecuado, por la buena actividad mostrada en la resolución de indolinas

estéricamente impedidas.<sup>143</sup> Como agentes de alcoxicarbonilación se seleccionaron los carbonatos de dialilo (**24a**) y el mixto de alilo y 3-metoxifenilo (**24b**), empleando diferentes disolventes como medios de reacción (Tabla 11).

**Tabla 11.** Resolución cinética enzimática de ( $\pm$ )-*cis*-**21a** empleando CAL-A y 2.5 equiv. de agente alcoxicarbonilante (**24a-b**) en diferentes disolventes orgánicos.

Entrada	24	Disolvente	t (h)	$ee_p$ (%) <sup>a</sup>	$ee_s$ (%) <sup>a</sup>	c (%) <sup>b</sup>	$E^c$
1	24a	TBME	167	>99	19	16	>200
2	24b	TBME	24	98 (35)	99 (30)	50	>200
3	24b	Et <sub>2</sub> O	24	99	94	49	>200
4	24b	THF	24	99	6	6	>200
5	24b	Hexano	24	99	63	39	>200
6	24b	Tolueno	24	99	70	41	>200

<sup>a</sup> Determinado por HPLC. Se indican entre paréntesis los rendimientos aislados.

<sup>b</sup>  $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$ .

<sup>c</sup>  $E = \ln[(1-c)(1-ee_p)] / \ln[(1-c)(1+ee_p)]$ .<sup>144</sup>

Así, en la alcoxicarbonilación de *cis*-**21a** con el carbonato de dialilo (**24a**) en presencia de la CAL-A se obtuvo una enantioselectividad excelente, si bien la reactividad fue baja tras 167 horas de reacción en TBME (entrada 1). Al utilizar un carbonato más reactivo como es el carbonato de alilo y 3-metoxifenilo (**24b**), se alcanzó un 50% de conversión tras 24 horas con una excelente enantiodiscriminación ( $E > 200$ ), lo que permitió aislar tanto sustrato como producto de forma prácticamente enantiopura y con buenos rendimientos (entrada 2). Cuando se emplearon otros disolventes como Et<sub>2</sub>O, THF, hexano o

<sup>143</sup> P. Domínguez de María, C. Carboni-Oerlemans, B. Tuin, G. Bargeman, A. van der Meer, R. van Gemert, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2005**, *37*, 36-46.

<sup>144</sup> C.-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *102*, 7294-7299.

tolueno (entradas 3-6) se obtuvieron resultados similares en términos de enantioselectividad ( $E > 200$ ), pero los valores de conversión fueron menores, excepto en el caso del éter dietílico con el que se observaron resultados comparables a los de la reacción con TBME (entrada 3).

De esta manera, las mejores condiciones para la resolución cinética enzimática quedaron definidas llevando a cabo la reacción en TBME, utilizando CAL-A como biocatalizador y 2.5 equiv. de carbonato de alilo y 3-metoxifenilo como agente de alcoxicarbonilación. Por último, la medida de la rotación óptica de la amina enantioenriquecida permitió la asignación de la configuración absoluta por comparación con los valores descritos en la bibliografía. Así, el experimento se realizó en las condiciones descritas para (*R,R*)-**21a** ( $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +26.6$  (*c* 0.83,  $\text{CHCl}_3$ ) para un 92% de *ee*),<sup>117</sup> obteniéndose un valor similar de signo contrario ( $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -29.0$  (*c* 0.83,  $\text{CHCl}_3$ ) para un 99% de *ee*). De acuerdo con esto, las configuraciones de los productos de la resolución enzimática se asignaron como (*S,S*) para la amina **21a** y (*R,R*) para el carbamato **23a**.

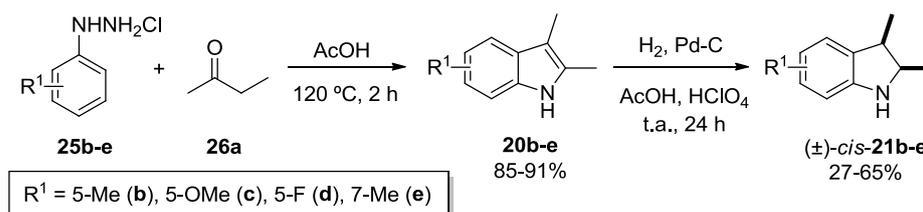
## 2.6. Síntesis y Resolución de *cis*-Indolinas Sustituidas

Una vez que se ha desarrollado una metodología eficiente para la resolución de la indolina *cis*-**21a**, se decidió extender la misma a otros sustratos, estudiando en primer lugar la funcionalización del anillo aromático, y variando en segundo lugar la sustitución en las posiciones C-2 y C-3. En ambos casos fue necesaria la síntesis previa de los indoles (**20b-i**) precursores de las indolinas racémicas (*cis*-**21b-i**), ya que éstos no son comercialmente accesibles.

### 2.6.1. Síntesis y Resolución de *cis*-2,3-Dimetilindolinas con Distintas Funcionalidades en el Anillo Aromático

La reacción de indolización de Fischer entre la 2-butanona (**26a**) y diferentes fenilhidrazinas (**25b-e**) a reflujo de ácido acético permitió aislar con excelentes rendimientos los indoles funcionalizados en las

posiciones C-5 (Me, OMe, F) y C-7 (Me) del anillo aromático (Esquema 48).



**Esquema 48.** Síntesis diastereoselectiva de las indolinas *cis*-**21b-e**.

Posteriormente, para la hidrogenación diastereoselectiva de los indoles **20b-e** se aplicaron las condiciones optimizadas para el indol **20a**. Al igual que ocurría con éste, la diastereoselectividad fue excelente con todos los sustratos, obteniéndose las correspondientes *cis*-indolinas sin detectar en ningún caso la formación del isómero *trans*. Sin embargo, en términos de reactividad se apreció un comportamiento diferente dependiendo del patrón de sustitución (Tabla 12). Así, en la hidrogenación de los indoles **20b** y **20c** con sustituyentes electrondadores en la posición C-5 (entradas 1 y 2) se alcanzaron conversiones elevadas, aislándose las indolinas *cis*-**21b** y **21c** con buenos rendimientos. Por otro lado, las conversiones fueron moderadas para los derivados con un sustituyente flúor en la posición C-5 (**20d**, entrada 3) o un metilo en la posición C-7 (**20e**, entrada 4), con los que se obtuvieron rendimientos entre bajos y moderados.

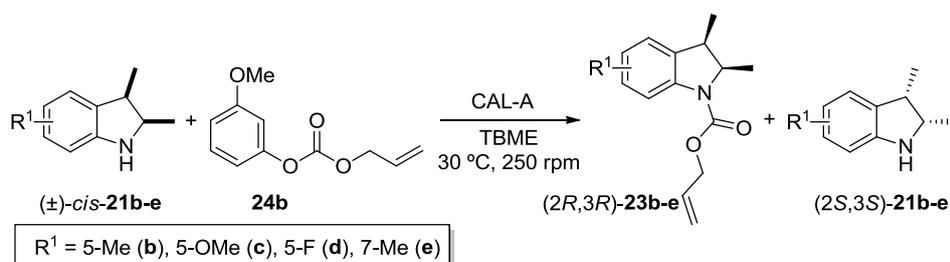
**Tabla 12.** Síntesis de las indolinas racémicas *cis*-**21b-e** por indolización de Fischer y subsiguiente reducción estereoselectiva de los indoles **20b-e** empleando Pd-C como catalizador.

Entrada	R <sup>1</sup>	<b>20b-e</b> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> <b>21b-e</b> (%) <sup>b</sup>	<b>21b-e</b> (%) <sup>a</sup>
1	5-Me ( <b>b</b> )	85	80	65
2	5-OMe ( <b>c</b> )	85	76	65
3	5-F ( <b>d</b> )	97	69	41
4	7-Me( <b>e</b> )	76	57	27

<sup>a</sup> Rendimientos aislados tras purificación por columna cromatográfica en gel de sílice.

<sup>b</sup> Conversiones determinadas por <sup>1</sup>H-RMN del crudo de reacción.

Las indolinas racémicas sintetizadas *cis*-**21b-e** se utilizaron como sustratos de partida para la síntesis de los correspondientes carbamatos (*cis*-**23b-e**), aislándolos en forma racémica con buenos rendimientos (los datos se recogen en la Parte Experimental). Tras la separación de ambos enantiómeros de las indolinas y carbamatos racémicos *cis*-**23b-e** mediante HPLC con columnas de relleno quiral, se llevó a cabo la resolución cinética enzimática de las aminas, de nuevo en las condiciones óptimas establecidas para el sustrato modelo (Esquema 49).



**Esquema 49.** Resolución cinética de las indolinas racémicas *cis*-**21b-e** empleando CAL-A como biocatalizador en TBME.

La reacción de alcoxicarbonilación de los derivados sustituidos en la posición C-5 del anillo aromático tuvo lugar con valores de enantioselectividad excelentes (Tabla 13), alcanzándose además conversiones del 50% en todos los casos (entradas 1-4). La velocidad de reacción fue especialmente elevada para los derivados con grupos electrodadores, aislándose sustrato y producto en forma prácticamente enantiopura tras 6.5 horas de reacción en el caso de la *cis*-5-metil-2,3-dimetilindolina (*cis*-**21b**, entrada 2), 4 horas para la *cis*-5-metoxi-2,3-dimetilindolina (*cis*-**21c**, entrada 3) y 24 h para la *cis*-5-fluoro-2,3-dimetilindolina (*cis*-**21d**, entrada 4). Por otra parte, en la resolución del derivado *cis*-**21e** sustituido con un grupo metilo en la posición C-7, muy cercana al centro reactivo, no se obtuvo conversión alguna incluso tras 5 días de reacción (entrada 5).

**Tabla 13.** Resolución cinética de las indolinas *cis*-**21b-e** en TBME empleando la CAL-A como biocatalizador y 2.5 equivalentes de carbonato de alilo y 3-metoxifenilo.

Entrada	R <sup>1</sup>	t (h)	ee <sub>p</sub> (%) <sup>a</sup>	ee <sub>s</sub> (%) <sup>a</sup>	c (%) <sup>b</sup>	E <sup>c</sup>
1	H ( <b>a</b> )	24	98 (35)	99 (30)	50	>200
2	5-Me ( <b>b</b> )	6.5	97 (36)	>99 (29)	50	>200
3	5-OMe ( <b>c</b> )	4	97 (38)	>99 (30)	50	>200
4	5-F ( <b>d</b> )	24	99 (35)	99 (29)	50	>200
5	7-Me ( <b>e</b> )	111	--	--	--	

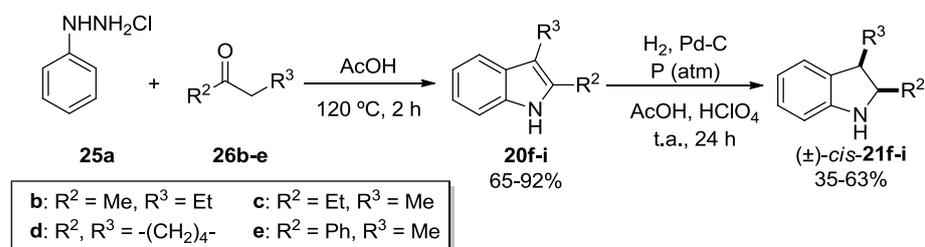
<sup>a</sup> Porcentajes determinados por HPLC. Se indican entre paréntesis los rendimientos aislados.

<sup>b</sup>  $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$ .

<sup>c</sup>  $E = \ln[(1-c)(1-ee_p)] / \ln[(1-c)(1+ee_p)]$ .<sup>144</sup>

### 2.6.2. Síntesis y Resolución de Derivados de *cis*-Indolinas Disustituidas en las Posiciones C-2 y C-3

Una vez analizado el efecto en la catálisis enzimática de la sustitución del anillo aromático, se realizó un estudio detallado de la influencia de distintos grupos en las posiciones C-2 (Et, Ph y Cy) y C-3 (Et y Cy). Los indoles precusores **20f-i** se prepararon con buen rendimiento a través de la indolización de Fischer entre la fenilhidrazina (**25a**) y diferentes cetonas (**26b-e**). Tras el aislamiento y la purificación de dichos indoles se llevó a cabo su hidrogenación catalítica diastereoselectiva con Pd-C, observando una vez más la ausencia total de formación del isómero *trans* (Esquema 50).



**Esquema 50.** Síntesis diastereoselectiva de las indolinas (±)-*cis*-**21f-i**.

En la Tabla 14 se recogen los resultados correspondientes a ambos procesos. Cabe destacar el hecho de que la reacción de hidrogenación

transcurrió con conversión completa para los derivados con sustituyentes alifáticos (**20f-g**), así como para el derivado de carbazol (**20h**), y pese a la ausencia de productos secundarios los rendimientos aislados fueron moderados debido a la descomposición de los productos en la etapa de purificación (entradas 1-3). Sin embargo, la formación de la indolina *cis*-**21i** con un grupo aromático en la posición C-2 apenas tuvo lugar a presión atmosférica. Por este motivo, la hidrogenación se llevó a cabo a una presión de 8 atm de hidrógeno, aislando la indolina **21i** con un rendimiento bajo (35%) debido a la formación de productos secundarios de sobre-hidrogenación (entrada 4).

**Tabla 14.** Síntesis de las indolinas ( $\pm$ )-*cis*-**21f-i** por indolización de Fischer y subsiguiente reducción estereoselectiva de los indoles **20f-i** empleando Pd-C como catalizador.

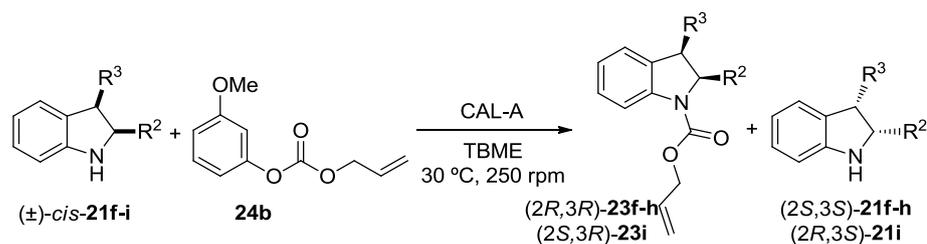
Entrada	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	20f-i (%) <sup>a</sup>	P (atm)	21i-f (%) <sup>a</sup>
1	Me	Et ( <b>f</b> )	92	1	47
2	Et	Me ( <b>g</b> )	75	1	46
3		-(CH <sub>2</sub> )- ( <b>h</b> )	65	1	63
4	Ph	Me ( <b>i</b> )	82	8	35

<sup>a</sup> Rendimientos aislados tras purificación por cromatografía de columna en gel de sílice.

La síntesis de los carbamatos racémicos *cis*-**23f-i** a partir de las correspondientes indolinas transcurrió con muy buenos rendimientos (ver Parte Experimental). La separación de ambos enantiómeros de sustratos y productos de la resolución cinética permitió la posterior monitorización de las reacciones enzimáticas por HPLC.

Por último, la resolución cinética enzimática de estos derivados en las condiciones previamente optimizadas reveló un efecto negativo asociado a la introducción de sustituyentes etilo conformacionalmente más flexibles que el resto metilo tanto en la posición C-2 como en C-3 (Tabla 15). En ambos casos las reacciones transcurrieron con excelentes enantioselectividades ( $E > 200$ ) aunque las conversiones fueron moderadas a 30 °C, obteniendo unos valores del 31% para **21f** tras 67 h (entrada 1) y del 20% para **21g** (entrada 3) tras 71 h.

**Tabla 15.** Resolución cinética de las indolinas ( $\pm$ )-*cis*-**21f-i** en TBME empleando la CAL-A como biocatalizador y 2.5 equivalentes de carbonato de alilo y 3-metoxifenilo.



Entrada	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	T (°C)	t (h)	ee <sub>p</sub> (%) <sup>a</sup>	ee <sub>s</sub> (%) <sup>a</sup>	c (%) <sup>b</sup>	E <sup>c</sup>
1	Me	Et ( <b>f</b> )	30	67	>99	45	31	>200
2	Me	Et ( <b>f</b> )	45	67	>99	51	34	>200
3	Et	Me ( <b>g</b> )	30	71	>99	25	20	>200
4	Et	Me ( <b>g</b> )	45	71	>99	34	26	>200
5	-(CH <sub>2</sub> )- ( <b>h</b> )		30	34	98 (39)	97 (25)	50	>200
6	Ph	Me ( <b>i</b> )	30	72	>99 (25)	96 (20)	49	>200

<sup>a</sup> Determinado por HPLC. Se indican entre paréntesis los rendimientos aislados.

<sup>b</sup>  $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$ .

<sup>c</sup>  $E = \ln[(1-d)(1-ee_p)] / \ln[(1-d)(1+ee_p)]$ .<sup>144</sup>

En un intento por aumentar las conversiones se realizaron una serie de pruebas en las que se incrementó la temperatura (entradas 2 y 4) o se utilizaron carbonatos más reactivos como el carbonato de difenilo, el carbonato de alilo y fenilo o el carbonato de bis(4-nitrofenilo). Desafortunadamente, ninguna de estas alternativas consiguió una mejora significativa de la conversión. En cambio, cuando la movilidad conformacional de los sustituyentes se encuentra restringida, el tamaño voluminoso de los mismos no impidió una buena resolución cinética, y tanto en el caso del derivado de carbazol (*cis*-**21h**) como el sustrato *cis*-**21i** en el que está presente un fenilo en la posición C-2 se alcanzaron conversiones del 50% o cercanas al 50% con excelentes valores de enantioselectividad (entradas 5 y 6).



## **CONCLUSIONES**



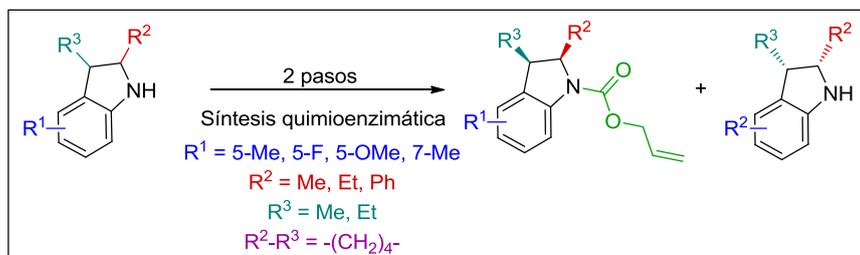
✓ En este capítulo se han sintetizado a partir de cetonas y fenilhidrazinas, y a través de un procedimiento de indolización de Fischer, una familia de indoles con rendimientos entre buenos y muy altos (65-92%), los cuales poseen distintos patrones de sustitución en las posiciones C-2 y C-3, así como en las posiciones C-5 y C-7 del anillo aromático.

✓ La hidrogenación de los indoles catalizada por Pd-C ha permitido acceder a diferentes *cis*-indolinas 2,3-disustituidas racémicas y diastereoméricamente puras, con rendimientos entre moderados y muy buenos (35-85%).

✓ Se ha estudiado la resolución cinética de las indolinas empleando diferentes biocatalizadores y agentes de alcoxicarbonilación, lo que ha permitido estudiar la influencia de diferentes factores estructurales en la catálisis enzimática.

✓ Los mejores resultados han sido obtenidos con la combinación de la CAL-A y el carbonato mixto de alilo y 3-metoxifenilo, observándose que la efectividad de la resolución cinética presenta una fuerte dependencia de la estructura de la indolina.

✓ Así, se ha detectado una total ausencia de reactividad para las indolinas con estereoquímica *trans*, o bien sustituidas en C-7 y de estereoquímica *cis*, mientras que se han obtenido excelentes resultados en la resolución de *cis*-indolinas con diferentes grupos en las posiciones C-2, C-3 o C-5.





## **PARTE EXPERIMENTAL**



## 2.7. General

La procedencia de los reactivos químicos es común a lo establecido en el Capítulo 1. Adicionalmente, Codexis suministró la lipasa de *Candida antarctica* tipo A (CAL-A, 2.6 U/mg); la compañía Novo-Nordisk donó la lipasa de *Candida antarctica* tipo B (CAL-B, Novozym-435, 7300 PLU/g); las lipasas de *Thermomyces lanuginosus* (TLL, 250 IUN/g) y *Rhizomucor miehei* (RM-IM, 150 IUN/g) proceden de Novo-Nordisk. Las lipasas de páncreas porcino (PPL, 46 U/mg), AK de *Pseudomonas fluorescens* (AK, 22100 U/g) y *Candida rugosa* (CRL, 1.41 U/g) se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

El hexano (grado HPLC) se utilizó sin tratamiento adicional. El resto de disolventes se secaron, destilaron y almacenaron bajo atmósfera de nitrógeno para su uso. El TBME, THF, tolueno y Et<sub>2</sub>O se secaron sobre sodio, empleando como indicador benzofenona, mientras que el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se secó sobre hidruro cálcico.

## 2.8. Técnicas de Análisis

Las técnicas de cromatografía en gel de sílice, espectroscopía IR, RMN, punto de fusión y rotación óptica específica se realizaron según se ha descrito en el Capítulo 1. Para la adquisición de los espectros de resonancia magnética nuclear se utilizó, además, un espectrómetro Bruker AV-400 (400.13 MHz para <sup>1</sup>H y 100.6 MHz para <sup>13</sup>C) a diferentes temperaturas.

### 2.8.1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Sumado a lo especificado en el Capítulo 1, para el seguimiento de las reacciones de alcoxycarbonilación enzimática, así como para la separación analítica de los enantiómeros de las aminas **21a-i** y los carbamatos **23a-i**, se utilizaron también como columnas quirales Chiralpak IC y Chiralcel OD (25 × 4.6 mm D.I.). Las condiciones de HPLC y los tiempos de retención se recogen en la Tabla 16.

**Tabla 16.** Separación analítica por HPLC de sustratos y productos de las reacciones enzimáticas.

Compuesto	Columna	Eluyente ( <i>n</i> -hexano/2-propanol) <sup>a</sup>	<i>t<sub>R</sub></i> (min) <sup>b</sup>	<i>R<sub>S</sub></i> <sup>c</sup>
<i>trans</i> -21a	OJ-H	95:5	12.5 y 22.5	9.2
<i>cis</i> -21a	OJ-H	95:5	<b>18.5</b> ( <i>S, S</i> ) y 20.9 ( <i>R, R</i> )	2.0
<i>cis</i> -21b	OJ-H	95:5	<b>16.7</b> ( <i>S, S</i> ) y 19.4 ( <i>R, R</i> )	1.5
<i>cis</i> -21c	OJ-H	95:5	22.6 ( <i>R, R</i> ) y <b>25.5</b> ( <i>S, S</i> )	1.7
<i>cis</i> -21d	OJ-H	95:5	<b>9.8</b> ( <i>S, S</i> ) y 10.8 ( <i>R, R</i> )	1.4
<i>cis</i> -21e	OJ-H	95:5	9.7 y 10.3	1.1
<i>cis</i> -21f	OD	98:2	<b>11.9</b> ( <i>S, S</i> ) y 13.6 ( <i>R, R</i> )	1.6
<i>cis</i> -21g	OJ-H	98:2	<b>14.4</b> ( <i>S, S</i> ) y 26.0 ( <i>R, R</i> )	8.1
<i>cis</i> -21h	IC	95:5	5.7 ( <i>R, R</i> ) y <b>8.0</b> ( <i>S, S</i> )	4.5
<i>cis</i> -21i	IC	95:5	7.0 ( <i>S, R</i> ) y <b>8.3</b> ( <i>R, S</i> )	1.8
<i>trans</i> -23a	IA	98:2	6.7 y 8.0	2.4
<i>cis</i> -23a	IA	99:1	<b>9.9</b> ( <i>R, R</i> ) y 10.7 ( <i>S, S</i> )	1.0
<i>cis</i> -23b	IC	95:5	8.3 ( <i>S, S</i> ) y <b>9.1</b> ( <i>R, R</i> )	1.4
<i>cis</i> -23c	OJ-H	95:5	<b>10.8</b> ( <i>R, R</i> ) y 12.5 ( <i>S, S</i> )	1.9
<i>cis</i> -23d	IC	95:5	7.4 ( <i>S, S</i> ) y <b>7.9</b> ( <i>R, R</i> )	0.8
<i>cis</i> -23e	IC	95:5	8.2 y 9.0	1.3
<i>cis</i> -23f	OD	98:2	5.9 ( <i>S, S</i> ) y <b>7.1</b> ( <i>R, R</i> )	1.8
<i>cis</i> -23g	IA	99:1	<b>9.0</b> ( <i>R, R</i> ) y 10.1 ( <i>S, S</i> )	1.2
<i>cis</i> -23h	IA	99:1	<b>10.4</b> ( <i>R, R</i> ) y 12.5 ( <i>S, S</i> )	2.5
<i>cis</i> -23i	IC	99:1	16.6 ( <i>R, S</i> ) y <b>17.8</b> ( <i>S, R</i> )	1.3

<sup>a</sup> Todos los análisis se efectuaron con un flujo de 0.8 mL/min a 30 °C.

<sup>b</sup> Se destaca en negrita el enantiómero mayoritario obtenido tras la transformación enzimática.

<sup>c</sup> Factor de resolución:  $R_S = 2x[t_R(S) - t_R(R)]/w_{b1}(S) + w_{b2}(R)$

## 2.8.2. Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRMS)

Las medidas de masas de alta resolución se efectuaron en un espectrómetro Micro Tof-Q con las técnicas ESI<sup>+</sup> (ionización por electrospray en modo positivo) y ESI<sup>-</sup> (ionización por electrospray en modo negativo).

## 2.9. Procedimientos Sintéticos

### 2.9.1. Procedimiento General para la Síntesis de los Indoles 20b-i

Sobre una disolución de la correspondiente cetona **26a-e** (8.90 mmol) en ácido acético (AcOH, 14.3 mL) se añade el respectivo clorhidrato de fenilhidrazina **25a-e** (2.86 mmol) y la disolución resultante se agita a reflujo durante 2 h. Transcurrido ese tiempo se deja enfriar la mezcla a temperatura ambiente y se añade AcOEt (60 mL). La fase orgánica se lava con salmuera (2 x 150 mL) y con una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (150 mL), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y el disolvente se elimina por evaporación a presión reducida, aislándose los indoles **20b-d**, **20g** y **20h** sin ser necesaria purificación adicional (82-92% rendimiento). Por su parte, los indoles **20e**, **20f** y **20i** se purifican por cromatografía de columna en gel de sílice (65-76% rendimiento).

### 2.9.2. Síntesis de la *trans*-2,3-Dimetilindolina Racémica (*trans*-**21a**)

Sobre una disolución de 2,3-dimetil-1*H*-indol (**20a**, 1.00 g, 6.88 mmol) en AcOH (10 mL) se añade gota a gota una disolución de NaBH<sub>3</sub>CN (1.30 g, 29.64 mmol) en AcOH (10 mL), y la disolución resultante se agita a temperatura ambiente durante 12 h. Transcurrido ese tiempo se transfiere la mezcla a un matraz Erlenmeyer, se lleva a pH ligeramente básico (8-9) con una disolución acuosa saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (150 mL) y se extrae con Et<sub>2</sub>O (3 x 100 mL). Las fases orgánicas se combinan, se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtran y se elimina el disolvente por evaporación a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) obteniéndose 385 mg de la indolina *trans*-**21a** como un aceite incoloro (38%).

### 2.9.3. Procedimiento General para la Síntesis de la *cis*-Indolinas **21a-h**

A un matraz de 100 mL que contiene el correspondiente indol **20a-h** (0.94 mmol) y 10% Pd-C (34 mg) se le hace vacío y posteriormente se conecta un globo que contiene H<sub>2</sub>. Se añade entonces cuidadosamente una mezcla de AcOH (3.0 mL) y HClO<sub>4</sub> (1.0 mL). La suspensión resultante se agita a temperatura ambiente durante 24 h, transcurridas las cuales se detiene la reacción por filtración de la suspensión sobre tierra de diatomeas. El crudo de reacción se alcaliniza con una disolución acuosa de NaOH 4 M (100 mL), se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 30 mL), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se elimina el disolvente por evaporación a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (mezclas de Et<sub>2</sub>O/hexano), aislándose las *cis*-indolinas **21a-h** como aceites incoloros (27-85% rendimiento).

### 2.9.4. Síntesis de la *cis*-2-Fenil-3-metilindolina Racémica (*cis*-**21i**)

En un hidrogenador se introducen el 3-metil-2-fenilindol (**20i**, 750 mg, 3.62 mmol), 10% Pd-C (133 mg), AcOH (13.4 mL) y HClO<sub>4</sub> (4.0 mL). El hidrogenador se sella, se evacúa el aire y se introduce H<sub>2</sub> en el sistema (8 atm de presión). La suspensión se agita a temperatura ambiente durante 24 h y, transcurrido ese tiempo, se detiene la reacción por filtración de la mezcla sobre tierras diatomeas. El crudo se alcaliniza con una disolución acuosa saturada de NaHCO<sub>3</sub> (150 mL) y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 30 mL). Las fases orgánicas se combinan y se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtran y el disolvente se elimina por destilación a presión reducida. El crudo de reacción obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (5-10% Et<sub>2</sub>O/hexano), obteniéndose la indolina *cis*-**21i** como un aceite incoloro (35% rendimiento).

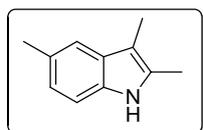
### 2.9.5. Procedimiento General para la Síntesis de los Carbamatos Racémicos *trans*-23a y *cis*-23a-i

Sobre una disolución de la correspondiente indolina racémica *trans*-21a o *cis*-21a-i (0.25 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (0.9 mL) se añaden, sucesivamente y bajo atmósfera inerte, piridina (19 µL, 0.27 mmol) y cloroformiato de alilo (29 µL, 0.27 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 3 h y transcurrido ese tiempo se elimina el disolvente bajo presión reducida. El crudo se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (mezclas de AcOEt/hexano), obteniéndose los correspondientes carbamatos racémicos *trans*-23a y *cis*-23a-h como aceites incoloros, y *cis*-23i como un sólido blanco (72-95% rendimiento).

### 2.9.6. Procedimiento General para la Resolución Cinética Enzimática de las Indolinas Racémicas *cis*-21a-i

Una suspensión que contiene la correspondiente indolina racémica *cis*-21a-i (0.48 mmol), el carbonato 24b (252 mg, 1.21 mmol) y la CAL-A (relación 1:2 en peso, amina:enzima) en TBME seco (3.2 mL) se agita a 30 °C y 250 rpm monitorizando el transcurso de la reacción por HPLC. Cuando la reacción alcanza valores óptimos de conversión (4-72 h, Tabla 11, 13 y 15) se detiene por filtración de la enzima, que se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 5 mL). El disolvente se evapora bajo presión reducida, obteniéndose un crudo que se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (mezclas de distintos disolventes como AcOEt, hexano, Et<sub>2</sub>O o CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), aislando los correspondientes carbamatos y aminas en forma ópticamente activa.

## 2.10. Datos Experimentales



### 2,3,5-Trimetil-1*H*indol (20b)

**Fórmula empírica:** C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**R<sub>f</sub>** (10% AcOEt/hexano): 0.38

**Rendimiento:** 85%    **Peso Molecular:** 159.23 g/mol    **Pf:** 104-106 °C

**IR** (KBr):  $\nu$  3393, 2919, 2855, 2362, 1595, 1478, 1449, 1417, 1303, 1265, 791 cm<sup>-1</sup>

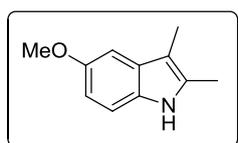
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.35 (s, 3H), 2.37 (s, 3H), 2.63 (s, 3H), 7.10 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.1, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.4 Hz, 1H), 7.17 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.1 Hz, 1H), 7.35 (sa, 1H), 7.43 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 0.6 Hz, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  8.5 (CH<sub>3</sub>), 11.4 (CH<sub>3</sub>), 21.6 (CH<sub>3</sub>), 106.5 (C), 109.9 (CH), 117.8 (CH), 122.4 (CH), 128.1 (C), 129.7 (C), 131.0 (C), 133.6 (C) ppm

**HRMS** (ESI, *m/z*) (C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>)<sup>+</sup> (M-H)<sup>+</sup>: calculada 317.2023, encontrada: 317.2008

---

### 2,3,-Dimetil-5-metoxi-1*H*indol (20c)



**Fórmula empírica:** C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**Rendimiento:** 85%

**R<sub>f</sub>** (10% AcOEt/hexano): 0.21

**Peso Molecular:** 175.23 g/mol    **Pf:** 106-109 °C

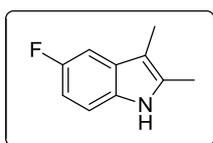
**IR** (KBr):  $\nu$  3463, 3406, 3049, 2919, 2359, 1595, 1484, 1268, 1217, 1137, 1029 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz):  $\delta$  2.22 (s, 3H), 2.35 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 6.79 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.6 Hz, 1H), 6.95 (s, 1H), 7.14 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.6 Hz, 1H), 7.57 (sa, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz):  $\delta$  8.6 (CH<sub>3</sub>), 11.7 (CH<sub>3</sub>), 56.1 (CH<sub>3</sub>), 100.6 (CH), 107.1 (C), 110.6 (CH), 110.8 (CH), 130.0 (C), 130.4 (C), 131.8 (C), 153.9 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>NO)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 176.1070, encontrada: 176.1064

**5-Fluoro-2,3-Dimetil-1H-indol (20d)**



**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>FN

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**Rendimiento:** 91%

**R<sub>f</sub>** (5% AcOEt/hexano): 0.14

**Peso Molecular:** 163.19 g/mol

**Pf:** 98-99 °C

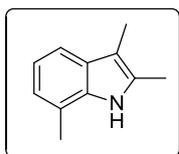
**IR** (KBr):  $\nu$  3465, 3365, 2913, 2869, 1594, 1487, 1437, 1270 1229, 1176, 794, 734 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.22 (s, 3H), 2.36 (s, 3H), 6.85-6.92 (m, 1H), 7.13-7.17 (m, 2H), 7.64 (sa, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  8.6 (CH<sub>3</sub>), 11.7 (CH<sub>3</sub>), 103.1 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 23.3 Hz, CH), 107.5 (d, <sup>4</sup>J<sub>FC</sub> = 4.5 Hz, C), 108.9 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 26.1 Hz, CH), 110.6 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 9.7 Hz, CH), 130.0 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 9.5 Hz, C), 131.7 (C), 132.9 (C), 157.9 (d, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 233.3 Hz, C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>-</sup>, *m/z*) (C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>FN)<sup>-</sup> (M-H)<sup>-</sup>: calculada 162.0725, encontrada: 162.0720

**2,3,7-Trimetil-1H-indol (20e)**



**Fórmula empírica:** C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N

**Aspecto Físico:** Sólido blanco gomoso

**Rendimiento:** 76%

**R<sub>f</sub>** (10% AcOEt/hexano): 0.38

**Peso Molecular:** 159.23 g/mol

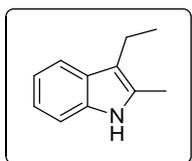
**IR** (KBr):  $\nu$  3393, 2919, 2855, 2362, 1595, 1478, 1449, 1417, 1303, 1265, 791 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.31 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 2.52 (s, 3H), 6.98-7.05 (m, 1H), 7.10 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, 1H), 7.42 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.8 Hz, 1H), 7.64 (sa, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  8.7 (CH<sub>3</sub>), 11.7 (CH<sub>3</sub>), 16.7 (CH<sub>3</sub>), 107.7 (C), 115.8 (CH), 119.2 (C), 119.3 (CH), 121.7 (CH), 129.1 (C), 130.4 (C), 134.7 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>N<sub>2</sub>)<sup>+</sup> (2M+H)<sup>+</sup>: calculada 319.2169, encontrada: 319.2181

**3-Etil-2-metil-1*H*indol (20f)**



**Fórmula empírica:** C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**Rendimiento:** 92%

***R*<sub>f</sub>** (10% AcOEt/hexano): 0.24

**Peso Molecular:** 159.23 g/mol

**Pf:** 104-106 °C

**IR** (KBr):  $\nu$  3406, 3055, 2964, 2930, 2869, 1612, 1461, 1299, 1265, 1235, 1011 cm<sup>-1</sup>

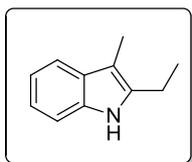
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz):  $\delta$  1.52 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, 3H), 2.39 (s, 3H), 3.00 (q, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, 2H), 7.20 (sa, 1H), 7.24-7.33 (m, 1H), 7.39-7.49 (m, 2H), 7.81-7.91 (m, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz):  $\delta$  11.4 (CH<sub>3</sub>), 15.5 (CH<sub>3</sub>), 17.5 (CH<sub>2</sub>), 110.3 (CH), 113.9 (C), 118.1 (CH), 119.0 (CH), 120.8 (CH), 128.5 (C), 130.3 (C), 135.3 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>-</sup>, *m/z*) (C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N)<sup>-</sup> (M-H)<sup>-</sup>: calculada 158.0975, encontrada: 158.0957

---

**2-Etil-3-metil-1*H*indol (20g)**



**Fórmula empírica:** C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**Rendimiento:** 75%

***R*<sub>f</sub>** (10% AcOEt/hexano): 0.28

**Peso Molecular:** 159.23 g/mol

**Pf:** 57-59 °C

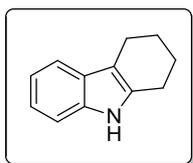
**IR** (KBr):  $\nu$  3464, 3410, 3054, 2971, 2922, 2873, 2305, 1464, 1383, 1265, 740 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.33 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, 3H), 2.33 (s, 3H), 2.80 (q, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, 2H), 7.05-7.35 (m, 3H), 7.47-7.63 (m, 1H), 7.66 (sa, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  8.4 (CH<sub>3</sub>), 14.1 (CH<sub>3</sub>), 19.5 (CH<sub>2</sub>), 106.2 (C), 110.3 (CH), 118.1 (CH), 119.1 (CH), 121.0 (CH), 129.6 (C), 135.2 (C), 136.7 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 159.1043, encontrada: 159.1043

**2,3,4,9-Tetrahidro-1H-carbazol (20h)**



**Fórmula empírica:** C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**Rendimiento:** 65%

**R<sub>f</sub>** (10% AcOEt/hexano): 0.38

**Peso Molecular:** 171.24 g/mol

**Pf:** 99-103 °C

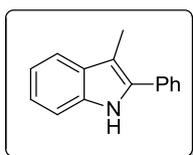
**IR** (KBr):  $\nu$  3406, 3055, 2964, 2930, 2869, 1261, 1461, 1299, 1265, 1234, 1011 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.95-2.12 (m, 4H), 2.68-2.81 (m, 2H), 2.82-2.93 (m, 2H), 7.21-7.34 (m, 3H), 7.39 (sa, 1H), 7.60-7.69 (m, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  21.0 (CH<sub>2</sub>), 23.2 (CH<sub>2</sub>), 23.3 (CH<sub>2</sub>), 23.4 (CH<sub>2</sub>), 110.0 (C), 110.5 (CH), 117.8 (CH), 119.1 (CH), 120.9 (CH), 127.8 (C), 134.2 (C), 135.7 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>-</sup>, *m/z*) (C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N)<sup>-</sup> (M+H)<sup>-</sup>: calculada 170.0975, encontrada: 170.0966

**2-Fenil-3-metil-1H-indol (20i)**



**Fórmula empírica:** C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**Rendimiento:** 82%

**R<sub>f</sub>** (10% AcOEt/hexano): 0.28

**Peso Molecular:** 207.27 g/mol

**Pf:** 89-92 °C

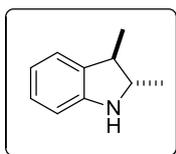
**IR** (KBr):  $\nu$  3464, 3410, 3054, 2971, 2922, 2873, 2305, 1464, 1383, 1265, 740 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.64 (s, 3H), 7.32-7.47 (m, 3H), 7.47-4.55 (m, 1H), 7.57-7.65 (m, 2H), 7.65-7.72 (m, 2H), 7.77-7.85 (m, 1H), 7.68 (sa, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  9.7 (CH<sub>3</sub>), 108.6 (C), 110.8 (CH), 119.0 (CH), 119.6 (CH), 122.3 (CH), 127.3 (CH), 127.8 (2CH), 128.8 (2CH), 130.1 (C), 133.3 (C), 134.1 (C), 135.9 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>N)<sup>+</sup> (M)<sup>+</sup>: calculada 207.1048, encontrada: 207.1043

***trans*-2,3-dimetilindolina (*trans*-21a)**



**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 38%

**R<sub>t</sub>** (100% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.37

**Peso Molecular:** 147.22 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3367, 3050, 3032, 2967, 2865, 1615, 1487, 1468, 1254, 1095 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.36 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, 3H), 1.37 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.3 Hz, 3H), 2.77-3.02 (m, 1H), 3.47-3.56 (m, 1H), 3.83 (sa, 1H), 6.66 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, 1H), 6.75-6.87 (m, 1H), 7.03-7.18 (m, 2H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  17.3 (CH<sub>3</sub>), 20.6 (CH<sub>3</sub>), 44.4 (CH), 64.0 (CH), 109.2 (CH), 118.6 (CH), 123.3 (CH), 127.4 (CH), 134.3 (C), 150.6 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 148.1121, encontrada: 148.1122

**Separación analítica de *trans*-21a (HPLC):**

Columna: Chiralcel OJ-H

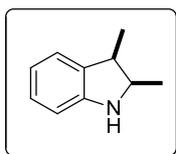
Temperatura: 30 °C

Eluyente: n-hexano/2-propanol 95:5

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (1) = 12.5 min, *t<sub>R</sub>* (2) = 22.5 min

***cis*-2,3-Dimetilindolina (*cis*-21a)**



**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 85%

***R<sub>f</sub>*** (10% AcOEt/hexano): 0.27

**Peso Molecular:** 147.22 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3367, 3049, 3032, 2966, 2919, 2870, 1610, 1484, 1463, 1250, 1092, 1011, 922, 742 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.17 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 3H), 1.22 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, 3H), 3.30 (q, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, 1H), 3.47 (sa, 1H), 3.91-4.03 (m, 1H), 6.65 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7 Hz, 1H), 6.77 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7 Hz; <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 0.9 Hz, 1H), 6.97-7.18 (m, 2H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  13.7 (CH<sub>3</sub>), 16.4 (CH<sub>3</sub>), 39.5 (CH), 58.4 (CH), 109.4 (CH), 118.8 (CH), 123.9 (CH), 127.3 (CH), 134.4 (C), 150.2 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 148.1121, encontrada: 148.1118

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = -29.0$  (*c* 0.8, CHCl<sub>3</sub>) [para (2*S*,3*S*)-21a en 97% *ee*] [lit.  $[\alpha]_D^{20} = +26.6$  (*c* 0.8, CHCl<sub>3</sub>) para (2*R*,3*R*)-21a en 92% *ee*]<sup>117</sup>

**Separación analítica de *cis*-21a (HPLC):**

Columna: Chiralcel OJ-H

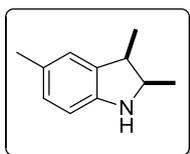
Temperatura: 30 °C

Eluyente: n-hexano/2-propanol 95:5

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (2*S*,3*S*) = 18.5 min, *t<sub>R</sub>* (2*R*,3*R*) = 20.9 min

***cis*-2,3,5-Trimetilindolina (*cis*-21b)**



**Fórmula empírica:** C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 65%

**R<sub>f</sub>** (10% Et<sub>2</sub>O/hexano): 0.16

**Peso Molecular:** 161.24 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3362, 3010, 2965, 2918, 2866, 1618, 1494, 1448, 1378, 1249, 1115, 1095, 925, 807 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.15 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, 3H), 1.18 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, 3H), 2.28 (s, 3H, Me), 3.00-3.47 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 3.87-4.03 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 6.55 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.8 Hz, 1H), 6.84 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.8 Hz, 1H), 6.91 (s, 1H, H<sub>4</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  13.8 (CH<sub>3</sub>), 16.4 (CH<sub>3</sub>), 21.0 (CH<sub>3</sub>), 39.7 (CH), 58.7 (CH), 109.5 (CH), 124.7 (CH), 127.7 (CH), 128.2 (C), 134.8 (C), 147.9 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 162.1277, encontrada: 162.1268

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = -28.4$  (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) [para (2*S*,3*S*)-21b en 99% *ee*]

**Separación analítica de *cis*-21b (HPLC):**

Columna: Chiralcel OJ-H

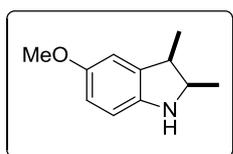
Temperatura: 30 °C

Eluyente: n-hexano/2-propanol 95:5

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (2*S*,3*S*) = 16.7 min, *t<sub>R</sub>* (2*R*,3*R*) = 19.4 min

*cis*-2,3-Dimetil-3-metoxindolina (*cis*-21c)



Fórmula empírica: C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>NO

Aspecto Físico: Aceite incoloro

Rendimiento: 65%

*R<sub>f</sub>* (20% Et<sub>2</sub>O/hexano): 0.16

Peso Molecular: 177.24 g/mol

IR (NaCl):  $\nu$  3358, 2964, 2933, 2831, 1598, 1491, 1434, 1379, 1286, 1232, 1203, 1150, 1041, 908, 866, 806, 717 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz):  $\delta$  1.05 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 3H), 1.08 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, 3H), 2.28 (sa, 1H), 3.12 (q, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.77-3.84 (m, 1H), 6.44 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.3 Hz, 1H), 6.52 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.3 Hz; <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.4 Hz, 2H), 6.68 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.4 Hz, 1H) ppm

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz):  $\delta$  13.9 (CH<sub>3</sub>), 16.2 (CH<sub>3</sub>), 40.8 (CH), 56.3 (CH), 59.5 (CH<sub>3</sub>), 110.1 (CH), 111.7 (CH), 112.7 (CH), 137.0 (C), 145.7 (C), 154.1 (C) ppm

HRMS (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>NO)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 178.1226, encontrada: 178.1217

Rotación Óptica Específica:  $[\alpha]_D^{20} = -29.0$  (*c* 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) [para (2*S*,3*S*)-21c en 99% *ee*]

Separación analítica de *cis*-21c (HPLC):

Columna: Chiralcel OJ-H

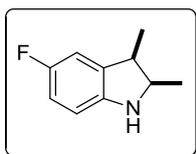
Temperatura: 30 °C

Eluyente: n-hexano/2-propanol 95:5

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (2*R*,3*R*) = 22.6 min, *t<sub>R</sub>* (2*S*, 3*S*) = 25.5 min

***cis*-5-Fluoro-2,3-dimetilindolina (*cis*-21d)**



**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>FN

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 41%

**R<sub>f</sub>** (40% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/hexano): 0.21

**Peso Molecular:** 165.21 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3372, 2969, 2924, 2873, 1606, 1484, 1436, 1201, 798 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.14 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 3H), 1.17 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, 3H), 3.19-3.32 (m, 1H), 3.33 (sa, 1H), 3.86-4.07 (m, 1H), 6.48-6.54 (m, 1H), 6.65-6.76 (m, 1H), 6.76-6.84 (m, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  13.6 (CH<sub>3</sub>), 16.3 (CH<sub>3</sub>), 39.9 (CH), 59.1 (CH), 109.6 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 8.2 Hz CH), 111.3 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 23.6 Hz, CH), 113.1 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 23.2 Hz, CH), 136.2 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 7.5 Hz, C), 146.1 (C), 157.3 (d, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 234.8 Hz, C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>FN)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 166.1027, encontrada: 166.1046

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = -1.6$  (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) [para (2*S*,3*S*)-21d en 99% *ee*]

**Separación analítica de *cis*-21d (HPLC):**

Columna: Chiralcel OJ-H

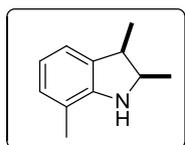
Temperatura: 30 °C

Eluyente: n-hexano/2-propanol 95:5

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (2*S*,3*S*) = 9.8 min, *t<sub>R</sub>* (2*R*,3*R*) = 10.8 min

***cis*-2,3,7-Trimetilindolina (*cis*-21e)**



**Fórmula empírica:** C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 27%

**R<sub>f</sub>** (40% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/hexano): 0.24

**Peso Molecular:** 161.24 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3365, 3050, 3022, 2965, 2928, 2870, 1888, 1836, 1602, 1465, 1378, 1351, 1318, 1257, 1228, 1203, 1093, 1058, 924, 771, 747 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.20 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 3H), 1.22 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, 3H), 1.32 (sa, 1H), 2.17 (s, 3H), 3.15-3.43 (m, 1H), 3.30 (sa, 1H), 3.92-4.06 (m, 1H), 6.73 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, 1H), 6.91 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, 1H), 6.98 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  13.9 (CH<sub>3</sub>), 16.6 (CH<sub>3</sub>), 16.8 (CH<sub>3</sub>), 39.8 (CH), 58.3 (CH), 118.7 (C), 119.0 (CH), 121.4 (CH), 128.3 (CH), 133.8 (C), 148.7 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 162.1277, encontrada: 162.1281

**Separación analítica de *cis*-21e (HPLC):**

Columna: Chiralcel OJ-H

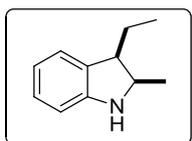
Temperatura: 30 °C

Eluyente: n-hexano/2-propanol 95:5

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (1) = 9.7 min, *t<sub>R</sub>* (2) = 10.3 min

***cis*-3-Etil-2-metilindolina (21f)**



**Fórmula empírica:** C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 47%

***R*<sub>f</sub>** (10% Et<sub>2</sub>O/hexano): 0.15

**Peso Molecular:** 161.24 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3353, 3056, 2942, 2488, 1682, 1570, 1539, 1455, 1429, 1325, 1251, 996, 789, 670 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.13 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, 3H), 1.23 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 3H), 1.61-1.89 (m, 2H), 3.11 (c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, 1H), 3.64 (sa, 1H), 4.05 (dc, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 13.2, 6.5 Hz, 1H), 6.71 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7 Hz, 1H), 6.82 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz; <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 0.9 Hz, 1H), 7.13 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, 1H), 7.20 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  12.5 (CH<sub>3</sub>), 15.9 (CH<sub>3</sub>), 20.8 (CH<sub>2</sub>), 46.7 (CH), 58.4 (CH), 109.5 (CH), 118.4 (CH), 124.4 (CH), 127.3 (CH), 132.7 (C), 150.6 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 162.1277, encontrada: 162.1269

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -2.4$  (*c* 1.3, CHCl<sub>3</sub>) [para (2*S*,3*S*)-**21f** en 54% *ee*] [lit.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +4.3$  (*c* 1.3, CHCl<sub>3</sub>) para (2*R*,3*R*)-**21f** en 93% *ee*]<sup>116d</sup>

**Separación analítica de *cis*-21f (HPLC):**

Columna: Chiralcel OD

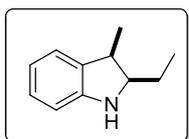
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 98:2

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t*<sub>R</sub> (2*S*,3*S*) = 11.9 min, *t*<sub>R</sub> (2*R*,3*R*) = 13.6 min

***cis*-2-Etil-3-metilindolina (21g)**



**Fórmula empírica:** C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 46%

***R*<sub>f</sub>** (20% AcOEt/hexano): 0.44

**Peso Molecular:** 161.24 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3365, 3050, 3030, 2962, 2932, 2874, 1609, 1483, 1462, 1380, 1242, 1097, 1020, 741 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.08 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, 3H), 1.22 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, 3H), 1.53-1.79 (m, 2H), 3.33 (q, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, 1H), 3.74 (td, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.1, 5.9 Hz, 1H), 3.96 (sa, 1H), 6.70 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7 Hz, 1H), 6.82 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz; <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 0.9 Hz, 1H), 7.08-7.14 (m, 1H), 7.17 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  11.5 (CH<sub>3</sub>), 14.3 (CH<sub>3</sub>), 23.2 (CH<sub>2</sub>), 38.9 (CH), 64.9 (CH), 109.3 (CH), 118.7 (CH), 123.8 (CH), 127.3 (CH), 135.3 (C), 150.1 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 162.1277, encontrada: 162.1282

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = +0.55$  (*c* 0.9, CHCl<sub>3</sub>) [para (2*S*,3*S*)-**21g** en 54% *ee*] [lit.  $[\alpha]_D^{20} = +23.4$  (*c* 0.9, CHCl<sub>3</sub>) para (2*S*,3*S*)-**21g** en 90% *ee*]<sup>116d</sup>

**Separación analítica de *cis*-21g (HPLC):**

Columna: Chiralcel OJ-H

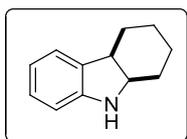
Temperatura: 30 °C

Eluyente: n-hexano/2-propanol 98:2

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t*<sub>R</sub> (2*S*,3*S*) = 14.4 min, *t*<sub>R</sub> (2*R*, 3*R*) = 26.0 min

***cis*-2,3,4,4a,9,9a-Hexahidro-1*H*-carbazol (21h)**



**Fórmula empírica:** C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 63%

**R<sub>f</sub>** (20% Et<sub>2</sub>O/hexano): 0.29

**Peso Molecular:** 173.25 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3362, 3048, 3030, 2928, 2854, 1763, 1610, 1477, 1460, 1249, 1151, 1017, 974, 749 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.31-1.46 (m, 3H), 1.69-1.52 (m, 3H), 1.73-1.82 (m, 2H), 3.11 (q, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, 1H), 3.65 (sa, 1H), 3.70-3.79 (m, 1H), 6.69 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7 Hz, 1H), 6.75 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, 1H), 7.04 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7 Hz, 1H), 7.10 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  21.8 (CH<sub>2</sub>), 22.7 (CH<sub>2</sub>), 27.1 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 41.1 (CH), 59.8 (CH), 110.3 (CH), 118.9 (CH), 123.3 (CH), 127.1 (CH), 133.7 (C), 150.9 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 174.1277, encontrada: 174.1290

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = -8.6$  (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>) [para (2*S*,3*S*)-**21h** en 97% *ee*] [lit.  $[\alpha]_D^{20} = +23.4$  (*c* 1.2, CHCl<sub>3</sub>) para (2*R*,3*R*)-**21h** en 91% *ee*]<sup>117</sup>

**Separación analítica de *cis*-21h (HPLC):**

Columna: Chiralpak IC

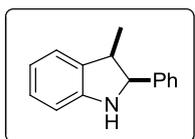
Temperatura: 30 °C

Eluyente: n-hexano/2-propanol 95:5

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (2*R*,3*R*) = 5.7 min, *t<sub>R</sub>* (2*S*, 3*S*) = 8.0 min

***cis*-2-Fenil-3-metilindolina (21i)**



**Fórmula empírica:** C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 35%

**R<sub>f</sub>** (20% Et<sub>2</sub>O/hexano): 0.48

**Peso Molecular:** 209.29 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3370, 3030, 2966, 2925, 2869, 1609, 1484, 1454, 1398, 1358, 1324, 1089, 1027, 806, 740, 702 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.08 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, 3H), 1.22 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, 3H), 1.53-1.79 (m, 2H), 3.33 (q, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, 1H), 3.74 (td, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.1, 5.9 Hz, 1H), 3.96 (sa, 1H), 6.70 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7 Hz, 1H), 6.82 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz; <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 0.9 Hz, 1H), 7.08-7.14 (m, 1H), 7.17 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  15.9 (CH<sub>3</sub>), 41.3 (CH), 67.4 (CH), 108.9 (CH), 119.0 (CH), 124.2 (CH), 127.3 (2CH), 127.4 (CH), 127.6 (CH), 128.3 (2CH), 133.9 (C), 140.9 (C), 150.6 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 210.1277, encontrada: 210.1265

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = +176.4$  (*c* 0.5, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) [para (2*R*,3*S*)-21i en 96% *ee*]

**Separación analítica de *cis*-21i (HPLC):**

Columna: Chiralpak IC

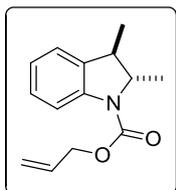
Temperatura: 30 °C

Eluyente: n-hexano/2-propanol 95:5

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (2*S*,3*R*) = 7.0 min, *t<sub>R</sub>* (2*R*, 3*S*) = 8.3 min

*trans*-*N*-Aliloxicarbonil-2,3-dimetilindolina (*trans*-23a)



**Fórmula empírica:** C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 95%

**R<sub>f</sub>** (5% AcOEt/hexano): 0.16

**Peso Molecular:** 231.29 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3047, 2979, 2877, 1705, 1607, 1483, 1280, 1149, 1068, 1021 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, 50 °C, 400.13 MHz):  $\delta$  1.14 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.0 Hz, 3H), 1.20 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.3 Hz, 3H), 2.81-2.92 (m, 1H), 4.86-4.52 (m, 2H), 5.25 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 10.5 Hz, 1H), 5.33 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 17.2 Hz, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 1.0 Hz, 1H), 5.92-6.07 (m, 1H), 6.99 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, 1H), 7.18 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7 Hz, 1H), 7.23 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, 3H), 7.60 (sa, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, 50 °C, 100.6 MHz):  $\delta$  21.5 (CH<sub>3</sub>), 22.8 (CH<sub>3</sub>), 43.7 (CH), 64.5 (CH), 66.9 (CH<sub>2</sub>), 116.0 (CH), 119.1 (CH<sub>2</sub>), 124.4 (CH), 126.0 (CH), 128.9 (CH), 134.2 (CH), 137.2 (C), 141.3 (C), 153.9 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>NNaO<sub>2</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 254.1151, encontrada: 254.1149

**Separación analítica de *trans*-23a (HPLC):**

Columna: Chiralpak IA

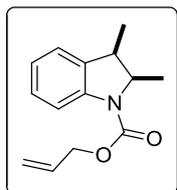
Temperatura: 30 °C

Eluyente: n-hexano/2-propanol 98:2

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (1) = 6.7 min, *t<sub>R</sub>* (2) = 8.0 min

*cis*-*N*-Aliloxycarbonil-2,3-dimetilindolina (*cis*-23a)



**Fórmula empírica:** C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 78%

**R<sub>f</sub>** (10% AcOEt/hexano): 0.40

**Peso Molecular:** 231.29 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3047, 2979, 2940, 2875, 1707, 1603, 1483, 1402, 1277, 1149, 1068, 1024, 932, 752 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, 100 °C, 400.13 MHz):  $\delta$  1.13 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 3H), 1.32 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, 3H), 3.59 (q, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, 1H), 4.57-4.64 (m, 1H), 4.76 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.4 Hz, 2H), 5.30 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 10.5 Hz, 1H), 5.42 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 17.3 Hz, 1H), 6.08 (ddt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 16.2, 10.5, 5.4 Hz, 1H), 7.03 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, 1H), 7.18-7.22 (m, 2H), 7.64 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.9 Hz, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, 100 °C, 100.6 MHz):  $\delta$  12.2 (CH<sub>3</sub>), 14.0 (CH<sub>3</sub>), 37.7 (CH), 59.9 (CH), 65.7 (CH<sub>2</sub>), 115.0 (CH), 117.9 (CH<sub>2</sub>), 123.1 (CH), 123.7 (CH), 127.6 (CH), 133.5 (CH), 135.8 (C), 141.0 (C), 152.4 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>NNaO<sub>2</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 254.1151, encontrada: 254.1146

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = -46.2$  (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) [para (2*R*,3*R*)-23a en 98% *ee*]

**Separación analítica de *cis*-23a (HPLC):**

Columna: Chiralpak IA

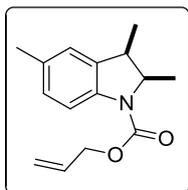
Temperatura: 30 °C

Eluyente: n-hexano/2-propanol 99:1

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (2*R*,3*R*) = 9.9 min, *t<sub>R</sub>* (2*S*,3*S*) = 10.7 min

*cis*-*N*-Aliloxicarbonil-2,3,5-trimetilindolina (*cis*-23b)



**Fórmula empírica:** C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub>

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 77%

**R<sub>f</sub>** (20% Et<sub>2</sub>O/hexano): 0.48

**Peso Molecular:** 245.32 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  2977, 2940, 2872, 1707, 1490, 1397, 1275, 1141, 1071, 818, 760 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>CN, 70 °C, 400.13 MHz):  $\delta$  1.13 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 3H), 1.32 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, 3H), 2.33 (s, 3H), 3.47-3.60 (m, 1H), 4.53-4.65 (m, 1H), 4.74 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.8 Hz, 2H), 5.28 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 10.5 Hz, 1H), 5.41 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 17.3 Hz, 1H), 6.01-6.14 (m, 1H), 6.96-7.04 (m, 2H), 7.55 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.8 Hz, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>CN, 70 °C, 100.6 MHz):  $\delta$  12.7 (CH<sub>3</sub>), 14.6 (CH<sub>3</sub>), 21.4 (CH<sub>3</sub>), 39.1 (CH), 61.5 (CH), 66.9 (CH<sub>2</sub>), 116.1 (CH), 118.2 (CH<sub>2</sub>), 125.5 (CH), 129.0 (CH), 133.8 (C), 134.8 (CH), 137.3 (C), 140.2 (C), 153.9 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>NNaO<sub>2</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 268.1308, encontrada: 268.1314

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = -39.2$  (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) [para (2*R*,3*R*)-23b en 97% *ee*]

**Separación analítica de *cis*-23b (HPLC):**

Columna: Chiralpak IC

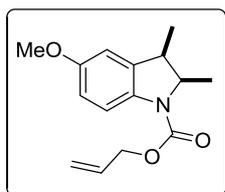
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 95:5

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (2*S*,3*S*) = 8.3 min, *t<sub>R</sub>* (2*R*, 3*R*) = 9.1 min

*cis*-*N*-Aliloxycarbonil-2,3-dimetil-5-metoxindolina (*cis*-23c)



**Fórmula empírica:** C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 73%

**R<sub>f</sub>** (10% AcOEt/hexano): 0.26

**Peso Molecular:** 261.32 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3052, 2985, 1692, 1490, 1401, 1260, 1068, 735 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>CN, 70 °C, 400.13 MHz):  $\delta$  1.08 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 3H), 1.26 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, 3H), 3.43-3.56 (m, 1H), 3.74 (s, 3H), 4.48-4.57 (m, 1H), 4.68 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.2 Hz, 2H), 5.22 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 10.4 Hz, 1H), 5.34 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 17.2 Hz, 1H), 5.94-6.08 (m, 1H), 6.70 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.4 Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 7.51 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.4 Hz, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>CN, 70 °C, 100.6 MHz):  $\delta$  12.6 (CH<sub>3</sub>), 14.6 (CH<sub>3</sub>), 39.3 (CH), 56.8 (CH), 61.5 (CH<sub>3</sub>), 66.8 (CH<sub>2</sub>), 111.6 (CH), 113.4 (CH), 116.9 (CH), 118.2 (CH<sub>2</sub>), 134.8 (CH), 136.1 (C), 138.8 (C), 153.8 (C), 157.8 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>NNaO<sub>3</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 284.1257, encontrada: 284.1251

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = -19.1$  (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) [para (2*R*,3*R*)-23c en 98% *ee*]

**Separación analítica de *cis*-23c (HPLC):**

Columna: Chiralpak OJ-H

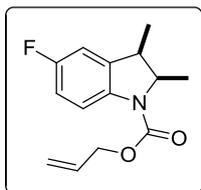
Temperatura: 30 °C

Eluyente: n-hexano/2-propanol 95:5

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (2*R*,3*R*) = 10.8 min, *t<sub>R</sub>* (2*S*,3*S*) = 12.5 min

*cis*-*N*-Aliloxycarbonil-5-fluoro-2,3-dimetilindolina (*cis*-23d)



**Fórmula empírica:** C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>FNO<sub>2</sub>

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 72%

**R<sub>f</sub>** (10% AcOEt/hexano): 0.40

**Peso Molecular:** 249.28 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3052, 2985, 1692, 1490, 1401, 1260, 1068, 735 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** ((CD<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SO, 75 °C, 400.13 MHz):  $\delta$  1.12 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 3H), 1.30 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, 3H), 3.50-3.68 (m, 1H), 4.57-4.67 (m, 1H), 4.74 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.1 Hz, 2H), 5.30 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 10.4 Hz, 1H), 5.41 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 17.3 Hz, 1H), 6.06 (ddt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 16.0, 10.5, 5.4 Hz, 1H), 6.95-7.03 (m, 1H), 7.04-7.10 (m, 1H), 7.54-7.66 (m, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** ((CD<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SO, 75 °C, 100.6 MHz):  $\delta$  12.1 (CH<sub>3</sub>), 14.2 (CH<sub>3</sub>), 38.0 (CH), 60.4 (CH), 66.0 (CH<sub>2</sub>), 111.5 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 24.2 Hz, CH), 113.8 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 23.1 Hz, CH), 115.9 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 8.3 Hz CH), 118.2 (CH<sub>2</sub>), 133.6 (CH), 137.4 (C), 138.5 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 7.9 Hz, C), 152.4 (C), 159.2 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 238.7 Hz, C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>FNNaO<sub>2</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 272.1057, encontrada: 272.1051

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = -38.8$  (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) [para (2*R*,3*R*)-23d en 99% *ee*]

**Separación analítica de *cis*-23d (HPLC):**

Columna: Chiralpak IC

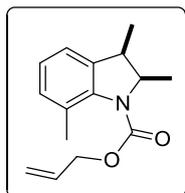
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 95:5

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (2*S*,3*S*) = 7.4 min, *t<sub>R</sub>* (2*R*, 3*R*) = 7.9 min

*cis*-*N*-Aliloxycarbonil-2,3,7-trimetilindolina (*cis*-23e)



**Fórmula empírica:** C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub>

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 78%

**R<sub>f</sub>** (10% AcOEt/hexano): 0.33

**Peso Molecular:** 245.32 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3047, 3017, 2970, 2934, 2874, 1713, 1597, 1464, 1390, 1338, 1296, 1261, 1064, 1028, 996, 931, 763 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100.13 MHz):  $\delta$  1.09 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 3H), 1.24 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, 3H), 2.29 (s, 3H), 3.55-3.65 (m, 1H), 4.70-4.82 (m, 3H), 5.24-5.44 (m, 2H), 5.95-6.08 (m, 1H), 6.95-7.02 (m, 2H), 7.03-7.10 (m, 2H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  12.1 (CH<sub>3</sub>), 14.6 (CH<sub>3</sub>), 20.1 (CH<sub>3</sub>), 39.1 (CH), 63.0 (CH), 66.3 (CH<sub>2</sub>), 117.9 (CH<sub>2</sub>), 120.5 (CH), 124.8 (CH), 128.1 (C), 130.0 (CH), 132.9 (CH), 138.2 (C), 139.9 (C), 153.8 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>2</sub>)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 246.1489, encontrada: 246.1485

**Separación analítica de *cis*-23e (HPLC):**

Columna: Chiralpak IC

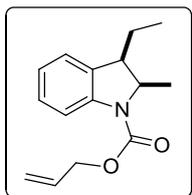
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 95:5

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t*<sub>R</sub> (1) = 8.2 min, *t*<sub>R</sub> (2) = 9.0 min

***cis*-N-Aliloxicarbonil-3-etil-2-metilindolina (*cis*-23f)**



**Fórmula empírica:** C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub>

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 88%

**R<sub>t</sub>** (10% Et<sub>2</sub>O/hexano): 0.15

**Peso Molecular:** 245.32 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3081, 3048, 2963, 2936, 2877, 1707, 1649, 1603, 1484, 1462, 1401, 1325, 1279, 1149, 1074, 1454, 933, 752 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** ((CD<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SO, 75 °C, 400.13 MHz):  $\delta$  1.04-1.17 (m, 6H), 1.51-1.67 (m, 1H), 1.92-2.13 (m, 1H), 3.30-3.41 (m, 1H), 4.55-4.68 (m, 1H), 4.70-4.81 (m, 2H), 5.30 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 10.4 Hz, 1H), 5.42 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 17.2 Hz, 1H), 5.99-6.15 (m, 1H), 7.02 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, 1H), 7.30-7.14 (m, 2H), 7.65 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.8 Hz, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** ((CD<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SO, 75 °C, 100.6 MHz):  $\delta$  13.1 (CH<sub>3</sub>), 13.6 (CH<sub>3</sub>), 20.0 (CH<sub>2</sub>), 45.5 (CH), 59.3 (CH), 65.9 (CH<sub>2</sub>), 115.2 (CH), 118.1 (CH<sub>2</sub>), 123.2 (CH), 124.0 (CH), 127.8 (CH), 133.7 (CH), 134.8 (C), 141.3 (C), 152.4 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>NNaO<sub>2</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 268.1308, encontrada: 268.1301

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = -37.0$  (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) [para (2*R*,3*R*)-23f en 99% *ee*]

**Separación analítica de *cis*-23f (HPLC):**

Columna: Chiralcel OD

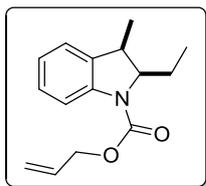
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 98:2

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (2*S*,3*S*) = 5.9 min, *t<sub>R</sub>* (2*R*, 3*R*) = 7.1 min

*cis*-*N*-Aliloxicarbonil-2-etil-3-metilindolina (*cis*-23g)



**Fórmula empírica:** C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub>

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 79%

**R<sub>f</sub>** (10% AcOEt/hexano): 0.48

**Peso Molecular:** 245.32 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3082, 3049, 2963, 2877, 1707, 1649, 1603, 1484, 1401, 1279, 1149, 1074, 1054, 933, 752, 709 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  0.87 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, 3H), 1.38 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.2 Hz, 3H), 1.44-1.59 (m, 1H), 1.70-1.84 (m, 1H), 3.56-3.66 (m, 1H), 4.51-4.58 (m, 1H), 4.77 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.6 Hz, 2H), 5.28 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 10.4 Hz; <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.2 Hz, 1H), 5.40 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 17.2 Hz; <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.4 Hz, 1H), 5.98-6.11 (m, 1H), 7.00-7.29 (m, 3H), 7.69 (sa, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  10.5 (CH<sub>3</sub>), 11.8 (CH<sub>3</sub>), 22.4 (CH<sub>2</sub>), 38.3 (CH), 64.9 (CH), 66.1 (CH<sub>2</sub>), 115.7 (CH), 117.9 (CH<sub>2</sub>), 122.6 (CH), 123.1 (CH), 127.4 (CH), 132.8 (CH), 136.5 (C), 141.7 (C), 153.3 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>NNaO<sub>2</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 268.1308, encontrada: 268.1318

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -38.4$  (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) [para (2*R*,3*R*)-23g en 99% *ee*]

**Separación analítica de *cis*-23g (HPLC):**

Columna: Chiralpak IA

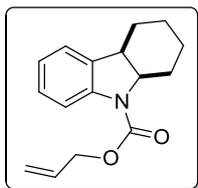
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 99:1

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (2*R*,3*R*) = 9.0 min, *t<sub>R</sub>* (2*S*,3*S*) = 10.1 min

***cis*-*N*-Aliloxicarbonil-2,3,4,4a,9,9a-hexahidro-1*H*-carbazol (*cis*-23h)**



**Fórmula empírica:** C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub>

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 94%

***R*<sub>f</sub>** (10% AcOEt/hexano): 0.35

**Peso Molecular:** 257.33 g/mol

**IR** (NaCl): 3356, 3049, 2932, 2859, 1707, 1604, 1480, 1402, 1323, 1276, 1254, 1141, 1089, 933, 754 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.09-1.41 (m, 3H), 1.52-1.70 (m, 2H), 1.74-1.97 (m, 1H), 2.28 (ad, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 14.2 Hz, 1H), 3.42-3.58 (m, 1H), 4.36-4.63 (m, 1H), 4.76 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 5.2 Hz, 2H), 5.28 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 10.4 Hz, 1H), 5.39 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 17.2 Hz, 1H), 5.95-6.13 (m, 1H), 7.03 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, 1H), 7.10-7.40 (m, 2H), 7.76 (sa, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 21.0 (CH<sub>2</sub>), 22.4 (CH<sub>2</sub>), 24.1 (CH<sub>2</sub>), 27.3 (CH<sub>2</sub>), 39.5 (CH), 60.6 (CH), 66.0 (CH<sub>2</sub>), 115.7 (CH), 117.9 (CH<sub>2</sub>), 122.8 (CH), 122.9 (CH), 127.5 (CH), 132.9 (CH), 133.8 (C), 141.9 (C), 152.8 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>NNaO<sub>2</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 280.1308, encontrada: 280.1299

**Rotación Óptica Específica:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -43.2 (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) [para (2*R*,3*R*)-23h en 98% *ee*]

**Separación analítica de *cis*-23h (HPLC):**

Columna: Chiralpak IA

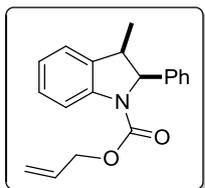
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 99:1

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t*<sub>R</sub> (2*R*,3*R*) = 10.4 min, *t*<sub>R</sub> (2*S*,3*S*) = 12.5 min

*cis*-*N*-Aliloxicarbonil-2-fenil-3-metilindolina (*cis*-23i)



**Fórmula empírica:** C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>2</sub>

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**Rendimiento:** 82%

**R<sub>t</sub>** (20% AcOEt/hexano): 0.51

**Peso Molecular:** 293.36 g/mol

**Pf:** 50-52 °C

**IR** (KBr):  $\nu$  3033, 2969, 2934, 2876, 1707, 1652, 1602, 1484, 1456, 1321, 1268, 1143, 1076, 1041, 933, 822, 739, 701 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** ((CD<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SO, 75 °C, 400.13 MHz):  $\delta$  0.90 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, 3H), 3.86-3.99 (m, 1H), 4.43-4.66 (m, 2H), 4.98-5.22 (m, 2H), 5.58 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.8 Hz, 1H), 5.70-5.90 (m, 1H), 7.02-7.12 (m, 3H), 7.21 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, 1H), 7.25-7.34 (m, 4H), 7.82 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.9 Hz, 1H) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** ((CD<sub>3</sub>)<sub>3</sub>SO, 75 °C, 100.6 MHz):  $\delta$  14.4 (CH<sub>3</sub>), 39.1 (CH), 65.7 (CH<sub>2</sub>), 67.6 (CH), 114.2 (CH), 117.3 (CH<sub>2</sub>), 123.6 (CH), 124.2 (CH), 126.9 (CH), 127.8 (CH), 128.1 (CH), 128.6 (CH), 133.3 (CH), 135.5 (C), 139.6 (C), 143.0 (C), 152.6 (C) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>NNaO<sub>2</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 316.1308, encontrada: 316.1323

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = -115.0$  (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) [para (2*S*,3*R*)-23i en 99% *ee*]

**Separación analítica de *cis*-23i (HPLC):**

Columna: Chiralpak IC

Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 99:1

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (2*R*,3*S*) = 16.6 min, *t<sub>R</sub>* (2*S*, 3*R*) = 17.8 min



# CAPÍTULO 3

DESARROLLO DE PROCESOS ENZIMÁTICOS PARA  
LA SÍNTESIS DE AMINOFOSFONATOS  
ÓPTICAMENTE ACTIVOS



# **ANTECEDENTES**



La estereoquímica de los productos bioactivos a menudo determina su actividad biológica,<sup>145</sup> lo que en el caso de los ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos y sus derivados implica una alta dependencia de la configuración absoluta del centro estereogénico del carbono en posición  $\alpha$  al átomo de fósforo. No resulta extraño, por tanto, el empeño que distintos autores han puesto en desarrollar metodologías sintéticas eficientes para la preparación de estos derivados en forma ópticamente activa.<sup>146</sup> De entre los múltiples ejemplos descritos, se destacarán aquí aquellos que guarden relación directa con las estructuras objeto de estudio de este capítulo, por lo que se obviarán aquellas estrategias basadas en la preparación de fosfonatos acíclicos y se prestará especial atención a la síntesis de derivados cíclicos.

### 3.1. Importancia de los Ácidos $\alpha$ -Aminofosfónicos

Los ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos son bioisómeros de los  $\alpha$ -aminoácidos en los que el grupo carboxílico planar y menos voluminoso ( $-\text{CO}_2\text{H}$ ) ha sido remplazado por un grupo ácido fosfónico tetraédrico ( $-\text{PO}_3\text{H}_2$ , Figura 25).



**Figura 25.** Estructura de los ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos y  $\alpha$ -aminoácidos.

A pesar de las diferencias estructurales entre ambos grupos, la sustitución de un grupo carboxílico por uno fosfónico a menudo se

<sup>145</sup> B. Kasprzyk-Hordern, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4466-4503.

<sup>146</sup> a) M. Ordóñez, H. Rojas-Cabrera, C. Cativiela, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 17-49; b) T. E. Ali, *Arkivoc* **2014**, (*j*), 21-91; c) A. Lemos, *Molecules* **2009**, *14*, 4098-4119; d) M. Ordóñez, J. L. Viveros-Ceballos, C. Cativiela, A. Arizpe, *Curr. Org. Synth.* **2012**, *9*, 310-341.

traduce en miméticos de aminoácidos. Es por ello que el descubrimiento de la actividad biológica que la presencia de la matriz N-C-P podía conferir a la molécula que lo contuviera, hace ya más de 50 años, abrió un amplio abanico de posibilidades en cuanto a su aplicación farmacológica.<sup>147</sup> No solo eso, sino que el desarrollo de nuevas estructuras aminofosforadas ha encontrado aplicabilidad en otras industrias, como la agroquímica o la metalúrgica.

Un derivado destacado y que guarda relación estructural con los compuestos que se estudiarán en este capítulo es el análogo fosforado de la prolina, también conocido como fosfoprolina (Figura 26). La presencia del grupo reactivo fosfónico induce en la molécula propiedades inhibitorias hacia distintas serín proteasas con las que establece interacciones covalentes irreversibles en el centro activo, lo que permite, por ejemplo, utilizar estos análogos en pruebas de monitorización de algunas proteasas específicas como la oligopeptidasa prolilo (POP).<sup>148</sup> De forma similar, los fosfonatos de prolina han encontrado aplicación como inhibidores de peptidasas dipeptidilo de tipo II<sup>149</sup> IV<sup>149,150</sup> u VIII.<sup>151</sup>

---

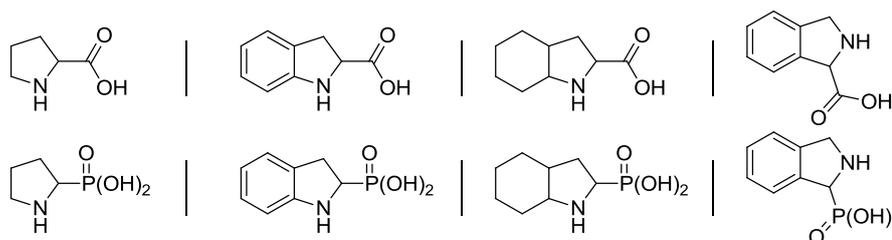
<sup>147</sup> a) A. Mucha, P. Kafarski, L. Berlicki, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5955-5980; b) S. J. Hecker, M. D. Erion, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2328-2345.

<sup>148</sup> E. Sabidó, T. Tarragó, S. Niessen, B. F. Cravatt, E. Giralt, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2361-2366.

<sup>149</sup> K. Senten, L. Daniëls, P. V. der Veken, I. D. Meester, A.-M. Lambeir, S. Scharpé, A. Haemers, K. Augustyns, *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 336-344.

<sup>150</sup> B. F. Gilmore, L. Carson, L. L. McShane, D. Queen, W. A. Coulter, B. Walker, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *347*, 373-379.

<sup>151</sup> P. V. der Veken, A. Soroka, I. Brandt, Y.-S. Chen, M.-B. Maes, A.-M. Lambeir, X. Chen, A. Haemers, S. Scharpé, K. Augustyns, I. D. Meester, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5568-5570.



**Figura 26.** De izquierda a derecha: estructura de la prolina, el ácido indolin-2-carboxílico, el L-Oic y el ácido isoindolin-1-carboxílico (arriba), así como de sus correspondientes análogos fosfónicos (abajo).

Otro compuesto análogo es el derivado bicíclico ácido indolin-2-carboxílico, que representa la forma conjugada de prolina y fenilalanina (Figura 26) y que es un motivo estructural integrado en diferentes inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) como el Pentopril y la Benzastatina E, medicamentos empleados en el tratamiento de la hipertensión y en la prevención de isquemias cerebrales.<sup>152</sup> El correspondiente derivado hidrogenado ácido (2*S*,3*aS*,7*aS*)-octahidroindol-2-carboxílico (L-Oic) forma parte de pequeños péptidos que actúan como fármacos en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.<sup>153</sup> Por su parte, el anillo de isoindolina es también un motivo estructural que da acceso a múltiples compuestos con importantes propiedades biológicas (Figura 26).<sup>154</sup>

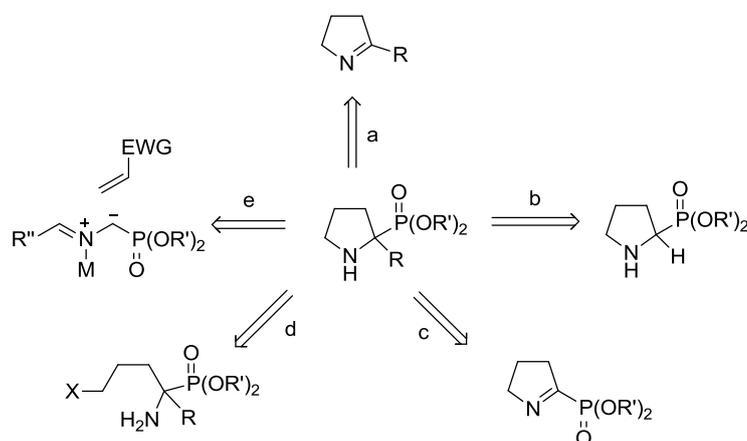
<sup>152</sup> a) N. Gruenfeld, J. L. Stanton, A. M. Yuan, F. H. Ebetino, L. J. Browne, C. Gude, C. F. Huebner, *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 1277-1282; b) D. Liu, G. Zhao, L. Xiang, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3975-3984; c) W.-G. Kim, J.-P. Kim, H. Koshino, K. Shin-Ya, H. Seto, I.-D. Yoo, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 4309-4316; d) N. Toda, M. Ori, K. Takami, K. Tago, H. Kogen, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 269-271.

<sup>153</sup> F. J. Sayago, P. Laborda, M. I. Calaza, A. I. Jiménez, C. Cativiela, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2011-2028.

<sup>154</sup> a) J. H. Lee, S. R. Byeon, Y. Kim, S. J. Lim, S. J. Oh, D. H. Moon, K. H. Yoo, B. Y. Chung, D. J. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5701-5704; b) T. Lübbers, P. Angehrn, H. Gmünderb, S. Herzig, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4708-4714; c) U. C. Yoon, Y. X. Jin, S. W. Oh, C. H. Park, J. H. Park, C. F. Campana, X. Cai, E. N. Duesler, P. S. Mariano, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10664-10671; d) A. J. Grenning, J. K. Synder, J. A. Porco Jr. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 792-795.

### 3.2. Síntesis de Ácidos $\alpha$ -Aminofosfónicos

De una manera simplista, las metodologías en las cuales se describe la síntesis de derivados cíclicos de ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos, más concretamente, de derivados del ácido pirrolidin-2-ilfosfónico, en relación con los compuestos estudiados en este capítulo, se podrían clasificar en función del enlace formado y la estrategia empleada para la formación de dicho enlace. En el Esquema 51 se recoge dicha clasificación general: (a) formación de enlaces C-P por adición nucleofílica de fósforo a un doble enlace C=N; (b) formación de enlaces C-C por alquilación del anillo heterocíclico preformado con el electrófilo adecuado; (c) formación de enlaces C-C por adición nucleofílica a  $\alpha$ -aminofosfonatos cíclicos; (d) formación de enlaces C-N por ciclación de los correspondientes  $\alpha$ -aminofosfonatos cuaternarios; (e) formación de enlaces C-C mediante cicloadición 1,3-dipolar.<sup>155</sup>



**Esquema 51.** Estrategias para la síntesis de derivados del ácido pirrolidin-2-ilfosfónico en función del enlace formado (C-C, C-N o C-H).

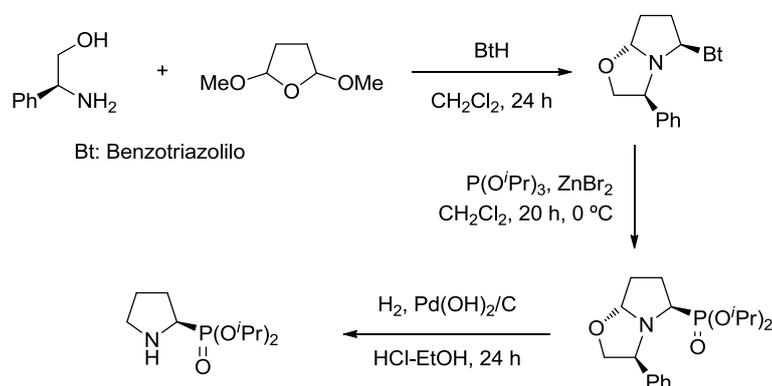
De estas múltiples estrategias sintéticas se han seleccionado algunos ejemplos relevantes.<sup>156</sup> Cabe decir que los  $\alpha$ -aminofosfonatos son intermedios precursores de los ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos, lo que

<sup>155</sup> M. Ordóñez, F. J. Sayago, C. Cativiela, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 6369-6412.

<sup>156</sup> M. Ordóñez, J. L. Viveros-Ceballos, C. Cativiela, F. J. Sayago *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1745-1784.

implica que aquellas metodologías descritas para los primeros son también aplicables a los correspondientes ácidos.

Tang y colaboradores sintetizaron  $\alpha$ -aminofosfonatos cíclicos ópticamente activos para su posterior aplicación como organocatalizadores en reacciones de adición de Michael asimétricas.<sup>157</sup> Para la preparación de estos catalizadores partieron del (*S*)-fenilglicinol, generando primeramente un derivado bicíclico en el que se introdujo el grupo fosfónico a través de una reacción de tipo Michaelis-Arbuzov (Esquema 52). Finalmente, la hidrogenólisis del compuesto obtenido dio lugar al (*R*)-fosfoprolinato de diisopropilo con un rendimiento para este último paso del 85%.

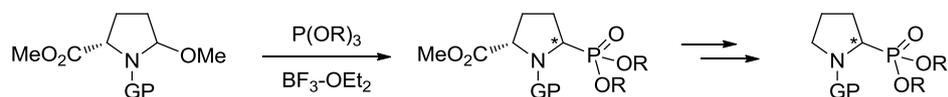


**Esquema 52.** Síntesis del (*R*)-fosfoprolinato de diisopropilo.

La introducción de grupos fosfonato en la posición 5 de derivados de L-prolina se ha estudiado con detalle mediante el análisis de distintos factores determinantes en la reacción diastereoselectiva de Arbusov como son el efecto del ácido de Lewis empleado, la influencia del grupo *N*-protector o la del grupo éster del fosfito reactivo (Esquema 53).<sup>158</sup> En la optimización de estos parámetros destaca el caso del grupo protector del grupo amino, en función del cual es posible aislar los intermedios carboxilados *cis* o *trans* y, por tanto, ambos enantiómeros del aminofosfonato final tras una serie de transformaciones químicas.

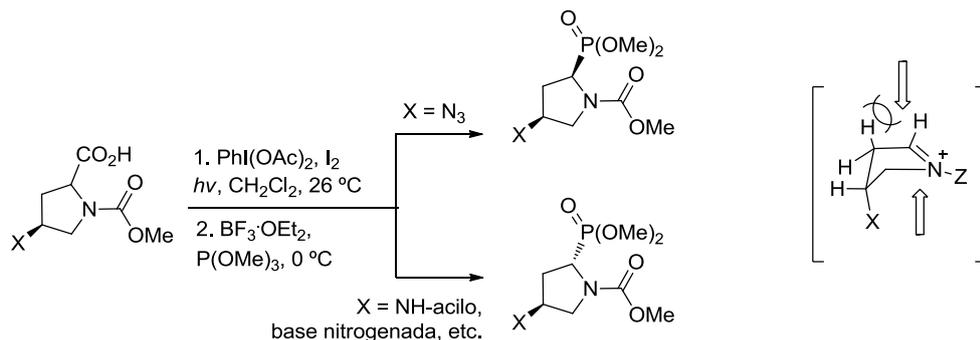
<sup>157</sup> Q. Tao, G. Tang, K. Lin, Y.-F. Zhao, *Chirality* **2008**, *20*, 833-838.

<sup>158</sup> S. Hirata, M. Kuriyama, O. Onomura, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 9411-9416.



**Esquema 53.** Síntesis de (*R*) y (*S*)-(pirrolidin-2-il)fosfonatos.

Se ha descrito también el control de la estereoquímica de (pirrolidin-2-il)fosfonatos mediante la introducción de sustituyentes nitrogenados en la posición 4 de las prolinas de partida (Esquema 54).<sup>159</sup> La naturaleza de la función nitrogenada determina la configuración *cis* o *trans* del aminofosfonato a través de una escisión oxidativa radicalaria seguida de una fosforilación en presencia de un ácido de Lewis.



**Esquema 54.** Control estereoquímico del proceso de introducción del grupo fosfonato en derivados de prolina.

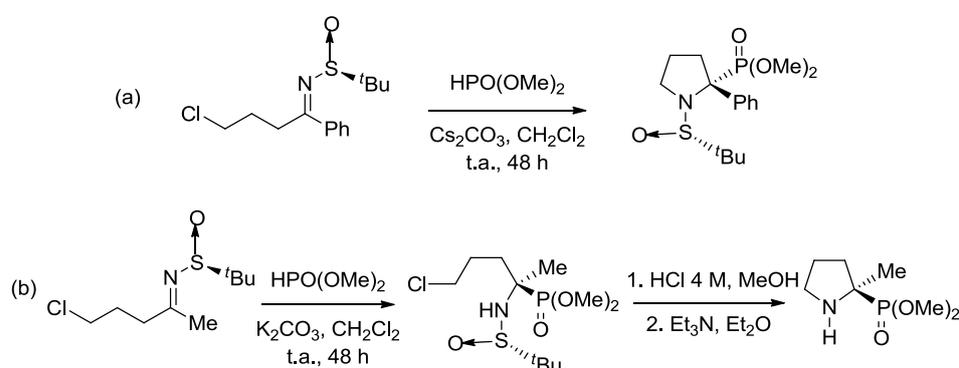
La explicación para la estereopreferencia observada se fundamenta en el intermedio aciliminio que se encontraría estabilizado por efectos electrónicos en el caso del grupo azida, mientras que para el resto de derivados nitrogenados predominarían los efectos estéricos.

$\alpha$ -Aminofosfonatos cuaternarios cíclicos son accesibles por reacción entre cetosulfiniminas  $\omega$ -cloro-sustituidas y fosfonato de dimetilo en presencia de carbonato de cesio (Esquema 55a).<sup>160</sup> En el caso del ciclo de cinco eslabones, el producto final se aisló con un 83% de rendimiento y un 42% *de*. Un ligero cambio en las condiciones, así como en la estructura de la clorosulfinimina de partida dio lugar a la formación del producto acíclico en presencia de carbonato de potasio (Esquema 55b)

<sup>159</sup> J. Miguélez-Ramos, V. R. Batchu, A. Boto, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 846-852.

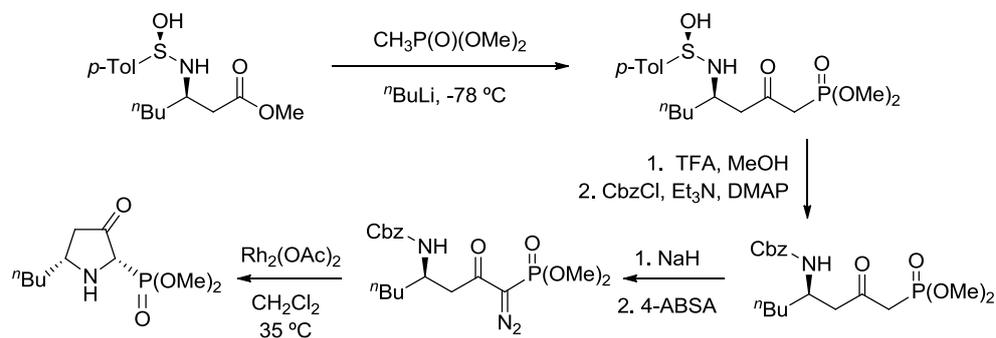
<sup>160</sup> Q. Chen, J. Li, C. Yuan, *Synthesis* **2008**, 2986-2990.

con buen rendimiento (85%) y buena diastereoselectividad (87% *de*). La eliminación del grupo *N*-sulfinilo en presencia de ácido clorhídrico 4 M permitió la obtención del correspondiente producto cíclico con buen rendimiento (83%).



**Esquema 55.** Síntesis de  $\alpha$ -aminofosfonatos cíclicos a partir de quetosulfiniminas  $\omega$ -cloro-sustituidas.

La síntesis de 3-oxo-pirrolidina 2-fosfonatos se ha desarrollado a partir de *N*-sulfinil  $\delta$ -amino  $\beta$ -cetofosfonatos, obtenidos a su vez por tratamiento del correspondiente  $\beta$ -aminoéster con dimetil metilfosfonato de litio a  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  (Esquema 56).<sup>161</sup>



**Esquema 56.** Estrategia para la síntesis de 3-oxo-pirrolidina 2-fosfonatos.

El grupo *N*-sulfinilo es reemplazado entonces por el grupo benciloxicarbonilo (Cbz), aunque también se ha utilizado para la misma ruta sintética el grupo protector *tert*-butoxicarbonilo (Boc). El

<sup>161</sup> F. A. Davis, J. Zhang, Y. Wu, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 2054-2057.

tratamiento del derivado obtenido con NaH y azida de 4-acetamidobenzensulfonilo proporciona un  $\alpha$ -diazofosfonato estable, que en presencia de cantidades catalíticas de  $\text{Rh}_2(\text{OAc})_4$  da lugar a una reacción intramolecular de inserción NH generando el 3-oxopirrolidinofosfonato final. Este tipo de aminofosfonatos cíclicos son intermediarios adecuados para la síntesis asimétrica de diversos compuestos, algunos de ellos biológicamente activos.<sup>161,162</sup>

Esta estrategia sintética se ha aplicado de forma similar en otras ocasiones como, por ejemplo, en la síntesis de 2-benziliden-3-oxopirrolidinas 5,5-disustituídas a partir de 4-(*tert*-butilsulfinilamino)-2-oxofosfonatos quirales, empleando en este caso *N*-(sulfinil)iminas como productos de partida.<sup>163</sup>

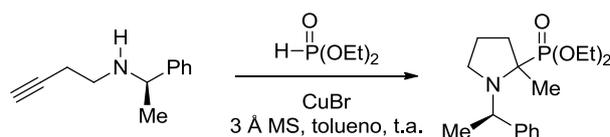
Además de los derivados *N*-sulfinilados, la ciclación de otros precursores adecuados para la síntesis de  $\alpha$ -aminofosfonatos se ha utilizado ampliamente. Por ejemplo, se ha descrito una ciclación tándem a través de una estrategia de hidroaminación/fosforilación empleando fosfito de dietilo y cantidades catalíticas de bromuro de cobre (I), lo que ha sido posible gracias a la transformación de la enamina generada in situ en un buen electrófilo (Esquema 57).<sup>164</sup> En el único ejemplo de transformación asimétrica, el producto se obtuvo con un rendimiento del 88% y una relación diastereoisomérica baja (52/48).

---

<sup>162</sup> a) F. A. Davis, H. Xu, Y. Wu, J. Zhang, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2273-2276; b) F. A. Davis, J. Zhang, H. Qiu, Y. Wu, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1433-1436.

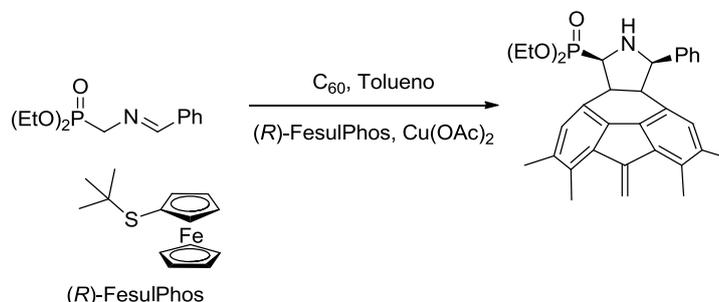
<sup>163</sup> Q. Chen, C. Yuan, *Synthesis* **2008**, *7*, 1085-1093.

<sup>164</sup> J. Han, R. S. Paton, B. Xu, G. B. Hammond, *Synthesis* **2013**, *45*, 463-470.



**Esquema 57.** Síntesis de  $\alpha$ -aminofosfonatos a través de un proceso tandem de hidroaminación/fosforilación.

La reacción de cicloadición también se ha estudiado en diversas variantes.<sup>165</sup> Por ejemplo, Martín y colaboradores describieron la síntesis estereoselectiva de pirrolidinofulerenos quirales en condiciones suaves de reacción mediante un proceso de cicloadición 1,3-dipolar de  $\alpha$ -aminofosfonatos bases de Schiff con un fullereno ( $C_{60}$ ) catalizado por (*R*)-FesulPhos y  $Cu(OAc)_2$  (Esquema 58).<sup>166</sup> En el caso del derivado fosfónico se obtuvo el producto deseado con un 25% de rendimiento, un 95% de exceso diastereomérico y un 65% de exceso enantiomérico.



**Esquema 58.** Síntesis de derivados de fullereno quirales mediante cicloadiciones 1,3-dipolares.

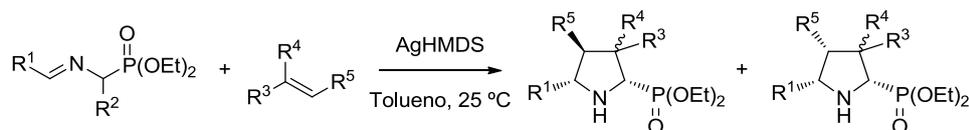
Kobayashi y colaboradores utilizaron una estrategia similar en un proceso catalítico de cicloadición [3+2] de bases de Schiff de  $\alpha$ -aminofosfonatos con olefinas en el que emplearon complejos quirales de

<sup>165</sup> a) D. G. Piotrowska, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 279-287; b) D. G. Piotrowska, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2323-2329; c) Y. Yamashita, T. Imaizumi, X.-X. Guo, S. Kobayashi, *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 2550-2559.

<sup>166</sup> S. Filippone, E. E. Maroto, A. Martín-Domenech, M. Suarez, N. Martín, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 578-582.

### Capítulo 3

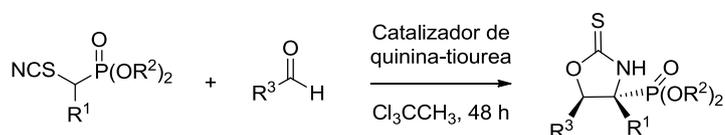
amidas de plata como catalizadores quirales bases de Brønsted (Esquema 59).<sup>167</sup>



**Esquema 59.** Cicloadición [3+2] de  $\alpha$ -iminofosfonatos con olefinas.

La especie catalítica más efectiva fue la hexametildisilazida de plata (AgHMDS), resultado de usar triflato de plata (AgOTf) como catalizador y hexametildisilazida de potasio (KHMDS) como base. Mayoritariamente, se obtuvieron los productos *exo* para una variedad de  $\alpha$ -aminofosfonatos con grupos de distinta naturaleza electrónica, obteniéndose los productos finales con elevados rendimientos en la mayoría de los casos (56-99%) y excelentes excesos diastereoméricos (94/6->99/1) y enantioméricos (82->99%).

Recientemente, se ha descrito la reacción entre  $\alpha$ -isotiocianato fosfonatos y distintos aldehídos como electrófilos catalizada por una tiourea derivada de quinina, que transcurre a través de una cascada aldólica/ciclación (Esquema 60).<sup>168</sup> Los ácidos  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminofosfónicos ópticamente activos resultantes se consiguieron con rendimientos de moderados a buenos (36-93%), excesos enantioméricos hasta del 81% y excesos diastereoméricos hasta >99/1.



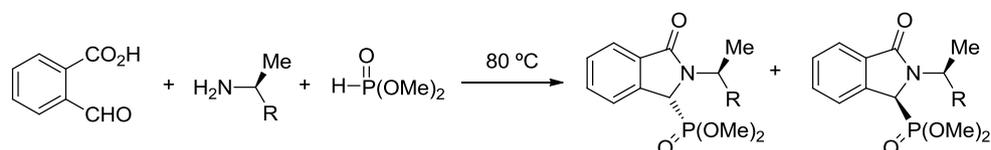
**Esquema 60.** Reacción entre isotiocianato fosfonatos y aldehídos.

Resulta especialmente interesante, por su relación con el presente capítulo, la síntesis realizada por Ordóñez y colaboradores de un novedoso ácido  $\alpha$ -aminofosfónico derivado de la isoindolin-1-ona, un

<sup>167</sup> Y. Yamashita, X.-X. Guo, R. Takashita, S. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3262-3263.

<sup>168</sup> W.-Y. Han, J.-Q. Zhao, Z.-J. Wu, X.-M. Zhang, W.-C. Yuan, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 10541-10547.

análogo fosfónico que carece de análogo entre los 20  $\alpha$ -aminoácidos proteínogénicos.<sup>169</sup> El proceso tiene lugar a través de una reacción de tres componentes en una sola etapa altamente diastereoselectiva y en ausencia de disolvente, aislándose los productos finales con rendimientos de moderados a buenos (40-80%) y excesos diastereoméricos de hasta una proporción >98/2 (Esquema 61).

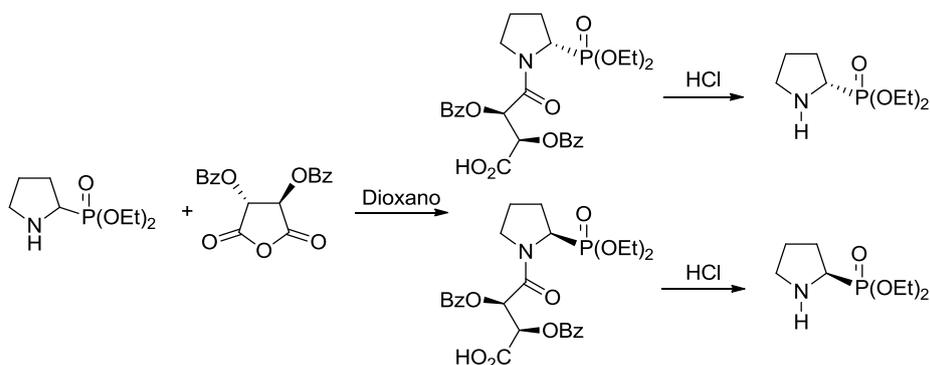


**Esquema 61.** Síntesis de (3*R*,1'*S*)- y (3*S*,1'*S*)-isoindolin-1-ona-3-fosfonato de dimetilo.

También es posible encontrar en la bibliografía algún ejemplo de resolución cinética de fosfonatos derivados de la pirrolidina. Así, el pirrolidin-2-fosfonato de dietilo preparado en forma racémica a partir de prolina se consiguió resolver cinéticamente por acción del anhídrido (+)-dibenzoil-L-tartárico en dioxano a temperatura ambiente, separando posteriormente las amidas resultantes por cromatografía de columna (32-48%, Esquema 62).<sup>170</sup> La subsiguiente hidrólisis de los diastereoisómeros formados dio lugar a los ácidos (*R*)- y (*S*)-pirrolidin-2-fosfónicos con rendimientos excelentes (100%).

<sup>169</sup> J. L. Viveros-Ceballos, C. Cativiela, M. Ordóñez, *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 1479-1484.

<sup>170</sup> B. Kaboudin, J.-Y. Kato, H. Aoyama, T. Yokomatsu, *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24*, 1562-1566.



**Esquema 62.** Resolución del pirrolidin-2-fosfonato de dietilo con anhídrido (+)-dibenzoil-L-tartárico.

### 3.3. Síntesis Asimétrica mediante Biocatálisis de Derivados de Prolina

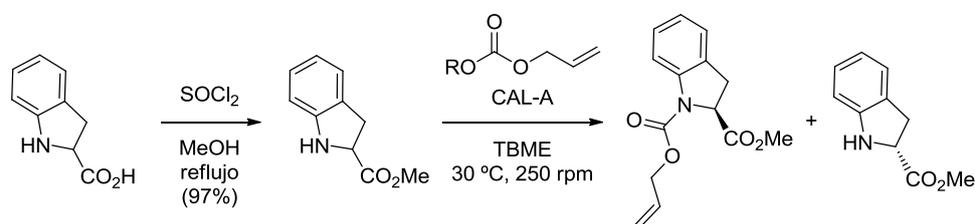
En la bibliografía se pueden encontrar dos estudios que, sin contener el fragmento fosforado en su estructura, han sido claramente inspiradores en la elaboración de este capítulo. En ellos, se ha demostrado la actividad de las lipasas en procesos de resolución de compuestos bicíclicos que contienen residuos de prolina y que, además, incorporan un grupo carboxílico en el anillo de pirrolidina.

#### 3.3.1. Resolución Cinética de Indolinas Carboxiladas

La síntesis quimioenzimática del indolin-2-carboxilato de metilo se ha descrito mediante la combinación de un primer paso de esterificación con MeOH del correspondiente ácido carboxílico en presencia de cloruro de tionilo y una posterior resolución cinética enzimática promovida por la lipasa de *Candida antarctica* tipo A (CAL-A, Esquema 63).<sup>171</sup> Este segundo paso se desarrolló con excelente enantioselectividad tanto con el carbonato de alilo y 3-metoxifenilo como con el carbonato de dialilo comercialmente accesible, si bien con este último la cinética fue más lenta y, por tanto, las conversiones menores. Llevando a cabo la reacción

<sup>171</sup> S. Alatorre-Santamaría, M. Rodríguez-Mata, V. Gotor-Fernández, M. C. de Mattos, F. J. Sayago, A. I. Jiménez, C. Cativiela, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1714-1719.

en TBME, a 30 °C, 250 rpm y añadiendo 2.5 equivalentes de carbonato de 3-metoxifenilo y alilo se aislaron tanto el producto como el sustrato en forma enantiopura y con buenos rendimientos. Posteriormente, se extendió al derivado octahidroindol-2-carboxilato de bencilo, para el que los mejores resultados se alcanzaron con el carbonato de dialilo.



**Esquema 63.** Síntesis y resolución cinética enzimática de indolin-2-carboxilato de metilo.

### 3.3.2. Resolución Cinética de Isoindolinas Carboxiladas

Otro tipo de compuestos análogos de la prolina, los derivados del ácido isoindolin-1-carboxílico, se han investigado desde puntos de vista divergentes en función del fragmento de estructura susceptible de modificarse, es decir, transformaciones del grupo éster mediante reacciones de hidrólisis o transesterificación, o alteraciones del grupo amino libre a través de procesos de alcoxicarbonilación.<sup>172</sup> Esta última fue, de las distintas alternativas consideradas, la que dio lugar a resultados prometedores y, consecuentemente, la estrategia que los autores estudiaron más a fondo sobre la base de la catálisis mediante lipasas. Sorprendentemente, durante la resolución cinética catalizada por la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PSL-C I) tenía lugar una racemización espontánea basada en un equilibrio de protonación-desprotonación a través de un intermedio aquiral que, para producirse, no requería de la adición de ningún tipo de catalizador ácido-base, metal o agente oxidante (Esquema 64). La resolución cinética dinámica (DKR) transcurrió en presencia de carbonato de dialilo como agente de

<sup>172</sup> R. Morán-Ramallal, V. Gotor-Fernández, P. Laborda, F. J. Sayago, C. Cativiela, V. Gotor, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1696-1699.

### Capítulo 3

---

alcoxicarbonilación y reveló una gran influencia del medio de reacción, seleccionando tolueno como óptimo. También se obtuvieron buenos valores de conversión y excesos enantioméricos empleando el carbonato de dibencilo, introduciendo así el grupo Cbz (85% conversión, 98% *ee*). Finalmente, la configuración absoluta del producto de la reacción se estableció por comparación de las señales de  $^1\text{H}$ -RMN del derivado de Mosher racémico con las señales correspondientes del compuesto ópticamente activo.



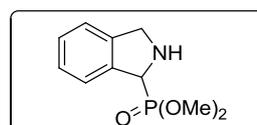
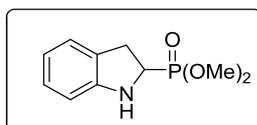
**Esquema 64.** DKR del isoindolin-1-carboxilato de metilo catalizada por PSL-C I empleando distintos carbonatos.

## **OBJETIVOS**



Debido a las interesantes propiedades biológicas que el grupo fosfónico confiere a sus derivados, los siguientes objetivos fueron planteados:

- Estudiar la resolución cinética del indolin-2-ilfosfonato de dimetilo empleando lipasas en reacciones de alcoxicarbonilación.
- Conocer la estereopreferencia de la enzima en el proceso, complementando los datos analíticos y las medidas experimentales con estudios realizados en la Universidad de Zaragoza.
- Estudiar, análogamente, la efectividad de las lipasas en la resolución cinética del isoindolin-1-ilfosfonato de dimetilo.
- Determinar de manera inequívoca la configuración absoluta de los compuestos ópticamente activos obtenidos en las transformaciones enzimáticas estudiadas.





## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



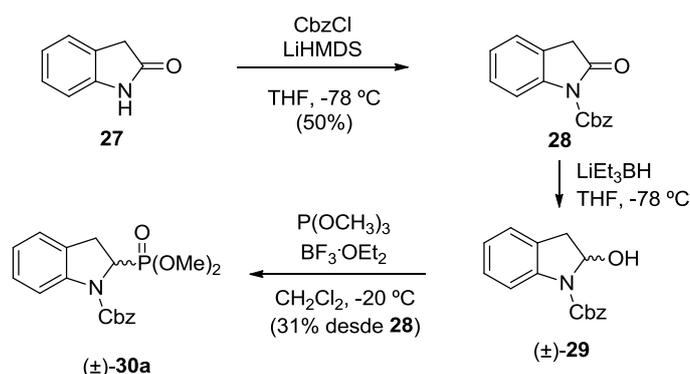
La discusión de resultados que se recoge a continuación se encuadra dentro de una colaboración con el grupo del Profesor Carlos Cativiela de la Universidad de Zaragoza. En ella, se pueden distinguir dos partes bien diferenciadas según el tipo de estructura que será objeto de estudio. En una primera se consideran estructuras derivadas del ácido indolin-2-ilfosfónico y en la segunda sección la molécula objetivo proviene del ácido isoindolin-1-ilfosfónico. Mientras que el estudio enzimático será expuesto detalladamente, las cuestiones sintéticas se han desarrollado en su mayor parte en el centro zaragozano y, por lo tanto, se omitirán aquellos pormenores que no sean necesarios para la comprensión del capítulo.

### **3.4. Síntesis y Resolución Cinética Enzimática de Derivados de Fosfoinfolinas**

Inicialmente, se abordó el estudio de la resolución cinética enzimática del indolin-2-ilfosfonato de dimetilo, cuya síntesis en forma racémica se optimizó en la Universidad de Zaragoza y se comentará brevemente para, a continuación, profundizar en los detalles relativos al proceso enzimático.

#### **3.4.1. Síntesis del Indolin-2-ilfosfonato de Dimetilo Protegido**

La fosfoindolina que actuará como sustrato en la posterior resolución cinética se preparó en su forma *N*-protegida siguiendo la secuencia descrita en el Esquema 65. La protección del grupo amino se realizó con la intención de obtener un compuesto suficientemente estable para ser transportado y almacenado, así como para el estudio alternativo de la resolución mediante HPLC preparativo.



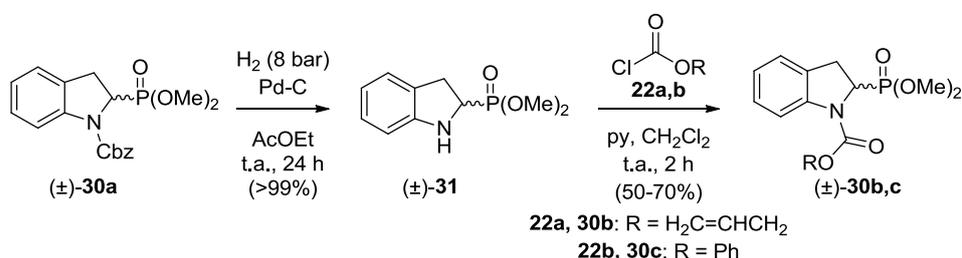
**Esquema 65.** Síntesis química del aminofosfonato racémico **30a** a partir de la 2-indolinona **27**.

El primer paso consistió en la introducción del grupo protector benciloxicarbonilo (Cbz) en la 2-indolinona (**27**), reacción que transcurrió con rendimiento moderado (50%) por tratamiento con cloroformiato de bencilo y una base fuerte, hexametildisilazida de litio (LiHMDS), a baja temperatura. Seguidamente, la reducción de su grupo ceto en presencia de trietilborohidruro de litio derivó en la formación del hemiaminal racémico **29**, que se hizo reaccionar directamente con el complejo trifluoruro de boro-eterato y fosfito de trimetilo para obtener la fosfindolina racémica **30a** con un rendimiento global en estas dos últimas etapas del 31%.

### 3.4.2. Resolución Cinética Enzimática del Indolin-2-ilfosfonato de Dimetilo

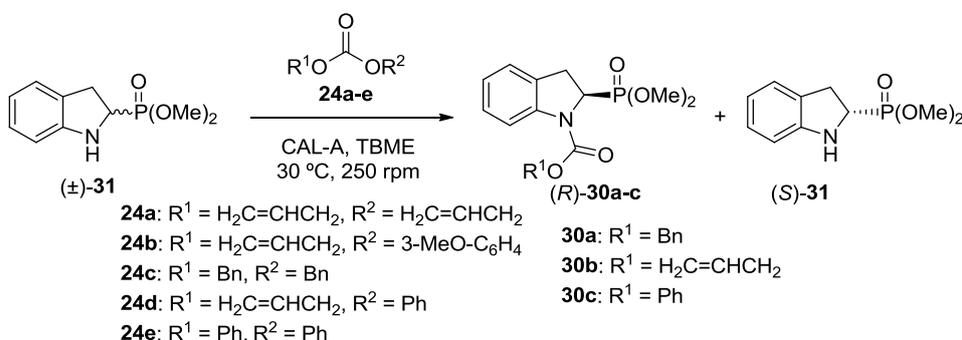
Una vez obtenido el precursor protegido **30a** en forma racémica se establecieron las condiciones óptimas de desprotección, que consistieron en una hidrogenación a una presión de hidrógeno de 8 bares en presencia de paladio sobre carbono (Esquema 66). A partir del aminofosfonato con el grupo amino libre **31**, que se obtuvo con un rendimiento cuantitativo, se sintetizaron los correspondientes carbamatos racémicos **30b** y **30c**, los cuales serán productos finales de la reacción enzimática y para los que se desarrollaron separaciones de HPLC con columnas de relleno quiral adecuadas para el seguimiento de la biotransformación. También se incluirá el carbamato **30a** como material de referencia,

aunque en este caso su síntesis no fue necesaria por ser éste el compuesto de partida. La reacción entre el aminofosfonato **31** y los cloroformiatos de alilo y de bencilo (**22a** y **22b**) en diclorometano seco tuvo lugar con rendimientos moderados pero suficientes para cumplir el propósito analítico de separación de ambos enantiómeros.



**Esquema 66.** Síntesis del aminofosfonato racémico **31** y los correspondientes carbamatos (±)-**30b** y **30c**.

La estrategia seleccionada para la resolución cinética enzimática fue la reacción de alcoxicarbonilación a través del grupo amino de **31**, técnica recurrente para la síntesis de carbamatos y aminas secundarias ópticamente activas empleando lipasas.<sup>129</sup> Los resultados reflejados en los antecedentes de este capítulo<sup>171</sup> incentivaron el uso de la CAL-A como biocatalizador del proceso, para cuya optimización se seleccionaron una serie de carbonatos **24a-e** y TBME como disolvente a 30 °C y 250 rpm (Esquema 67).



**Esquema 67.** Resolución cinética enzimática de la amina racémica **31** empleando CAL-A y distintos carbonatos a 30 °C y 250 rpm.

Tal y como se recoge en la Tabla 17, para una concentración de sustrato 140 mM y una relación enzima:sustrato de 2:1 en peso, la lipasa no mostró actividad alguna en la reacción con los carbonatos menos reactivos de dibencilo **24c** o de dialilo **24a** (entradas 1 y 2). Sin embargo, la reacción sí tuvo lugar con carbonatos más reactivos, alcanzándose conversiones moderadas tanto con el de alilo y 3-metoxifenilo (**24b**) como con el de alilo y fenilo (**24d**, entradas 3 y 8, respectivamente), siendo destacable en ambos casos la excelente enantioselectividad observada hacia la formación del carbamato de configuración (*R*)-**30b**. La resolución cinética no evolucionó al llevarla a tiempos más largos (48 h) con ninguno de los dos carbonatos mixtos **24b** y **24d**. Además del tiempo de reacción, en el caso del carbonato de 3-metoxifenilo y alilo (**24b**) se estudiaron otras variables que afectaron al proceso en distinta medida. Tanto el aumento de la temperatura hasta 45 °C (entrada 6) como el incremento de la concentración de sustrato a 200 mM (entrada 7) no tuvieron efectos positivos, al contrario, la conversión disminuyó ligeramente. Lo mismo ocurrió al emplear el doble de cantidad de carbonato (entrada 4), lo que podría sugerir, junto con el estancamiento de la reacción, un efecto inhibitorio a altas concentraciones de este reactivo. El valor de la conversión fue incluso menor al añadir el doble de enzima (entrada 5).

Los mejores resultados se obtuvieron, sin duda, con el carbonato de difenilo (**24e**). A diferencia de la inhibición enzimática observada anteriormente, la reacción no se detuvo sino que siguió avanzando a tiempos prolongados hasta alcanzar un 43% de conversión tras casi 4 días con excelente enantioselectividad (entradas 10 y 11). Duplicar los equivalentes de carbonato añadidos no supuso una mejoría en la conversión y provocó que la reacción no evolucionase más con el tiempo, tanto para una relación enzima:sustrato de 2:1 como de 4:1 (entradas 12 y 13, respectivamente). Finalmente, solo se obtuvo una ligera mejora al añadir el doble de enzima y 2.5 equivalentes de carbonato, no obstante el proceso se detuvo, de nuevo tras 46 h de reacción (entrada 14).

**Tabla 17.** Resolución cinética enzimática del aminofosfonato **31** (140 mM) empleando CAL-A en TBME a 30 °C y 250 rpm.

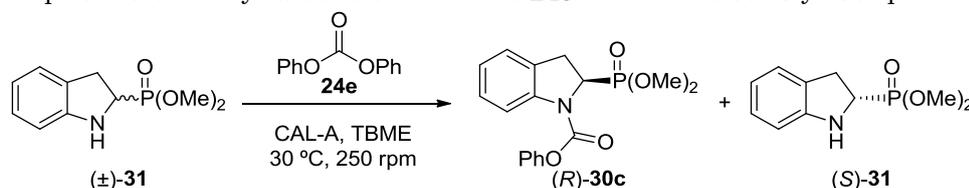
Entrada	<b>24</b>	CAL-A <sup>a</sup>	<b>7</b> (eq)	t (h)	ee <sub>p</sub> (%) <sup>b</sup>	ee <sub>s</sub> (%) <sup>b</sup>	c (%) <sup>c</sup>	E <sup>d</sup>
1	<b>24c</b>	2:1	2.5	48	--	--	<1	--
2	<b>24a</b>	2:1	2.5	48	--	--	<1	--
3	<b>24b</b>	2:1	2.5	23	>99	27	22	>200
4	<b>24b</b>	2:1	5	23	>99	17	15	>200
5	<b>24b</b>	4:1	2.5	23	>99	12	11	>200
6 <sup>e</sup>	<b>24b</b>	2:1	2.5	24	>99	18	15	>200
7 <sup>f</sup>	<b>24b</b>	2:1	2.5	24	>99	16	14	>200
8	<b>24d</b>	2:1	2.5	23	>99	22	18	>200
9	<b>24e</b>	2:1	2.5	22	>99	40	29	>200
10	<b>24e</b>	2:1	2.5	48	>99	58	37	>200
11	<b>24e</b>	2:1	2.5	89	>99	74	43	>200
12	<b>24e</b>	2:1	5	46	>99	58	37	>200
13	<b>24e</b>	4:1	5	46	>99	58	37	>200
14	<b>24e</b>	4:1	2.5	46	>99	70	41	>200

<sup>a</sup> Relación enzima:sustrato en peso.<sup>b</sup> Determinado por HPLC.<sup>c</sup>  $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$ <sup>d</sup>  $E = \ln[(1-c)(1-ee_p)] / \ln[(1-c)(1+ee_p)]$ <sup>e</sup> La reacción se llevó a cabo a 45 °C.<sup>f</sup> La reacción se llevó a cabo para una concentración de sustrato 200 mM.

En vista de estos resultados, se concluyó que la inactivación de la lipasa impedía alcanzar conversiones cercanas a la ideal del 50% por lo que, con la finalidad de aislar sustrato y producto con excesos enantioméricos más elevados, se valoró la posibilidad de adicionar más cantidad de enzima de forma secuencial, es decir, añadiendo la CAL-A a intervalos de tiempo regulares. Para este propósito, se realizó la alcoxicarbonilación del aminofosfonato racémico **31** con el carbonato de difenilo (**24e**) en TBME a 30 °C, 250 rpm y una relación enzima:sustrato inicial de 2:1 en peso. Transcurridas 22 h y con una conversión alcanzada del 29% (entrada 1, Tabla 18), se añadieron 2 equivalentes adicionales de enzima en peso, lo que llevó la conversión al 45% tras 46 h (entrada 2). Ese valor se incrementó hasta el 49% a las 71 h (entrada 3), habiendo añadido otros dos equivalentes de CAL-A a las 53 h. De esta manera, se aislaron del crudo de reacción tras la correspondiente

purificación el carbamato enantiopuro (*R*)-**30c** y la amina remanente (*S*)-**31** con exceso enantiomérico muy altos.

**Tabla 18.** Resolución cinética enzimática del aminofosfonato **31** (140 mM) empleando CAL-A y carbonato de difenilo **24e** en TMBE a 30 °C y 250 rpm.



Entrada	CAL-A <sup>a</sup>	7e (eq)	t (h)	ee <sub>p</sub> (%) <sup>b</sup>	ee <sub>s</sub> (%) <sup>b</sup>	c (%) <sup>c</sup>	E <sup>d</sup>
1	2:1	2.5	22	>99	40	29	>200
2	4:1 <sup>e</sup>	2.5	46	>99	80	45	>200
3	6:1 <sup>e,f</sup>	2.5	71	>99	94	49	>200
4	4:1 <sup>e</sup>	5 <sup>g</sup>	46	>99	68	41	>200
5	6:1 <sup>e,f</sup>	5	71	>99	85	46	>200
6	4:1	2.5	22	>99	67	40	>200
7	6:1 <sup>e</sup>	5 <sup>g</sup>	46	>99	85	46	>200
8	8:1 <sup>e,f</sup>	5	71	>99 (42)	92 (43)	48	>200

<sup>a</sup> Relación enzima:sustrato en peso.

<sup>b</sup> Determinado por HPLC. Se indican entre paréntesis los rendimientos aislados.

<sup>c</sup>  $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$

<sup>d</sup>  $E = \ln[(1-d)(1-ee_p)] / \ln[(1-d)(1+ee_p)]$

<sup>e</sup> Se añadieron 2 equivalentes de enzima (en peso) a las 24 h.

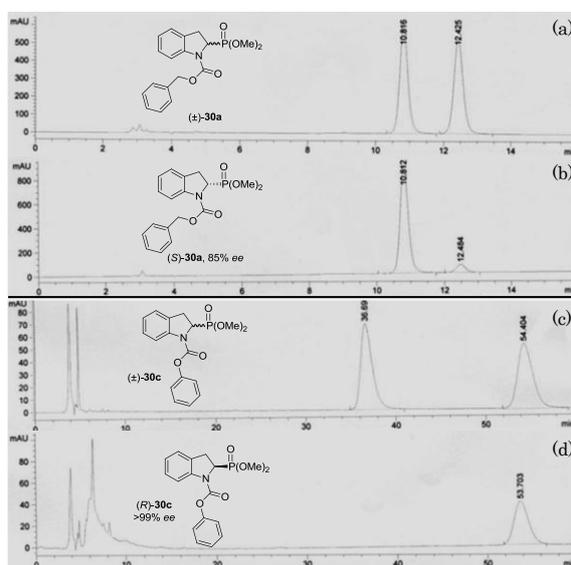
<sup>f</sup> Se añadieron 2 equivalentes de enzima (en peso) a las 53 h.

<sup>g</sup> Se añadieron 2 equivalentes de carbonato **24e** (relación molar) a las 24 h.

De manera alternativa, la misma táctica de adición secuencial de enzima se efectuó añadiendo, además, 2 equivalentes del carbonato **24e** a las 24 h de reacción (entrada 4), observándose cierta inhibición con conversiones ligeramente inferiores en comparación con la reacción con 2.5 equivalentes de **24e** (entradas 4 y 5). Por último, el proceso en el que se partió de una relación enzima:sustrato 4:1 y que combinó la adición secuencial de enzima y carbonato condujo a conversiones elevadas (entradas 6-8), aislándose con buenos rendimientos el carbamato enantiopuro (*R*)-**30c** (42% rendimiento para un máximo del 50%, >99% *ee*) y el sustrato remanente (*S*)-**31** (43% rendimiento, 92% *ee*) tras purificación del crudo de reacción por cromatografía de columna. Tal y como se encuentra descrito en la bibliografía, el aislamiento de estos

derivados permite el acceso a los correspondientes análogos fosforados del L-Oic.<sup>173</sup>

Los compuestos ópticamente activos aislados fueron empleados por parte del grupo del Profesor Carlos Cativiela como sustratos de distintas transformaciones químicas. De ellas, cabe mencionar la síntesis de un derivado del que se consiguió determinar la estructura mediante difracción de Rayos X, lo que permitió obtener la configuración absoluta de los compuestos finales. Una vez conocida ésta, se completó la descripción de los compuestos analizando la rotación óptica específica de los mismos y los tiempos de retención de ambos enantiómeros mediante HPLC con columnas quirales (ver Parte Experimental). La Figura 27 muestra los cromatogramas correspondientes a los carbamatos racémicos y ópticamente activos de fenilo **30c** y bencilo **30a**, procedente este último de la derivatización de la amina libre aislada tras la biotransformación.



**Figura 27.** Cromatogramas del compuesto **30a** racémico (a) y enantioenriquecido (b), y del compuesto **30c** racémico (c) y enantiopuro (d).

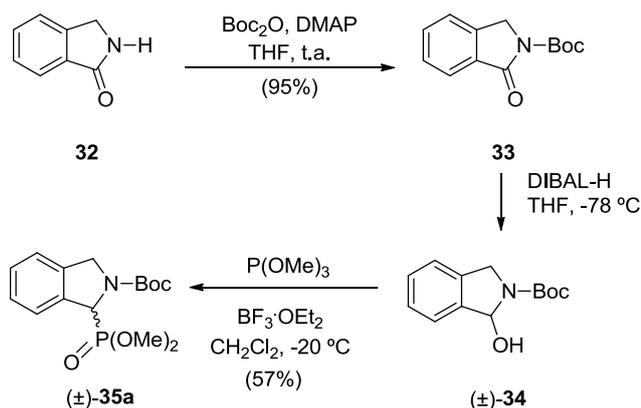
<sup>173</sup> A. Arizpe, F. J. Sayago, A. I. Jiménez, M. Ordóñez, C. Cativiela, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3074-3081.

### 3.5. Síntesis y Resolución Cinética Enzimática de Derivados de Fosfoisoindolinas

Una vez completado el estudio correspondiente al derivado aminofosfónico de la indolina se consideró el correspondiente análogo de la fosfoisoindolina, cuya síntesis se desarrolló, nuevamente, en la Universidad de Zaragoza.

#### 3.5.1. Síntesis del Isoindolin-1-ilfosfonato de Dimetilo Protegido

En esta ocasión, para la introducción del grupo fosfonato se partió de la 1-isoindolinona (**32**), la cual se protegió con el grupo *tert*-butoxicarbonilo (Boc) con excelente rendimiento empleando dicarbonato de di-*tert*-butilo (Boc<sub>2</sub>O) en presencia de DMAP (Esquema 68).<sup>174</sup> A continuación, el grupo ceto se redujo con hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL-H) para dar el hemiaminal racémico **34**, que reaccionó con el complejo trifluoruro de boro-eterato y fosfito de trimetilo, aislándose la fosfoisoindolina racémica **35a** con un rendimiento del 57% desde **33**.

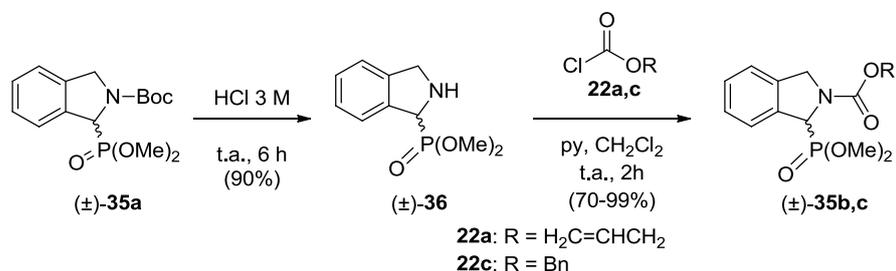


**Esquema 68.** Síntesis química del aminofosfonato racémico **35a** a partir de la 1-isoindolinona **32**.

<sup>174</sup> A. Arizpe, F. J. Sayago, A. I. Jiménez, M. Ordóñez, C. Cativiela, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 6732-6738.

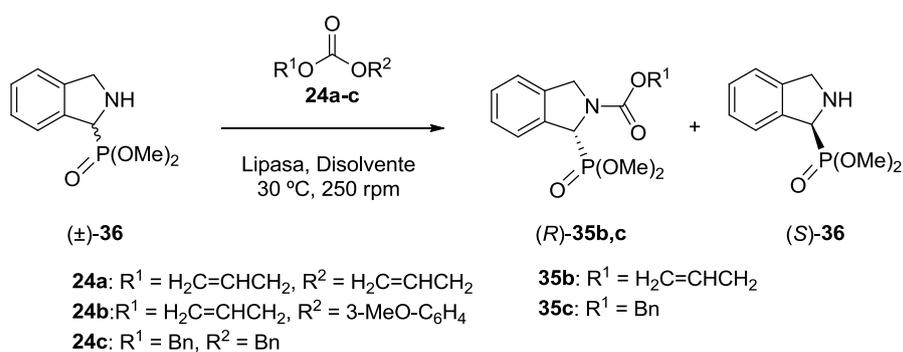
### 3.5.2. Resolución Cinética Enzimática del Isoindolin-1-ilfosfonato de Dimetilo

En la búsqueda de una metodología analítica adecuada para el seguimiento de las reacciones con el tiempo, así como para la determinación de los excesos enantioméricos de sustrato y producto de la resolución cinética del aminofosfonato **36**, se sintetizaron los correspondientes carbamatos de alilo y bencilo y se optimizó la separación de sus enantiómeros mediante HPLC. En primer lugar, se eliminó el grupo Boc en medio ácido obteniéndose el aminofosfonato racémico **36** con buen rendimiento aislado (Esquema 69). Por su parte, la formación de los carbamatos racémicos **35b** y **35c** tuvo lugar con un rendimiento alto con el cloroformiato de alilo y excelente en el caso del derivado bencilado.



**Esquema 69.** Síntesis de la amina racémica **36** y los correspondientes carbamatos racémicos **35b** y **35c**.

Seguidamente, se procedió a estudiar la resolución cinética enzimática mediante procesos de alcoxicarbonilación, para lo cual se partió de una concentración de sustrato de 140 mM y se emplearon distintas lipasas como biocatalizadores en una relación enzima:sustrato de 2:1 en peso y 2.5 equivalentes molares de una serie de carbonatos **24a-c** en TBME a 30 °C y 250 rpm (Esquema 70).



**Esquema 70.** Resolución cinética enzimática de la amina racémica **36** empleando lipasas.

Curiosamente, la PSL-C I, lipasa empleada en la resolución de isoindolinas carboxiladas análogas,<sup>172</sup> no catalizó el proceso en medida alguna (Tabla 19, entrada 1), al igual que ocurrió con la CAL-B en presencia del carbonato de dialilo **24a** (entrada 2) o del carbonato de alilo y 3-metoxifenilo **24b** (entrada 3).

**Tabla 19.** Resolución cinética de la amina racémica **36** empleando lipasas en una relación enzima:sustrato 2:1 en peso y 2.5 equiv. de carbonato a 30 °C y 250 rpm.

Entrada	Lipasa	<b>24</b>	Disolvente	t (h)	$ee_p$ (%) <sup>a</sup>	$ee_s$ (%) <sup>a</sup>	$c$ (%) <sup>b</sup>
1	PSL-C I	<b>24a</b>	TMBE	24	--	--	<1
2	CAL-B	<b>24a</b>	TMBE	48	--	--	<1
3	CAL-B	<b>24b</b>	TMBE	48	--	--	<1
4	CAL-A	<b>24c</b>	TMBE	24	--	--	<1
5	CAL-A	<b>24a</b>	TMBE	92	78	26	50
6	CAL-A	<b>24b</b>	TMBE	27	87	32	67
7	CAL-A	<b>24b</b>	Tolueno	47	96	9	77 (58)

<sup>a</sup> Determinado por HPLC tras purificación del crudo de reacción por cromatografía de columna.

<sup>b</sup> Determinado por <sup>1</sup>H-RMN del crudo de reacción. Se indica entre paréntesis el rendimiento aislado.

Sin embargo, la CAL-A, que no mostró actividad con el carbonato de dibencilo **24c** (entrada 4), sí promovió la reacción en una extensión considerable con los carbonatos alilados **24a** y **24b** (entradas 5 y 6). En ambos casos, la amina remanente se aisló con bajo exceso enantiomérico para conversiones iguales o superiores al 50%, lo cual resultó indicativo

de un proceso dinámico de racemización espontánea de la amina libre. Esta observación concuerda con lo descrito en los antecedentes de este capítulo,<sup>172</sup> y se hizo aún más patente al cambiar el disolvente empleado en la reacción por tolueno, en cuyo caso la reacción avanzó hasta un 77% de conversión, aislándose el carbamato con buen exceso enantiomérico mientras que la amina remanente se obtuvo prácticamente en forma racémica (entrada 7).

Con el fin de mejorar la efectividad de la resolución cinética dinámica y llevar el proceso hasta conversiones cercanas al 100% se evaluaron una serie de variables (Tabla 20). Entre ellas, el aumento de la carga de enzima dio lugar a una ligera disminución de la conversión, manteniéndose el elevado exceso enantiomérico del producto (entrada 2). Algo similar ocurrió al llevar a cabo la reacción a 45 °C (entrada 5), mientras que la conversión disminuyó por debajo del 60% al duplicar la concentración del aminofosfonato **36** (entrada 3) o al añadir 10 equivalentes del carbonato mixto **24b** (entrada 4).

**Tabla 20.** Resolución cinética dinámica de la amina racémica **36** empleando CAL-A y el carbonato de alilo y 3-metoxifenilo **24b** en tolueno a 30 °C y 250 rpm.

COC(=O)OCC=C + COC(=O)Nc1ccc2c(c1)ncn2COP(=O)(OC)OC  $\xrightarrow[\text{Tolueno, 30 } ^\circ\text{C, 250 rpm}]{\text{CAL-A}}$  COC(=O)Nc1ccc2c(c1)ncn2COP(=O)(OC)OC

(±)-**36**                      **24b**                      (*R*)-**35b**

Entrada	CAL-A <sup>a</sup>	24b (equiv)	36 (mol/L)	T (°C)	t (h)	ee <sub>p</sub> (%) <sup>b</sup>	c (%) <sup>c</sup>
1	2:1	2.5	0.14	30	47	96	77 (58)
2	4:1	2.5	0.14	30	46	95	62
3	2:1	2.5	0.28	30	46	91	59
4	2:1	10	0.14	30	71	85	57
5	2:1	2.5	0.14	45	47	94	68

<sup>a</sup> Relación enzima:substrato en peso.

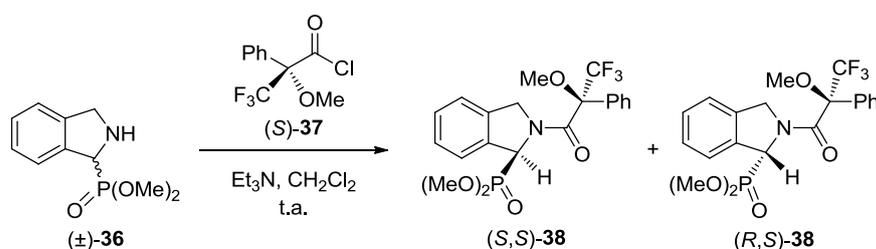
<sup>b</sup> Determinado por HPLC tras purificación del crudo de reacción por cromatografía de columna.

<sup>c</sup> Determinado por <sup>1</sup>H-RMN del crudo de reacción. Se indica entre paréntesis el rendimiento aislado.

Por tanto, ninguna prueba consiguió hacer evolucionar la reacción más allá de lo observado previamente, de manera que se establecieron como condiciones óptimas el uso de tolueno como disolvente, CAL-A como biocatalizador en una proporción 2:1 en peso respecto al sustrato, 2.5 equivalentes de carbonato de alilo y 3-metoxifenilo, 30 °C y 250 rpm (entrada 1), bajo las cuales se aisló el carbamato de interés en forma ópticamente activa (96% *ee*) con un rendimiento moderado (58%).

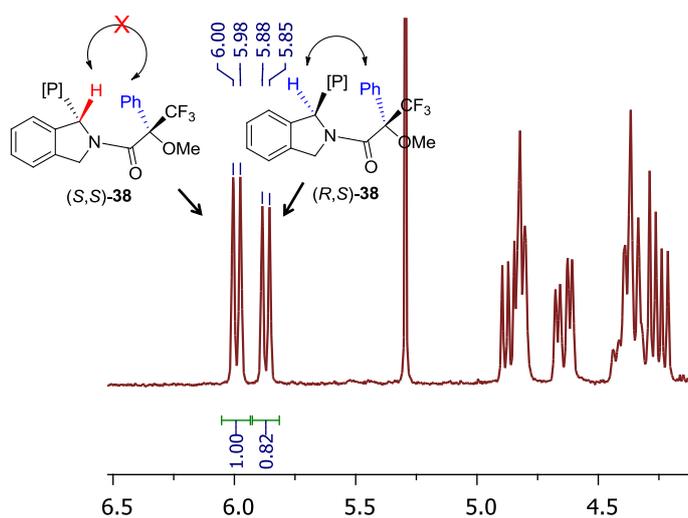
### 3.5.3. Determinación de la Configuración Absoluta

Por último, las configuraciones absolutas de los productos de la resolución enzimática se determinaron a través de la síntesis de los derivados de Mosher del aminofosfonato **36** en forma racémica y enantioenriquecida. En primer lugar, el derivado racémico se preparó haciendo reaccionar la fosfoisindolina racémica **36** con el cloruro de (*S*)-(+)- $\alpha$ -metoxi- $\alpha$ -trifluorometilfenilacetilo (MTPA-Cl, (*S*)-**37**) en presencia de trietilamina (Esquema 71).



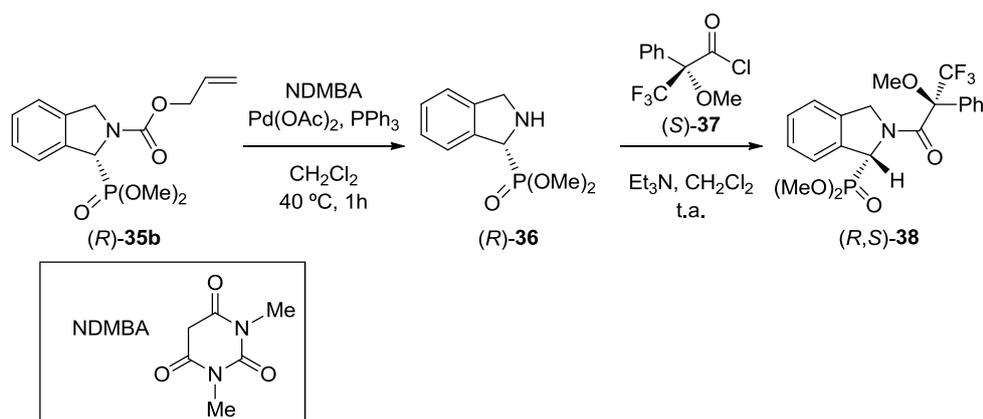
**Esquema 71.** Síntesis de los derivados de Mosher de la amina libre racémica **36**.

De esta manera, se aislaron los correspondientes diastereoisómeros (*RS,S*)-**38** y mediante el experimento de  $^1\text{H}$ -RMN se identificaron dos dobletes a  $\delta$  5.87 ( $^2J_{\text{PH}} = 9.0$  Hz) y 5.99 ( $^2J_{\text{PH}} = 8.9$  Hz) ppm para cada uno de los isómeros, correspondientes a los protones metínicos en posición  $\alpha$  respecto al fósforo (Figura 28). La señal aparece a campos más bajos al verse afectada por la anisotropía diamagnética del fenilo, mientras que se encuentra más desapantallada en el isómero en el que el protón y el fenilo están en lados opuestos.



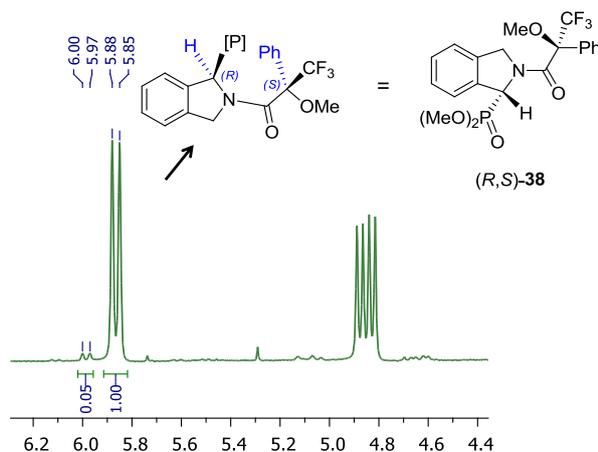
**Figura 28.** Ampliación del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN donde se muestran las señales de los protones en posición  $\alpha$  fósforo de los diastereoisómeros  $(R,S,S)$ -**38**.

Una vez identificada la señal diferenciadora entre un diastereoisómero y otro, se aplicó el mismo procedimiento tomando como sustrato la fosfoisoindolina **36** ópticamente activa. Debido a la racemización observada para la amina libre en la DKR, se llevó a cabo la desprotección del carbamato con buen exceso enantiomérico (producto de la resolución) y la consecutiva protección con MTPA-Cl (*S*)-**37**, evitando así una posible racemización del aminofosfonato libre (Esquema 72).



**Esquema 72.** Síntesis del derivado de Mosher de la amina ópticamente activa (*R*)-**36** obtenida por desprotección del carbamato enantioenriquecido (*R*)-**35b**.

Tras el proceso de desprotección y protección se registró el espectro de  $^1\text{H-RMN}$  cuyas señales representativas se muestran en la Figura 29. Se aprecia claramente una señal mayoritaria de las dos observadas en el espectro de la mezcla de diastereoisómeros, en concreto el doblete a  $\delta$  5.87 ( $^2J_{\text{PH}} = 9.0$  Hz) ppm. Siendo ésta la señal que aparece a campos más bajos, se concluyó que el compuesto en estudio era el (*R,S*)-**38** y, consecuentemente, al carbamato **35b** producto de la DKR se le asignó la configuración (*R*).



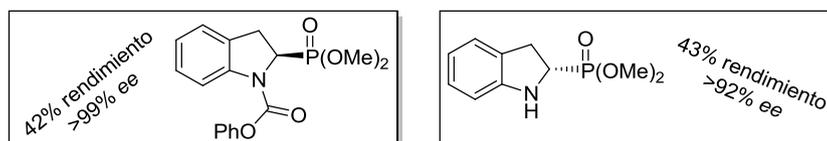
**Figura 29.** Desplazamiento de la señal de  $^1\text{H-RMN}$  del H en posición  $\alpha$  al grupo fosfonato correspondiente al diastereoisómero mayoritario (*R,S*)-**38**.

# CONCLUSIONES



✓ Se ha estudiado la resolución cinética enzimática del indolin-2-ilfosfonato de dimetilo empleando una serie de carbonatos a distintas concentraciones.

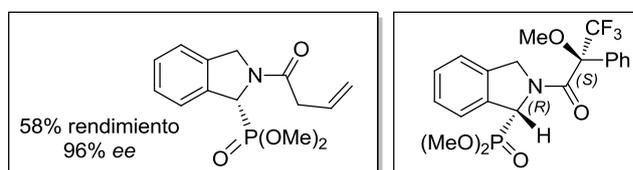
✓ Los mejores resultados se han obtenido utilizando la CAL-A como biocatalizador y el carbonato de difenilo como agente de alcoxicarbonilación en TBME a 30 °C y 250 rpm, observándose cierta inhibición de la enzima, que fue posible subsanar mediante la adición por partes de la misma.



✓ Paralelamente, se ha abordado la resolución cinética del análogo estructural isoindolin-1-ilfosfonato de dimetilo estudiando el efecto del medio y variando el agente de alcoxicarbonilación empleado.

✓ El biocatalizador más eficiente ha sido nuevamente la CAL-A, con la que se ha conseguido la resolución cinética dinámica gracias a la racemización espontánea del aminofosfonato de partida en el medio de reacción. Esto ha permitido sobrepasar el valor de conversión del 50%, limitación inherente a las resoluciones cinéticas clásicas.

✓ Se ha determinado la configuración absoluta del (R)-carbamato obtenido en la resolución cinética dinámica mediante la preparación del correspondiente derivado de Mosher.





# PARTE EXPERIMENTAL



### 3.6. General

La procedencia de los reactivos químicos es común a lo establecido en los Capítulos 1 y 2, así como el tratamiento de secado, destilación y almacenaje de los disolventes. Adicionalmente, Sigma-Aldrich suministró la lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre un soporte cerámico (PSL-C, 1019 U/g). El AcOEt se utilizó sin tratamiento previo.

### 3.7. Técnicas de Análisis

Las técnicas de cromatografía en gel de sílice, espectroscopía IR, RMN, HRMS, punto de fusión y rotación óptica específica se realizaron según lo descrito en los Capítulos 1 y 2.

#### 3.7.1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Los cromatogramas de HPLC se adquirieron bajo las mismas especificaciones de los Capítulos 1 y 2. Las condiciones de HPLC y los tiempos de retención de los aminofosfonatos **31** y **36**, así como de los carbamatos **30a-c** y **35b** se recogen en la Tabla 21.

**Tabla 21.** Separación analítica por HPLC de sustratos y productos de las reacciones enzimáticas.

Compuesto	Columna	Eluyente ( <i>n</i> -hexano/2-propanol) <sup>a</sup>	<i>t<sub>R</sub></i> (min) <sup>b</sup>	<i>R<sub>S</sub></i> <sup>c</sup>
<b>30a<sup>d</sup></b>	IA	90:10	16.6 ( <i>S</i> ) y 19.0 ( <i>R</i> )	1.8
<b>30b</b>	OJ-H	80:20	10.5 ( <i>S</i> ) y <b>20.5</b> ( <i>R</i> )	5.6
<b>30c</b>	OJ-H	80:20	36.7 ( <i>S</i> ) y <b>54.4</b> ( <i>R</i> )	6.0
<b>31</b>	OJ-H	80:20	<b>12.3</b> ( <i>S</i> ) y 13.4 ( <i>R</i> )	1.4
<b>35b</b>	OJ-H	80:20	<b>8.0</b> ( <i>R</i> ) y 9.7 ( <i>S</i> )	1.3
<b>36</b>	AS	80:20	13.1 ( <i>R</i> ) y <b>19.1</b> ( <i>S</i> )	1.9

<sup>a</sup> Todos los análisis se efectuaron con un flujo de 0.8 mL/min a 30 °C.

<sup>b</sup> Se destaca en negrita el enantiómero mayoritario obtenido tras la transformación enzimática.

<sup>c</sup> Factor de resolución:  $R_S = 2x[t_R(S) - t_R(R)] / (w_{b1}(S) + w_{b2}(R))$

<sup>d</sup> El compuesto **30a** también se separó empleando hexano/acetona (85:15) a 20 °C en la columna de relleno quiral IA para hacer coincidir los tiempos de retención con los descritos en la Universidad de Zaragoza.

## 3.8. Procedimientos Sintéticos

### 3.8.1. Síntesis de la Fosfoindolina Racémica **31**

En un hidrogenador que contiene una suspensión del carbamato racémico **30a** (400 mg, 1.108 mmol) y Pd/C (40 mg) en acetato de etilo (15 mL) se introducen 8 bares de presión de hidrógeno y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 24 h. La reacción se para por filtración del catalizador sobre tierra diatomea y el disolvente se elimina por evaporación a presión reducida, obteniéndose el aminofosfonato racémico **31** como un sólido blanco (100%).

### 3.8.2. Procedimiento General para la Síntesis de los Carbamatos Racémicos **30b** y **30c**

A una disolución del aminofosfonato **31** (60 mg, 0.26 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (1 mL) se le añaden, sucesivamente, piridina (23.5 µL, 0.29 mmol) y el cloroformiato correspondiente **22a** o **22b** (0.29 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 h, tras las cuales se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (eluyente 100% AcOEt para **30b**; 70% AcOEt/hexano para **30c**), obteniéndose los correspondientes carbamatos **30b** y **30c** (50-70%).

### 3.8.3. Procedimiento General para la Resolución Cinética Enzimática por Alcoxycarbonilación del Aminofosfonato Racémico **31**

Una suspensión del aminofosfonato racémico **31** (125 mg, 0.55 mmol) en TBME seco (3.9 mL) se agita a 45 °C hasta la disolución completa del sustrato, momento en el cual se añaden sucesivamente la CAL-A (240 mg, relación 2:1 en peso enzima:sustrato) y el carbonato de difenilo **24e** (296 mg, 1.38 mmol). La mezcla se agita a 30 °C y 250 rpm durante el tiempo indicado en la Tabla 18, añadiendo a la reacción 250 mg de CAL-A adicionales a las 24 h y otros 250 mg a las 53 h. El

transcurso de la reacción se monitoriza a través del HPLC y, después de 71 h la enzima se filtra, se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 5 mL) y el disolvente se evapora a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice, obteniéndose el correspondiente carbamato (*R*)-**30c** (eluyente 80% AcOEt/hexano) y, en segundo lugar, el aminofosfonato (*S*)-**31** (5% MeOH/AcOEt) ópticamente activos (ver Tabla 18).

#### **3.8.4. Síntesis de la Fosfoisindolina Racémica 36**

El aminofosfonato protegido **35a** en forma racémica (200 mg, 0.612 mmol) se suspende en una disolución acuosa de HCl 3 M (10 mL) y se agita a temperatura ambiente. La reacción acaba pasadas 6 h, lo que se puede determinar visualmente al no observarse nada de sólido en suspensión. La disolución se alcaliniza con NaOH 4 M (10 mL) y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 15 mL). Las fases orgánicas se combinan, se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtran y el disolvente se elimina por evaporación a presión reducida, obteniéndose el aminofosfonato racémico **36** como un sólido blanco (90%).

#### **3.8.5. Procedimiento General para la Síntesis de los Carbamatos Racémicos 35b y 35c**

A una disolución del aminofosfonato **36** (60 mg, 0.26 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (1 mL) se le añaden, sucesivamente, piridina (23.5 µL, 0.29 mmol) y el cloroformiato de alilo (**22a**) o de bencilo (**22c**, 0.29 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 h, tras las cuales se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (eluyente 80% AcOEt/hexano para **35b**; 100% AcOEt para **35c**), obteniéndose los correspondientes carbamatos **35b** y **35c** (70-99%).

### 3.8.6. Procedimiento General para la Resolución Cinética Dinámica Enzimática por Alcoxycarbonilación de la Amina Racémica **36**

Una suspensión del aminofosfonato racémico **36** (100 mg, 0.44 mmol), el carbonato mixto de alilo y 3-metoxifenilo (**24b**, 228 mg, 1.10 mmol) y CAL-A (200 mg, relación 2:1 en peso enzima:sustrato) en tolueno seco (3.1 mL) se agita bajo atmósfera inerte a 30 °C y 250 rpm durante 47 h. La enzima se filtra, se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 5 mL) y el disolvente se evapora a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice, aislándose el correspondiente carbamato (*R*)-**35b** (80% AcOEt/hexano) y, en segundo lugar, el aminofosfonato (*S*)-**36** (100% AcOEt) ópticamente activos.

### 3.8.7. Procedimiento General para la Desprotección del Carbamato Ópticamente Activo **35b**

A una disolución del carbamato ópticamente activo **35b** (20 mg, 0.064 mmol, 96% *ee*) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (0.8 mL) se le añaden, sucesivamente y bajo atmósfera de argón, ácido *N,N*-dimetilbarbitúrico (27 mg, 0.17 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (1.5 mg, 0.0064 mmol) y PPh<sub>3</sub> (5 mg, 0.019 mmol). La reacción se agita a reflujo durante 1 h y, entonces, se deja que alcance temperatura ambiente, se le añade CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> adicional (10 mL) y se lava con H<sub>2</sub>O (2 x 10 mL). La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y el disolvente se elimina por evaporación a presión reducida, obteniéndose un crudo de reacción en el que está presente el aminofosfonato **36** en forma ópticamente activa. La purificación del crudo de reacción se descartó para evitar la probable racemización del compuesto (*R*)-**36**.

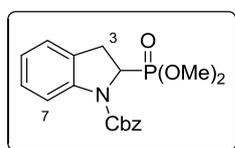
### 3.8.8. Procedimiento General para la Síntesis del Derivado de Mosher Ópticamente Activo (*R,S*)-**38**

A una disolución en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.7 mL) del crudo de reacción obtenido tras la desprotección del grupo aliloxycarbonilo del carbamato (*R*)-**35b**,

donde está contenido el aminofosfonato (*R*)-**36** en una cantidad máxima de 0.064 mmol (15 mg), se le añaden, sucesivamente y bajo atmósfera de nitrógeno, el cloruro de ácido de Mosher (*S*)-**37** (15  $\mu$ L, 0.080 mmol) y trietilamina seca (11  $\mu$ L, 0.080 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 10 h, tras las cuales se añade CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> adicional (10 mL) y se lava con H<sub>2</sub>O (2 x 10 mL). La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y el disolvente se elimina por evaporación a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (eluyente 50% AcOEt/hexano), obteniéndose el correspondiente derivado de Mosher (*R,S*)-**38** con 91% *de* y un 76% de rendimiento aislado.

### 3.9. Datos Experimentales

#### 2-(Dimetoxifosforil)indolin-1-carboxilato de bencilo (30a)



**Fórmula empírica:** C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>5</sub>P

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

***R*<sub>f</sub>** (80% AcOEt/hexano): 0.42

**IR** (KBr):  $\nu$  1710, 1267, 1033 cm<sup>-1</sup>

**Peso Molecular:** 361.33 g/mol

**Pf:** 76-77 °C

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz):  $\delta$  3.18-3.40 (m, 2H, H<sub>3</sub>), superpuesto con 3.40-3.45 (m, 4H, OMe), superpuesto con 3.45-3.59 (s, 2H, OMe), 4.79 (m, 1H, H<sub>2</sub>), 5.19 (m, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 6.88 (m, 1H, H<sub>6</sub>), 7.06 (m, 2H, H<sub>4</sub> y H<sub>5</sub>), 7.19-7.28 (m, 3H, Cbz), 7.33-7.34 (m, 2H, Cbz), 7.41-7.71 (m, 1H, H<sub>7</sub>) ppm

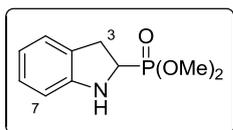
**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz):  $\delta$  30.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>), 53.1 (d, <sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 7.1 Hz, CH<sub>3</sub>, OMe), 53.2 (d, <sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 8.0 Hz, CH<sub>3</sub>, OMe), 54.9 (d, <sup>1</sup>J<sub>PC</sub> = 158.1 Hz, CH, C<sub>2</sub>), 67.9 (CH<sub>2</sub>, Cbz), 116.1 (CH, C<sub>7</sub>), 123.5 (CH, C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub>), 124.5 (CH, C<sub>4</sub>), 127.6 (Cbz), 128.3 (Cbz), 128.5 (Cbz), 130.1 (C<sub>3a</sub>, Cbz-C), 135.8 (C, C<sub>7a</sub>), 152.9 (C, C=O) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NNaO<sub>4</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada, encontrada:

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = +34.4$  (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) [para (*S*)-**30a** en 85% *ee*]



**Indolin-2-ilfosfonato de dimetilo (31)**



**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>3</sub>P

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**Rendimiento:** 100%

**R<sub>f</sub>** (80% AcOEt/hexano): 0.19

**Peso Molecular:** 227.20 g/mol

**Pf:** 74-76 °C

**IR (KBr):**  $\nu$  3425, 1256, 1033 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz):  $\delta$  3.21-3.38 (m, 2H, H<sub>3</sub>), 3.75 (d, <sup>3</sup>J<sub>PH</sub> = 3.3 Hz, 3H, OMe), 3.78 (d, <sup>3</sup>J<sub>PH</sub> = 3.5 Hz, 3H, OMe), 4.10 (dd, <sup>2</sup>J<sub>PH</sub> = 9.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.4 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 6.65 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6.73 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 0.9 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.02 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.09 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.3 Hz, 1H, H<sub>7</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz):  $\delta$  31.3 (d, <sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 3.4 Hz, CH<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>), 53.0 (d, <sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>, OMe), 53.7 (d, <sup>2</sup>J<sub>PC</sub> = 6.7 Hz, CH<sub>3</sub>, OMe), 54.5 (d, <sup>1</sup>J<sub>PC</sub> = 165.8 Hz, CH, C<sub>2</sub>), 110.0 (CH, C<sub>4</sub>), 119.6 (CH, C<sub>5</sub>), 124.6 (CH, C<sub>7</sub>), 127.5 (d, <sup>3</sup>J<sub>PC</sub> = 8.3 Hz, C, C<sub>3a</sub>), 127.7 (CH, C<sub>6</sub>), 149.9 (d, <sup>3</sup>J<sub>PC</sub> = 9.5 Hz, C, C<sub>7a</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>P)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 228.0784, encontrada: 228.0786

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = -23.5$  (*c* 1, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) [para (*S*)-31 en 94% *ee*]

**Separación analítica de 31 (HPLC):**

Columna: Chiralcel OJ-H

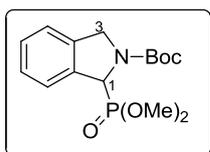
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 80:20

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*S*) = 12.3 min, *t<sub>R</sub>* (*R*) = 13.4 min

**1-(Dimetoxifosforil)isoindolin-2-carboxilato de *tert*-butilo (35a)**



**Fórmula empírica:** C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>5</sub>P

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**R<sub>f</sub>** (70% AcOEt/hexano): 0.43

**IR (KBr):**  $\nu$  1704, 1288, 1106, 1029 cm<sup>-1</sup>

**Peso Molecular:** 327.31 g/mol

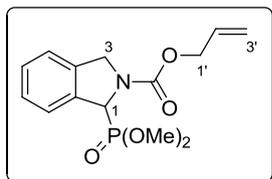
**Pf:** 108-110 °C

**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300.13 MHz): se observan algunas señales duplicadas que se indican juntas entre corchetes, con un asterisco sobre el rotámero minoritario;  $\delta$  1.50 (s, 9H,  $t\text{Bu}$ ), [3.41\* (d,  $^3J_{\text{PH}} = 10.3$  Hz) + 3.52 (d,  $^3J_{\text{PH}} = 10.4$  Hz, 3H, OMe)], [3.76\* (d,  $^3J_{\text{PH}} = 10.8$  Hz) + 3.82 (d,  $^3J_{\text{PH}} = 10.7$  Hz, 3H, OMe)], 4.50-4.67 (m, 1H,  $\text{H}_3$ ), 4.74-5.00 (m, 1H,  $\text{H}_3$ ), [5.42\* (d,  $^3J_{\text{PH}} = 6.7$  Hz) + 5.50 (d,  $^3J_{\text{PH}} = 6.2$  Hz, 1H,  $\text{H}_1$ )], 7.19-7.34 (m, 3H, Ar), 7.44-7.53 (m, 1H, Ar) ppm.

**$^{13}\text{C-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 75.5 MHz): muchas de las señales se observan duplicadas y se indican juntas entre corchetes, con un asterisco sobre el rotámero minoritario;  $\delta$  28.4 (3 $\text{CH}_3$ ,  $t\text{Bu}$ ), [52.2\* + 52.7 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_3$ )], [53.1\* (d,  $^2J_{\text{PC}} = 6.8$  Hz) + 53.5 (d,  $^2J_{\text{PC}} = 6.0$  Hz,  $\text{CH}_3$ , OMe)], [53.6 (d,  $^2J_{\text{PC}} = 6.8$  Hz) + 53.9\* (d,  $^2J_{\text{PC}} = 7.0$  Hz,  $\text{CH}_3$ , OMe)], [58.8 (d,  $^1J_{\text{PC}} = 62.6$  Hz) + 60.9\* (d,  $^1J_{\text{PC}} = 63.4$  Hz, CH,  $\text{C}_1$ )], [80.6 + 80.8\* (C,  $t\text{Bu}$ )], [122.5 + 122.7\* (CH, Ar)], [124.2\* + 124.3 (CH, Ar)], 127.5 (CH, Ar), [128.3 + 128.4\* (CH, Ar)], 134.3 (C, Ar), 138.3 (C, Ar), [154.0\* + 154.2 (C, C=O)] ppm.

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>,  $m/z$ ) ( $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NNaO}_5\text{P}$ )<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 350.1128, encontrada: 350.1139

**1-(Dimetoxifosforil)isoindolin-2-carboxilato de alilo (35b)**



**Fórmula empírica:**  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{NO}_5\text{P}$

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**Rendimiento:** 70%

**$R_f$**  (80% AcOEt/hexano): 0.30

**Peso Molecular:** 311.27 g/mol

**$^1\text{H-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 300.13 MHz): se observan algunas señales duplicadas que se indican juntas entre corchetes, con un asterisco sobre el rotámero minoritario;  $\delta$  [3.45\* (d,  $^3J_{\text{PH}} = 10.4$  Hz) + 3.52 (d,  $^3J_{\text{PH}} = 10.5$  Hz, 3H, OMe)], [3.77\* (d,  $^3J_{\text{PH}} = 10.7$  Hz) + 3.85 (d,  $^3J_{\text{PH}} = 10.7$  Hz, 3H, OMe)], 4.59-4.63 (m, 3H,  $\text{H}_3 + \text{H}_1$ ), 5.24 (d,  $^2J_{\text{HH}} = 10.4$  Hz, 1H,  $\text{H}_3$ ), 5.36 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 10.4$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 17.1$  Hz, 1H,  $\text{H}_3$ ), [5.50 (d,  $^2J_{\text{PH}} = 6.4$  Hz) + 5.54 (d,  $^2J_{\text{PH}} = 6.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_1$ )], 5.97 (ddt,  $^3J_{\text{HH}} = 16.4$ , 10.6, 5.5 Hz, 1H,  $\text{H}_2$ ), 7.26-7.35 (m, 3H, Ar), 7.45-7.56 (m, 1H, Ar) ppm.

**$^{13}\text{C-RMN}$**  ( $\text{CDCl}_3$ , 75.5 MHz): muchas de las señales se observan duplicadas y se indican juntas entre corchetes, con un asterisco sobre el rotámero minoritario, los dobletes de los dos rotámeros de los grupos metoxi aparecen solapados;  $\delta$  [52.5 + 52.8\* ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_3$ )], 53.5-53.7 (m, 2 $\text{CH}_3$ , OMe), 59.8 (d,  $^1J_{\text{PC}} = 158.8$  Hz, CH,  $\text{C}_1$ ), [66.6 + 66.8\* ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_1$ )], [117.9 + 118.3\* ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_3$ )], [122.6 + 122.7\* (CH, Ar)], 124.3 (CH, Ar),

127.7 (CH, Ar), 128.5 (CH, Ar), 132.7 (CH, C<sub>2</sub>), 134.1 (C, Ar), 137.9 (C, Ar), 154.7 (C, C=O)

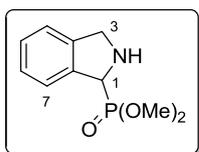
**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>NNaO<sub>5</sub>P)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 334.0815, encontrada: 334.0825

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = -58.3$  (*c* 0.3, EtOH) [para (*R*)-**35b** en 96% *ee*]

**Separación analítica de 35b (HPLC):**

Columna: Chiralcel OJ-H Temperatura: 30 °C  
 Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 80:20 Flujo: 0.8 mL/min  
 Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*S*) = 8.0 min, *t<sub>R</sub>* (*R*) = 9.7 min

**Isoindolin-1-il-fosfonato de dimetilo (36)**



**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>3</sub>P

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**Rendimiento:** 90%

***R<sub>f</sub>*** (70% AcOEt/hexano): 0.24

**Peso Molecular:** 227.20 g/mol

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 3.58 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>PH</sub> = 10.3 Hz, 3H, OMe), 3.75 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>PH</sub> = 10.4 Hz, 3H, OMe), 4.23-4.44 (m, 2H, H<sub>3</sub>), 4.78 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>PH</sub> = 7.7 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 5.26 (sa, 1H, NH), 7.19-7.29 (m, 3H, Ar), 7.46 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 5.2, <sup>4</sup>*J*<sub>HH</sub> = 1.8 Hz, 1H, Ar) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 52.5 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>PC</sub> = 2.4 Hz, CH<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>), 53.2 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>PC</sub> = 7.3 Hz, CH<sub>3</sub>, OMe), 53.6 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>PC</sub> = 7.2 Hz, CH<sub>3</sub>, OMe), 60.6 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>PC</sub> = 159.3 Hz, CH, C<sub>1</sub>), 122.6 (d, *J*<sub>PC</sub> = 2.2 Hz, CH, Ar), 123.9 (d, *J*<sub>PC</sub> = 3.3 Hz, CH, Ar), 127.1 (d, *J*<sub>PC</sub> = 2.9 Hz, CH, Ar), 128.0 (d, *J*<sub>PC</sub> = 3.0 Hz, CH, Ar), 136.3 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>PC</sub> = 3.9 Hz, C, C<sub>3a</sub>), 141.7 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>PC</sub> = 7.2 Hz, C, C<sub>7a</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NNaO<sub>4</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada, encontrada:

**Separación analítica de 36 (HPLC):**

Columna: Chiralpak AS Temperatura: 30 °C  
 Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 80:20 Flujo: 0.8 mL/min  
 Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*S*) = 13.1 min, *t<sub>R</sub>* (*R*) = 19.1 min



# **CAPÍTULO 4**

**SÍNTESIS ASIMÉTRICA DE BENZOXAZINAS.  
APLICACIÓN A LA PREPARACIÓN DE UN  
PRECURSOR DEL LEVOFLOXACINO**

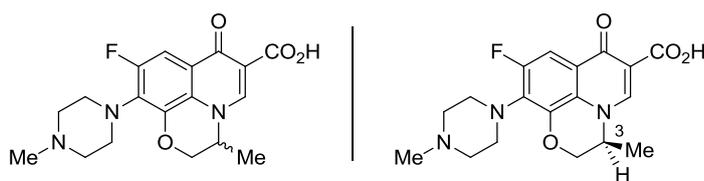


# **ANTECEDENTES**



#### 4.1. Importancia de las Benzoxazinas

El esqueleto de las 1,4-benzoxazinas y, en particular, de los derivados 2,3-dihidro, está presente en numerosas moléculas biológicamente activas, que abarcan desde herbicidas y fungicidas hasta compuestos de interés terapéutico. La versatilidad del mismo y la relativa sencillez de preparación de estas estructuras han contribuido a elevar el interés de su estudio, situando a algunos derivados de benzoxazina en fase de desarrollo como potenciales fármacos y habiendo llegado otros a comercializarse o superar la fase clínica.<sup>175</sup> Este es el caso del ofloxacino (Figura 30), un antibiótico de amplio espectro que se encuentra actualmente en el mercado para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias tanto gram-positivas como gram-negativas. El correspondiente isómero *S*, que recibe el nombre de levofloxacino, es entre 8 y 128 veces más activo que el isómero *R* y el doble que el racemato, lo que es indicativo del papel crucial que juega el centro quiral C-3 en las propiedades farmacológicas.<sup>176</sup>



**Figura 30.** Estructura del ofloxacino (izquierda) y del levofloxacino (derecha).

La importancia de estos heterociclos no sólo radica en sus aplicaciones biológicas directas, sino que también son intermedios con gran interés sintético que han sido ampliamente empleados a nivel industrial para la preparación de compuestos con actividad farmacológica.

<sup>175</sup> a) N. Siddiqui, R. Ali, M. S. Alam, W. Ashan, *J. Chem. Pharm. Res.* **2010**, *2*, 309-316;

b) J. Ilaš, P. Š. Anderluh, M. S. Dolenc, D. Kikelj, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7325-7348.

<sup>176</sup> B. Achari, S. B. Mandal, P. K. Dutta, C. Chowdhury, *Synlett* **2004**, *14*, 2449-2467.

En paralelismo con la importancia de las 1,4-benzoxazinas, se han descrito un elevado número de síntesis de estos heterociclos.<sup>176,177</sup> Aquí se considerarán aquellas metodologías que hayan sido aplicadas para la preparación de sistemas 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazinas, objeto de estudio de este capítulo.

## 4.2. Síntesis Química de 1,4-Benzoxazinas

La revisión bibliográfica que se presenta a continuación se encuentra clasificada en función de la enantiodiscriminación o ausencia de la misma por la influencia que la quiralidad ejerce en las propiedades de los compuestos. De los múltiples ejemplos existentes en cuanto a aproximaciones no quirales se han seleccionado algunos considerados relevantes, mientras que se pondrá especial atención a aquellos que incluyan asimetría en la obtención de los productos finales.

### 4.2.1. Aproximaciones No Quirales

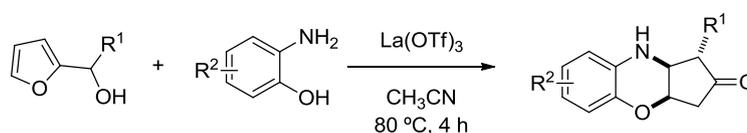
Los procesos dominó en los que se forman varios enlaces bajo unas únicas condiciones de reacción suponen una herramienta muy útil en síntesis orgánica. Esta estrategia se ha empleado recientemente por Wang y colaboradores para la síntesis de benzoxazinas por reacción entre 2-furilcarbinoles y  $\sigma$ -aminofenoles en un proceso que comprende un reagrupamiento de Piancatelli, un acoplamiento C-N y una adición de Michael (Esquema 73).<sup>178</sup> Utilizando La(OTf)<sub>3</sub> como catalizador y acetonitrilo como disolvente se aislaron una serie de derivados de *cis*-1,4-benzoxazina como únicos diastereoisómeros y con rendimientos aislados de bajos a moderados (10-82%). Por otra parte, Sekar y colaboradores han descrito la síntesis de derivados *trans*-1,4-benzoxazinas a partir de aziridinas y  $\sigma$ -clorofenoles o sus análogos bromados, en presencia del complejo Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>-(±)-BINAP como

---

<sup>177</sup> a) J. Ilaš, P. Š. Anderluh, M. S. Dolenc, D. Kikelj, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7325-7348;  
b) S. K. Singh, A. K. Bajpai, R. Saini, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 7132-7135.

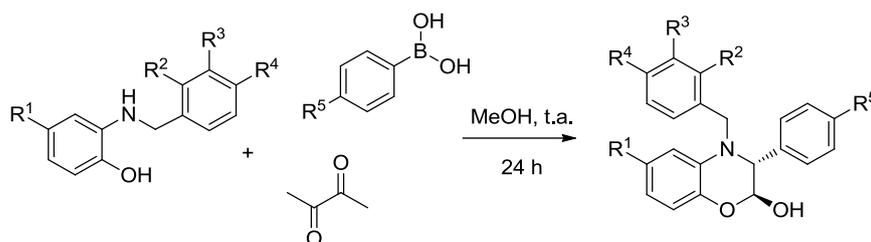
<sup>178</sup> J. Liu, Q. Shen, J. Yu, M. Zhu, J. Han, L. Wang, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 6933-6939.

catalizador y  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  como base.<sup>179</sup> La reacción transcurre a través de un proceso dominó en el que la aziridina experimenta, en primer lugar, una apertura del anillo para, posteriormente, sufrir una ciclación intramolecular mediante un acoplamiento de tipo Buchwald-Hartwig.



**Esquema 73.** Reacción dominó de síntesis de derivados de *cis*-1,4-benzoxazinas.

La reacción de Petasis entre una amina, un ácido organoborónico y un compuesto carbonílico funcionalizado en la posición  $\alpha$  también ha servido para la síntesis de 2-hidroxi-1,4-benzoxazinas. Un ejemplo reciente es el descrito por Debache y colaboradores en el que se proponen intermedios del tipo 2-(arilmetilamino)fenol como reactivos (Esquema 74).<sup>180</sup> La síntesis de las benzoxazinas finales tiene lugar con rendimientos entre moderados y buenos (38-89%).



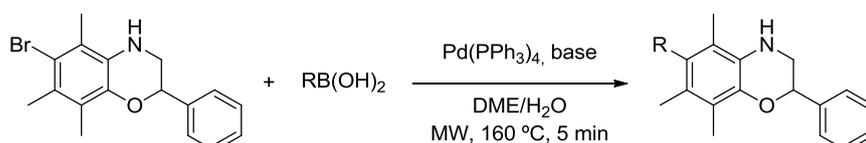
**Esquema 74.** Síntesis de 2-hidroxi-1,4-benzoxazinas por reacción de Petasis.

Algunos ejemplos interesantes parten de compuestos que son, propiamente, 1,4-benzoxazinas para generar derivados más complejos mediante la funcionalización de los mismos. Por ejemplo, la reacción de Suzuki-Miyaura, una de las transformaciones más utilizadas en química sintética, es la base del acoplamiento entre la 6-bromo-2-fenil-5,7,8-trimetil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazina y distintos ácidos

<sup>179</sup> R. K. Rao, I. Karthikeyan, G. Sekar, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 9090-9094.

<sup>180</sup> L. Chouguiat, R. Boulcina, B. Carboni, A. Demonceau, A. Debache, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 5124-5128.

borónicos que incluyen sustituyentes de toda naturaleza electrónica, ya sean neutros, deficitarios o ricos en electrones. La reacción transcurre eficientemente empleando radiación de microondas, permitiendo la incorporación en la molécula final de funcionalidades de tipo alquilo, arilo y heteroarilo con rendimientos entre moderados y altos (47-90%) (Esquema 75).<sup>181</sup>



**Esquema 75.** Acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura entre 6-bromo-2-fenil-5,7,8-trimetil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazina y distintos ácidos borónicos.

#### 4.2.2. Aproximaciones Quirales

La preparación de 1,4-benzoxazinas ópticamente activas ha recibido menor atención en comparación con la de sus homólogos aquirales. Estas aproximaciones se pueden dividir en dos grandes grupos: la reducción de iminas asimétrica o la síntesis asimétrica empleando sintones quirales.

##### 4.2.2.1. Catálisis Asimétrica

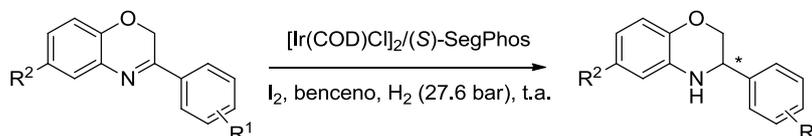
Entre las metodologías descritas para la síntesis de benzoxazinas enantioenriquecidas cabe destacar el uso de la organocatálisis en la hidrogenación asimétrica de iminas precursoras, donde el uso de ácidos fosfóricos derivados de BINOL como catalizadores y ésteres de Hantzsch o benzotiazoles como fuente de hidruro ha permitido obtener buenos valores de enantioselectividad y rendimientos aislados.<sup>182</sup> Alternativamente, la hidrogenación asimétrica de 3-fenil-2*H*-1,4-benzoxazina se llevó a cabo empleando una cadena polimérica microporosa preparada a partir de un nuevo monómero de 1,1'-

<sup>181</sup> E. N. Koini, N. Avlonitis, E. S. Martins-Duarte, W. de Souza, R. C. Vommaro, T. Calogeropoulou, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 10302-10309.

<sup>182</sup> J. G. de Vries, N. Mršić, *Catal. Sci. Technol.* **2011**, *1*, 727-735.

binaftaleno-2,2'-diil-hidrogenofosfato (BNPPA) dando lugar a una conversión completa y total enantioselectividad hacia la formación del enantiómero (*S*).<sup>183</sup> De esta manera, los autores se beneficiaron de las ventajas de la inmovilización polimérica y, lejos de experimentar pérdidas en reactividad, habituales debido a la difícil accesibilidad al centro catalítico, mejoraron los resultados previamente descritos, incrementando el exceso enantiomérico desde un 95% hasta un 99%.

Este proceso también se ha realizado en presencia del sistema catalítico Ir/difosfina/I<sub>2</sub>, que ya había demostrado ser efectivo para estructuras similares como las quinolinas.<sup>184</sup> En este caso, el ligando quiral (*S*)-SegPhos resultó ser mejor elección que el BINAP al dar lugar a excesos enantioméricos más elevados. Se redujeron un total de 15 benzoxazinas 3-aryl-sustituidas, obteniendo las respectivas aminas con excelentes rendimientos aislados (91-98%) y elevadas enantioselectividades (79-90% *ee*) independientemente de la posición y la naturaleza electrónica de los sustituyentes del anillo de benceno (Esquema 76). Asimismo, los autores aplicaron el sistema catalítico a la hidrogenación asimétrica de derivados 3-estiril-2*H*-1,4-benzoxazina, si bien fue necesaria la inclusión de un paso de hidrogenación catalizada por paladio sobre carbono a 27.6 bar para completar la reducción del enlace C=C remanente.



**Esquema 76.** Hidrogenación asimétrica de 3-aryl-2*H*-1,4-benzoxazinas.

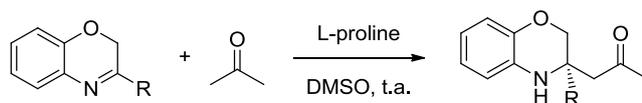
Una estrategia similar en cuanto a que está fundamentada en la reducción de 1,4-benzoxazinas es la hidrosililación enantioselectiva de enlaces C=N. Zhang y colaboradores impulsaron este proceso promovido

<sup>183</sup> D. S. Kundu, J. Schmidt, C. Bleschke, A. Thomas, S. Blechert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5456-5459.

<sup>184</sup> K. Gao, C.-B. Yu, D.-S. Wang, Y.-G. Zhou, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 483-488.

por bases quirales de Lewis como organocatalizadores aislando una serie de dihidro-2*H*-benzoxazinas con buenos rendimientos (86-98%) y enantioselectividades moderadas (18-87%).<sup>185</sup> Más recientemente, el desarrollo de un nuevo catalizador basado en la L-fenilalanina, en el que la presencia de centros quirales tanto de carbono como de azufre resultó ser determinante, transcurriendo la hidrosililación asimétrica de manera más eficiente. Así, se obtuvieron 3-aril-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazinas con rendimientos y excesos enantioméricos de moderados a excelentes (66-97% rendimiento, 70-99% *ee*).<sup>186</sup>

Dejando a un lado las reducciones, una propuesta claramente diferente es la adición de nucleófilos a enlaces C=N mediante reacciones tipo Mannich entre acetona y 2*H*-1,4-benzoxazinas sustituidas en la posición 3. La síntesis transcurre con buenos rendimientos y, en general, excelentes enantioselectividades (Esquema 77).<sup>187</sup> A pesar de que las cetiminas no activadas no son sustratos habituales en la reacción de Mannich, en este caso la tensión del anillo y la falta de libertad rotacional favorecieron la reactividad frente a nucleófilos quedando bloqueada la isomerización *E/Z* del enlace C=N.



**Esquema 77.** Reacción de Mannich asimétrica entre acetona y 2*H*-1,4-benzoxazinas 3-sustituidas empleando L-prolina.

#### 4.2.2.2. Resolución Cinética

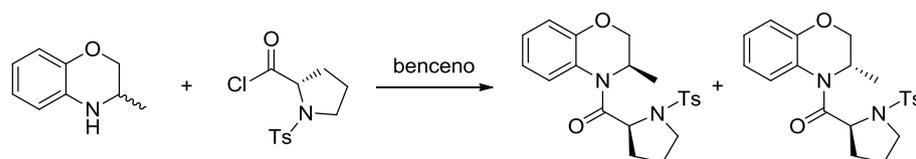
La resolución cinética de racematos también es una alternativa adecuada para acceder a 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazinas enantiopuras. La obtención de enantioselectividades razonablemente elevadas es posible, por ejemplo, con la participación de agentes de resolución

<sup>185</sup> Y. Jiang, L.-X. Liu, W.-C. Yuan, X.-M. Zhang, *Synlett* **2012**, 23, 1797-1800.

<sup>186</sup> X.-W. Liu, C. Wang, Y. Yan, Y.-Q. Wang, J. Sun, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 6276-6280.

<sup>187</sup> Y.-Q. Wang, Y. Zhang, K. Pan, J. You, J. Zhao, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, 355, 3381-3386.

quiral. Así, la ( $\pm$ )-3-metil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzo[*b*]oxazina se resolvió empleando el cloruro de *N*-tosil-(*S*)-propilo (Esquema 78).<sup>188</sup> El diastereoisómero (*R,S*) se aisló con un exceso diastereomérico del 80% cuando la relación entre la amina de partida y el agente quiral fue de 2:1. La hidrólisis en condiciones ácidas de la amida, obtenida por recristalización de la mezcla de diastereoisómeros, condujo al aislamiento del isómero (*R*) de la correspondiente amina.



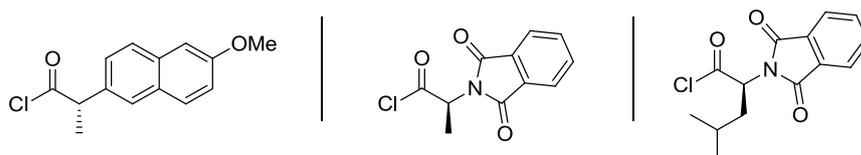
**Esquema 78.** Resolución cinética de benzoxazinas mediante agentes quirales.

Análogamente, los mismos autores se han servido de sendos cloruros de acilo ópticamente activos, como son el cloruro de (*S*)-naproxeno y el cloruro de *N*-ftaloil-(*S*)-alanilo (Figura 31), para llegar, a través de la resolución cinética de las aminas racémicas, a los diastereoisómeros de configuración (*S,S*) y, por tanto, a las (*S*)-aminas.<sup>189</sup> Dentro de este contexto, también se ha realizado un estudio comparativo de la eficiencia de las resoluciones cinéticas de la ( $\pm$ )-3-metil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzo[*b*]oxazina utilizando como agente quiral el (*S*)-naproxeno o el *N*-ftaloil-(*S*)-alanilo.<sup>190</sup> El análisis incluye la influencia del disolvente y la presencia o ausencia de aminas terciarias como bases auxiliares de los procesos, en los que pueden estar implicados varios mecanismos de acilación cada uno de ellos caracterizado por su propio patrón de diastereodiscriminación.

<sup>188</sup> 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.

<sup>189</sup> 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.

<sup>190</sup> 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.



**Figura 31.** Agentes de resolución quiral: cloruro de (*S*)-naproxeno (izquierda); cloruro de *N*-ftpaloil-(*S*)-alanilo (medio); cloruro de *N*-ftpaloil-(*S*)-leucilo (derecha).

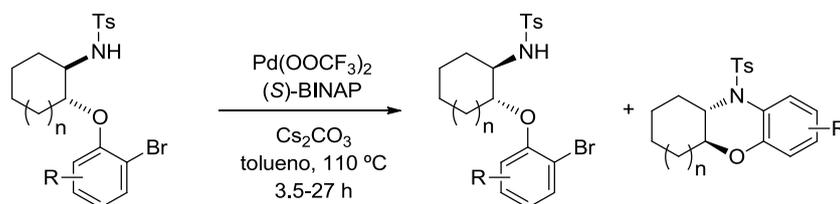
Otro aspecto relevante en estas resoluciones es el efecto que la estructura del agente de resolución ejerce en la estereoquímica de la acilación.<sup>191</sup> Se investigaron, para el mismo sustrato, una serie de derivados de cloruros de *N*-ftpaloil amino acilos y se observó una importante contribución en la estereoselectividad tanto de los factores estéricos como de las interacciones aromáticas, siendo el cloruro de *N*-ftpaloil-(*S*)-leucilo (Figura 31) el más efectivo entre los distintos agentes de resolución estudiados. Un último aspecto que se ha tenido en cuenta ha sido la influencia en la resolución cinética de los átomos de flúor de las aminas heterocíclicas.<sup>192</sup> La importancia de este elemento es tal que justamente la benzoxazina fluorada 7,8-difluoro-3,4-dihidro-3-metil-2*H*-1,4-benzo[*b*]oxazina es la precursora del agente antibiótico levofloxacino. Los autores concluyeron que la presencia de estos átomos de flúor tenía un impacto significativo en la estereoselectividad de la acilación, si bien el efecto observado fue opuesto dependiendo de si se usaba el cloruro de acilo del (*S*)-naproxeno, donde la presencia de flúor aumentó la estereoselectividad del proceso, o los cloruros de *N*-ftpaloil-(*S*)-amino acilo, en cuyo caso la acilación fue menos selectiva. Este hecho llevó a asumir que el mecanismo de reacción que da lugar a la estereoselectividad es diferente en cada caso.

También se consiguen resoluciones cinéticas mediante la reacción de acoplamiento catalizada por paladio valiéndose de la adición de un ligando quelante quiral. Esta fue la metodología empleada por Sekar y

<sup>191</sup> D. A. Gruzdev, G. L. Levit, V. P. Krasnov, *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 1640-1646.

<sup>192</sup> D. A. Gruzdev, E. N. Chulakov, G. L. Levit, M. A. Ezhikova, M. I. Kodess, V. P. Krasnov, *Tetrahedron Asymmetry* **2013**, *24*, 1240-1246.

Rao quienes, tras la optimización de parámetros de reacción tales como la fuente de paladio, el ligando, la base y el disolvente, desarrollaron el proceso que se detalla en el Esquema 79, utilizando como fuente de quiralidad el (*S*)-BINOL y el complejo Pd(OOCF<sub>3</sub>)<sub>2</sub> como catalizador.<sup>193</sup> Tanto los sustratos bromados remanentes como las benzoxazinas finales se aislaron con rendimientos y excesos enantioméricos moderados.



**Esquema 79.** Resolución cinética por acoplamiento catalizado por paladio.

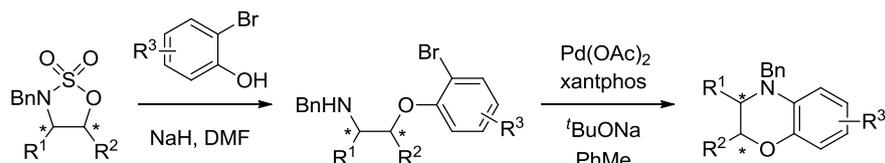
#### 4.2.3. Aproximaciones a la Síntesis Química del Levofloxacin

La síntesis de, entre otras, la benzoxazina (*S*)-7,8-difluoro-3,4-dihidro-3-metil-2*H*-1,4-benzo[*b*]oxazina, precursora del levofloxacin, se ha descrito mediante un protocolo de dos pasos a partir de una serie de sulfamidatos 1,2-cíclicos enantiopuros y 2-bromofenoles con distinta sustitución (Esquema 80).<sup>194</sup> Los intermediarios obtenidos por la apertura de los sulfamidatos con los 2-bromofenolatos nucleófilos se obtuvieron con rendimientos entre moderados y excelentes (57-100%), y la posterior ciclación en las condiciones de Buchwald-Hartwig dio lugar a las benzoxazinas con rendimientos similares (50-88%). Un intermedio muy similar se sintetizó haciendo reaccionar el 6-bromo-2,3-difluorofenol con el derivado 4-metilbenzenosulfonato de la L-alanina.<sup>195</sup> En esta ocasión, la ciclación para llegar a la benzoxazina precursora del levofloxacin se logró, previa desprotección del grupo amino, a través de catálisis con CuI en presencia de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y DMF como disolvente.

<sup>193</sup> R. K. Rao, G. Sekar, *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 948-954.

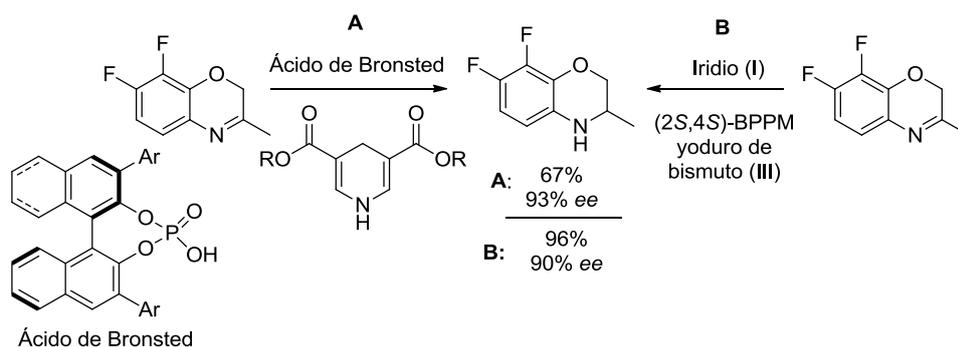
<sup>194</sup> J. F. Bower, P. Szeto, T. Gallagher, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3283-3286.

<sup>195</sup> M. K. Parai, G. Panda, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4703-4705.



**Esquema 80.** Síntesis de benzoxazinas por  $\sigma$ -alquilación seguida de ciclación.

La hidrogenación catalítica de benzoxazinas, de la que ya se ha hablado en el apartado anterior, es otra de las estrategias que ha encontrado aplicación en la síntesis de este precursor. El elemento diferenciador de los distintos ejemplos publicados al respecto es el sistema responsable de la reducción de la agrupación C=N. Por ejemplo, la organocatálisis con ácidos fosfóricos derivados del BINOL 3,3-diaril sustituidos en presencia de dihidropiridina y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como disolvente origina la benzoxazina de interés con un exceso enantiomérico aceptable del 93% y un rendimiento del 67% (Esquema 81A).<sup>196</sup> Mejores resultados en lo que al rendimiento se refiere (96% rendimiento, 90% *ee*) se obtuvieron en la hidrogenación asimétrica descrita por Kanai y colaboradores (Esquema 81B), en la que se utilizó el sistema catalítico de iridio (I), (2*S*,4*S*)-BPPM y yoduro de bismuto (III).<sup>197</sup>



**Esquema 81.** Comparación entre dos estrategias descritas para la hidrogenación catalítica de benzoxazinas con aplicación a un precursor del levofloxacin.

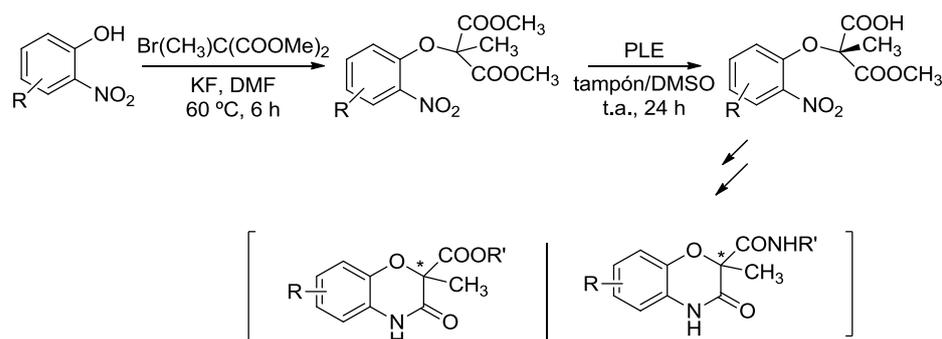
<sup>196</sup> M. Rueping, M. Stoeckel, E. Sugiono, T. Theissmann, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 6565-6568.

<sup>197</sup> K. Satoh, M. Inenaga, K. Kanai, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 2657-2662.

### 4.3. Síntesis Enzimática de 1,4-Benzoxazinas

En comparación con las estrategias químicas convencionales, el empleo de métodos enzimáticos para la preparación de 1,4-benzoxazinas ópticamente activas es ciertamente escaso, localizando en la bibliografía únicamente unos pocos ejemplos que se comentarán a continuación.

Se han sintetizado una serie de carboxilatos y ácidos carboxílicos derivados de la 2-metil-3-oxo-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazina enantiopuras a partir de precursores quirales procedentes de la hidrólisis catalizada por la esterasa de hígado de cerdo (*pig liver esterase*, PLE) de los correspondientes dimetil malonatos (Esquema 82).<sup>198</sup> El paso enzimático consistió en un sistema tampón de fosfatos (pH 7)/DMSO en proporción 8:2 v/v, obteniendo los correspondientes (*R*)-malonatos con excesos enantioméricos de moderados a buenos (73-88%). Una serie de transformaciones químicas posteriores permitieron el aislamiento de ambos enantiómeros de los derivados de benzoxazina tanto en forma de ácidos carboxílicos como de carboxamidas.

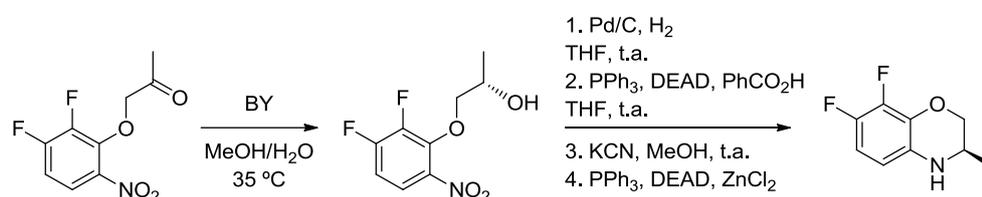


**Esquema 82.** Hidrólisis catalizada por la PLE de dimetil 2-metil-2-(2-nitrofenoxi)malonatos y aplicación a la síntesis de benzoxazinas.

Por su parte, tan solo dos enzimas han resultado eficaces en la preparación selectiva del levofloxacino. El primer ejemplo se remonta a finales del pasado siglo y en él se describe la biorreducción con levadura

<sup>198</sup> M. Breznik, V. Hrast, A. Mrcina, D. Kikelj, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 153-167.

de panadería (*Baker's yeast*, BY) de una nitroacetona proquiral al correspondiente nitroalcohol a partir del cual sintetizan la benzoxazina de interés tras una serie de transformaciones químicas (Esquema 83).<sup>199</sup> Entre ellas, cabe destacar el estudio realizado en el último paso de ciclación en el que se intentan minimizar las mezclas de productos.



**Esquema 83.** Síntesis quimioenzimática del levofloxacino empleando oxidorreductasas.

Posteriormente, la PLE se ha utilizado en procesos hidrolíticos en los que la formación del levofloxacino tuvo lugar con excesos enantioméricos moderados a partir de los ésteres de butilo del ofloxacino.<sup>200</sup> En ambos trabajos los autores basaron la eficiencia de la hidrólisis en el desarrollo de técnicas de inmovilización enzimática empleando distintas estrategias que incluyen geles de poliacrilamida como el alginato de calcio con el propósito de optimizar la reutilización de la esterasa.

<sup>199</sup> S. B. Kang, E. J. Ahn, Y. Kim, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 9317-9320.

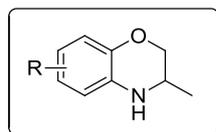
<sup>200</sup> a) S.-Y. Lee, B.-H. Min, S.-H. Hwang, Y.-M. Koo, C.-K. Lee, S.-W. Song, S.-Y. Oh, S.-M. Lim, S.-L. Kim, D.-I. Kim, *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 1033-1037; b) S.-Y. Lee, B.-H. Min, S.-W. Song, S.-Y. Oh, S.-M. Lim, S.-L. Kim, D.-I. Kim, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2001**, *6*, 179-182.

## **OBJETIVOS**

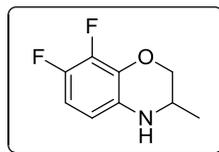


Habiendo quedado patente la importancia estructural de las 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazinas, así como los múltiples esfuerzos que la comunidad investigadora ha realizado para el diseño de rutas eficientes y, cada vez más, respetuosas con el medio ambiente, se plantearon los siguientes objetivos:

- Desarrollar un proceso sintético que permita la obtención de benzoxazinas enantioenriquecidas valiéndose de la versatilidad de las enzimas.
- Estudiar la resolución cinética de benzoxazinas o precursores empleando lipasas.



- Estudiar procesos complementarios que sean catalizados por otro tipo de enzimas, como alcohol deshidrogenasas o transaminasas.
- Extender la metodología optimizada a distintas benzoxazinas variando la sustitución en el anillo aromático.
- Aplicar el proceso a la síntesis de un precursor del levofloxacin, conocido antibiótico de amplio espectro.





## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



#### 4. 4. Resolución Cinética Enzimática de Benzoxazinas

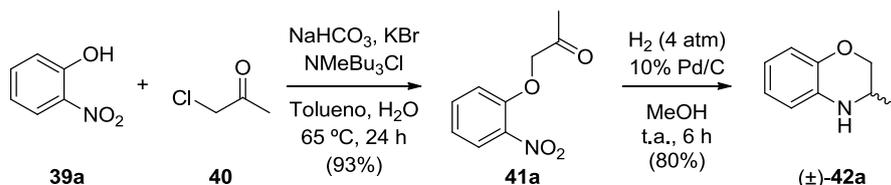
Considerando la escasez de ejemplos publicados en los que se aplica la Biocatálisis para la obtención de derivados de benzoxazina ópticamente enriquecidos, se optó por explorar nuevas rutas asimétricas para lo cual se seleccionó la 3-metil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzo[*b*]oxazina como sustrato modelo. En un primer momento, se planteó la opción de llevar a cabo su resolución cinética empleando lipasas debido a los resultados previos obtenidos en la resolución de indolinas<sup>201</sup> y los múltiples ejemplos de resolución de aminas secundarias cíclicas en los que las lipasas han actuado con buenos niveles de actividad y estereoselectividad.<sup>139,202</sup> Con esta finalidad, se sintetizó el racemato a través de la  $\sigma$ -alquilación del 2-nitrofenol (**39a**), haciéndolo reaccionar con la cloroacetona (**40**) para obtener la nitroacetona intermedia **41a** (Esquema 84). Ésta se sometió a una secuencia de hidrogenación-ciclación intramolecular catalizada por paladio para aislar, finalmente, la benzoxazina ( $\pm$ )-**42a** con un rendimiento global del 75%.

Seguidamente, se examinó el papel de una serie de lipasas en la alcoxicarbonilación de **42a**, entre las que se encuentran las lipasas CAL-A, CAL-B, PPL, CRL y la lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre distintos soportes (PSL-IM y PSL-SD). Ninguna de ellas mostró, sin embargo, actividad significativa al utilizar el carbonato de dialilo o el carbonato de alilo y 3-metoxifenilo en TBME como disolvente a 30 °C y 250 rpm.

---

<sup>201</sup> M. López-Iglesias, E. Busto, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 8049-8055

<sup>202</sup> a) G. F. Breen, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1427-1430; b) M. Stirling, J. Blacker, M. I. Page, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1247-1250.



**Esquema 84.** Síntesis de la benzoxazina racémica **42a** para el estudio de su resolución cinética.

La nula reactividad observada motivó un planteamiento alternativo para el cual se aprovechó la síntesis descrita en el Esquema 84 y, en particular, la presencia en la ruta de la nitroacetona **41a**. A partir de este intermedio se diseñaron tres estrategias independientes:

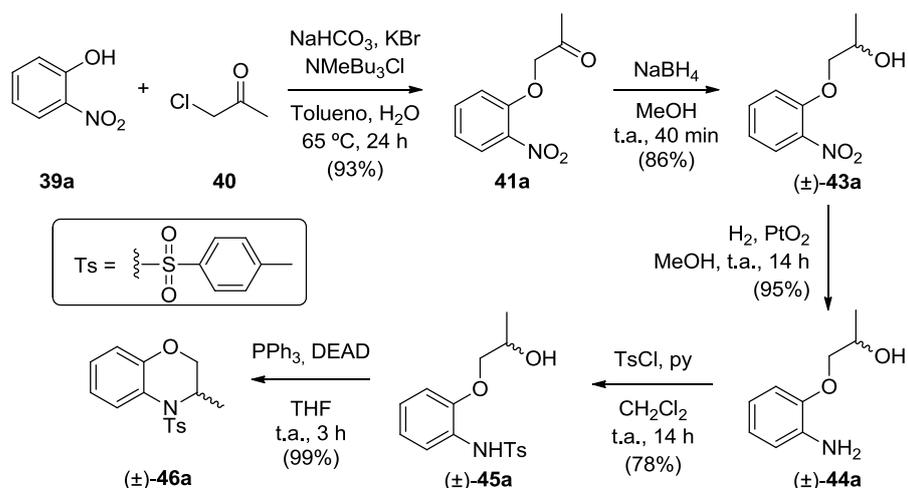
- a) La resolución cinética catalizada por lipasas a través de un proceso de acilación del alcohol racémico **43a** obtenido por reducción no selectiva de la cetona **41a**.
- b) El proceso complementario de hidrólisis catalizado por lipasas del acetato racémico **47a** obtenido por acilación química del alcohol **43a**.
- c) La biorreducción selectiva empleando alcohol deshidrogenasas de la cetona proquiral **41a**.

A continuación, se discutirá cada una de estas aproximaciones, comenzando con una primera optimización para el sustrato modelo y extendiendo la metodología a otras benzoxazinas con distinta sustitución en el anillo aromático.

#### 4.5. Resolución Cinética Enzimática de los Alcoholes Precursores de Benzoxazinas

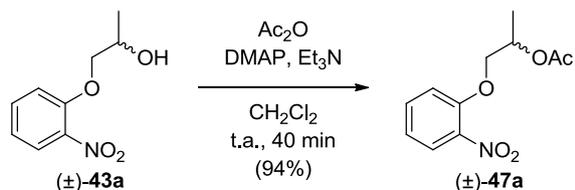
Atendiendo a la necesidad de generar una ruta sintética donde el alcohol racémico **43a** participe como intermedio, se puso a punto la secuencia detallada en el Esquema 85 para el sustrato modelo. La benzoxazina racémica protegida **46a** se sintetizó en 4 pasos de reacción a partir de la nitroacetona **41a**. El primer paso de la síntesis fue, precisamente, la obtención del nitroalcohol **43a** por reducción de la

cetona **41a** con borohidruro de sodio, que transcurrió con buen rendimiento (86%), para seguidamente reducir el grupo nitro mediante una hidrogenación catalizada por paladio (95% rendimiento). El aminoalcohol **44a** se protegió empleando cloruro de tosilato (cloruro de *p*-toluenosulfonilo) y, finalmente, el aminoalcohol resultante **45a** se sometió a las condiciones de Mistunobu obteniendo la benzoxazina tosilada **46a** de forma cuantitativa. En este punto, cabe señalar que la protección fue necesaria para evitar la formación de mezclas de productos que se originan al llevar a cabo la ciclación a partir del amino libre o al emplear catalizadores alternativos como  $\text{ZnCl}_2$ .<sup>199</sup>



**Esquema 85.** Síntesis química de la benzoxazina racémica protegida **46a**.

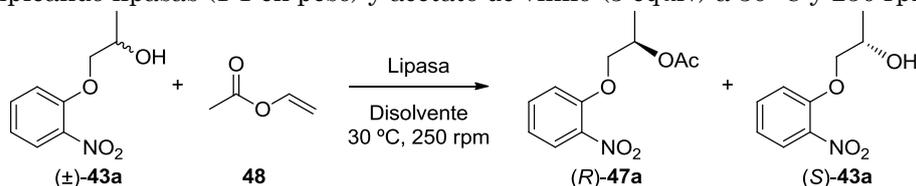
Previamente al estudio de la acilación enzimática, se sintetizó el compuesto acilado **47a** en forma racémica por tratamiento del alcohol **43a** con anhídrido acético en presencia de DMAP y trietilamina durante 40 min a temperatura ambiente (Esquema 86).



**Esquema 86.** Síntesis química del acetato racémico **47a**.

A continuación, se consideraron una serie de lipasas como posibles biocatalizadores para la resolución cinética (Tabla 22). Inicialmente, el esquema de reacción consistió en añadir 3 equivalentes de acetato de vinilo como agente acilante a la mezcla de **43a** y lipasa en TBME a 30 °C y 250 rpm y para la medida de los excesos enantioméricos se diseñó una metodología analítica mediante HPLC.

**Tabla 22.** Optimización de las condiciones de resolución cinética de **43a** empleando lipasas (1:1 en peso) y acetato de vinilo (3 equiv) a 30 °C y 250 rpm.



Entrada	Lipasa	Disolvente	t (h)	$ee_p$ (%) <sup>b</sup>	$ee_s$ (%) <sup>b</sup>	$c$ (%) <sup>c</sup>	$E^d$
1	--	TBME	5	--	<1	<1	n.d.
2	RML-IM	TBME	2	96	63	40	104
3	RML-IM	TBME	5	94 (45)	89 (44)	48	103
4	CAL-A	TBME	2.5	69	22	76	3
5	CAL-B	TBME	2	<1	--	>99	n.d.
6	PSL-C I	TBME	3	13	>99	88	6
7	RML-IM <sup>a</sup>	TBME	51.5	95	86	48	108
8	RML-IM	Tolueno	29.5	97	92	49	188
9	RML-IM	1,4-Dioxano	22.5	98	20	17	96
10	RML-IM	MeCN	22.5	>99	2	2	>200
11	RML-IM	THF	22.5	97	11	10	72
12	RML-IM	Et <sub>2</sub> O	20	97	82	46	164

<sup>a</sup> Relación enzima:sustrato 1:4 en peso.

<sup>b</sup> Determinado por HPLC. Se indican entre paréntesis los rendimientos aislados.

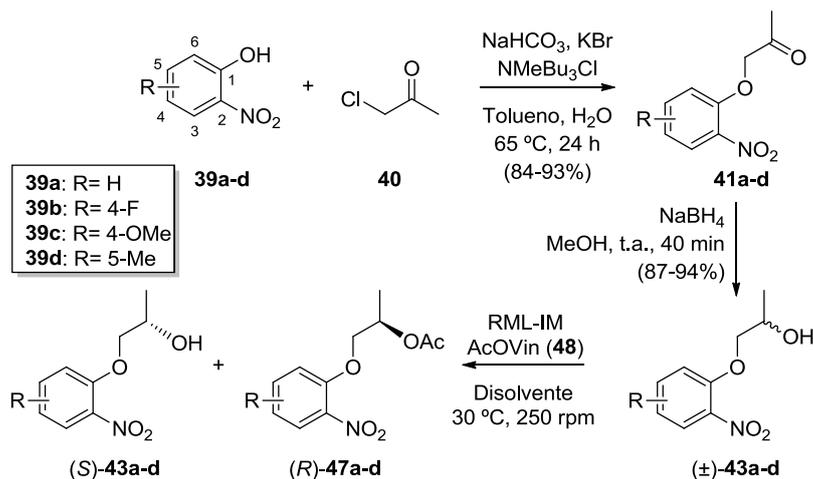
<sup>c</sup>  $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$

<sup>d</sup>  $E = \ln[(1-\varphi)(1-ee_p)] / \ln[(1-\varphi)(1+ee_p)]$

Mientras que en ausencia de enzima no se observó la formación de producto (entrada 1), las lipasas CAL-A, CAL-B y PSL-C I mostraron un exceso de reactividad dando lugar a conversiones elevadas e incluso completas en poco tiempo de reacción y, en consecuencia, enantioselectividades pobres o nulas (entradas 4-6). El mejor compromiso entre conversión y excesos enantioméricos se dio con la lipasa de *Rhizomucor miehei* en forma inmovilizada (RML-IM), que permitió aislar, tras 5 h de reacción, el acetato (*R*)-**47a** con un 94% *ee* y el alcohol remanente (*S*)-**43a** con un 89% *ee*, ambos con buenos rendimientos teniendo en cuenta el máximo posible del 50% (entrada 3). Una reducción sustancial de la carga de enzima alargó el tiempo de reacción, pero sin un efecto significativo en la enantioselectividad (entrada 7). Por último, de entre los distintos disolventes probados los mejores resultados se consiguieron con TBME y tolueno (entradas 3 y 8, respectivamente), alcanzándose conversiones cercanas al 50% con mayor velocidad en el caso del TBME, mientras que los excesos enantioméricos fueron más elevados al utilizar tolueno.

#### **4.5.1. Extensión a Otros Sustratos**

El proceso de resolución cinética optimizado se extendió a una serie de nitroalcoholes representativos con distinto patrón de sustitución en el anillo aromático, que se sintetizaron con buenos rendimientos a partir de los correspondientes fenoles siguiendo el procedimiento aplicado previamente al sustrato modelo (Esquema 87). La reacción enzimática transcurrió a 30 °C y 250 rpm, utilizando 3 equivalentes de acetato de vinilo y RML-IM como biocatalizador en una proporción enzima:sustrato 1:1 en peso.



**Esquema 87.** Síntesis y resolución cinética con lipasas de los alcoholes (±)-**43a-d**.

Como disolventes se contemplaron tanto TBME como tolueno, observándose la misma tendencia mostrada por el alcohol **43a** (Tabla 23). Así, los mejores valores de conversión se consiguieron en TBME (entradas 1, 3, 5 y 7) en tiempos de reacción cortos, mientras que la enantioselectividad fue considerablemente superior cuando el disolvente utilizado fue tolueno (entradas 2, 4, 6 y 8). A pesar de la importancia de este parámetro, la menor reactividad en tolueno, especialmente en el caso de los derivados fluorado y metilado (entradas 4 y 8), fue suficiente para considerar el TBME como el disolvente más adecuado, en el que se aislaron producto y sustrato remanente con rendimientos elevados (44-48% rendimiento para una conversión máxima del 50%), así como buenos excesos enantioméricos (89-95% *ee*).

**Tabla 23.** Resolución cinética de los derivados **43a-d** empleando la RML-IM (1:1 en peso) y acetato de vinilo (3 equiv) en TBME y tolueno a 30 °C y 250 rpm.

Entrada	R	Disolvente	t (h)	ee <sub>p</sub> (%) <sup>a</sup>	ee <sub>s</sub> (%) <sup>a</sup>	c (%) <sup>b</sup>	E <sup>c</sup>
1	<b>43a</b> (H)	TBME	5	94 (45)	89 (44)	48	103
2	<b>43a</b> (H)	Tolueno	29.5	97	92	49	188
3	<b>43b</b> (4-F)	TBME	5	95 (47)	91 (48)	49	117
4	<b>43b</b> (4-F)	Tolueno	20	99	37	27	>200
5	<b>43c</b> (4-OMe)	TBME	5	94 (47)	93 (48)	50	102
6	<b>43c</b> (4-OMe)	Tolueno	20	>99	73	42	>200
7	<b>43d</b> (5-Me)	TBME	7	93 (46)	94 (48)	50	103
8	<b>43d</b> (5-Me)	Tolueno	20	>99	45	31	>200

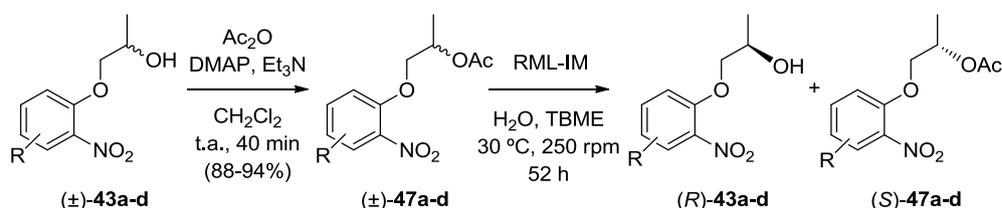
<sup>a</sup> Determinado por HPLC. Se indican entre paréntesis los rendimientos aislados.

<sup>b</sup>  $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$

<sup>c</sup>  $E = \ln[(1-c)(1-ee_p)] / \ln[(1-c)(1+ee_p)]$

#### 4.6. Hidrólisis Enzimática de Acetilos para la Obtención de Alcoholes Precursores de Benzoxazinas

Paralelamente, se estudió la hidrólisis de los acetatos racémicos **47a-d** (Esquema 88). Las condiciones iniciales de reacción se extrapolaron de aquellas previamente optimizadas para la acilación enzimática, con la expectativa de obtener resultados similares por tratarse de procesos complementarios. Así pues, la lipasa RML-IM fue utilizada como biocatalizador y TBME como disolvente a 30 °C y 250 rpm.

**Esquema 88.** Síntesis y resolución mediante hidrólisis enzimática de los acetatos racémicos **47a-d** catalizada por la RML-IM.

La cantidad de agua necesaria para la hidrólisis de ésteres es un parámetro decisivo que ejerce gran influencia en la actividad

enzimática, motivo por el cual se estudió para el sustrato modelo **47a** sin sustitución en el anillo aromático (Tabla 24). Todas las pruebas transcurrieron con excelente enantioselectividad, superior en todos los casos a la observada para la acilación, obteniéndose de manera complementaria el (*R*)-alcohol y (*S*)-acetato. La cinética de la reacción se vió ampliamente influenciada por la cantidad de agua añadida, siendo la conversión cercana al 50% cuando se utilizaron 5 equivalentes (entrada 1) y disminuyendo progresivamente con el incremento del agua hasta un 21% de conversión con 20 equivalentes (entrada 3). Tanto la enantioselectividad como la conversión se mantuvieron en niveles excelentes al extender el proceso a los demás sustratos con la adición de 5 equivalentes de agua (entradas 4-6).

**Tabla 24.** Hidrólisis enzimática de los derivados **47a-d** catalizada por la RML-IM en TBME a 30 °C y 250 rpm durante 52 h.

Entrada	R	H <sub>2</sub> O (equiv)	<i>ee<sub>p</sub></i> (%) <sup>a</sup>	<i>ee<sub>s</sub></i> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>
1	<b>47a</b> (H)	5	98 (44)	92 (41)	48	>200
2	<b>47a</b> (H)	10	99	53	35	>200
3	<b>47a</b> (H)	20	>99	27	21	>200
4	<b>47b</b> (4-F)	5	96 (44)	97 (48)	50	>200
5	<b>47c</b> (4-OMe)	5	>99 (46)	91 (47)	48	>200
6	<b>47d</b> (5-Me)	5	>99 (47)	94 (48)	49	>200

<sup>a</sup> Determinado por HPLC. Se indican entre paréntesis los rendimientos aislados.

<sup>b</sup>  $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$

<sup>c</sup>  $E = \ln[(1-\rho)(1-ee_p)] / \ln[(1-\rho)(1+ee_p)]$

## 4.7. Biorreducción

Si bien el proceso de hidrólisis enzimática transcurrió con buenos resultados, la limitación inherente de alcanzar conversiones máximas del 50% llevó a sopesar una ruta alternativa que posibilitase la obtención de los productos finales en forma enantiopura con rendimientos teóricos del 100%. La biorreducción surgió así como la opción más plausible que, además, permitiría el acceso a ambos

enantiómeros en el caso de disponer de oxidorreductasas eficientes con estereopreferencias opuestas.

#### 4.7.1. Optimización

Con la idea de desarrollar rutas eficientes para las dos antípodas del alcohol **43a**, se estudió el proceso de biorreducción de la cetona proquiral **41a** empleando alcohol deshidrogenasas de preferencia Prelog y anti-Prelog<sup>100</sup> en una disolución reguladora del hidrocloreuro de tris(hidroximetil)aminometano (Tris·HCl) 50 mM pH 7.5 (Esquema 89).



**Esquema 89.** Biorreducción de la cetona **41a** empleando alcohol deshidrogenasas.

Entre las distintas alcohol deshidrogenasas de preferencia Prelog disponibles, la ADH-A de *Rhodococcus ruber* (ADH-A) resultó ser el catalizador más eficiente lográndose una conversión completa con total enantioselectividad hacia la formación del (*S*)-alcohol (Tabla 25, entrada 1). Por su parte, la ADH de *Candida parapsilosis* (ADH-CP) catalizó el proceso en muy baja extensión (entrada 2), mientras que la levadura de panadería (BY) proporcionó excesos enantioméricos moderados (entrada 3). El alcohol de configuración absoluta (*R*) se obtuvo con conversiones cuantitativas tanto empleando la ADH de *Lactobacillus kefir* (ADH-LK) como la evo-1.1.200, no obstante con esta última se logra una enantioselectividad superior (entradas 4 y 6, respectivamente). Por último, la ADH de *Lactobacillus brevis* también condujo al alcohol enantiopuro, aunque la reducción de la cetona no fue completa (entrada 5).

**Tabla 25.** Síntesis estereoselectiva del alcohol **43a** por biorreducción de la nitroacetona **41a** en un tampón Tris·HCl 50 mM pH 7.5 a 30 °C tras 24 h.

Entrada	Enzima	Cofactor	Regeneración	<i>c</i> (%) <sup>a</sup>	<i>ee</i> (%) <sup>a</sup>
1	ADH-A	NADH	Isopropanol	>99	>99 ( <i>S</i> )
2	ADH-CP	NADH	Isopropanol	8	99 ( <i>S</i> )
3	BY	--	Glucosa	>99	86 ( <i>S</i> )
4	ADH-LK	NADPH	G6P/G6PDH	>99	96 ( <i>R</i> )
5	ADH-LB	NADPH	Isopropanol	91	>99 ( <i>R</i> )
6	evo-1.1.200	NADH	Isopropanol	>99	>99 ( <i>R</i> )

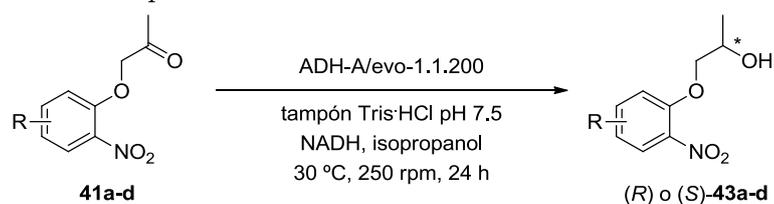
<sup>a</sup> Determinado por HPLC. Conversiones no completas determinadas por <sup>1</sup>H-RMN.

El escalado de la reacción para las oxidorreductasas ADH-A y evo-1.1.200, seleccionadas como mejores biocatalizadores de la etapa de biorreducción, facilitó el aislamiento de los alcoholes enantiopuros (*S*)-**43a** y (*R*)-**43a** con rendimientos aislados del 85% y 99%, respectivamente, después de una simple extracción del crudo de reacción. En el caso de la ADH-A es importante resaltar que, lejos de realizar un escalado lineal de las condiciones en pequeña escala (15 mg células para 0.012 mmol de sustrato), la cantidad de enzima se redujo hasta el mínimo posible, siendo la relación enzima:sustrato final de 1:20 en peso para una conversión completa en 24 h.

#### 4.7.2. Extensión a Otros Sustratos

La biorreducción se extendió al resto de cetonas proquirales **41b-d** con ambas enzimas, alcanzando conversión completa tras 24 h en todos los casos y con una enantioselectividad excelente (Tabla 26). Por una parte, la ADH-A permitió aislar a los alcoholes (*S*)-**43b-d** enantiopuros con muy buenos rendimientos (88-93%, entradas 1, 3, 5 y 7) y, por otra, los alcoholes (*R*)-**43b-d** enantiopuros se obtuvieron con rendimientos entre 78-88% al emplear la evo-1.1.200 (entradas 2, 4, 6 y 8). De esta manera, se considera alcanzado el objetivo con el que se comenzó este apartado, habiéndose superado la limitación de las transformaciones catalizadas por lipasas y, por tanto, mejorado notablemente los rendimientos finales.

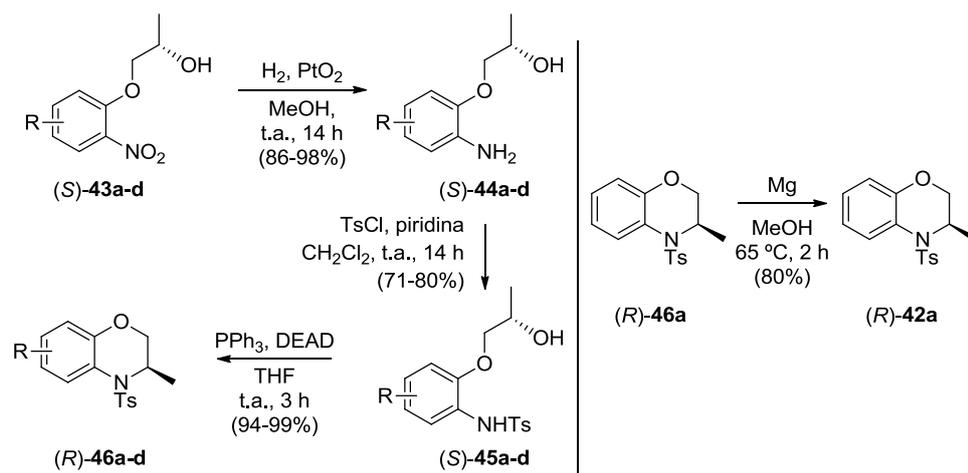
**Tabla 26.** Biorreducción de las nitroacetonas **41a-d** en tampón Tris·HCl pH 7.5 tras 24 h a 30 °C empleando ADH-A o evo-1.1.200 como biocatalizadores.



Entrada	R	Enzima	c (%) <sup>a</sup>	ee (%) <sup>a</sup>
1	<b>41a</b> (H)	ADH-A	>99 (85)	>99 (S)
2	<b>41a</b> (H)	evo-1.1.200	>99 (99)	>99 (R)
3	<b>41b</b> (4-F)	ADH-A	>99 (89)	>99 (S)
4	<b>41b</b> (4-F)	evo-1.1.200	>99 (87)	>99 (R)
5	<b>41c</b> (4-OMe)	ADH-A	>99 (88)	>99 (S)
6	<b>41c</b> (4-OMe)	evo-1.1.200	>99 (88)	>99 (R)
7	<b>41d</b> (5-Me)	ADH-A	>99 (93)	>99 (S)
8	<b>41d</b> (5-Me)	evo-1.1.200	>99 (78)	>99 (R)

<sup>a</sup> Determinado por HPLC. Se indica entre paréntesis el rendimiento aislado.

Siguiendo la ruta descrita para el sustrato modelo en el Esquema 85, las benzoxazinas tosiladas (*R*)-**46a-d** se sintetizaron en forma enantiopura en tan solo tres pasos de reacción a partir de los correspondientes nitroalcoholes (*S*)-**43a-d** obtenidos en la biorreducción catalizada por la ADH-A (Esquema 90).



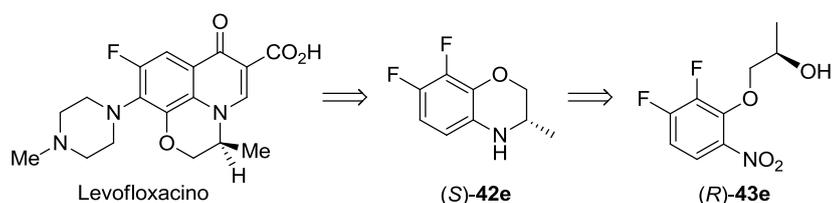
**Esquema 90.** Síntesis de las benzoxazinas (*R*)-**46a-d** enantiopuras a partir de los correspondientes nitroalcoholes enantiopuros (*S*)-**43a-d**. Desprotección de la benzoxazina (*R*)-**46a**.

La pureza óptica de los compuestos se mantuvo constante a lo largo de todo el proceso, aislándose las benzoxazinas tosiladas de configuración (*R*) en forma enantiopura tras la hidrogenación del grupo nitro, la tosilación de la correspondiente amina y la ciclación intramolecular con inversión de la configuración en las condiciones de Mitsunobu. A modo de ejemplo, la benzoxazina activada (*R*)-**46a** se desprotegió empleando magnesio a reflujo de metanol, lo que condujo a la (*R*)-3-metil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzo[*b*]oxazina (**42a**) con un 80% de rendimiento tras 2 h de reacción (Esquema 90).

#### 4.8. Aplicación al Precursor del Levofloxacino

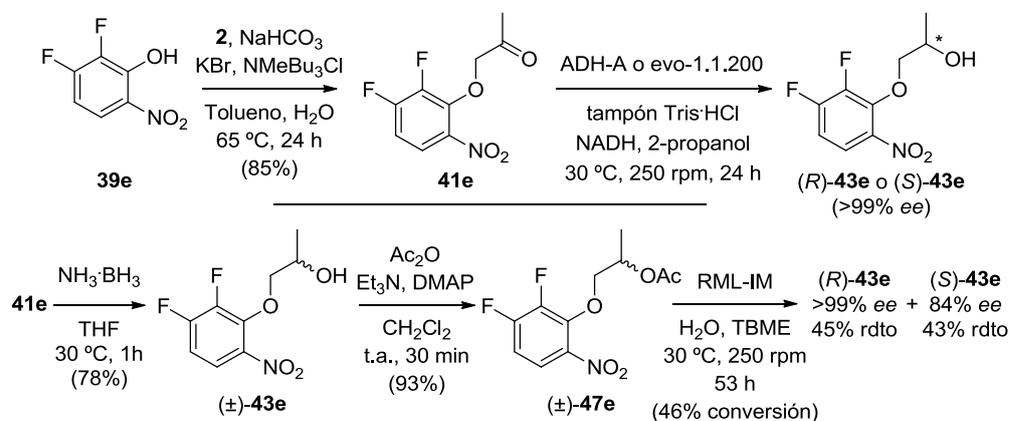
Una vez que se ha desarrollado una metodología quimioenzimática robusta de eficacia contrastada para una serie de derivados de benzoxazina estructuralmente representativos, se decidió estudiar su aplicabilidad en la preparación selectiva de la (*S*)-7,8-difluoro-3-metil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzo[*b*]oxacina (*S*)-**42e**, precursor del levofloxacino. A su vez, el alcohol (*R*)-**43e** es precursor de la benzoxazina (*S*)-**42e** al

reproducir las estrategias sintéticas descritas hasta el momento en este capítulo (Esquema 91).



**Esquema 91.** Análisis retrosintético del levofloxacin hacia el precursor (*R*)-43e.

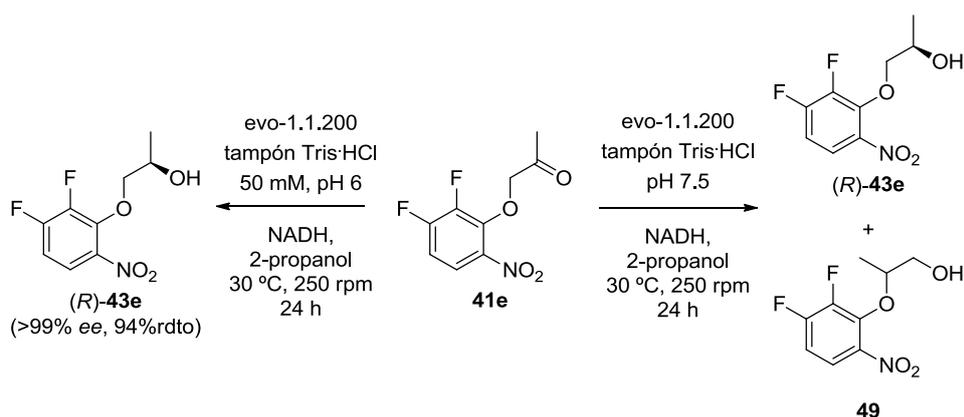
Las dos aproximaciones quimioenzimáticas que permiten el acceso a ese enantiómero en particular son, por una parte, la hidrólisis del acetato racémico **47e** a través de lipasas y, por otra, la biorreducción de la cetona proquiral **41e** mediante oxidorreductasas (Esquema 92).



**Esquema 92.** Alternativas sintéticas quimioenzimáticas para la preparación del alcohol enantiopuro (*R*)-43e.

La ruta sintética se desarrolló con buenos rendimientos a partir de la  $\sigma$ -alquilación del nitrofenol **39e** disponible comercialmente, de forma análoga a la descrita para los demás sustratos. La cetona **41e** obtenida se redujo selectivamente en presencia de ADH-A, aislándose el nitroalcohol (*S*)-43e enantiopuro tras 24 horas de reacción en una reguladora Tris·HCl 50 mM pH 7.5 con un rendimiento del 91%. Por su parte, la preparación del enantiómero homólogo (*R*)-43e, objeto de interés por dar acceso a la benzoxazina (*S*)-42e, se logró utilizando la

evo-1.1.200 como biocatalizador y, si bien el proceso transcurrió con completa estereoselectividad, se detectó la aparición indeseada de cantidades apreciables del isómero estructural 2-(2,3-difluoro-6-nitrofenoxi)propan-1-ol (**49**) en las condiciones de reacción (Esquema 93). La formación de este producto secundario se minimizó con éxito variando el pH de la biorreducción, llegando a eliminarse por completo a pH 6, lo que hizo posible el aislamiento del alcohol (*R*)-**43e** enantiopuro y con un excelente rendimiento del 94%.

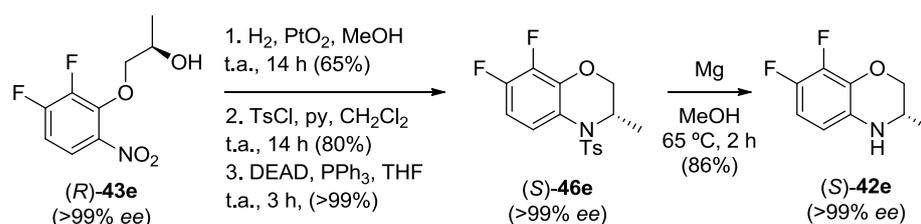


**Esquema 93.** Preparación del nitroalcohol (*R*)-**43e** por biorreducción de la cetona **41e**. Variación de la relación de productos **43e** y **49** a distintos pHs.

Adicionalmente, el proceso de hidrólisis, que también da acceso al (*R*)-alcohol de interés, se efectuó con la lipasa RML-IM como biocatalizador y 5 equivalentes de agua en TBME a 30 °C. Es importante señalar que la síntesis del alcohol racémico ( $\pm$ )-**43e** a partir del cual se obtuvo el acetato necesario para la hidrólisis enzimática, se vio condicionada nuevamente por la formación del isómero **49** (proporción 61:39), que se suprimió en este caso variando ligeramente la reducción no selectiva de la cetona **41e** con el complejo  $\text{NH}_3\text{-BH}_3$ , medida que evitó tanto el medio básico de la reacción como el tratamiento básico de la misma (Esquema 92). Solventado este problema, la acilación química dio lugar al acetato racémico ( $\pm$ )-**47e**, y la subsiguiente hidrólisis enzimática a la formación, tras 53 horas de

reacción, del acetato (*S*)-**47e** con un 84% *ee* y del alcohol deseado (*R*)-**43e** en forma enantiopura.

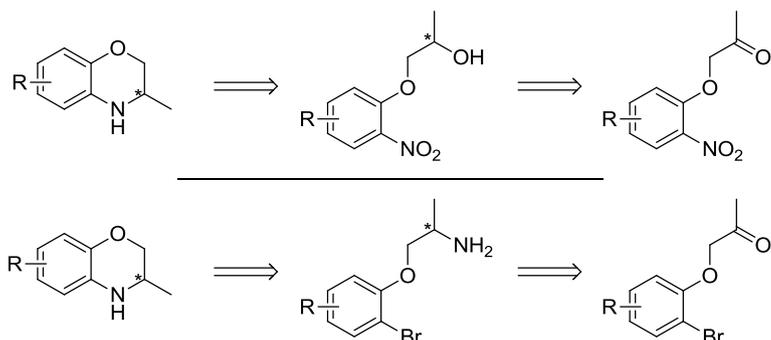
Por último, se aplicó la secuencia de cuatro pasos de reacción ya descrita con anterioridad y que conduce a la correspondiente benzoxazina (*S*)-**42e** (Esquema 94). La reducción del grupo nitro, la protección del grupo amino, la ciclación en las condiciones de Mitsunobu y la desprotección final del *N*-tosilo transcurrieron sin racemización alguna, aislándose finalmente el precursor del Levofloxacino (*S*)-**42e** en forma enantiopura y con buen rendimiento global (36%).



**Esquema 94.** Síntesis de la benzoxazina (*S*)-**42e** precursora del Levofloxacino, a partir del correspondiente alcohol (*R*)-**43e**.

#### 4.9. Nueva Aproximación Empleando Transaminasas

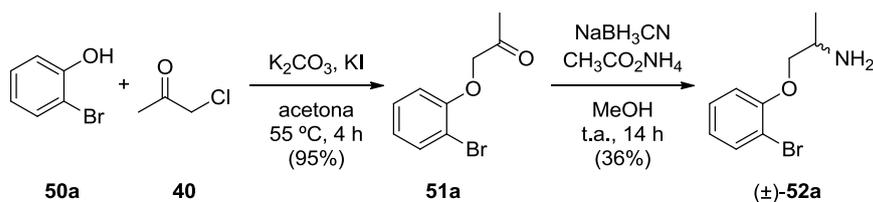
Un cambio de enfoque en lo que respecta al paso enzimático de la ruta sintética generó un nuevo análisis retrosintético de las 3,4-dihidro-2*H*-benzo-*[b]*-oxazinas. Éste involucra intermedios de índole diferente, aunque estructuralmente similares a los que se han venido mostrando a lo largo del capítulo (Esquema 95). Así, en lugar de los alcoholes que intervenían tanto en la biorreducción como en la resolución a través de lipasas, en la nueva aproximación el intermedio quiral es una amina. Esto implica, por una parte, la transformación selectiva que debe proporcionar esta amina y que pasa por introducir unas enzimas nuevas como son las transaminasas y, por otra, una nueva metodología de ciclación para la formación de las benzoxazinas finales, que en este caso requerirá la presencia de un halógeno en la estructura.



**Esquema 95.** Análisis retrosintético involucrando distintos intermedios para la síntesis asimétrica de 3,4-dihidro-2*H*-benzoxazinas.

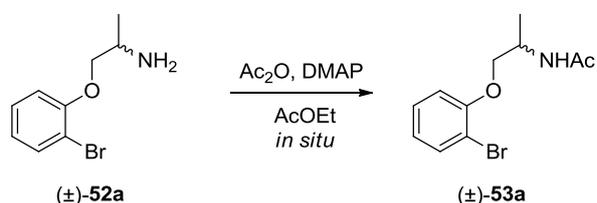
#### 4.9.1. Optimización

La obtención del nuevo intermedio se llevó a cabo, primeramente, en forma racémica para el sustrato modelo sin sustitución en el anillo. Para ello, se partió del correspondiente bromofenol **50a** cuya reacción con la cloroacetona **40** condujo a la cetona **51a** con muy buen rendimiento, en unas condiciones de reacción ligeramente distintas a las empleadas para las nitroacetonas facilitando el trabajo de la reacción al utilizar ahora un reflujo de acetona y  $K_2CO_3$  como base (Esquema 96). La amina racémica **52a** se obtuvo con un 36% de rendimiento por aminación reductiva de la cetona **51a** por tratamiento con cianoborohidruro de sodio y acetato de amonio en metanol anhidro y sirvió como referencia para el desarrollo de métodos analíticos adecuados para el seguimiento de la reacción de transaminación enzimática.



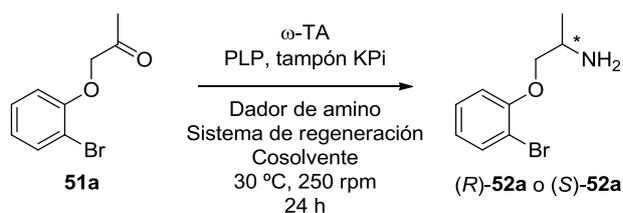
**Esquema 96.** Síntesis química de la bromoamina racémica **52a** a partir del bromofenol **50a**.

Se intentó sin éxito establecer una metodología adecuada para la medida por CG del exceso enantiomérico de la amina **52a**, por lo que se derivatizó *in situ*, formándose en el medio de reacción la acetamida **53a** (Esquema 97).



**Esquema 97.** Preparación de la bromo acetamida racémica **53a** como referencia para la medida de los excesos enantioméricos.

La formación de la bromoamina **52a** a través de un proceso de transaminación se estudió en profundidad evaluando como biocatalizadores tanto  $\omega$ -transaminasas ( $\omega$ -TAs) adquiridas comercialmente como otras que fueron cedidas por el profesor Wolfgang Kroutil de la Universidad de Graz y que han sido utilizadas como células enteras (Esquema 98).



**Esquema 98.** Síntesis selectiva de las aminas **52a** por reacción de transaminación de **51a**.

Las reacciones enzimáticas se realizaron en tampón de fosfatos 100 mM pH 7.5 a 30 °C y 250 rpm durante 24 h, siendo el dador de amino isopropilamina o alanina en función de cada enzima. En el caso de emplear alanina, se añadió la D- o L-alanina dependiendo de la estereopreferencia definida para la transaminasa, es decir, D-alanina para las  $\omega$ -TAs (*R*)-selectivas y L-alanina para las  $\omega$ -TAs (*S*)-selectivas. A su vez, como sistema de regeneración de la alanina se utilizó la alanina deshidrogenasa (AlaDH) para las enzimas no comerciales, y

alternativamente el preparado PRM-102 de la casa comercial Codexis para las transaminasas comerciales, el cual contiene la lactato deshidrogenasa (LDH), glucosa, NAD<sup>+</sup> y glucosa deshidrogenasa (GDH). Los mejores resultados de un total de 37  $\omega$ -transaminasas comerciales y 7 no comerciales consideradas se encuentran recogidos en la Tabla 27. En todas las pruebas efectuadas con enzimas comerciales se añadió, además, un 2.5% de DMSO para favorecer la disolución del sustrato de partida **51a**. Esta medida no se aplicó a las enzimas no comerciales ya que no siempre admitían el uso de un cosolvente orgánico, por lo que se desarrollaron en ausencia del mismo estudiando cada caso de forma particular.

**Tabla 27.** Transaminación de la bromoacetona **51a** para la formación selectiva de la amina **52a** en tampón KPi 100 mM pH 7.5 a 30 °C y 250 rpm.

Entrada	$\omega$ -TAs <sup>a</sup>	Dador	Regeneración	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>ee</i> (%) <sup>b</sup>
1	ATA-103	L-Ala	PRM-102	64	97 (S)
2	TA-P1-G06	Isopropilamina	--	67	>99 (S)
3	ATA-200	Isopropilamina	--	97	>99 (S)
4	ATA-251	Isopropilamina	--	66	>99 (S)
5	ATA-254	Isopropilamina	--	89	>99 (S)
6	ATA-256	Isopropilamina	--	99	>99 (S)
7	ATA-260	Isopropilamina	--	53	>99 (S)
8	ATA-P1-B04	Isopropilamina	--	94	>99 (S)
9	Vf	L-Ala	AlaDH	97	93 (S)
10	Vf-mutante	Isopropilamina	--	60	>99 (S)
11	Cv	L-Ala	AlaDH	77	>99 (S)
12	ATA-033	Isopropilamina	--	57	65 (R)
13	ATA-415	Isopropilamina	--	86	74 (R)
14	ArR sp.	D-Ala	AlaDH	45	>99 (R)
15	At	D-Ala	AlaDH	70	>99 (R)

<sup>a</sup> En las entradas 1-8, 12 y 13, correspondientes con enzimas comerciales, se empleó un 2.5% de DMSO como cosolvente.

<sup>b</sup> Determinado por CG.

Se observó que varias  $\omega$ -TAs catalizaban la formación de la amina (S)-**52a** con buenos resultados (entradas 1-11), si bien el enantiómero de

configuración contraria resultó menos accesible (entradas 12-15). Así, destacan dos enzimas (*S*)-selectivas comerciales, la ATA-200 y ATA-256, con las que se obtuvieron conversiones casi completas y excesos enantioméricos excelentes (entradas 3 y 6, respectivamente). Las conversiones fueron moderadas con las enzimas no comerciales *Chromobacterium violaceum* (Cv, entrada 11) y la mutante de la *Vibrio fluvialis* (Vf-mutante, entrada 10), mientras que el exceso enantiomérico del producto decreció ligeramente cuando se empleó como biocatalizador la *Vibrio fluvialis* (Vf, entrada 9). La reacción de transaminación dirigida hacia la formación del enantiómero (*R*) transcurrió con selectividades moderadas con las enzimas comerciales ATA-033 y ATA-415 (entradas 12 y 13), mientras que la amina enantiopura (*R*)-52a se obtuvo con conversiones moderadas empleando la *Arthrobacter species* (ArR sp., entrada 14) y la *Aspergillus terreus* (At, entrada 15) no comerciales.

Para algunos casos particulares se realizaron, con escaso éxito, una serie de pruebas de optimización (Tabla 28). Entre ellas, el aumento de temperatura tuvo el efecto contrario al deseado, alcanzándose conversiones más bajas que las obtenidas inicialmente a 30 °C (comparación entre entradas 1 y 2, 3 y 4). Triplicar el tiempo de reacción, sin embargo, provocó un aumento en la conversión aunque en una extensión insuficiente para la ATA-412 (comparación entradas 3 y 5) y prácticamente insignificante para la TA-P1-G06 (comparación entradas 6 y 7). Algo similar se observó al duplicar la cantidad de enzima añadida, donde se obtuvo un aumento del 5% en la conversión de la reacción catalizada por la ATA-200 (comparación entradas 9 y 10). Con estas últimas pruebas se estudió también la influencia del DMSO en enzimas no comerciales alcanzándose valores de conversión menores que los obtenidos al añadir un 2.5% de DMSO (entrada 8). Dicha influencia, positiva para la ATA-200, demostró ser negativa para la enzima no comercial At (comparación entradas 11 y 13). Únicamente con esta transaminasa la medida de aumentar la cantidad de enzima de

10 a 20 mg fue efectiva hasta el punto de alcanzarse una conversión casi completa (entrada 12) frente al 70% obtenido anteriormente (entrada 13).

**Tabla 28.** Estudios de temperatura, tiempo, cosolvente y cantidad de transaminasa añadida en la reacción de transaminación de **51a**.

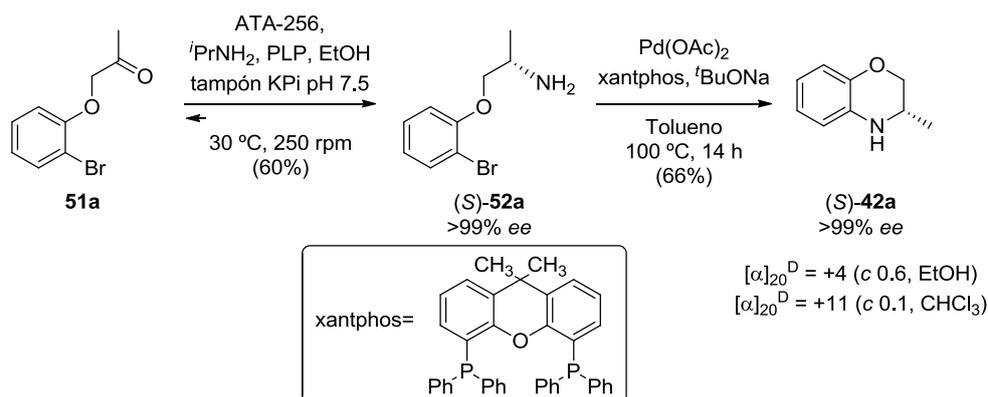
Entrada	$\omega$ -TAs <sup>a</sup>	Cosolvente	$\omega$ -TA (mg) <sup>b</sup>	T (°C)	t (h)	c (%) <sup>c</sup>
1	ATA-117 ( <i>R</i> )	DMSO	2	30	24	21
2	ATA-117 ( <i>R</i> )	DMSO	2	45	24	6
3	ATA-412 ( <i>R</i> )	DMSO	2	30	24	22
4	ATA-412 ( <i>R</i> )	DMSO	2	45	24	20
5	ATA-412 ( <i>R</i> )	DMSO	2	30	72	36
6	TA-P1-G06 ( <i>S</i> )	DMSO	2	30	24	67
7	TA-P1-G06 ( <i>S</i> )	DMSO	2	30	72	72
8	ATA-200 ( <i>S</i> )	DMSO	2	30	24	97
9	ATA-200 ( <i>S</i> )	--	2	30	24	85
10	ATA-200 ( <i>S</i> )	--	4	30	24	90
11	At ( <i>R</i> )	DMSO	10	30	24	65
12	At ( <i>R</i> )	--	10	30	24	70
13	At ( <i>R</i> )	--	20	30	24	96

<sup>a</sup> Se indica entre paréntesis la enantiopreferencia de la enzima.

<sup>b</sup> Cantidad de  $\omega$ -TA añadida (mg) para 0.025 mmol de sustrato (5.7 mg).

<sup>c</sup> Determinado por CG.

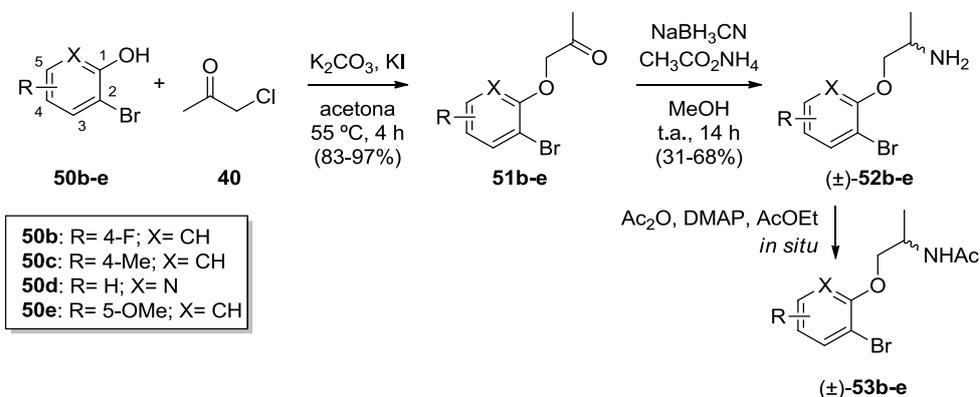
Por último, la transaminación catalizada por la ATA-256, enzima que mostró los mejores valores a pequeña escala, se efectuó a mayor escala (100 mg) con el ligero cambio de sustituir el DMSO, cosolvente utilizado en la reacción en una proporción del 2.5%, por EtOH, ya que su eliminación resulta mucho menos trabajosa. La posterior ciclación a través de la aminación de Buchwald-Hartwig permitió el aislamiento de la benzoxazina (*S*)-**42a** enantiopura con buen rendimiento empleando acetato de paladio como catalizador y xantphos (4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno) como ligando bidentado (Esquema 99). De esta manera, pudo medirse la rotación óptica específica de la benzoxazina enantiopura y definir su configuración absoluta por comparación con el valor descrito,<sup>188</sup> confirmándose la (*S*)-estereopreferencia de la enzima.



**Esquema 99.** Síntesis de la benzoxazina (*S*)-**42a** enantiopura a través de una secuencia de transaminación catalizada por la ATA-256 y ciclación en condiciones de Buchwald-Hartwig.

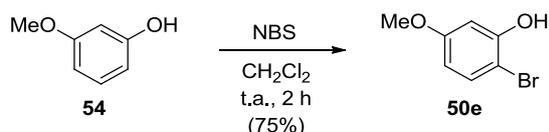
#### 4.9.2. Extensión a Otros Sustratos

La síntesis de las bromoaminas racémicas **52b-d** se llevó a cabo a partir de los correspondientes bromofenoles **50b-d** y se consiguieron, al igual que para el sustrato modelo **52a**, buenos rendimientos en la formación de las cetonas **51b-d** y considerablemente más bajos en el proceso de aminación reductiva química (Esquema 100).



**Esquema 100.** Síntesis de las aminas racémicas **52b-e** a partir de los bromofenoles **50b-e**. Derivatización *in situ* para la obtención de las acetamidas **53b-e** como referencia para la medida de los excesos enantioméricos.

Al igual que ocurría para el sustrato modelo, fue necesaria la derivatización de las aminas **52b-e** para obtener las acetamidas **53b-e** como material de referencia para la medida de los excesos enantioméricos. Un caso que requiere un comentario adicional es la preparación del sustrato **52e**, ya que fue necesaria la síntesis del bromofenol **50e** por no encontrarse éste disponible comercialmente. La reacción de bromación del correspondiente fenol se llevó a término selectivamente hacia la posición contigua al grupo alcohol y opuesta al grupo metoxi empleando la *N*-bromosuccinimida (NBS) como fuente de bromo (Esquema 101).<sup>203</sup>



**Esquema 101.** Síntesis del bromofenol **50e** a partir del correspondiente fenol **54**.

El estudio de transaminación de las bromocetonas **51b-e** se realizó con diversas enzimas al no encontrar una tendencia clara o una transaminasa que, en general, mostrase una aceleración del proceso superior al resto. En todos los casos se utilizó una disolución reguladora de fosfatos 100 mM a pH 7.5, una concentración de sustrato 50 mM, a 30 °C y 250 rpm. En la Tabla 29 se encuentra recogida una selección de los mejores resultados obtenidos para cada sustrato, siendo considerados a priori aquellos con conversiones superiores al 50% para un posterior análisis de la estereoselectividad del proceso.

---

<sup>203</sup> M. O. Kitching, T. E. Hurst, V. Snieckus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2925-2929.

**Tabla 29.** Transaminación de las bromocetonas **51b-e** para la formación selectiva de las aminas **52b-e** en tampón KPi 100 mM pH 7.5 a 30 °C y 250 rpm.



Entrada	R; X	$\omega$ -TAs	<i>c</i> (%) <sup>a</sup>	<i>ee</i> (%) <sup>a</sup>
1	<b>51b</b> (4-F; CH)	ATA-200	76	>99 ( <i>S</i> )
2	<b>51b</b> (4-F; CH)	ATA-254	87	>99 ( <i>S</i> )
3	<b>51b</b> (4-F; CH)	ATA-256	98	>99 ( <i>S</i> )
4	<b>51b</b> (4-F; CH)	ATA-P1-B04	95	>99 ( <i>S</i> )
5	<b>51b</b> (4-F; CH)	Vf	98	85 ( <i>S</i> )
6	<b>51b</b> (4-F; CH)	At	57	>99 ( <i>R</i> )
7	<b>51c</b> (4-Me; CH)	ATA-200	77	>99 ( <i>S</i> )
8	<b>51c</b> (4-Me; CH)	ATA-254	77	>99 ( <i>S</i> )
9	<b>51c</b> (4-Me; CH)	ATA-256	68	>99 ( <i>S</i> )
10	<b>51c</b> (4-Me; CH)	ATA-P1-B04	64	>99 ( <i>S</i> )
11	<b>51c</b> (4-Me; CH)	Vf	91	91 ( <i>S</i> )
12	<b>51c</b> (4-Me; CH)	At	91	>99 ( <i>R</i> )
13	<b>51d</b> (H; N)	ATA-254	88	97 ( <i>S</i> )
14	<b>51d</b> (H; N)	ATA-256	72	63 ( <i>S</i> )
15	<b>51d</b> (H; N).	ATA-260	88	74 ( <i>S</i> )
16	<b>51d</b> (H; N)	ATA-251	93	95 ( <i>S</i> )
17	<b>51d</b> (H; N)	TA-P1-G06	97	97 ( <i>S</i> )
18	<b>51d</b> (H; N)	ATA-415	91	36 ( <i>R</i> )
19	<b>51d</b> (H; N)	ATA-303	73	27 ( <i>R</i> )
20	<b>51e</b> (5-OMe; CH)	ATA-200	59	n.m.
21	<b>51e</b> (5-OMe; CH)	ATA-254	54	n.m.
22	<b>51e</b> (5-OMe; CH)	ATA-256	87	93 ( <i>S</i> )
23	<b>51e</b> (5-OMe; CH)	ATA-P1-B04	72	89 ( <i>S</i> )
24	<b>51e</b> (5-OMe; CH)	ATA-260	64	n.m.
25	<b>51e</b> (5-OMe; CH)	ATA-251	97	93 ( <i>S</i> )
26	<b>51e</b> (5-OMe; CH)	TA-P1-G06	>99	91 ( <i>S</i> )
27	<b>51e</b> (5-OMe; CH)	ATA-415	70	n.m.
28	<b>51e</b> (5-OMe; CH)	ATA-303	86	n.m.

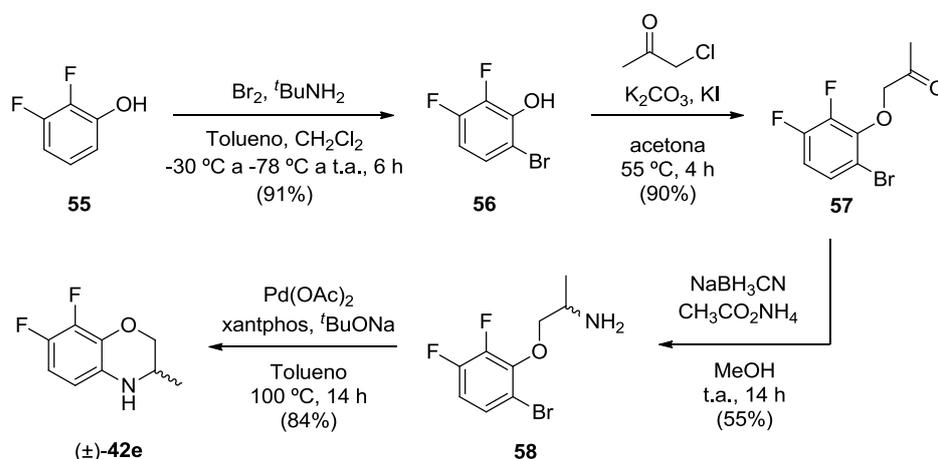
<sup>a</sup> Determinado por CG.

La presencia de un átomo de flúor en el anillo aromático no supuso una dificultad para la transaminación en lo que respecta a la formación de la amina (*S*)-**51b**, siendo varias las transaminasas (*S*)-selectivas con las que se obtuvieron conversiones superiores al 90% (entradas 3-5). Entre ellas, las enzimas comerciales llevaron a las mejores selectividades (entradas 3 y 4), mientras que con la transaminasa de *Vibrio fluvialis* no comercial solo se alcanzó un 85% de exceso enantiomérico. Por su parte, la cetona metilada **51c** dio lugar a conversiones más moderadas hacia la formación completamente selectiva del enantiómero (*S*)-**52c** (entradas 7-10), destacando que en este caso la conversión fue superior para la obtención del enantiómero (*R*)-**52c** (entrada 12). Nuevamente, la transaminasa de *Vibrio fluvialis* mostró buenos valores de conversión en un proceso que no transcurrió con total selectividad (entrada 11). La piridina **51d** condujo a un notable descenso de la selectividad, que fue más acentuado con las transaminasas (*R*)-selectivas (entradas 18 y 19) y menos con las (*S*)-selectivas (entradas 13-17) llegando incluso en una de las pruebas a conversión casi cuantitativa con un exceso enantiomérico del 97% (entrada 17). Por último, con el derivado **51e** se consiguieron, en general, buenas conversiones (entradas 20-28). En este caso la medida de los excesos enantioméricos se realizó mediante HPLC y entrañó cierta dificultad. Solo en determinados casos el crudo de reacción fue suficientemente limpio como para permitir esa medida (entradas 22, 23, 25 y 26), que desveló un empobrecimiento en la estereodiscriminación enzimática, con excesos enantioméricos buenos pero no excelentes.

Finalmente, la reacción se llevó a escala con los sustratos **51b** y **51e**. En el caso del sustrato fluorado se empleó la ATA-256 como biocatalizador, aislándose la amina (*S*)-**52b** enantiopura con un rendimiento moderado del 66%. Por su parte, la amina (*S*)-**52e** se obtuvo con un rendimiento ligeramente mayor (74%) y con un exceso del 91% *ee*.

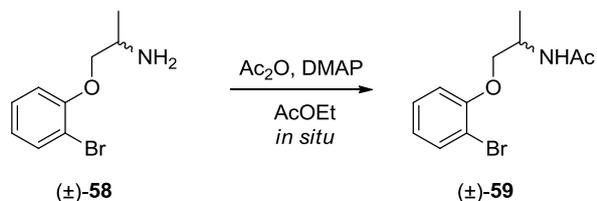
## 4.9.3. Aplicación al Precursor del Levofloxacin

Para concluir este capítulo, se extendió la metodología a un último sustrato, la benzoxazina **42e** precursora del levofloxacin. Al igual que en el caso del derivado **50e**, el bromofenol **56** no es comercialmente accesible, por lo que su síntesis se realizó mediante una reacción de bromación en condiciones muy suaves para evitar reacciones indeseadas de polibromación.<sup>194</sup> La secuencia sintética se desarrolló de forma análoga a la descrita para las aminas bromadas **52a-e** hasta la benzoxazina racémica **42e** (Esquema 102).



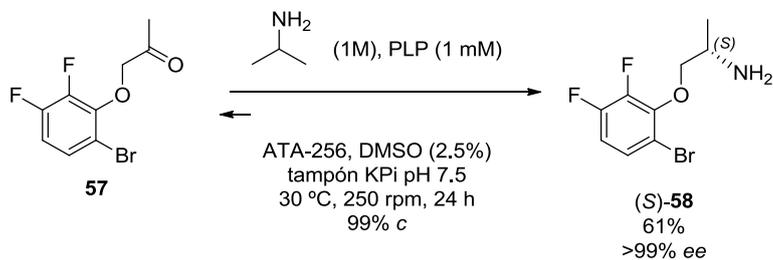
**Esquema 102.** Síntesis de la benzoxazina racémica **42e** a partir del correspondiente fenol **55**.

Nuevamente, no fue posible diseñar un programa de temperatura adecuado para la medida de los excesos enantioméricos de **58** empleando columnas quirales en CG, por lo que se derivatizó *in situ* generando la acetamida **59** (Esquema 103).



**Esquema 103.** Preparación in situ de la acetamida **59** para la medida de los excesos enantioméricos.

A continuación, en los estudios de transaminación enzimática la enzima comercial ATA-256, destacó notablemente frente al resto de transaminasas probadas, catalizando la formación de la amina (*S*)-**58** enantiopura en una extensión del 99%. La reacción se efectuó a escala preparativa (50 mg), aislándose la amina (*S*)-**58** con un 61% de rendimiento y >99% *ee*.



**Esquema 104.** Transaminación de **56** catalizada por la ATA-256 en tampón KPi 100 mM a pH 7.5.

## **CONCLUSIONES**



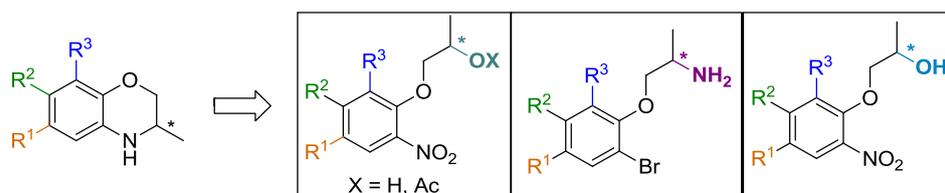
✓ Se han diseñado hasta cuatro rutas quimioenzimáticas alternativas para la síntesis de una familia de benzoxazinas. En todas ellas se han alcanzado valores excelentes de estereoselectividad, con conversiones de buenas a excelentes según el tipo de proceso y la sustitución del anillo aromático en la benzoxazina considerada.

✓ Así, se han empleado lipasas para la acilación y el proceso complementario de hidrólisis de una serie de nitroalcoholes y acetatos funcionalizados, obteniéndose conversiones cercanas a la ideal del 50% para todos los sustratos y muy buenas enantioselectividades, especialmente en las hidrólisis enzimáticas.

✓ Alternativamente, se ha estudiado la biorreducción de las cetonas precursoras, un proceso que ha transcurrido con conversiones cuantitativas y completa estereoselectividad. El empleo de alcohol deshidrogenasas de preferencia Prelog y anti-Prelog ha permitido aislar ambos enantiómeros de las benzoxazinas finales en seis pasos de reacción con buenos rendimientos.

✓ Por último, la transaminación de una familia de bromocetonas precursoras utilizando  $\omega$ -TAs de estereopreferencia opuesta ha dado lugar a distintas bromoaminas sustituidas enantiopuras. Las benzoxazinas de interés se han obtenido en tres o cuatro pasos de reacción en función de la disponibilidad comercial de los bromofenoles precursores.

✓ Todas las estrategias quimioenzimáticas han sido aplicadas a la preparación de un precursor del fármaco levofloxacino, que presenta actividad antibacteriana.





# PARTE EXPERIMENTAL



#### 4.10. General

La procedencia de los reactivos químicos y enzimas es común a lo especificado en capítulos previos, así como el tratamiento de los disolventes. Adicionalmente, el MeOH y MeCN utilizados en la optimización de la resolución cinética enzimática se secaron con hidruro cálcico, mientras que el 1,4-dioxano se secó con Na, empleando como indicador benzofenona. Todos ellos se destilaron y almacenaron bajo atmósfera de nitrógeno. Por su parte, no se realizaron tratamientos previos para la acetona.

Además, Novozymes donó la lipasa de *Rhizomucor miehei* (RM-IM, 150 IUN/g). La levadura de panadería (tipo II de *Saccharomyces cerevisiae*) procede de Sigma-Aldrich. La ADH de *Lactobacillus Kefir* (ADH-LK, 0.42 U/mg) se compró a Fluka, y la evo-1.1.200 (17.6 U/mg) a evocatal GmbH. Codexis Inc suministró tanto las alcohol deshidrogenasas de *Candida parapsilosis* (ADH-CP, 30 U/mL) y *Lactobacillus brevis* (ADH-LB, 780 U/mL), como las transaminasas comerciales utilizadas en la transaminación de las bromocetonas (ATA-xxx) y los respectivos preparados para la regeneración de los cofactores.

El Profesor Wolfgang Kroutil de la Universidad de Graz cedió las cepas de la alcohol deshidrogenasa ADH-A y las transaminasas *Vibrio fluvialis* y su mutante, *Chromobacterium violaceum*, *Arthrobacter species* y *Aspergillus terreus*, que se sobreexpresaron en células de *E. coli* y se almacenaron a 4 °C.

#### 4.11. Técnicas de Análisis

Las técnicas de cromatografía en gel de sílice, espectroscopía IR, RMN, HRMS, cromatografía de gases, punto de fusión y rotación óptica específica se realizaron según lo descrito en los capítulos previos.

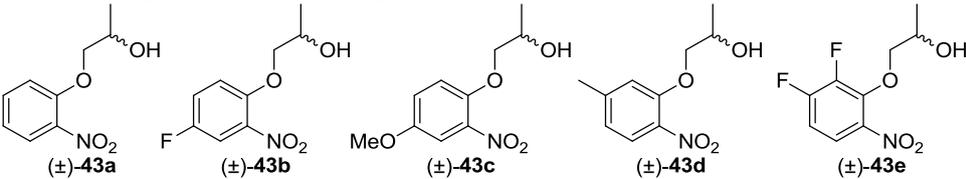
En la cromatografía en gel de sílice, adicionalmente al revelador de KMnO<sub>4</sub> se utilizaron una disolución formada por etanol (93%), ácido

acético glacial (1%), ácido sulfúrico fumante (3.5%) y *p*-anisaldehído (2.5%), y una disolución de ninhidrina en etanol.

#### 4.11.1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

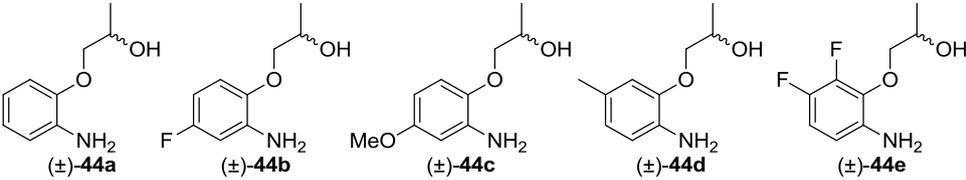
Las especificaciones para la adquisición de los cromatogramas de HPLC convergen con las de los Capítulos 1 y 2. Las condiciones y los tiempos de retención de los distintos intermedios quirales que participan en la síntesis de benzoxazinas se recogen en las Tabla 30-34.

**Tabla 30.** Separación analítica por HPLC de los nitroalcoholes **43a-e**.



Compuesto	Columna	Eluyente	$t_R$ (min) <sup>b</sup>	$R_S$ <sup>c</sup>
<i>(n</i> -hexano/2-propanol) <sup>a</sup>				
<b>43a</b>	IA	90:10	14.7 ( <i>R</i> ) y 19.1 ( <i>S</i> )	3.8
<b>43b</b>	IA	90:10	14.8 ( <i>R</i> ) y 17.3 ( <i>S</i> )	2.6
<b>43c</b>	IA	90:10	18.3 ( <i>R</i> ) y 22.2 ( <i>S</i> )	3.0
<b>43d</b>	IA	90:10	13.1 ( <i>R</i> ) y 19.0 ( <i>S</i> )	5.1
<b>43e</b>	IA	90:10	64.7 ( <i>R</i> ) y 84.8 ( <i>S</i> )	4.8

**Tabla 31.** Separación analítica por HPLC de los aminoalcoholes **44a-e**.



Compuesto	Columna	Eluyente	$t_R$ (min) <sup>b</sup>	$R_S$ <sup>c</sup>
<i>(n</i> -hexano/2-propanol) <sup>a</sup>				
<b>44a</b>	IC	80:20	12.7 ( <i>R</i> ) y 15.0 ( <i>S</i> )	3.0
<b>44b</b>	IA	90:10	25.7 ( <i>R</i> ) y 28.9 ( <i>S</i> )	1.9
<b>44c</b>	IC	80:20	26.9 ( <i>R</i> ) y 33.2 ( <i>S</i> )	3.5
<b>44d</b>	IC	80:20	14.3 ( <i>R</i> ) y 17.7 ( <i>S</i> )	3.6
<b>44e</b>	OJ-H	90:10	15.9 ( <i>S</i> ) y 21.1 ( <i>R</i> )	4.2

<sup>a</sup> Todos los análisis se efectuaron con un flujo de 0.8 mL/min a 30 °C.

<sup>b</sup> Se destaca en negrita el enantiómero mayoritario obtenido tras la transformación enzimática.

<sup>c</sup> Factor de resolución:  $R_S = 2x[t_R(S) - t_R(R)] / w_{b1}(S) + w_{b2}(R)$

**Tabla 32.** Separación analítica por HPLC de las sulfonamidas **45a-e**.

Compuesto	Columna	Eluyente	$t_R$ (min) <sup>b</sup>	$R_S$ <sup>c</sup>
<b>(<i>n</i>-hexano/2-propanol)<sup>a</sup></b>				
<b>45a</b>	IC	70:30	16.7 ( <i>S</i> ) y 21.9 ( <i>R</i> )	4.3
<b>45b</b>	IC	80:20	16.8 ( <i>S</i> ) y 20.8 ( <i>R</i> )	3.0
<b>45c</b>	IC	80:20	38.4 ( <i>S</i> ) y 44.9 ( <i>R</i> )	2.3
<b>45d</b>	IC	80:20	32.3 ( <i>S</i> ) y 46.3 ( <i>R</i> )	5.2
<b>45e</b>	IC	90:10	23.2 ( <i>S</i> ) y 25.4 ( <i>R</i> )	1.5

**Tabla 33.** Separación analítica por HPLC de las benzoxazinas tosiladas **46a-e** y de las benzoxazinas **42a** y **42e**.

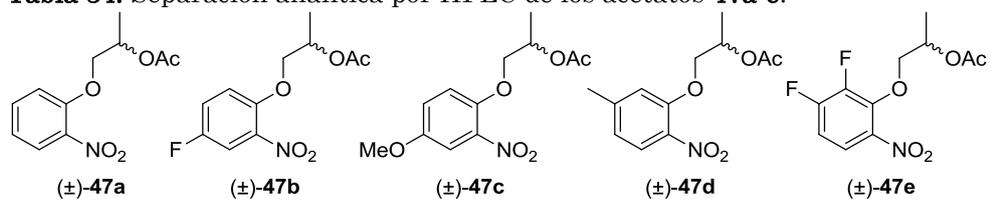
Compuesto	Columna	Eluyente	$t_R$ (min) <sup>b</sup>	$R_S$ <sup>c</sup>
<b>(<i>n</i>-hexano/2-propanol)<sup>a</sup></b>				
<b>46a</b>	OJ-H	90:10	16.6 ( <i>R</i> ) y 19.8 ( <i>S</i> )	2.1
<b>46b</b>	OJ-H	90:10	15.7 ( <i>S</i> ) y 20.7 ( <i>R</i> )	3.7
<b>46c</b>	OJ-H	90:10	20.7 ( <i>R</i> ) y 26.2 ( <i>S</i> )	2.8
<b>46d</b>	OJ-H	90:10	14.9 ( <i>R</i> ) y 17.9 ( <i>S</i> )	1.5
<b>46e</b>	OJ-H	90:10	17.1 ( <i>R</i> ) y 20.5 ( <i>S</i> )	1.6
<b>42a</b>	OJ-H	90:10	18.2 ( <i>S</i> ) y 22.6 ( <i>R</i> )	3.5
<b>42e</b>	OJ-H	95:5	24.4 ( <i>S</i> ) y 26.7 ( <i>R</i> )	1.1

<sup>a</sup> Todos los análisis se efectuaron con un flujo de 0.8 mL/min a 30 °C.

<sup>b</sup> Se destaca en **negrita** el enantiómero mayoritario obtenido tras la transformación enzimática.

<sup>c</sup> Factor de resolución:  $R_S = 2x[t_R(S) - t_R(R)] / w_{b1}(S) + w_{b2}(R)$

**Tabla 34.** Separación analítica por HPLC de los acetatos **47a-e**.



Compuesto	Columna	Eluyente ( <i>n</i> -hexano/2-propanol) <sup>a</sup>	<i>t<sub>R</sub></i> (min) <sup>b</sup>	<i>R<sub>S</sub></i> <sup>c</sup>
<b>47a</b>	IA	90:10	9.0 ( <i>R</i> ) y 9.6 ( <i>S</i> )	1.0
<b>47b</b>	IA	90:10	8.6 ( <i>R</i> ) y 9.5 ( <i>S</i> )	1.5
<b>47c</b>	IA	90:10	10.5 ( <i>R</i> ) y 11.2 ( <i>S</i> )	1.1
<b>47d</b>	IA	97:3	13.7 ( <i>R</i> ) y 14.6 ( <i>S</i> )	1.0
<b>47e</b>	IA	98:2	13.8 ( <i>R</i> ) y 15.3 ( <i>S</i> )	1.8

<sup>a</sup> Todos los análisis se efectuaron con un flujo de 0.8 mL/min a 30 °C.

<sup>b</sup> Se destaca en negrita el enantiómero mayoritario obtenido tras la transformación enzimática.

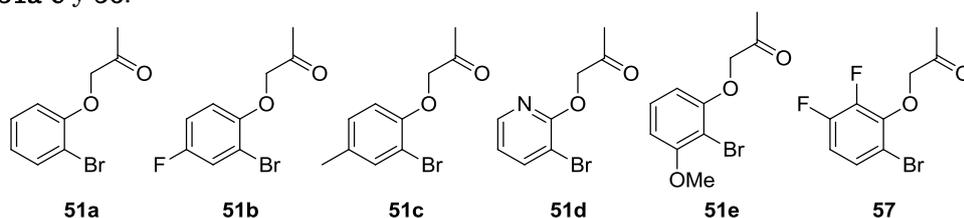
<sup>c</sup> Factor de resolución:  $R_S = 2x[t_R(S) - t_R(R)]/w_{b1}(S) + w_{b2}(R)$

Además, la bromoamina **52e** se separó en la columna ADH con una proporción *n*-hexano/2-propanol 90:10, un flujo de 0.8 mL/min a 30 °C, reteniéndose los enantiómeros a 20.2 (*R*) y 25.36 (*S*) min.

#### 4.11.2. Cromatografía de Gases (CG)

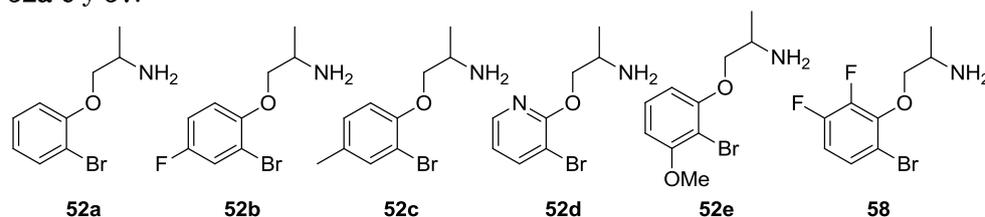
La cromatografía de gases se realizó según lo descrito en el Capítulo 1, con el uso adicional de la columna de relleno quiral CP-Chiralsil-Dex CB (25 m x 0.32 mm x 0.25 μm) para la medida de los excesos enantioméricos de las acetamidas bromadas. Las condiciones y tiempos de retención se recogen en las Tablas 35-37.

**Tabla 35.** Separación analítica por CG en columnas aquirales de las cetonas **51a-e** y **56**.



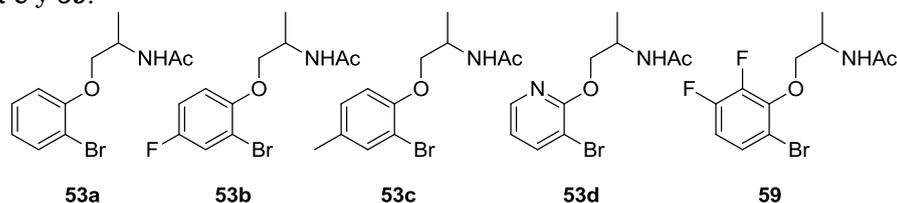
Compuesto	Columna	Programa de Temperatura <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> (min)
51a	HP-1	100/0/10/200/0	6.2
51b	HP-1	100/0/10/200/0	5.9
51c	HP-1	100/0/10/200/0	7.4
51d	HP-1	100/0/10/200/0	8.8
51e	HP-1	130/0/10/230/0	6.2
57	HP-1	100/0/10/200/0	5.4

Tabla 36. Separación analítica por CG en columnas quirales de las aminas 52a-e y 57.



Compuesto	Columna	Programa de Temperatura <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> (min)
52a	HP-1	100/0/10/200/0	5.7
52b	HP-1	100/0/10/200/0	5.4
52c	HP-1	100/0/10/200/0	6.9
52d	HP-1	100/0/10/200/0	8.3
52e	HP-1	130/0/10/230/0	5.6
58	HP-1	100/0/10/200/0	5.0

Tabla 37. Separación analítica por CG en columnas quirales de las acetamidas 53a-e y 59.



Compuesto	Columna	Programa de Temperatura <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> (min)
53a	ChiralSil	100/2/5/200/5	24.0 y 24.4
53b	ChiralSil	100/2/5/200/10	23.6 y 24.0
53c	ChiralSil	100/2/5/200/10	26.5 y 27.0
53d	ChiralSil	100/2/10/160/5/1/200/15	49.3 y 50.3
59	ChiralSil	100/2/160/5/1/200/0	

<sup>a</sup> Ti (°C)//tiempo (min)//rampa (°C/min)//Tf (°C)//tiempo (min).

## 4.12. Procedimientos Sintéticos

### 4.12.1. Procedimiento General para la Síntesis de las Nitroetonas 41a-e

Sobre una disolución del correspondiente nitrofenol **39a-e** (3.02 mmol) en tolueno (1 mL) se añaden, sucesivamente, cloroacetona (**40**, 481  $\mu$ L, 6.04 mmol), bromuro de potasio (43 mg, 0.36 mmol), hidrógenocarbonato de sodio (279 mg, 3.32 mmol) y cloruro de tributimetilamonio en disolución (75% de peso en agua, 16  $\mu$ L, 0.065 mmol). La mezcla se calienta a 65 °C y se agita a esa temperatura durante 6 h, tras las cuales se añade cloroacetona adicional (120  $\mu$ L, 1.51 mmol). La reacción se mantiene a 65 °C durante 18 h más y se para mediante adición de agua (1 mL). Se ajusta el pH de la mezcla con HCl 1N hasta 6.5-7 (entre 7 y 15 gotas) a 55-60 °C y se separan las fases en un embudo de extracción. La fase acuosa se descarta y sobre la fase orgánica se añade una disolución al 5% de NaCl (2 mL) y se agita la mezcla vigorosamente calentando a 55-60 °C durante 10 min. Nuevamente, se separan las fases en un embudo de extracción, la fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se lava con tolueno para asegurar una completa eliminación de la cloroacetona, aislándose así las correspondientes cetonas **41a-e** sin necesidad de purificación adicional (84-93%)

### 4.12.2. Procedimiento General para la Síntesis de los Nitroalcoholes Racémicos ( $\pm$ )-43a-d

Sobre una disolución de las correspondientes cetonas **41a-d** (1.00 mmol) en metanol seco (3.8 mL) se añade, borohidruro sódico (19 mg, 0.50 mmol) a 0 °C. La disolución se agita a temperatura ambiente durante 45 min, tras los cuales se detiene por adición de agua (10 mL). Se elimina el metanol por evaporación a presión reducida y el residuo acuoso resultante se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 10 mL). Las fases orgánicas

se combinan, se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente a presión reducida, obteniéndose los correspondientes nitroalcoholes **43a-d** (87-94%).

#### **4.12.3. Síntesis del Nitroabromofenollicohol Racémico (±)-43e**

Sobre una disolución de la cetona **41e** (350 mg, 1.51 mmol) en THF seco (4.6 mL) se añade el complejo de borano de amoniaco (24 mg, 0.76 mmol) y la mezcla se agita a 30 °C. Transcurrida 1 h, la reacción se detiene adicionando cuidadosamente una disolución acuosa de HCl 2 M a 0 °C hasta alcanzar un pH ácido (pH < 3). La mezcla se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 10 mL), las fases orgánicas se combinan, se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtran y el disolvente se elimina por evaporación a presión reducida. El crudo de reacción obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (10% AcOEt/hexano), aislándose el nitroalcohol **43e** (78%) como un aceite ligeramente amarillo.

#### **4.12.4. Procedimiento General para la Síntesis de los Aminoalcoholes Racémicos y Ópticamente Activos 44a-e**

En un matraz que contiene una suspensión de los correspondientes nitroalcoholes **43a-e** (2.50 mmol) y PtO<sub>2</sub> (150 mg, 0.66 mmol) en MeOH seco (14 mL) se hace una atmósfera de hidrógeno conectándole un globo de hidrógeno previa eliminación de la atmósfera de aire. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 14 h y se para por filtración de la mezcla sobre tierra diatomea. El disolvente se elimina por evaporación a presión reducida y el crudo resultante se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (mezclas AcOEt/hexano), aislándose los correspondientes aminoalcoholes **44a-e** (65-98%).

#### **4.12.5. Procedimiento General para la Síntesis de las Sulfonamidas Racémicas y Ópticamente Activas 45a-e**

A una disolución del correspondiente aminoalcohol **44a-e** (0.54 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (13.5 mL) se añaden piridina (56 µL, 0.69 mmol)

y cloruro de *p*-toluensulfonilo (134 mg, 0.70 mmol). La disolución se agita a temperatura ambiente durante 12 h, tiempo tras el cual se observa por análisis de TLC la completa desaparición del material de partida. Se evapora a presión reducida prácticamente la totalidad del disolvente, y el residuo resultante se disuelve en AcOEt (20 mL) y se lava primero con una disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (2 x 20 mL), una disolución acuosa de HCl 1 M (2 x 20 mL) y, finalmente, con una disolución saturada de NaCl (2 x 20 mL). La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se concentra por evaporación del disolvente a presión reducida. El crudo de reacción obtenido se purifica por columna cromatográfica de gel de sílice (mezclas AcOEt/hexano), aislándose las correspondientes sulfonamidas **45a-e** (71-80%).

#### 4.12.6. Procedimiento General para la Síntesis de las Benzoxazinas Tosiladas Racémicas y Ópticamente Activas **46a-e**

Se añade trifenilfosfina (89 mg, 0.34 mmol) a una disolución de la correspondiente sulfonamida **45a-e** (0.28 mmol) en THF seco (3.1 mL). A continuación, se añade gota a gota azadicarboxilato de dietilo (53 µL, 0.34 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 2 h. El disolvente se evapora a presión reducida hasta sequedad y el crudo obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (mezclas AcOEt/hexano), obteniéndose las correspondientes benzoxazinas tosiladas **46a-e** (94-100%).

#### 4.12.7. Procedimiento General para la Síntesis de los Acetatos Racémicos **47a-e**

A una disolución del correspondiente alcohol **43a-e** (0.47 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (3.2 mL) se añaden, sucesivamente, 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina (12 mg, 0.10 mmol), trietilamina (198 µL, 1.42 mmol) y anhídrido acético (90 µL, 0.95 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 30 min, tras los cuales se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo se purifica por cromatografía de

columna en gel de sílice (mezclas AcOEt/hexano), obteniéndose los correspondientes acetatos **47a-e** (88-94%).

#### **4.12.8. Procedimiento General para la Síntesis de las Benzoxazinas Racémicas y Ópticamente Activas 42a y 42e**

Sobre una disolución de la correspondiente benzoxazina tosilada **46a** o **46e** (0.18 mmol) en MeOH seco se añade el magnesio en forma de virutas (22 mg, 0.88 mmol). La mezcla se agita a reflujo del disolvente durante 2 h, completándose tras ese tiempo la desprotección del grupo tosilato. La mezcla se lleva a sequedad por evaporación del disolvente a presión reducida y el crudo obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (10% AcOEt/hexano), aislándose las correspondientes benzoxazinas **42a** y **42e** (79-86%).

#### **4.12.9. Biorreducción de 1-(2-Nitrofenoxi)propan-2-ona (41a) con ADH-LK**

En un tubo de microcentrífuga o tubo eppendorf que contiene la cetona **41a** (2.3 mg, 0.012 mmol) en una solución tampón Tris·HCl 50 mM pH 7.5 (450 µL) se añaden, sucesivamente, glucosa-6-fosfato (40 µL), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (3 U, 10 µL), una disolución 10 mM de NADPH en tampón Tris·HCl 50 mM pH 7.5 (50 µL) y ADH-LK (3 U, 2 mg). La mezcla se agita a 30 °C y 250 rpm durante 24 h, tras las cuales se extrae con AcOEt (2 x 500 µL) y las fases orgánicas se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El crudo de reacción se analiza mediante espectroscopía de RMN para calcular la conversión y de HPLC para calcular el exceso enantiomérico.

#### **4.12.10. Biorreducción de 1-(2-Nitrofenoxi)propan-2-ona (41a) con ADH-CP**

En un tubo de microcentrífuga que contiene la cetona **41a** (2.3 mg, 0.012 mmol) en una solución tampón Tris·HCl 50 mM pH 7.5 (450 µL) se añaden, sucesivamente, 2-propanol (25 µL), una disolución 10 mM de

NADH en tampón Tris·HCl 50 mM pH 7.5 (50  $\mu$ L) y ADH-CP (3 U, 7.5  $\mu$ L). La mezcla se agita a 30 °C y 250 rpm durante 24 h, tras las cuales se extrae con AcOEt (2 x 500  $\mu$ L) y las fases orgánicas se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El crudo de reacción se analiza mediante espectroscopía de RMN para calcular la conversión y de HPLC para calcular el exceso enantiomérico.

#### **4.12.11. Biorreducción de 1-(2-Nitrofenoxi)propan-2-ona (41a) con Levadura de Panadería (BY)**

A una disolución de glucosa (165 mg) en H<sub>2</sub>O (11 mL) se añade la levadura de panadería (1.3 g) y la suspensión resultante se agita a 30 °C y 250 rpm durante 15 min. Transcurrido ese tiempo, se añade la cetona **41a** (33 mg, 0.17 mmol) y la suspensión se agita en las mismas condiciones de 30 °C y 250 rpm durante 24 h. La reacción se centrifuga y el sobrenadante se extrae con AcOEt (3 x 20 mL). Las fases orgánicas se combinan, se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtran y el disolvente se evapora a presión reducida, analizándose el crudo de reacción mediante espectroscopía de RMN para calcular la conversión y de HPLC para calcular el exceso enantiomérico.

#### **4.12.12. Procedimiento General para la Biorreducción de las Cetonas 41a-e con ADH-LB**

En un tubo de microcentrífuga que contiene las cetonas **41a-e** (0.018 mmol) y 2-propanol (38  $\mu$ L) en una solución tampón Tris·HCl 50 mM pH 7.5 (555  $\mu$ L) se añaden, sucesivamente, una disolución 10 mM de MgCl<sub>2</sub> (75  $\mu$ L), una disolución 10 mM de NADPH en tampón Tris·HCl 50 mM pH 7.5 (75  $\mu$ L) y ADH-LB (4.5 U, 15  $\mu$ L). La mezcla se agita a 30 °C y 250 rpm durante 24 h, tras las cuales se extrae con AcOEt (2 x 500  $\mu$ L). Las fases orgánicas se combinan y se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, analizándose el crudo de reacción mediante espectroscopía de RMN para calcular la conversión y de HPLC para calcular el exceso enantiomérico.

#### **4.12.13. Procedimiento General para la Biorreducción de las Cetonas 41a-e con ADH-A**

En un tubo de microcentrífuga que contiene las cetonas **41a-e** (0.012 mmol) y 2-propanol (25  $\mu$ L) en una solución tampón Tris·HCl 50 mM pH 7.5 (425  $\mu$ L) se añaden, sucesivamente, una disolución 10 mM de NADH en tampón Tris·HCl 50 mM pH 7.5 (50  $\mu$ L) y células de *E. coli*/ADH-A (15 mg). La mezcla se agita a 30 °C y 250 rpm durante 24 h, tras las cuales se extrae con AcOEt (2 x 500  $\mu$ L). Las fases orgánicas se combinan, se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el crudo de reacción se analiza mediante espectroscopía de RMN para calcular la conversión y de HPLC para calcular el exceso enantiomérico.

#### **4.12.14. Procedimiento General para la Biorreducción de las Cetonas 41a-e con evo-1.1.200**

En un tubo de microcentrífuga que contiene las cetonas **41a-e** (0.015 mmol) y 2-propanol (25  $\mu$ L) en una solución tampón Tris·HCl 50 mM pH 7.5 (400  $\mu$ L) se añaden, sucesivamente, una disolución 10 mM de MgCl<sub>2</sub> en tampón Tris·HCl 50 mM pH 7.5 (60  $\mu$ L), una disolución 10 mM de NADH en tampón Tris·HCl 50 mM pH 7.5 (60  $\mu$ L) y evo-1.1.200 (60  $\mu$ L de una disolución compuesta por 1 mg de evo-1.1.200 pura en 760  $\mu$ L de tampón Tris·HCl 50 mM pH 7.5 y 240  $\mu$ L de tampón Tris·HCl 50 mM pH 7.5 de una disolución 10 mM de MgCl<sub>2</sub> en tampón Tris·HCl 50 mM pH 7.5). La mezcla se agita a 30 °C y 250 rpm durante 24 h, tras las cuales se extrae con AcOEt (2 x 500  $\mu$ L). Las fases orgánicas se combinan, se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el crudo de reacción se analiza mediante el empleo de la técnica de GC para calcular la conversión y de HPLC para calcular el exceso enantiomérico. En el caso particular de la cetona **41e** se obtuvieron mejores resultados a pHs ligeramente ácidos (6-6.5), suprimiéndose por completo la presencia del producto secundario **49** a un pH óptimo de 6.

#### 4.12.15. Procedimiento General para el Escalado de la Biorreducción de las Cetonas 41a-e con ADH-A

Las células de *E. coli*/ADH-A (relación 20:1 en peso entre cetona/crudo de enzima) se rehidratan en una solución tampón Tris·HCl 50 mM pH 7.5 (22 mL) mediante agitación de la mezcla a 30 °C y 250 rpm durante 5 min. Tras el tiempo de rehidratación se añaden, sucesivamente, la correspondiente cetona **41a-e** (0.094 mmol), 2-propanol (1.5 mL) y NADH (10 mg). La suspensión se agita a 30 °C y 250 rpm hasta que se concluye por análisis de TLC que se ha consumido todo el material de partida (24 h). La mezcla se extrae, entonces, con AcOEt (3 x 20 mL), las fases orgánicas se combinan, se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtran y el disolvente se elimina por evaporación a presión reducida, obteniéndose los correspondientes alcoholes (*S*)-**43a-e** (85-93%, >99% *ee*) sin necesidad de purificación adicional.

#### 4.12.16. Procedimiento General para el Escalado de la Biorreducción de las Cetonas 41a-e con evo-1.1.200

A una suspensión de la correspondiente cetona **41a-e** (0.15 mmol) en una mezcla 2-propanol (250 µL) y una suspensión tampón Tris·HCl 50 mM pH 7.5 (4 mL) se añaden, sucesivamente, una disolución 10 mM de MgCl<sub>2</sub> en tampón Tris·HCl 50 mM pH 7.5 (600 µL), una disolución 10 mM de NADH en tampón Tris·HCl 50 mM pH 7.5 (600 µL) y evo-1.1.200 (600 µL de una disolución compuesta por 1 mg de evo-1-1-200 pura en 760 µL de tampón Tris·HCl 50 mM pH 7.5 y 240 µL de una disolución 10 mM de MgCl<sub>2</sub> en tampón Tris·HCl 50 mM pH 7.5). La reacción se agita a 30 °C y 250 rpm durante 24 h. La mezcla se extrae con AcOEt (3 x 10 mL), las fases orgánicas se combinan, se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtran y el disolvente se elimina por evaporación a presión reducida, obteniéndose los correspondientes alcoholes (*R*)-**43a-e** (78-99%, >99% *ee*) sin necesidad de purificación adicional. Como se ha mencionado anteriormente, para la cetona **41e** se obtuvieron mejores

resultados a pHs ligeramente ácidos (6-6.5), suprimiéndose por completo la presencia del producto secundario **49** a un pH óptimo de 6.

#### **4.12.17. Procedimiento General para la Resolución Cinética Enzimática por Acilación de los Alcoholes Racémicos 43a-e**

A una suspensión del correspondiente alcohol racémico **43a-e** (0.51 mmol) y RML-IM (relación 1:1 en peso entre alcohol/enzima) en TBME seco (5.1 mL) se añade, bajo atmósfera de nitrógeno, acetato de vinilo (140  $\mu$ L, 1.52 mmol). La mezcla se agita a 30 °C y 250 rpm el tiempo necesario para conseguir una buena resolución cinética (ver Tabla 23). El seguimiento de la reacción por HPLC permite definir el momento en el que se alcanzan conversiones cercanas al 50%, momento en el cual la enzima se filtra, se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 5 mL) y el disolvente se evapora a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (eluyente: gradientes 20-40% AcOEt/hexano), obteniéndose los correspondientes acetatos (*R*)-**47a-e** y alcoholes (*S*)-**43a-e** ópticamente activos (ver Tabla 23).

#### **4.12.18. Procedimiento General para la Resolución Cinética Enzimática por Hidrólisis de los Acetatos Racémicos 47a-e**

A una suspensión del correspondiente acetato racémico **47a-e** (0.43 mmol) y RML-IM (relación 1:1 en peso entre alcohol/enzima) en TBME (4.3 mL) se le añade H<sub>2</sub>O (39  $\mu$ L, 2.16 mmol). La mezcla se agita a 30 °C y 250 rpm el tiempo necesario para conseguir una buena resolución cinética (ver Tabla 24). El seguimiento de la reacción por HPLC permite definir el momento en el que se alcanzan conversiones cercanas al 50%, momento en el cual la enzima se filtra, se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 5 mL) y el disolvente se evapora a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (eluyente: gradientes 20-40% AcOEt/hexano), obteniéndose los correspondientes alcoholes (*R*)-**43a-e** y acetatos(*S*)-**47a-e** ópticamente activos (ver Tabla 24).

#### 4.12.19. Síntesis del Bromofenol 50e

En un matraz schlenk o bulbo se disuelve, bajo atmósfera de nitrógeno, el 3-metoxifenol (**53**, 500  $\mu$ L, 4.55 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (90 mL) y se añade, de una vez, la *N*-bromosuccinimida (811 mg, 4.55 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla se lava con  $\text{H}_2\text{O}$  (30 mL), la fase orgánica se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtra y el disolvente se evapora a presión reducida. El crudo de reacción obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (10%  $\text{Et}_2\text{O}$ /hexano), aislándose el bromofenol **50e** con un 75% de rendimiento.<sup>203</sup>

#### 4.12.20. Síntesis del Bromofenol 56

En un matraz schlenk o bulbo se disuelve, bajo atmósfera de argón, la  $t\text{BuNH}_2$  (485  $\mu$ L, 4.61 mmol) en tolueno seco (5.8 mL). La disolución se enfría hasta  $-30\text{ }^\circ\text{C}$  y se añade  $\text{Br}_2$  (119  $\mu$ L, 2.31 mmol) gota a gota durante 3 min, formándose una disolución amarilla. La mezcla se enfría hasta  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  y, tras 10 min a esa temperatura, se añade, gota a gota y durante 5 min de adición, una disolución del 2,3-difluorofenol (**55**, 300 mg, 2.31 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (0.6 mL). Se deja que la reacción vaya alcanzando temperatura ambiente poco a poco (4 h) y, entonces, se agita a esa temperatura durante 1.5 h adicionales. La mezcla se diluye con  $\text{AcOEt}$  (10 mL), se lava con  $\text{HCl}$  1 M (2 x 10 mL), las fases orgánicas se juntan, se secan con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtran y el disolvente se evapora a presión reducida. El crudo de reacción obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice, obteniéndose el bromofenol **56** con un rendimiento del 91%.<sup>194</sup>

#### 4.12.21. Procedimiento General para la Síntesis de las Bromocetonas 51a-e y 57

En un matraz de boca redonda se introducen carbonato de potasio (238 mg, 1.72 mmol), yoduro de potasio (12 mg, 0.25 mmol), el correspondiente bromofenol **50a-e** o **56** (0.86 mmol) y acetona (3 mL). A

la suspensión resultante se le añade cloroacetona (82  $\mu$ L, 1.03 mmol) y la mezcla se calienta a reflujo durante 2 h. Tras dejar el matraz alcanzar temperatura ambiente, la reacción se vuelca sobre H<sub>2</sub>O (5 mL) y se extrae con Et<sub>2</sub>O (4 x 10 mL). Las fases orgánicas se combinan, se lavan con H<sub>2</sub>O (20 mL) y se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El disolvente se evapora a presión reducida obteniéndose las correspondientes bromocetonas **51a-e** y **57** sin necesidad de purificación adicional (83-97%). Cabe puntualizar que en el caso de la cetona **51d** fue necesario realizar la extracción en continuo, para lo que se empleó AcOEt como disolvente (100 mL).

#### **4.12.22. Procedimiento General para la Síntesis de las Bromoaminas Racémicas 52a-e y 58**

En un matraz schlenk o bulbo se disuelve, bajo atmósfera de nitrógeno, la correspondiente bromocetona **51a-e** o **57** (0.43 mmol) en MeOH seco (1.4 mL) y se añaden, sucesivamente, acetato de amonio (335 mg, 4.34 mmol) y cianoborohidruro de sodio (55 mg, 0.87 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 14 h, tras las cuales el disolvente se evapora a presión reducida. El crudo de reacción obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) aislándose las correspondientes aminas racémicas **52a-e** y **58** (%).

#### **4.12.23. Procedimiento General para la Síntesis de las Benzoxazinas Racémicas o Enantiopuras 42a-c y 42e a Partir de las Bromoaminas 52a-c y 57**

La síntesis de las benzoxazinas racémicas **42a-c** se llevó a cabo en un tubo Young bajo atmósfera de argón siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía para el sustrato **42e**.<sup>194</sup>

#### 4.12.24. Procedimiento General para la Transaminación de las Cetonas 51a-f Empleando el Sistema de Regeneración de la Alanina Deshidrogenasa

En un tubo de microcentrífuga que contiene una suspensión de las cetonas **51a-f** (0.05 mmol, 50 mM) en una disolución tampón de fosfatos 100 mM pH 7.5 (440  $\mu$ L) se añaden sucesivamente formiato de amonio (100  $\mu$ L de una disolución 1.5 M en tampón de fosfatos 100 mM pH 7.5; 150 mM de concentración final), L- o D-alanina (250  $\mu$ L de una disolución 1 M en tampón de fosfatos 100 mM pH 7.5; 250 mM de concentración final), NAD<sup>+</sup> (100  $\mu$ L de una disolución 10 mM en tampón de fosfatos 100 mM pH 7.5; 1 mM de concentración final), PLP (100  $\mu$ L de una disolución 10 mM en tampón de fosfatos 100 mM pH 7.5; 1 mM de concentración final), las células de *E. coli* $\omega$ -TAs (20 mg), FDH (2.6 mg, 11 U) y AlaDH (10  $\mu$ L). La mezcla resultante se agita a 30 °C y 250 rpm durante 24 h. La reacción se detiene añadiendo una disolución acuosa de NaOH 4 M (400  $\mu$ L), se extrae con AcOEt (3 x 500  $\mu$ L), las fases orgánicas se combinan y se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El crudo de reacción se analiza mediante el empleo de la técnica de CG para calcular la conversión y, tras una derivatización *in situ*, el exceso enantiomérico.

#### 4.12.25. Procedimiento General para la Transaminación de las Cetonas 51a-f Empleando Isopropilamina

En un tubo de microcentrífuga se suspenden las  $\omega$ -TAs (2 mg) en una disolución tampón de fosfatos de potasio 100 mM pH 7.5 (500  $\mu$ L) en la que están integrados el PLP (1 mM) y la isopropilamina (1 M). Se añaden entonces las cetonas **51a-f** (0.025 mmol, 50 mM) disueltas en el DMSO (12.5  $\mu$ L) y la mezcla se agita a 30 °C y 250 rpm durante 24 h. La reacción se detiene añadiendo una disolución acuosa de NaOH 4 M (200  $\mu$ L), se extrae con AcOEt (3 x 500  $\mu$ L), las fases orgánicas se combinan y se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El crudo de reacción se analiza mediante el empleo de la técnica de CG para calcular la conversión y, tras una derivatización *in situ*, el exceso enantiomérico.

#### 4.12.26. Procedimiento General para la Transaminación de las Cetonas 51a-f Empleando el Sistema de Regeneración de la Lactato Deshidrogenasa

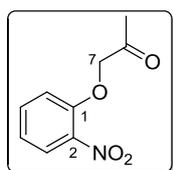
En un tubo de microcentrífuga que contiene una suspensión de las  $\omega$ -TAs comerciales (2 mg) en una disolución tampón de fosfatos 100 mM pH 7.5 (500  $\mu$ L) en la que está integrados el PLP (1 mM) se añaden sucesivamente las cetonas **51a-f** (0.025 mmol, 50 mM) disueltas en DMSO (12.5  $\mu$ L), L- o D-alanina (2.5 mg) y el preparado PRM-102 (15 mg). La mezcla resultante se agita a 30 °C y 250 rpm durante 24 h. La reacción se detiene añadiendo una disolución acuosa de NaOH 4 M (200  $\mu$ L), se extrae con AcOEt (3 x 500  $\mu$ L), las fases orgánicas se combinan y se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El crudo de reacción se analiza mediante el empleo de la técnica de CG para calcular la conversión y, tras una derivatización *in situ*, el exceso enantiomérico.

#### 4.12.27. Procedimiento General para el Escalado de la Transaminación de las Cetonas 51a-f Empleando Isopropilamina

En un tubo falcon se suspenden las  $\omega$ -TAs (35 mg) en una disolución tampón de fosfatos 100 mM pH 7.5 (8.8 mL) en la que están integrados el PLP (1 mM) y la isopropilamina (1 M). Se añaden entonces las cetonas **51a** o **51b** (0.44 mmol, 50 mM) disueltas en el EtOH (220  $\mu$ L) y la mezcla se agita a 30 °C y 250 rpm durante 24 h. La reacción se detiene añadiendo una disolución acuosa de NaOH 4 M (2 mL), se extrae con AcOEt (3 x 15 mL), las fases orgánicas se combinan, se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtran y el disolvente se evapora a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (mezclas CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH), aislándose las aminas **52a** y **52b** enantiopuras (60-66%).

### 4.13. Datos Experimentales

#### 1-(2-Nitrofenoxi)propan-2-ona (41a)



**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>4</sub>

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**Rendimiento:** 93%

**R<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.31

**Peso Molecular:** 195.17 g/mol

**Pf:** 68-70 °C

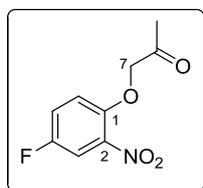
**IR** (KBr):  $\nu$  3055, 2987, 2306, 1739, 1724, 1608, 1528, 1357, 1166, 1052, 860 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.35 (s, 3H, H<sub>9</sub>), 4.62 (s, 2H, H<sub>7</sub>), 6.94 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.4 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 0.9 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.03-7.10 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 7.53 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.6, 7.5 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.7 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.87 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.1 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.6 Hz, 1H, H<sub>3</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  27.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 73.8 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 114.7 (CH, C<sub>6</sub>), 121.7 (CH, C<sub>4</sub>), 126.1 (CH, C<sub>3</sub>), 134.4 (CH, C<sub>5</sub>), 140.1 (C, C<sub>2</sub>), 151.1 (C, C<sub>1</sub>), 204.4 (C, C<sub>8</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NNaO<sub>4</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 218.0424, encontrada: 218.0402

#### 1-(4-Fluoro-2-nitrofenoxi)propan-2-ona (41b)



**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>FNO<sub>4</sub>

**Aspecto Físico:** Sólido amarillento

**Rendimiento:** 92%

**R<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.21

**Peso Molecular:** 213.16 g/mol

**Pf:** 82-83 °C

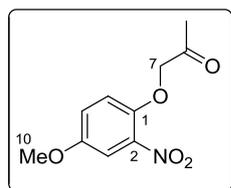
**IR** (KBr):  $\nu$  3055, 2987, 2343, 1739, 1740, 1723, 1538, 1498, 1420, 1360, 1204, 1049, 815 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz):  $\delta$  2.33 (s, 3H, H<sub>9</sub>), 4.62 (s, 2H, H<sub>7</sub>), 6.96 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.2 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 4.2 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.28 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 7.4 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 3.1 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.63 (dd, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 7.7 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 3.1 Hz, 1H, H<sub>3</sub>) ppm

**$^{13}\text{C}$ -RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 100.6 MHz):  $\delta$  26.9 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_9$ ), 74.6 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_7$ ), 113.4 (d,  $^2J_{\text{FC}} = 27.5$  Hz,  $\text{CH}$ ,  $\text{C}_5$ ), 116.7 (d,  $^3J_{\text{FC}} = 7.8$  Hz,  $\text{CH}$ ,  $\text{C}_6$ ), 121.4 (d,  $^2J_{\text{FC}} = 23.0$  Hz,  $\text{CH}$ ,  $\text{C}_3$ ), 139.9 (d,  $^3J_{\text{FC}} = 6.8$  Hz,  $\text{C}$ ,  $\text{C}_2$ ), 147.8 ( $\text{C}$ ,  $\text{C}_1$ ), 156.1 (d,  $^1J_{\text{FC}} = 245.6$  Hz,  $\text{C}$ ,  $\text{C}_4$ ), 204.0 ( $\text{C}$ ,  $\text{C}_8$ ) ppm

**HRMS** ( $\text{ESI}^+$ ,  $m/z$ ) ( $\text{C}_9\text{H}_8\text{FNNaO}_4$ )<sup>+</sup> ( $\text{M}+\text{Na}$ )<sup>+</sup>: calculada 236.0330, encontrada: 236.0335

**1-(4-Metoxi-2-nitrofenoxi)propan-2-ona (41c)**



**Fórmula empírica:**  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_5$

**Aspecto Físico:** Sólido amarillento

**Rendimiento:** 85%

**$R_f$**  (40% AcOEt/hexano): 0.38

**Peso Molecular:** 225.20 g/mol

**Pf:** 80-81 °C

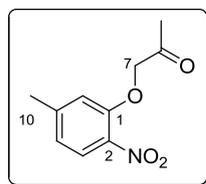
**IR** (KBr):  $\nu$  3055, 2987, 2348, 1739, 1718, 1534, 1499, 1430, 1360, 1224, 1052, 1035, 896, 811  $\text{cm}^{-1}$

**$^1\text{H}$ -RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 300.13 MHz):  $\delta$  2.31 (s, 3H,  $\text{H}_9$ ), 3.80 (s, 3H,  $\text{H}_{10}$ ), 4.57 (s, 2H,  $\text{H}_7$ ), 6.92 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 9.2$  Hz, 1H,  $\text{H}_6$ ), 7.07 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 9.1$  Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 3.1$  Hz, 1H,  $\text{H}_5$ ), 7.39 (d,  $^4J_{\text{HH}} = 3.1$  Hz, 1H,  $\text{H}_3$ ) ppm

**$^{13}\text{C}$ -RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 75.5 MHz):  $\delta$  27.0 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_9$ ), 56.3 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_{10}$ ), 75.1 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_7$ ), 110.4 ( $\text{CH}$ ,  $\text{C}_3$ ), 117.2 ( $\text{CH}$ ,  $\text{C}_6$ ), 121.0 ( $\text{CH}$ ,  $\text{C}_5$ ), 140.4 ( $\text{C}$ ,  $\text{C}_2$ ), 145.5 ( $\text{C}$ ,  $\text{C}_1$ ), 154.1 ( $\text{C}$ ,  $\text{C}_4$ ), 204.9 ( $\text{C}$ ,  $\text{C}_8$ ) ppm

**HRMS** ( $\text{ESI}^+$ ,  $m/z$ ) ( $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NNaO}_5$ )<sup>+</sup> ( $\text{M}+\text{Na}$ )<sup>+</sup>: calculada 248.0529, encontrada: 248.0540

**1-(5-Metil-2-nitrofenoxi)propan-2-ona (41d)**



**Fórmula empírica:**  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_4$

**Aspecto Físico:** Sólido amarillento

**Rendimiento:** 84%

**$R_f$**  (40% AcOEt/hexano): 0.41

**Peso Molecular:** 209.20 g/mol

**Pf:** 98-99 °C

**IR** (KBr):  $\nu$  3056, 1724, 1723, 1608, 1521, 1419, 1348, 1179, 1097, 1051, 896, 820  $\text{cm}^{-1}$

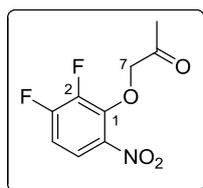
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.37 (s, 3H, H<sub>9</sub>), 2.41 (s, 3H, H<sub>10</sub>), 4.60 (s, 2H, H<sub>7</sub>), 6.73 (s, 1H, H<sub>6</sub>), 6.90 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.3 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.85 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.3 Hz, 1H, H<sub>3</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 21.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>10</sub>), 26.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 73.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 115.2 (CH, C<sub>6</sub>), 122.2 (CH, C<sub>4</sub>), 126.1 (CH, C<sub>3</sub>), 137.4 (C, C<sub>2</sub>), 146.3 (C, C<sub>5</sub>), 151.2 (C, C<sub>1</sub>), 204.4 (C, C<sub>8</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>NNaO<sub>4</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 232.0580, encontrada: 232.0581

---

**1-(2,3-Difluoro-6-nitrofenoxi)propan-2-ona (41e)**



**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>4</sub>

**Aspecto Físico:** Sólido amarillento

**Rendimiento:** 85%

**R<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.69

**Peso Molecular:** 231.15 g/mol

**Pf:** 43-45 °C

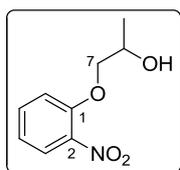
**IR** (KBr): ν 3056, 1724, 1723, 1608, 1521, 1419, 1348, 1179, 1097, 1051, 896, 820 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.32 (s, 3H, H<sub>9</sub>), 4.80 (d, <sup>5</sup>J<sub>FH</sub> = 1.3 Hz, 2H, H<sub>7</sub>), 7.05 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 8.8 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 7.2 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.72 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.4 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 5.2, <sup>5</sup>J<sub>FH</sub> = 2.4 Hz, 1H, H<sub>3</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 26.4 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 78.1 (d, <sup>4</sup>J<sub>FC</sub> = 5.3 Hz, CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 111.7 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 19.3 Hz, CH, C<sub>4</sub>), 120.8 (dd, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 9.0 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FC</sub> = 4.0 Hz, CH, C<sub>3</sub>), 140.0 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 3.7 Hz, C, C<sub>6</sub>), 142.6 (dd, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 10.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 2.9 Hz, C, C<sub>1</sub>), 144.7 (dd, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 252.9 Hz, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 14.7 Hz, C, C<sub>2</sub>), 154.1 (dd, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 259.6 Hz, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 11.6 Hz, C, C<sub>3</sub>), 203.0 (C, C<sub>8</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>F<sub>2</sub>NNaO<sub>4</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 254.0235, encontrada: 254.0249

**1-(2-Nitrofenoxi)propan-2-ol (43a)**



**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>

**Aspecto Físico:** Aceite amarillento

**Rendimiento:** 87%

**R<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.19

**Peso Molecular:** 197.19 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3586, 3440, 3055, 2985, 2937, 2307, 1609, 1526, 1354, 1166, 1020, 860 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.25 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.4 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 3.03 (sa, 1H, OH), 3.88 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 8.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 4.07 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 9.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.1 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 4.12-4.24 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 6.98-7.15 (m, 2H, H<sub>6</sub> y H<sub>4</sub>), 7.46-7.61 (m, 1H, H<sub>5</sub>), 7.80 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.0 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.6 Hz, 1H, H<sub>3</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  18.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 65.8 (CH, C<sub>8</sub>), 75.0 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 115.0 (CH, C<sub>6</sub>), 120.8 (CH, C<sub>4</sub>), 125.8 (CH, C<sub>3</sub>), 134.5 (CH, C<sub>5</sub>), 139.6 (C, C<sub>2</sub>), 152.2 (C, C<sub>1</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NNaO<sub>4</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 220.0580, encontrada: 220.0609

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = +6.0$  (*c* 0.6, EtOH) [para (*S*)-43a en >99% *ee*]

**Separación analítica de 43a (HPLC):**

Columna: Chiralpak IA

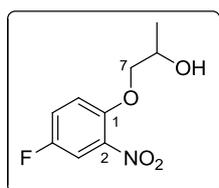
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*R*) = 14.7 min, *t<sub>R</sub>* (*S*) = 19.1 min

1-(4-Fluoro-2-nitrofenoxi)propan-2-ol (43b)



**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>FNO<sub>4</sub>

**Aspecto Físico:** Sólido amarillento

**Rendimiento:** 94%

**R<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.26

**Peso Molecular:** 215.18 g/mol

**Pf:** 74-76 °C

**IR** (KBr):  $\nu$  3055, 2987, 2343, 1739, 1740, 1723, 1538, 1498, 1420, 1360, 1204, 1049, 815 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.28 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.4 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 2.98 (sa, 1H, OH), 3.90 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 9.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 4.10 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 9.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.2 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 4.15-4.26 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 7.08 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.2 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 4.3 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.28 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 7.3 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 3.1 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.60 (dd, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 7.8 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 3.1 Hz, 1H, H<sub>3</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  18.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 65.9 (CH, C<sub>8</sub>), 75.8 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 113.0 (d, <sup>2</sup>J<sub>FH</sub> = 27.5 Hz, CH, C, C<sub>5</sub>), 116.6 (d, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 7.7 Hz, CH, C<sub>6</sub>), 121.5 (d, <sup>2</sup>J<sub>FH</sub> = 22.8 Hz, CH, C<sub>3</sub>), 139.3 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 8.3 Hz, C, C<sub>2</sub>), 148.9 (d, <sup>4</sup>J<sub>FC</sub> = 3.0 Hz, C, C<sub>1</sub>), 155.5 (d, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 244.3 Hz, C, C<sub>4</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>FNNaO<sub>4</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 238.0486, encontrada: 238.0500

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = +7.0$  (*c* 0.5, EtOH) [para (*S*)-43b en >99% *ee*]

**Separación analítica de 43b (HPLC):**

Columna: Chiralpak IA

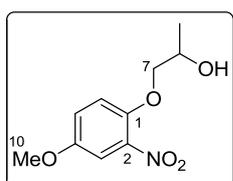
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*R*) = 14.8 min, *t<sub>R</sub>* (*S*) = 17.3 min

1-(4-Metoxi-2-nitrofenoxi)propan-2-ol (43c)



Fórmula empírica: C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub>

Aspecto Físico: Sólido anaranjado

Rendimiento: 93%

*R<sub>f</sub>* (40% AcOEt/hexano): 0.18

Peso Molecular: 227.21 g/mol

Pf: 75-77 °C

IR (KBr):  $\nu$  3576, 3431, 3058, 2964, 2922, 2840, 2343, 1527, 1496, 1346, 1216, 1040, 817 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.25 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.4 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 2.76 (sa, 1H, OH), 3.80 (s, 3H, H<sub>10</sub>), 3.81-3.91 (m, 1H, H, H<sub>7</sub>), 4.07 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 9.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.1 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 4.12-4.27 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 7.01 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.1 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.09 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.1 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 3.0 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.37 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 3.0 Hz, 1H, H<sub>3</sub>) ppm

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  18.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 56.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>10</sub>), 66.0 (CH, C<sub>8</sub>), 76.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 110.0 (CH, C<sub>3</sub>), 117.1 (CH, C<sub>6</sub>), 121.3 (CH, C<sub>5</sub>), 139.8 (C, C<sub>2</sub>), 146.6 (C, C<sub>1</sub>), 153.4 (C, C<sub>4</sub>) ppm

HRMS (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NNaO<sub>5</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 250.0686, encontrada: 250.0711

Rotación Óptica Específica:  $[\alpha]_D^{20} = +4.0$  (*c* 0.75, EtOH) [para (*S*)-43c en >99% *ee*]

Separación analítica de 43c (HPLC):

Columna: Chiralpak IA

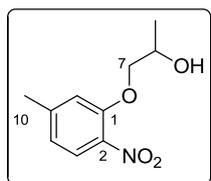
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*R*) = 18.3 min, *t<sub>R</sub>* (*S*) = 22.2 min

**1-(5-Metil-2-nitrofenoxi)propan-2-ol (43d)**



**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>

**Aspecto Físico:** Sólido anaranjado

**Rendimiento:** 88%

**R<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.18

**Peso Molecular:** 211.21 g/mol

**Pf:** 53-54 °C

**IR** (KBr):  $\nu$  3583, 3435, 3055, 2985, 2935, 1609, 1592, 1517, 1347, 1182, 1093, 1031, 841 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.26 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.4 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 2.37 (s, 3H, H<sub>10</sub>), 3.02 (sa, 1H, OH), 3.86 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 9.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 4.08 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 9.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.2 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 4.12-4.25 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 6.79 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.3 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6.84 (s, 1H, H<sub>6</sub>), 7.76 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.3 Hz, 1H, H<sub>3</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  18.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 22.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>10</sub>), 66.0 (CH, C<sub>8</sub>), 75.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 115.7 (CH, C<sub>6</sub>), 121.7 (CH, C<sub>4</sub>), 126.2 (CH, C<sub>3</sub>), 137.4 (C, C<sub>2</sub>), 146.4 (C, C<sub>5</sub>), 152.6 (C, C<sub>1</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NNaO<sub>4</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 234.0737, encontrada: 234.0727

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = +3.2$  (*c* 0.65, EtOH) [para (*S*)-**43d** en >99% *ee*]

**Separación analítica de 43d (HPLC):**

Columna: Chiralpak IA

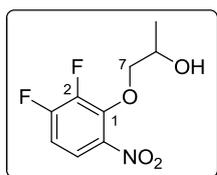
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*R*) = 13.1 min, *t<sub>R</sub>* (*S*) = 19.0 min

**1-(2,3-Difluoro-6-nitrofenoxi)propan-2-ol (43e)**



**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>4</sub>

**Aspecto Físico:** Aceite amarillento

**Rendimiento:** 78%

**R<sub>t</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.51

**Peso Molecular:** 233.17 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3569, 3439, 3054, 2987, 2360, 2307, 1653, 1539, 1355, 1163, 1022, 852, 665 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.25 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.4 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 2.83 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.7 Hz, 1H, OH), 4.10 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 9.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7 Hz, <sup>5</sup>J<sub>FH</sub> = 1.9 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 4.15-4.28 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 4.38 (dt, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 9.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.4 Hz, <sup>5</sup>J<sub>FH</sub> = 2.4 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 7.01 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 8.8 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 7.2 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.72 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.4 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 5.3, <sup>5</sup>J<sub>FH</sub> = 2.4 Hz, 1H, H<sub>5</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  18.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 66.5 (CH, C<sub>8</sub>), 81.2 (d, <sup>4</sup>J<sub>FC</sub> = 5.7 Hz, CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 111.1 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 19.3 Hz, CH, C<sub>4</sub>), 120.9 (dd, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 9.2 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FC</sub> = 4.0 Hz, CH, C<sub>5</sub>), 139.5 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 1.9 Hz, C, C<sub>6</sub>), 143.8 (dd, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 10.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 2.8 Hz, C, C<sub>1</sub>), 144.7 (dd, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 253.0 Hz, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 14.3 Hz, C, C<sub>2</sub>), 154.4 (dd, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 259.6 Hz, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 11.6 Hz, C, C<sub>3</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>F<sub>2</sub>NNaO<sub>4</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 256.0392, encontrada: 256.0390

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = -4.8$  (*c* 0.4, EtOH) [para (*R*)-43e en >99% *ee*]

**Separación analítica de 43e (HPLC):**

Columna: Chiralpak IA

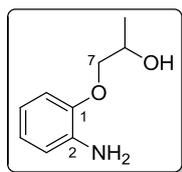
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 98:2

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*R*) = 64.7 min, *t<sub>R</sub>* (*S*) = 84.8 min

**1-(2-Aminofenoxi)propan-2-ol (44a)**



**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**Rendimiento:** 95%

**R<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.16

**Peso Molecular:** 167.21 g/mol

**Pf:** 66-67 °C

**IR** (KBr):  $\nu$  3391, 3054, 2986, 2924, 2340, 1653, 1558, 1506, 1219, 1154 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz):  $\delta$  1.30 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.4 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 3.83 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 9.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 3.94 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 9.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.7 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 4.16 (dq, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5, 3.7 Hz, 1H, H<sub>8</sub>), 4.91 (sa, 3H, OH y NH<sub>2</sub>), 6.66-6.75 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 6.75-6.90 (m, 3H, H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub> y H<sub>6</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz):  $\delta$  19.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 67.1 (CH, C<sub>8</sub>), 74.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 112.9 (CH, Ar), 117.0 (CH, Ar), 119.8 (CH, Ar), 122.3 (CH, Ar), 137.8 (C, C<sub>2</sub>), 148.4 (C, C<sub>1</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>2</sub>)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 168.1019, encontrada: 168.1020

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = +37.0$  (*c* 0.3, EtOH) [para (*S*)-44a en >99% *ee*]

**Separación analítica de 44a (HPLC):**

Columna: Chiralpak IC

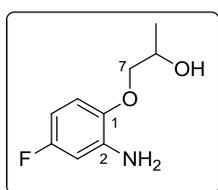
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 80:20

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*R*) = 12.7 min, *t<sub>R</sub>* (*S*) = 15.0 min

**1-(2-Amino-4-fluorofenoxi)propan-2-ol (44b)**



**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>FNO<sub>2</sub>

**Aspecto Físico:** Sólido marrón

**Rendimiento:** 96%

**R<sub>t</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.16

**Peso Molecular:** 185.20 g/mol

**Pf:** 119-121 °C

**IR** (KBr):  $\nu$  3391, 3054, 2985, 2933, 2341, 1623, 1513, 1218, 1160, 1035, 970, 842 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.25 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.4 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 3.77 (sa, 3H, OH y NH<sub>2</sub>), 3.78 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 9.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.8 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 3.90 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 9.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.0 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 4.06-4.25 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 6.36 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 8.6 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.9 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 6.43 (dd, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 9.8 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.9 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 6.68 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.8 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 5.1 Hz, 1H, H<sub>6</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  19.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 66.4 (CH, C<sub>8</sub>), 75.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 102.6 (d, <sup>2</sup>J<sub>FH</sub> = 26.7 Hz, CH, C<sub>3</sub>), 103.9 (d, <sup>2</sup>J<sub>FH</sub> = 23.0 Hz, CH, C<sub>5</sub>), 113.6 (d, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 10.0 Hz, CH, C<sub>6</sub>), 138.0 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 11.0 Hz, C, C<sub>2</sub>), 142.5 (C, C<sub>1</sub>), 158.2 (d, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 237.3 Hz, C, C<sub>4</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>FNO<sub>2</sub>)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 186.0925, encontrada: 186.0941

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = +21.6$  (*c* 0.7, EtOH) [para (*S*)-44b en >99% *ee*]

**Separación analítica de 44b (HPLC):**

Columna: Chiralpak IA

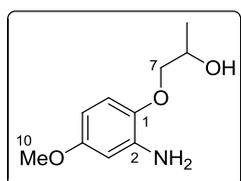
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*R*) = 25.7 min, *t<sub>R</sub>* (*S*) = 28.9 min

1-(2-Amino-4-metoxifenoxi)propan-2-ol (44c)



**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>

**Aspecto Físico:** Sólido amarillento

**Rendimiento:** 98%

**R<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.10

**Peso Molecular:** 197.23 g/mol

**Pf:** 75-76 °C

**IR** (KBr):  $\nu$  3583, 3391, 3054, 2986, 2340, 1623, 1516, 1419, 1220, 1168, 962 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.22 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 3.68 (sa, 3H, OH y NH<sub>2</sub>), 3.70 (s, 3H, H<sub>10</sub>), 3.75 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 9.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.8 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 3.87 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 9.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.1 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 4.07-4.22 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 6.22 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.7 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.9 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 6.30 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.9 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 6.69 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.7 Hz, 1H, H<sub>6</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  18.9 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 55.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>10</sub>), 66.3 (CH, C<sub>8</sub>), 74.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 102.5 (CH, Ar), 102.6 (CH, Ar), 114.2 (CH, C<sub>6</sub>), 137.8 (C, C<sub>2</sub>), 140.9 (C, C<sub>1</sub>), 155.0 (C, C<sub>4</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>3</sub>)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 198.1125, encontrada: 198.1135

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = +23.2$  (*c* 0.5, EtOH) [para (*S*)-44c en >99% *ee*]

**Separación analítica de 44c (HPLC):**

Columna: Chiralpak IC

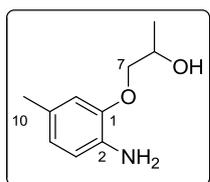
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 80:20

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*R*) = 26.9 min, *t<sub>R</sub>* (*S*) = 33.2 min

1-(2-Amino-5-metilfenoxi)propan-2-ol (44d)



**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>

**Aspecto Físico:** Sólido rosado

**Rendimiento:** 93%

**R<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.15

**Peso Molecular:** 181.23 g/mol

**Pf:** 76-78 °C

**IR** (KBr):  $\nu$  3402, 3054, 2985, 2929, 2523, 2307, 1592, 1520, 1420, 1152, 1132, 1041, 812 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 400.13 MHz):  $\delta$  1.26 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 2.21 (s, 3H, H<sub>10</sub>), 3.78 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 9.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 3.88 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 9.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.7 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 4.11 (dq, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5, 3.8 Hz, 1H, H<sub>8</sub>), 4.86 (sa, 3H, OH y NH<sub>2</sub>), 6.56 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.8 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 6.64 (s, 1H, H<sub>6</sub>), 6.66 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.8 Hz, 1H, H<sub>4</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 100.6 MHz):  $\delta$  19.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 21.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>10</sub>), 67.1 (CH, C<sub>8</sub>), 74.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 113.8 (CH, Ar), 117.2 (CH, Ar), 122.5 (CH, C<sub>4</sub>), 129.6 (C, C<sub>5</sub>), 134.8 (C, C<sub>2</sub>), 148.4 (C, C<sub>1</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>2</sub>)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 182.1176, encontrada: 182.1173

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = +12.5$  (*c* 0.6, EtOH) [para (*S*)-44d en >99% *ee*]

**Separación analítica de 44d (HPLC):**

Columna: Chiralpak IC

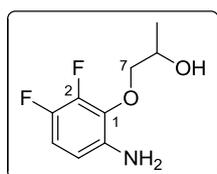
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 80:20

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*R*) = 14.3 min, *t<sub>R</sub>* (*S*) = 17.7 min

1-(6-Amino-2,3-difluorofenoxi)propan-2-ol (**44e**)



**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>

**Aspecto Físico:** Sólido amarillo

**Rendimiento:** 65%

**R<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.25

**Peso Molecular:** 203.19 g/mol

**Pf:** 56-58 °C

**IR** (KBr):  $\nu$ , 3054, 2986, 1653, 1559, 1507, 1490, 1419, 1165, 1047, 896 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz):  $\delta$  1.19 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.4 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 3.61 (sa, 3H, OH y NH<sub>2</sub>), 3.83 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.8 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 4.03-4.16 (m, 2H, H<sub>7</sub> y H<sub>8</sub>), 6.39 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.0 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 4.8, <sup>5</sup>J<sub>FH</sub> = 2.3 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6.70 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 9.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.0 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 8.1 Hz, 1H, H<sub>5</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz):  $\delta$  18.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 66.6 (CH, C<sub>8</sub>), 79.3 (d, <sup>4</sup>J<sub>FC</sub> = 3.3 Hz, CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 109.6 (dd, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 6.9 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FC</sub> = 3.2 Hz, CH, C<sub>5</sub>), 111.4 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 17.8 Hz, CH, C<sub>4</sub>), 135.5 (dd, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 10.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 1.3 Hz, C, C<sub>1</sub>), 136.8 (dd, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 2.7 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FC</sub> = 1.2 Hz, C, C<sub>6</sub>), 144.7 (dd, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 239.0 Hz, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 11.3 Hz, C, Ar), 144.9 (dd, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 247.1 Hz, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 14.6 Hz, C, Ar) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 204.0831, encontrada: 204.0857

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = -22.4$  (*c* 0.7, EtOH) [para (*R*)-**44e** en >99% *ee*]

**Separación analítica de 44e (HPLC):**

Columna: Chiralcel OJ-H

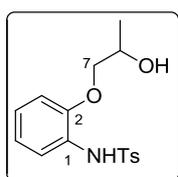
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*R*) = 15.9 min, *t<sub>R</sub>* (*S*) = 21.1 min

***N*-(2-(2-Hidroxipropoxi)fenil)-4-metilbencenosulfonamida (45a)**



**Fórmula empírica:** C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>S

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**Rendimiento:** 78%

**R<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.25

**Peso Molecular:** 321.39 g/mol

**Pf:** 166-167 °C

**IR** (KBr):  $\nu$  3545, 3297, 3054, 2985, 2920, 2343, 1596, 1501, 1404, 1340, 1156, 1114, 1088, 934, 819 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 300.13 MHz):  $\delta$  1.13 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.4 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 2.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ts), 3.61 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 9.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.6 Hz 1H, H<sub>7</sub>), 3.71 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 9.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.2 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 3.90-4.03 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 4.50 (sa, 1H, NH/OH), 6.84-6.97 (m, 2H, Ar), 7.05 (td, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.8 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.7 Hz, 1H, Ar), 7.23-7.34 (m, 2H, 2CH-Ts), 7.51 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.8 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.6 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.58-7.69 (m, 2H, 2CH-Ts), 8.46 (sa, 1H, NH/OH) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 75.5 MHz):  $\delta$  19.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 21.3 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-Ts), 66.0 (CH, C<sub>8</sub>), 75.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 113.4 (CH, C<sub>3</sub>), 121.7 (CH, Ar), 123.7 (CH, Ar), 126.6 (CH, Ar), 127.4 (C, C<sub>1</sub>), 127.9 (2xCH, 2CH-Ts), 130.1 (2xCH, 2CH-Ts), 138.2 (C, C-Ts), 144.2 (C, C-Ts), 151.0 (C, C<sub>2</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>NNaO<sub>4</sub>S)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 344.0927, encontrada: 344.0941

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = +15.1$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>) [para (*S*)-45a en >99% *ee*]

**Separación analítica de 45a (HPLC):**

Columna: Chiralpak IC

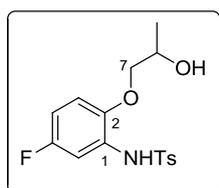
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 70:30

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*S*) = 16.7 min, *t<sub>R</sub>* (*R*) = 21.9 min

***N*-(5-Fluoro-2-(2-hidroxiopropoxi)fenil)-4-metilbencenosulfonamida (45b)**



**Fórmula empírica:** C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>FNO<sub>4</sub>S

**Aspecto Físico:** Aceite viscoso incoloro

**Rendimiento:** 80%

***R<sub>f</sub>*** (60% Et<sub>2</sub>O/hexano): 0.14

**Peso Molecular:** 339.38 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3342, 3054, 2986, 2934, 2362, 1616, 1506, 1419, 1339, 1170, 1153, 1091, 1034, 812 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 300.13 MHz):  $\delta$  1.15 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 2.34 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ts), 3.61 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 9.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, 1H), 3.77 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 9.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 3.0 Hz, 1H), 3.94-4.07 (m, 1H), 4.69 (sa, 1H, NH/OH), 6.78 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 9.0 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>FH</sub> = 8.3 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>HH</sub> = 3.1 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6.91 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 9.0 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>FH</sub> = 5.1 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 7.19-7.39 (m, 3H, H<sub>6</sub> y 2CH-Ts), 7.66-7.74 (m, 2H, 2CH-Ts), 8.74 (sa, 1H, NH/OH) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 75.5 MHz):  $\delta$  19.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 21.3 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-Ts), 66.0 (CH, C<sub>8</sub>), 76.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 109.5 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>FC</sub> = 27.8 Hz, CH, C<sub>6</sub>), 111.6 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>FC</sub> = 23.0 Hz, CH, C<sub>4</sub>), 114.9 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>FC</sub> = 9.4 Hz, CH, C<sub>3</sub>), 127.9 (2xCH, 2CH-Ts), 129.0 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>FC</sub> = 11.0 Hz, C, C<sub>1</sub>), 130.3 (2xCH, 2CH-Ts), 137.8 (C, C-Ts), 144.6 (C, C-Ts), 146.8 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>FC</sub> = 2.2 Hz, C, C<sub>2</sub>), 157.6 (d, <sup>1</sup>*J*<sub>FC</sub> = 237.0 Hz, C, C<sub>5</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>FNNaO<sub>4</sub>S)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 362.0833, encontrada: 362.0847

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = +16.0$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>) [para (*S*)-45b en >99% *ee*]

**Separación analítica de 45b (HPLC):**

Columna: Chiralpak IC

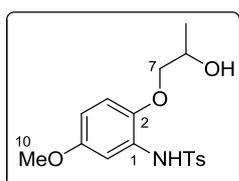
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 80:20

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*S*) = 16.8 min, *t<sub>R</sub>* (*R*) = 20.8 min

***N*-(2-(2-Hidroxiopropoxi)-5-metoxifenil)-4-metilbencenosulfonamida (45c)**



**Fórmula empírica:** C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>S

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**Rendimiento:** 71%

***R<sub>f</sub>*** (40% AcOEt/hexano): 0.18

**Peso Molecular:** 351.42 g/mol

**Pf:** 132-133 °C

**IR** (KBr):  $\nu$  3339, 3054, 2935, 2356, 1504, 1420, 1340, 1159, 1088, 956, 816 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 300.13 MHz):  $\delta$  1.14 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.4 Hz, 3H, C<sub>9</sub>), 2.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ts), 3.54 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 9.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.7 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 3.69-3.75 (m, 1H, H<sub>7</sub>), 3.71 (s, 3H, H<sub>10</sub>), 3.92-4.07 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 4.53 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.1 Hz, 1H, OH), 6.58 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.9 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 3.0 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6.83 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.9 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 7.13 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 3.0 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.23-7.32 (m, 2H, 2CH-Ts), 7.67-7.72 (m, 2H, 2CH-Ts), 8.58 (sa, 1H, NH) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 75.5 MHz):  $\delta$  19.3 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 21.3 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-Ts), 55.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>10</sub>), 66.1 (CH, C<sub>8</sub>), 76.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 108.9 (CH, Ar), 110.2 (CH, Ar), 115.4 (CH, C<sub>3</sub>), 128.1 (2xCH, 2CH-Ts), 128.9 (C, C<sub>1</sub>), 130.2 (2xCH, 2CH-Ts), 138.1 (C, C-Ts), 144.4 (C, Ar), 144.6 (C, Ar), 155.1 (C, C<sub>5</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>NNaO<sub>5</sub>S)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 374.1033, encontrada: 374.1050

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = +24.2$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>) [para (*S*)-45c en >99% *ee*]

**Separación analítica de 45c (HPLC):**

Columna: Chiralpak IC

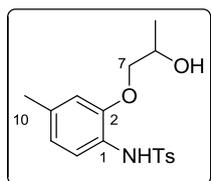
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 80:20

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*S*) = 38.4 min, *t<sub>R</sub>* (*R*) = 44.9 min

***N*-(2-(2-Hidroxiopropoxi)-4-metilfenil)-4-metilbencenosulfonamida (45d)**



**Fórmula empírica:** C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>S

**Aspecto Físico:** Sólido rosado

**Rendimiento:** 75%

***R*<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.27

**Peso Molecular:** 335.42 g/mol

**Pf:** 139-141 °C

**IR** (KBr):  $\nu$  3054, 2986, 2928, 2307, 1596, 1507, 1419, 1339, 1164, 1123, 1092, 815 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 400.13 MHz):  $\delta$  1.14 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 2.22 (s, 3H, H<sub>10</sub>), 2.31 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ts), 3.60 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 9.4 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 3.67 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 9.4 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 3.2 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 3.90-4.01 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 4.54 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 4.2 Hz, 1H, OH), 6.69-6.74 (m, 2H, Ar), 7.23 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 8.1 Hz, 2H, 2CH-Ts), 7.38 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.8 Hz, 1H, Ar), 7.61 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 8.3 Hz, 2H, 2CH-Ts), 8.37 (sa, 1H, NH) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, 100.6 MHz):  $\delta$  19.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 21.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>10</sub>), 21.3 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-Ts), 66.1 (CH, C<sub>8</sub>), 75.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 114.0 (CH, Ar), 122.1 (CH, Ar), 124.1 (CH, C<sub>5</sub>), 124.6 (C, C<sub>1</sub>), 127.9 (2xCH, 2CH-Ts), 130.0 (2xCH, 2CH-Ts), 136.6 (C, C<sub>4</sub>), 138.2 (C, C-Ts), 144.0 (C, C-Ts), 151.0 (C, C<sub>2</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>NNaO<sub>4</sub>S)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 358.1083, encontrada: 358.1096

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +9.2$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>) [para (*S*)-45d en >99% *ee*]

**Separación analítica de 45d (HPLC):**

Columna: Chiralpak IC

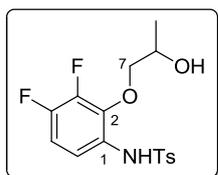
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 80:20

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t*<sub>R</sub> (*S*) = 32.3 min, *t*<sub>R</sub> (*R*) = 46.3 min

***N*-(3,4-Difluoro-2-(2-hidroxiopropoxi)fenil)-4-metilbencenosulfonamida (45e)**



**Fórmula empírica:** C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>4</sub>S

**Aspecto Físico:** Aceite viscoso incoloro

**Rendimiento:** 80%

***R*<sub>t</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.41

**Peso Molecular:** 357.37 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3349, 3054, 2986, 2359, 1653, 1559, 1507, 1490, 1419, 1265, 1165, 1047, 896, 738, 705 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.20 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6.4 Hz, 3H, C<sub>9</sub>), 2.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ts), 3.30 (sa, 1H, NH/OH), 3.59 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 10.3 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 8.1 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 3.93 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 10.4 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 2.3 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 4.04-4.18 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 6.83 (td, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 9.4 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>FH</sub> = 9.4, <sup>4</sup>*J*<sub>FH</sub> = 8.1 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.22 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 8.2 Hz, 2H, 2CH-Ts), 7.30 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 9.4 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>FH</sub> = 5.2, <sup>5</sup>*J*<sub>FH</sub> = 2.4 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.69 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 8.3 Hz, 2H, 2CH-Ts), 8.69 (sa, 1H, NH/OH) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  19.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 21.7 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-Ts), 66.7 (CH, C<sub>8</sub>), 79.8 (d, <sup>4</sup>*J*<sub>FC</sub> = 3.6 Hz, CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 111.8 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>FC</sub> = 18.1 Hz, CH, C<sub>5</sub>), 116.5 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>FC</sub> = 11.4 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>FC</sub> = 3.8 Hz, CH, C<sub>6</sub>), 127.5 (2xCH, 2CH-Ts), 127.9 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>FC</sub> = 3.2 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>FC</sub> = 1.9 Hz, C<sub>1</sub>), 129.8 (2xCH, 2CH-Ts), 136.3 (C, C-Ts), 139.7 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>FC</sub> = 10.6 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>FC</sub> = 2.0 Hz, C, C<sub>2</sub>), 144.2 (C, C-Ts), 144.6 (dd, <sup>1</sup>*J*<sub>FC</sub> = 248.7 Hz, <sup>2</sup>*J*<sub>FC</sub> = 14.3 Hz, C, Ar), 148.4 (dd, <sup>1</sup>*J*<sub>FC</sub> = 247.0 Hz, <sup>2</sup>*J*<sub>FC</sub> = 11.1 Hz, C, Ar) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>F<sub>2</sub>NNaO<sub>4</sub>S)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 380.0739, encontrada: 380.0736

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = -21.5$  (*c* 0.6, EtOH) [para (*R*)-45e en >99% *ee*]

**Separación analítica de 45e (HPLC):**

Columna: Chiralpak IC

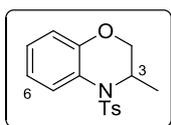
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t*<sub>R</sub> (*S*) = 23.2 min, *t*<sub>R</sub> (*R*) = 25.4 min

**3-Metil-4-tosil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzo[*b*]oxazina (46a)**



**Fórmula empírica:** C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub>S

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 99%

***R*<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.72

**Peso Molecular:** 303.38 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3054, 2986, 2340, 1599, 1559, 1490, 1350, 1170, 1072, 1015, 815 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.22 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6.9 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 2.38 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ts), 3.20 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 11.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 2.2 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 3.79 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 11.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 1.3 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4.27-4.63 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 6.80 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 8.0 Hz, 1H, H<sub>8</sub>), 6.95 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.7 Hz, 1H, Ar), 7.08 (t, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.6 Hz, 1H, Ar), 7.21 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.9 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>HH</sub> = 0.5 Hz, 2H, 2CH-Ts), 7.46 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.9 Hz, 2H, 2CH-Ts), 7.89 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 8.0 Hz, 1H, H<sub>5</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  17.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 21.7 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-Ts), 48.7 (CH, C<sub>3</sub>), 66.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 117.2 (CH, C<sub>8</sub>), 121.3 (CH, Ar), 122.0 (C, C<sub>4a</sub>), 126.1 (CH, Ar), 126.3 (CH, Ar), 127.3 (2xCH, 2CH-Ts), 130.0 (2xCH, 2CH-Ts), 135.5 (C, C-Ts), 144.3 (C, C-Ts), 146.1 (C, C<sub>8a</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NNaO<sub>3</sub>S)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 326.0821, encontrada: 326.0814

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = +164.8$  (*c* 1.0, EtOH) [para (*R*)-46a en >99% *ee*]

**Separación analítica de 46a (HPLC):**

Columna: Chiralcel OJ-H

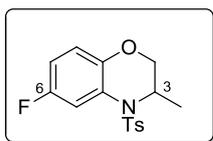
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t*<sub>R</sub> (*R*) = 16.6 min, *t*<sub>R</sub> (*S*) = 19.8 min

**6-Fluoro-3-metil-4-tosil-3,4-dihidro-2H-1,4-benzo[*b*]oxazina (46b)**



**Fórmula empírica:** C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>FNO<sub>3</sub>S

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**Rendimiento:** 94%

**R<sub>f</sub>** (60% AcOEt/hexano): 0.64

**Peso Molecular:** 321.37 g/mol

**Pf:** 81-83 °C

**IR** (KBr):  $\nu$  3054, 2987, 2929, 2341, 1616, 1597, 1499, 1419, 1353, 1212, 1169, 970, 936, 814 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.22 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ts), 3.16 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.6 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 3.80 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.5 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4.37-4.47 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 6.73-6.88 (m, 2H, H<sub>7</sub> y H<sub>8</sub>), 7.24 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.4 Hz, 2H, 2CH-Ts), 7.51 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.3 Hz, 2H, 2CH-Ts), 7.69 (dd, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 10.5 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.7 Hz, 1H, H<sub>5</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  17.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 21.7 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-Ts), 48.8 (CH, C<sub>3</sub>), 66.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 112.1 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 27.7 Hz, CH, Ar), 113.0 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 23.5 Hz, CH, Ar), 117.8 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 9.0 Hz, CH, C<sub>8</sub>), 122.5 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 10.9 Hz, C, C<sub>4a</sub>), 127.3 (2xCH, 2CH-Ts), 130.1 (2xCH, 2CH-Ts), 135.3 (C, C-Ts), 142.1 (d, <sup>4</sup>J<sub>FC</sub> = 2.5 Hz, C, C<sub>8a</sub>), 144.5 (C, C-Ts), 156.8 (d, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 238.2 Hz, C, C<sub>6</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>FNNaO<sub>3</sub>S)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 344.0727, encontrada: 344.0742

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = +171.7$  (*c* 1.0, EtOH) [para (*R*)-**46b** en >99% *ee*]

**Separación analítica de 46b (HPLC):**

Columna: Chiralcel OJ-H

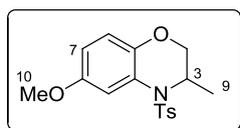
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*S*) = 15.7 min, *t<sub>R</sub>* (*R*) = 20.7 min

**3-Metil-6-metoxi-4-tosil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzo[*b*]oxazina (46c)**



**Fórmula empírica:** C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>S

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**Rendimiento:** 94%

**R<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.66

**Peso Molecular:** 333.40 g/mol

**Pf:** 150-152 °C

**IR** (KBr):  $\nu$  3734, 3054, 2986, 2360, 2342, 1761, 1646, 1559, 1506, 1420, 1363, 1168, 933, 814 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.22 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 2.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ts), 3.12 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.5 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 3.74 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.5 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 3.80 (s, 3H, H<sub>10</sub>), 4.34-4.50 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 6.66 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.0 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.8 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 6.72 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.9 Hz, 1H, H<sub>8</sub>), 7.21 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.1 Hz, 2H, 2CH-Ts), 7.44-7.54 (m, 3H, H<sub>5</sub> y 2CH-Ts) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  17.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 21.7 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-Ts), 48.9 (CH, C<sub>3</sub>), 55.9 (CH<sub>3</sub>, C<sub>10</sub>), 65.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 109.8 (CH, Ar), 110.1 (CH, Ar), 117.6 (CH, C<sub>8</sub>), 122.2 (C, C<sub>4a</sub>), 127.3 (2xCH, 2CH-Ts), 130.0 (2xCH, 2CH-Ts), 135.4 (C, C-Ts), 140.1 (C, C<sub>8a</sub>), 144.3 (C, C-Ts), 153.7 (C, C<sub>6</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NNaO<sub>4</sub>S)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 356.0927, encontrada: 356.0944

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +333.9$  (*c* 1.0, EtOH) [para (*R*)-46c en >99% *ee*]

**Separación analítica de 46c (HPLC):**

Columna: Chiralcel OJ-H

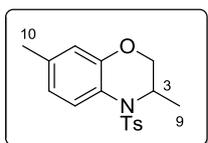
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*R*) = 20.7 min, *t<sub>R</sub>* (*S*) = 26.2 min

**3, 7-Dimetil-4-tosil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzo[*b*]oxazina (46d)**



**Fórmula empírica:** C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>S

**Aspecto Físico:** Aceite viscoso amarronado

**Rendimiento:** 99%

**R<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.57

**Peso Molecular:** 317.40 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3032, 2981, 2934, 2892, 2340, 1918, 1598, 1577, 1500, 1349, 1321, 1219, 1167, 1069, 917, 813 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.20 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 2.28 (s, 3H, H<sub>10</sub>), 2.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ts), 3.16 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.5 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 3.75 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 11.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 1.4 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4.34-4.46 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 6.61 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.2 Hz, 1H, H<sub>8</sub>), 6.76 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.4 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.4 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.21 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.0 Hz, 2H, 2CH-Ts), 7.46 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.3 Hz, 2H, 2CH-Ts), 7.75 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.4 Hz, 1H, H<sub>5</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  17.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 21.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>10</sub>), 21.7 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-Ts), 48.7 (CH, C<sub>3</sub>), 66.0 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 117.4 (CH, C<sub>8</sub>), 119.3 (C, C<sub>4a</sub>), 122.2 (CH, C<sub>6</sub>), 125.9 (CH, C<sub>5</sub>), 127.3 (2xCH, 2CH-Ts), 129.9 (2xCH, 2CH-Ts), 135.5 (C, C-Ts), 136.4 (C, C<sub>7</sub>), 144.1 (C, C-Ts), 145.9 (C, C<sub>8a</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NNaO<sub>3</sub>S)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 340.0978, encontrada: 340.0990

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = +210.1$  (*c* 1.0, EtOH) [para (*R*)-46d en >99% *ee*]

**Separación analítica de 46d (HPLC):**

Columna: Chiralcel OJ-H

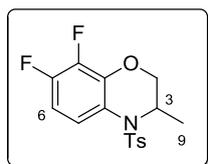
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*R*) = 14.9 min, *t<sub>R</sub>* (*S*) = 17.9 min

**7,8-Difluoro-3-metil-4-tosil-3,4-dihidro-2H-1,4-benzo[*b*]oxazina (46e)**



**Fórmula empírica:** C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>S

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**Rendimiento:** >99%

***R<sub>f</sub>*** (30% AcOEt/hexano): 0.42

**Peso Molecular:** 339.36 g/mol

**Pf:** 85-87 °C

**IR** (KBr):  $\nu$  3054, 2987, 2343, 1598, 1508, 1484, 1361, 1183, 1166, 1038, 815 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz):  $\delta$  1.21 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.0 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 2.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub>-Ts), 3.17 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 11.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 2.6 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 3.92 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 11.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 0.9 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4.43-4.50 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 6.78 (td, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 9.6 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>FH</sub> = 9.6, <sup>4</sup>*J*<sub>FH</sub> = 8.2, 1H, H<sub>6</sub>), 7.24 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 8.1 Hz, 2H, 2CH-Ts), 7.44 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 8.3 Hz, 2H, 2CH-Ts), 7.64 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 9.5 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>FH</sub> = 5.2, <sup>5</sup>*J*<sub>FH</sub> = 2.5 Hz, 1H, H<sub>5</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 100.6 MHz):  $\delta$  17.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 21.7 (CH<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>-Ts), 48.3 (CH, C<sub>3</sub>), 66.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 108.3 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>FC</sub> = 18.4 Hz, CH, C<sub>6</sub>), 119.4 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>FC</sub> = 3.0 Hz, C, C<sub>4a</sub>), 120.4 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>FC</sub> = 7.8 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>FC</sub> = 4.2 Hz, CH, C<sub>5</sub>), 127.3 (2xCH, 2CH-Ts), 130.2 (2xCH, 2CH-Ts), 135.0 (C, C-Ts), 136.7 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>FC</sub> = 10.1 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>FC</sub> = 3.4 Hz, C, C<sub>8a</sub>), 140.0 (dd, <sup>1</sup>*J*<sub>FC</sub> = 247.4 Hz, <sup>2</sup>*J*<sub>FC</sub> = 15.6 Hz, C, C<sub>7</sub>), 144.8 (C, C-Ts), 148.6 (dd, <sup>1</sup>*J*<sub>FC</sub> = 245.7 Hz, <sup>2</sup>*J*<sub>FC</sub> = 10.1 Hz, C, C<sub>8</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>F<sub>2</sub>NNaO<sub>3</sub>S)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 362.0633, encontrada: 362.0628

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = -183.2$  (*c* 0.5, EtOH) [para (*S*)-46e en >99% *ee*]

**Separación analítica de 46e (HPLC):**

Columna: Chiralcel OJ-H

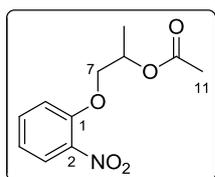
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*R*) = 17.1 min, *t<sub>R</sub>* (*S*) = 20.5 min

Acetato de 1-(2-nitrofenoxi)propan-2-ilo (47a)



**Fórmula empírica:** C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub>

**Aspecto Físico:** Aceite amarillo

**Rendimiento:** 94%

**R<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.41

**Peso Molecular:** 239.22 g/mol

**IR** (KBr):  $\nu$  3055, 2986, 2940, 2343, 1734, 1609, 1528, 1355, 1239, 1091, 1035, 992, 860 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.38 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 2.06 (s, 3H, H<sub>11</sub>), 4.12 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.1 Hz, 2H, H<sub>7</sub>), 5.14-5.53 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 6.96-7.17 (m, 2H, H<sub>6</sub> y H<sub>4</sub>), 7.51 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.0, 7.5 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.7 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.82 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.1 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.6 Hz, 1H, H<sub>3</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  16.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 21.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>11</sub>), 68.3 (CH, C<sub>8</sub>), 71.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 114.9 (CH, C<sub>6</sub>), 121.0 (CH, C<sub>4</sub>), 125.8 (CH, C<sub>3</sub>), 134.2 (CH, C<sub>5</sub>), 140.2 (C, C<sub>2</sub>), 151.9 (C, C<sub>1</sub>), 170.7 (C, C<sub>10</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NNaO<sub>5</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 262.0686, encontrada: 262.0708

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = -74.3$  (*c* 1.0, CHCl<sub>3</sub>) [para (*S*)-47a en 93% *ee*]

**Separación analítica de 47a (HPLC):**

Columna: Chiralpak IA

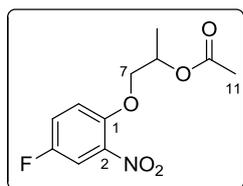
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*R*) = 9.0 min, *t<sub>R</sub>* (*S*) = 9.6 min

Acetato de 1-(4-fluoro-2-nitrofenoxi)propan-2-ilo (47b)



**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>FNO<sub>4</sub>

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**Rendimiento:** 88%

**R<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.67

**Peso Molecular:** 257.21 g/mol

**Pf:** 63-64 °C

**IR** (KBr):  $\nu$  3055, 2987, 2307, 1738, 1537, 1499, 1373, 1357, 1241, 1203, 1142, 1083, 1034, 943, 814, 788 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.37 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 2.05 (s, 3H, H<sub>11</sub>), 4.11 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.0 Hz, 2H, H<sub>7</sub>), 5.18-5.30 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 7.06 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.2 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 4.3 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.26 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 7.4, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 3.1 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.57 (dd, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 7.7 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 3.1 Hz, 1H, H<sub>3</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  16.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 21.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>11</sub>), 68.2 (CH, C<sub>8</sub>), 72.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 113.0 (d, <sup>2</sup>J<sub>FH</sub> = 27.4 Hz, CH, C<sub>5</sub>), 116.7 (d, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 7.9 Hz, CH, C<sub>6</sub>), 121.1 (d, <sup>2</sup>J<sub>FH</sub> = 22.9 Hz, CH, C<sub>3</sub>), 139.3 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 9.6 Hz, C, C<sub>2</sub>), 148.5 (d, <sup>4</sup>J<sub>FC</sub> = 2.6 Hz, C, C<sub>1</sub>), 155.7 (d, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 244.6 Hz, C, C<sub>4</sub>), 170.6 (C, C<sub>10</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>FNNaO<sub>5</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 280.0592, encontrada: 280.0613

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = +58.8$  (*c* 0.75, CHCl<sub>3</sub>) [para (*R*)-47b en 91% *ee*]

**Separación analítica de 47b (HPLC):**

Columna: Chiralpak IA

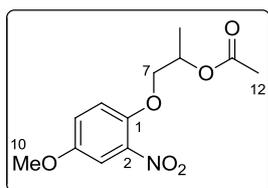
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*R*) = 8.6 min, *t<sub>R</sub>* (*S*) = 9.5 min

Acetato de 1-(4-metoxi-2-nitrofenoxi)propan-2-ilo (47c)



Fórmula empírica: C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>6</sub>

Aspecto Físico: Sólido amarillo

Rendimiento: 92%

R<sub>f</sub> (40% AcOEt/hexano): 0.46

Peso Molecular: 269.25 g/mol

Pf: 55-56 °C

IR (KBr):  $\nu$  3055, 2986, 2307, 1734, 1533, 1499, 1373, 1354, 1243, 1041, 812 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.35 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 2.06 (s, 3H, H<sub>12</sub>), 3.80 (s, 3H, H<sub>10</sub>), 4.07 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.8 Hz, 2H, H<sub>7</sub>), 5.16-5.28 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 7.01 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.1 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.07 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.1 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 3.0 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.34 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.9 Hz, 1H, H<sub>3</sub>) ppm

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  16.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 21.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>12</sub>), 56.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>10</sub>), 68.5 (CH, C<sub>8</sub>), 72.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 109.9 (CH, Ar), 117.4 (CH, Ar), 120.8 (CH, C<sub>5</sub>), 140.5 (C, C<sub>2</sub>), 146.2 (C, C<sub>1</sub>), 153.6 (C, C<sub>4</sub>), 170.7 (C, C<sub>11</sub>) ppm

HRMS (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NNaO<sub>6</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 292.0792, encontrada: 292.0796

Rotación Óptica Específica:  $[\alpha]_D^{20} = -49.7$  (*c* 0.7, CHCl<sub>3</sub>) [para (*S*)-47c en 80% *ee*]

Separación analítica de 47c (HPLC):

Columna: Chiralpak IA

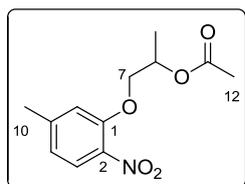
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t*<sub>R</sub> (*R*) = 10.5 min, *t*<sub>R</sub> (*S*) = 11.2 min

Acetato de 1-(5-metil-2-nitrofenoxi)propan-2-ilo (47d)



**Fórmula empírica:** C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>5</sub>

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**Rendimiento:** 90%

**R<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.63

**Peso Molecular:** 253.25 g/mol

**Pf:** 76-77 °C

**IR** (KBr):  $\nu$  3054, 2987, 2306, 1734, 1609, 1521, 1423, 1093, 1040 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.39 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 2.06 (s, 3H, H<sub>12</sub>), 2.40 (s, 3H, H<sub>10</sub>), 4.11 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.1 Hz, 2H, H<sub>7</sub>), 5.22-5.31 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 6.83 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.3 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 0.7 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6.86 (s, 1H, H<sub>6</sub>), 7.77 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.2 Hz, 1H, H<sub>3</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  16.7 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 21.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>12</sub>), 22.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>10</sub>), 68.4 (CH, C<sub>8</sub>), 71.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 115.5 (CH, C<sub>6</sub>), 121.7 (CH, C<sub>4</sub>), 126.0 (CH, C<sub>3</sub>), 137.9 (C, C<sub>2</sub>), 145.9 (C, C<sub>5</sub>), 152.2 (C, C<sub>1</sub>), 170.7 (C, C<sub>11</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NNaO<sub>5</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 276.0842, encontrada: 276.0856

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_D^{20} = -63.8$  (*c* 0.8, CHCl<sub>3</sub>) [para (*S*)-47d en 85% *ee*]

**Separación analítica de 47d (HPLC):**

Columna: Chiralpak IA

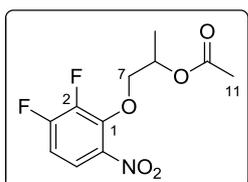
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 97:3

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*R*) = 13.7 min, *t<sub>R</sub>* (*S*) = 14.6 min

Acetato de 1-(2,3-difluoro-6-nitrofenoxi)propan-2-ilo (47e)



Fórmula empírica: C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>F<sub>2</sub>NO<sub>5</sub>

Aspecto Físico: Aceite amarillo

Rendimiento: 93%

*R<sub>f</sub>* (40% AcOEt/hexano): 0.68

Peso Molecular: 275.21 g/mol

IR (KBr):  $\nu$  3447, 3059, 2988, 2942, 2886, 2343, 1739, 1627, 1541, 1495, 1357, 1237, 1020, 813 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.33 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, 3H), 2.03 (s, 3H), 4.23 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 5.9 Hz, <sup>5</sup>J<sub>FH</sub> = 0.9 Hz, 1H), 4.33 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.3 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 3.4 Hz, <sup>5</sup>J<sub>FH</sub> = 1.0 Hz, 1H), 5.16-5.28 (m, 1H), 7.01 (td, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 9.1 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 7.2 Hz, 1H), 7.66 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.4 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 5.2 Hz, <sup>5</sup>J<sub>FH</sub> = 2.4 Hz, 1H) ppm

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  16.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 21.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>11</sub>), 68.8 (CH, C<sub>8</sub>), 77.2 (d, <sup>4</sup>J<sub>FC</sub> = 5.2 Hz, CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 111.4 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 19.4 Hz, CH, C<sub>4</sub>), 120.4 (dd, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 9.1 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FC</sub> = 4.1 Hz, CH, C<sub>5</sub>), 140.3 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 2.2 Hz, C, C<sub>6</sub>), 143.4 (dd, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 9.7 Hz, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 4.41 Hz, C, C<sub>1</sub>), 144.9 (dd, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 253.6 Hz, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 14.2 Hz, C, C<sub>2</sub>), 154.0 (dd, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 259.0 Hz, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 11.3 Hz, C, C<sub>3</sub>), 170.5 (C, C<sub>10</sub>) ppm

HRMS (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>F<sub>2</sub>NNaO<sub>5</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 298.0497, encontrada: 298.0528

Rotación Óptica Específica:  $[\alpha]_D^{20} = -18.5$  (*c* 0.6, CHCl<sub>3</sub>) [para (*S*)-47e en 63% *ee*]

Separación analítica de 47e (HPLC):

Columna: Chiralpak IA

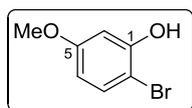
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 98:2

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t<sub>R</sub>* (*R*) = 13.8 min, *t<sub>R</sub>* (*S*) = 15.3 min

**2-Bromo-5-metoxifenol (50e)**



**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>BrO<sub>2</sub>

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 75%

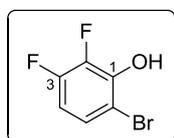
**R<sub>f</sub>** (15% Et<sub>2</sub>O/hexano): 0.18      **Peso Molecular:** 203.03 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3493, 3005, 2940, 2837, 1590, 1504, 1488, 1429, 1297, 1269, 1254, 1207, 1153, 1119, 1052, 1018 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  3.76 (s, 3H, OMe), 5.48 (s, 1H, OH), 6.42 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.9 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.9 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6.60 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.9 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.31 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.9 Hz, 1H, H<sub>3</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  55.6 (CH<sub>3</sub>, OMe), 101.0 (C, C<sub>2</sub>), 101.8 (CH, C<sub>6</sub>), 108.6 (CH, C<sub>4</sub>), 132.1 (CH, C<sub>3</sub>), 153.1 (C, C<sub>1</sub>), 160.7 (C, C<sub>5</sub>) ppm

**6-Bromo-2,3-difluorofenol (56)**



**Fórmula empírica:** C<sub>6</sub>H<sub>3</sub>BrF<sub>2</sub>O

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 91%

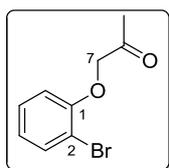
**R<sub>f</sub>** (15% Et<sub>2</sub>O/hexano): 0.33      **Peso Molecular:** 208.99 g/mol

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  5.16 (br s, 1H, OH), 6.69 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 9.3 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 7.4 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.20 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.3 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 5.2, <sup>5</sup>J<sub>HF</sub> = 2.5 Hz, 1H, H<sub>5</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  105.4 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 3.4 Hz, C, C<sub>6</sub>), 109.4 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 18.6 Hz, CH, C<sub>4</sub>), 126.2 (dd, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 7.7 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FC</sub> = 4.4 Hz, CH, C<sub>5</sub>), 140.8 (dd, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 248.1 Hz, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 15.6 Hz, C, C<sub>2</sub>), 143.0 (dd, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 11.2 Hz, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 3.4 Hz, C, C<sub>1</sub>), 150.8 (dd, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 248.3 Hz, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 10.6 Hz, C, C<sub>3</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>-</sup>, *m/z*) (C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>BrF<sub>2</sub>O)<sup>-</sup> (M-H)<sup>-</sup>: calculada 206.9263, encontrada: 206.9274

**1-(2-Bromofenoxi)propan-2-ona (51a)**



**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>BrO<sub>2</sub>

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 95%

**R<sub>f</sub>** (30% AcOEt/hexano): 0.53

**Peso Molecular:** 229.07 g/mol

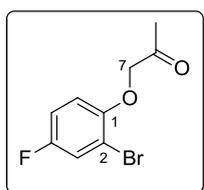
**IR** (NaCl):  $\nu$  3450, 3066, 3007, 2919, 1732, 1586, 1575, 1478, 1444, 1431, 1360, 1294, 1237, 1174, 1128, 1067, 1031, 969, 932, 863, 830 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.37 (s, 3H, H<sub>9</sub>), 4.54 (s, 2H, H<sub>7</sub>), 6.77 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.2 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.3 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 6.89 (td, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.9 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.3 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.17-7.39 (m, 1H, H<sub>5</sub>), 7.58 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.9 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.6 Hz, 1H, H<sub>3</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  27.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 73.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 112.3 (C, C<sub>2</sub>), 113.3 (CH, C<sub>6</sub>), 123.1 (CH, C<sub>4</sub>), 128.7 (CH, C<sub>5</sub>), 133.9 (CH, C<sub>3</sub>), 154.3 (C, C<sub>1</sub>), 205.8 (C, C<sub>8</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>BrNaO<sub>2</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 250.9678, encontrada: 250.9691

**1-(2-Bromo-4-fluorofenoxi)propan-2-ona (51b)**



**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>BrFO<sub>2</sub>

**Aspecto Físico:** Sólido Blanco

**Rendimiento:** 92%

**R<sub>f</sub>** (30% Et<sub>2</sub>O/hexano): 0.29

**Peso Molecular:** 247.06 g/mol

**Pf:** 67-68 °C

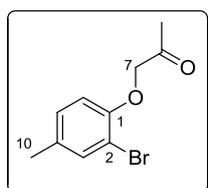
**IR** (KBr):  $\nu$  3401, 3055, 2306, 1730, 1722, 1594, 1489, 1361, 1192, 1171, 1066, 866 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.36 (s, 3H, H<sub>9</sub>), 4.52 (s, 2H, H<sub>7</sub>), 6.75 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.0 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 4.6 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 6.98 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 7.7 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 3.0 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.34 (dd, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 7.7 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 3.0, 1H, H<sub>3</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  27.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 74.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 112.6 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 9.9 Hz, C, C<sub>2</sub>), 114.2 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 8.6 Hz, CH, C<sub>6</sub>), 115.0 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 22.9 Hz, CH, C<sub>5</sub>), 121.0 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 25.8 Hz, CH, C<sub>3</sub>), 151.0 (d, <sup>4</sup>J<sub>FC</sub> = 2.6 Hz, C, C<sub>1</sub>), 157.4 (d, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 244.5 Hz, C, C<sub>4</sub>), 205.3 (C, C<sub>8</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>BrFNaO<sub>2</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 268.9584, encontrada: 268.9578

**1-(2-Bromo-4-metilfenoxi)propan-2-ona (51c)**



**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>BrO<sub>2</sub>

**Aspecto Físico:** Sólido amarillento

**Rendimiento:** 83%

**R<sub>f</sub>** (30% Et<sub>2</sub>O/hexano): 0.34

**Peso Molecular:** 243.10 g/mol

**Pf:** 47-49 °C

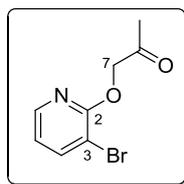
**IR** (KBr):  $\nu$  3055, 2925, 1724, 1606, 1496, 1359, 1290, 1240, 1155, 1071, 1040 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.28 (s, 3H, H<sub>10</sub>), 2.36 (s, 3H, H<sub>9</sub>), 4.51 (s, 2H, H<sub>7</sub>), 6.66 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.3 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.03 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.3 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.0 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 0.6 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.39 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.6 Hz, 1H, H<sub>3</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  20.3 (CH<sub>3</sub>, C<sub>10</sub>), 27.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 74.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 112.0 (C, C<sub>2</sub>), 113.2 (CH, C<sub>6</sub>), 129.1 (CH, C<sub>5</sub>), 132.9 (C, C<sub>4</sub>), 134.2 (CH, C<sub>3</sub>), 152.2 (C, C<sub>1</sub>), 206.1 (C, C<sub>8</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>BrNaO<sub>2</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 264.9835, encontrada: 264.9807

**1-((3-Bromopiridin-2-il)oxi)propan-2-ona (51d)**



**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>BrNO<sub>2</sub>

**Aspecto Físico:** Sólido anaranjado

**Rendimiento:** 97%

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.64

**Peso Molecular:** 230.06 g/mol

**Pf:** 101-103 °C

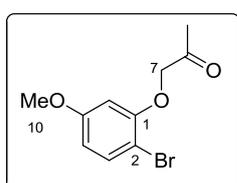
**IR** (KBr):  $\nu$  3055, 2987, 1738, 1656, 1738, 1656, 1603, 1527, 1422, 1406, 1371, 1233, 1174, 1127, 852 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.16 (s, 3H, H<sub>9</sub>), 4.69 (s, 2H, H<sub>7</sub>), 6.03 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.0 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.18 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.8 Hz 1H, H<sub>6</sub>), 7.67 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.8 Hz, 1H, H<sub>4</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  27.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 59.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 106.2 (CH, C<sub>5</sub>), 116.4 (C, C<sub>3</sub>), 137.7 (CH, C<sub>6</sub>), 142.3 (CH, C<sub>4</sub>), 158.8 (C, C<sub>2</sub>), 200.3 (C, CO) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>BrNNaO<sub>2</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 251.9631, encontrada: 251.9630

**1-(2-Bromo-5-metoxifenoxi)propan-2-ona (51e)**



**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>BrO<sub>3</sub>

**Aspecto Físico:** Sólido blanco

**Rendimiento:** 92%

**R<sub>f</sub>** (50% AcOEt/hexano): 0.68

**Peso Molecular:** 259.10 g/mol

**Pf:** 62-64 °C

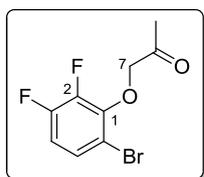
**IR** (KBr):  $\nu$  2840, 1734, 1722, 1586, 1488, 1421, 1360, 1307, 1201, 1169, 1067, 1025 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.32 (s, 3H, H<sub>9</sub>), 3.73 (s, 3H, H<sub>10</sub>), 4.47 (s, 2H, H<sub>7</sub>), 6.30 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.7 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 6.41 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.7 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.7 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 7.39 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.7 Hz, 1H, H<sub>3</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  26.9 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 55.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>10</sub>), 73.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 101.1 (CH, C<sub>6</sub>), 102.7 (C, C<sub>2</sub>), 107.2 (CH, C<sub>4</sub>), 133.5 (CH, C<sub>3</sub>), 154.8 (C, C<sub>1</sub>), 160.2 (C, C<sub>5</sub>), 205.4 (C, C<sub>8</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>BrNaO<sub>3</sub>)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 280.9784, encontrada: 280.9792

**1-(6-Bromo-2,3-difluorofenoxi)propan-2-ona (57)**



**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>BrF<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Aspecto Físico:** Aceite anaranjado

**Rendimiento:** 90%

**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt/hexano): 0.44

**Peso Molecular:** 265.05 g/mol

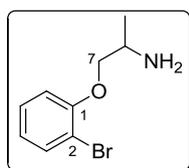
**IR** (KBr):  $\nu$  3461, 3094, 2921, 1741, 1724, 1612, 1588, 1485, 1462, 1429, 1360, 1297, 1208, 1179, 1058, 1019, 991, 975, 881, 801 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.35 (s, 3H, H<sub>9</sub>), 4.64 (d, <sup>5</sup>J<sub>FH</sub> = 0.9 Hz, 2H, H<sub>7</sub>), 6.74-6.92 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 7.26 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.2 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 5.4, <sup>5</sup>J<sub>FH</sub> = 2.4 Hz, 1H, H<sub>5</sub>) ppm

**$^{13}\text{C}$ -RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 75.5 MHz):  $\delta$  26.7 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_9$ ), 77.5 (d,  $^4J_{\text{FC}} = 4.8$  Hz,  $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_7$ ), 111.1 (d,  $^3J_{\text{FC}} = 3.6$  Hz, C,  $\text{C}_6$ ), 112.9 (d,  $^2J_{\text{FC}} = 18.4$  Hz, CH,  $\text{C}_4$ ), 127.2 (dd,  $^3J_{\text{FC}} = 7.4$  Hz,  $^4J_{\text{FC}} = 4.2$  Hz, C,  $\text{C}_5$ ), 144.5 (dd,  $^1J_{\text{FC}} = 251.8$  Hz,  $^2J_{\text{FC}} = 14.8$  Hz, C,  $\text{C}_2$ ), 144.8 (d,  $^3J_{\text{FC}} = 7.3$  Hz, C,  $\text{C}_1$ ), 150.8 (dd,  $^1J_{\text{FC}} = 250.3$  Hz,  $^2J_{\text{FC}} = 11.5$  Hz, C,  $\text{C}_3$ ), 204.1 (C,  $\text{C}_8$ ) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>,  $m/z$ ) ( $\text{C}_9\text{H}_7\text{BrF}_2\text{NaO}_2$ )<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 286.9490, encontrada: 286.9480

**1-(2-Bromofenoxi)propan-2-amina (52a)**



**Fórmula empírica:**  $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{BrNO}$

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 36%

**$R_f$**  (10% MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 0.29

**$^1\text{H}$ -RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 300.13 MHz):  $\delta$  1.18 (d,  $^3J_{\text{HH}} = 6.5$  Hz, 3H,  $\text{H}_9$ ), 1.71 (sa, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 3.30-3.46 (m, 1H,  $\text{H}_8$ ), 3.70 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 8.8$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 7.6$  Hz, 1H,  $\text{H}_7$ ), 3.92 (dd,  $^2J_{\text{HH}} = 8.8$  Hz,  $^3J_{\text{HH}} = 4.1$  Hz, 1H,  $\text{H}_7$ ), 6.76-6.91 (m, 2H,  $\text{H}_6$  y  $\text{H}_4$ ), 7.23 (td,  $^3J_{\text{HH}} = 8.3$  Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 1.5$  Hz, 1H,  $\text{H}_5$ ), 7.51 (dd,  $^3J_{\text{HH}} = 7.9$  Hz,  $^4J_{\text{HH}} = 1.5$  Hz, 1H,  $\text{H}_3$ ) ppm

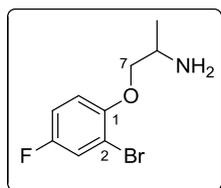
**$^{13}\text{C}$ -RMN** ( $\text{CDCl}_3$ , 75.5 MHz):  $\delta$  19.8 ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_9$ ), 46.4 (CH,  $\text{C}_8$ ), 75.6 ( $\text{CH}_2$ ,  $\text{C}_7$ ), 112.4 (C,  $\text{C}_2$ ), 113.5 (CH,  $\text{C}_6$ ), 122.1 (CH,  $\text{C}_4$ ), 128.5 (CH,  $\text{C}_5$ ), 133.4 (CH,  $\text{C}_3$ ), 155.2 (C,  $\text{C}_1$ ) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>,  $m/z$ ) ( $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{BrNO}$ )<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 230.0175, encontrada: 230.0141

**Peso Molecular:** 230.10 g/mol

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +6.4$  ( $c$  0.5, EtOH) [para (*S*)-52a en >99% ee]

**1-(2-Bromo-4-fluorofenoxi)propan-2-amina (52b)**



**Fórmula empírica:**  $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{BrFNO}$

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 39%

**$R_f$**  (10% MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): 0.24

**Peso Molecular:** 247.06 g/mol

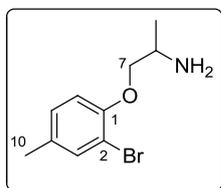
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.17 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5, 3H, H<sub>9</sub>), 2.67 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.31-3.46 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 3.68 (t, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 8.8, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.8, 1H, H<sub>7</sub>), 3.88 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 8.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.0, 1H, H<sub>7</sub>), 6.78 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 9.0 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HF</sub> = 4.8 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 6.86-6.96 (m, 1H, H<sub>5</sub>), 7.22 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HF</sub> = 7.8 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.9, 1H, H<sub>3</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 19.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 46.4 (CH, C<sub>8</sub>), 75.8 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 112.4 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 9.9 Hz, C, C<sub>2</sub>), 114.1 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 8.5 Hz, CH, C<sub>6</sub>), 114.8 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 22.6 Hz, CH, C<sub>5</sub>), 120.3 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 25.8 Hz, CH, C<sub>3</sub>), 151.7 (d, <sup>4</sup>J<sub>FC</sub> = 2.4 Hz, C, C<sub>1</sub>), 156.7 (d, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 243.3 Hz, C, C<sub>4</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>BrFNO)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 248.0081, encontrada: 248.0048

**Rotación Óptica Específica:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 2.5 (*c* 1, EtOH) [para (*S*)-**52b** en >99% *ee*]

**1-(2-Bromo-4-metilfenoxi)propan-2-amina (52c)**



**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>BrNO

**Aspecto Físico:** Aceite incoloro

**Rendimiento:** 31%

**R<sub>f</sub>** (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.29

**Peso Molecular:** 244.13 g/mol

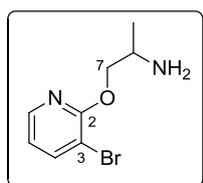
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.16 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 1.84 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>), 2.24 (s, 3H, H<sub>10</sub>), 3.27-3.45 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 3.66 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 8.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.4 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 3.89 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 8.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.0 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 6.74 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.3 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.00 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.3 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 0.9 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.32 (s, 1H, H<sub>3</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 19.3 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 20.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>10</sub>), 46.4 (CH, C<sub>8</sub>), 75.3 (CH<sub>2</sub>, H<sub>7</sub>), 112.0 (C, C<sub>2</sub>), 113.6 (CH, C<sub>6</sub>), 128.9 (CH, C<sub>5</sub>), 131.8 (C, C<sub>4</sub>), 133.6 (CH, C<sub>3</sub>), 152.9 (C, C<sub>1</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>BrNO)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 244.0332, encontrada: 244.0297

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 6.4 (*c* 1, EtOH) [para (*S*)-**52c** en >99% *ee*]

1-((3-Bromopiridin-2-il)oxi)propan-2-amina (52d)



Fórmula empírica: C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>BrN<sub>2</sub>O

Aspecto Físico: Aceite viscoso amarillento

Rendimiento: 68%

*R<sub>f</sub>* (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.22

Peso Molecular: 231.09 g/mol

IR (KBr):  $\nu$  3419, 3093, 2345, 2177, 1706, 1648, 1583, 1530, 1427, 1396, 1327, 1240, 1121, 1056, 1021, 976, 866, 855 cm<sup>-1</sup>

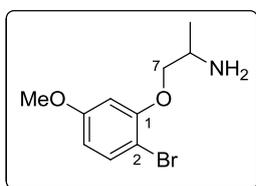
<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.16 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 2.15 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.39-3.52 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 3.69 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.1 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 4.07 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 12.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.7 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 6.07 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.0 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.35 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.9 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.9 Hz 1H, H<sub>6</sub>), 7.74 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 7.1 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.9 Hz, 1H, H<sub>4</sub>) ppm

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  21.3 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 45.8 (CH, C<sub>8</sub>), 59.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 105.8 (CH, C<sub>5</sub>), 116.9 (C, C<sub>3</sub>), 138.2 (CH, C<sub>6</sub>), 141.8 (CH, C<sub>4</sub>), 159.3 (C, C<sub>2</sub>) ppm

HRMS (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>BrN<sub>2</sub>NaO)<sup>+</sup> (M+Na)<sup>+</sup>: calculada 252.9947, encontrada: 252.9945

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 31.5 (*c* 0.5, EtOH) [para (*S*)-52d en >99% *ee*]

1-(2-Bromo-5-metoxifenoxi)propan-2-amina (52e)



Fórmula empírica: C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>BrO<sub>2</sub>

Aspecto Físico: Aceite incoloro

Rendimiento: 66%

*R<sub>f</sub>* (50% AcOEt/hexano): 0.38

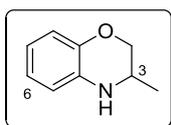
Peso Molecular: 260.13 g/mol

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.24 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 2.68 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.39-3.52 (m, 1H, H<sub>8</sub>), 3.70-3.79 (m, 1H, H<sub>7</sub>), señal solapada con 3.77 (s, 3H, OMe), 3.95 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 8.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 4.0 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 6.39 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.7 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.7 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 6.49 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.7 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 7.38 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.7 Hz, 1H, H<sub>3</sub>) ppm

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  15.3 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 48.4 (CH, C<sub>8</sub>), 55.9 (CH<sub>3</sub>, OMe), 69.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 102.1 (CH, C<sub>6</sub>), 103.1 (C, C<sub>2</sub>), 108.8 (CH, C<sub>4</sub>), 133.3 (CH, C<sub>3</sub>), 154.5 (C, C<sub>1</sub>), 160.3 (C, C<sub>5</sub>) ppm



**3-Metil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzo[*b*]oxazina (42a)**



**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO

**Aspecto Físico:** Aceite amarillento

**Rendimiento:** 80% (245 mg)

***R*<sub>f</sub>** (20% Et<sub>2</sub>O/hexano): 0.22

**Peso Molecular:** 149.19 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3384, 3052, 2974, 2874, 2358, 1608, 1590, 1501, 1436, 1346, 1309, 1209, 1122, 1045, 876 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.20 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6.4 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 3.47-3.61 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 3.69 (sa, 1H, NH), 3.82 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 10.4 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 8.1 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4.23 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 10.4 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 2.8 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 6.64 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.7 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>HH</sub> = 1.5 Hz, 1H, Ar), 6.73 (td, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.6, <sup>4</sup>*J*<sub>HH</sub> = 1.5 Hz, 1H, Ar), 6.83 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.5 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>HH</sub> = 1.4 Hz, 1H, Ar), 6.89 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 7.9, <sup>4</sup>*J*<sub>HH</sub> = 1.4 Hz, 1H, Ar) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  17.7 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 45.0 (CH, C<sub>3</sub>), 70.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 115.4 (CH, Ar), 116.4 (CH, Ar), 118.6 (CH, Ar), 121.3 (CH, Ar), 133.6 (C, C<sub>4a</sub>), 143.6 (C, C<sub>8a</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>NO)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 150.0913, encontrada: 150.0931

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -17.6$  (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>) [para (*R*)-**42a** en >99% *ee*] [lit.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -19$  (*c* 1.3, CHCl<sub>3</sub>) para (*R*)-**42a** en 97% *ee*]<sup>188</sup>

**Separación analítica de 42a (HPLC):**

Columna: Chiralcel OJ-H

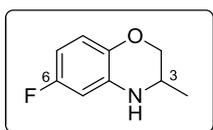
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 90:10

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t*<sub>R</sub> (*R*) = 16.6 min, *t*<sub>R</sub> (*S*) = 19.8 min

**6-Fluoro-3-metil-3,4-dihidro-2H-1,4-benzo[*b*]oxazina (42b)**



**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>FNO

**Aspecto Físico:** Aceite amarillento

**Rendimiento:** 61%

**R<sub>f</sub>** (60% AcOEt/hexano):

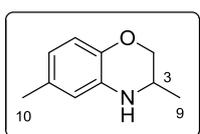
**Peso Molecular:** 167.18 g/mol

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.17 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.4 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 3.45-3.60 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 3.72 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.0 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 3.75 (sa, 1H, NH), 4.15 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.8 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 6.25-6.36 (m, 2H, H<sub>5</sub> y H<sub>7</sub>), 6.69 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.6, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 5.4 Hz, 1H, H<sub>8</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 17.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 45.2 (CH, C<sub>3</sub>), 70.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 101.7 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 26.6 Hz, CH, C<sub>5</sub>), 104.3 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 23.3 Hz, CH, C<sub>7</sub>), 116.8 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 9.7 Hz, CH, C<sub>8</sub>), 134.4 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 10.8 Hz, C, C<sub>4a</sub>), 139.6 (C, C<sub>8a</sub>), 157.9 (d, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 236.6 Hz, C, C<sub>6</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>NO)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 168.0819, encontrada: 168.0823

**3,7-Dimetil-3,4-dihidro-2H-1,4-benzo[*b*]oxazina (42c)**



**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO

**Aspecto Físico:** Aceite amarillento

**Rendimiento:** 66%

**R<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano):

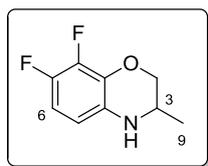
**Peso Molecular:** 163.22 g/mol

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.18 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.4 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 2.23 (s, 3H, H<sub>10</sub>), 3.46-3.60 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 3.61 (sa, 1H, NH), 3.75 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.0 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4.17 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> = 10.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 2.8 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 6.42 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.5 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 6.48 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.1 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.5 Hz, 1H, H<sub>7</sub>), 6.70 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.1 Hz, 1H, H<sub>8</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 17.9 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 20.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>10</sub>), 45.3 (CH, C<sub>3</sub>), 70.8 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 116.0 (CH, Ar), 116.3 (CH, Ar), 119.4 (CH, Ar), 130.8 (C, C<sub>6</sub>), 133.2 (C, C<sub>4a</sub>), 141.6 (C, C<sub>8a</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>NO)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 164.1070, encontrada: 164.1075

**7,8-Difluoro-3-metil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzo[*b*]oxazina (42e)**



**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>F<sub>2</sub>NO

**Aspecto Físico:** Aceite amarillento

**Rendimiento:** 86% (29 mg)

***R*<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.43

**Peso Molecular:** 185.17 g/mol

**IR** (NaCl):  $\nu$  3392, 3054, 2986, 2359, 1653, 1616, 1559, 1506, 1419, 1227, 1064, 931 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.19 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 6.4 Hz, 3H, H<sub>9</sub>), 3.42-3.57 (m, 1H, H<sub>3</sub>), 3.62 (sa, 1H, NH), 3.78 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 10.4 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 8.2 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 4.28 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>HH</sub> = 10.5 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 2.8 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 6.25 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 9.0 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>FH</sub> = 4.8, <sup>5</sup>*J*<sub>FH</sub> = 2.3 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 6.55 (ddd, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub> = 9.0 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>FH</sub> = 9.9, <sup>4</sup>*J*<sub>FH</sub> = 7.8 Hz, 1H, H<sub>6</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  17.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>9</sub>), 45.0 (CH, C<sub>3</sub>), 77.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 107.9 (d, <sup>2</sup>*J*<sub>FC</sub> = 18.4 Hz, CH, C<sub>6</sub>), 108.6 (dd, <sup>3</sup>*J*<sub>FC</sub> = 7.5 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>FC</sub> = 3.9 Hz, CH, C<sub>5</sub>), 131.0 (d, <sup>3</sup>*J*<sub>FC</sub> = 1.9 Hz, C, C<sub>4a</sub>), 133.5 (dd, <sup>2</sup>*J*<sub>FC</sub> = 10.7 Hz, <sup>3</sup>*J*<sub>FC</sub> = 2.9 Hz, C, C<sub>8a</sub>), 140.8 (dd, <sup>1</sup>*J*<sub>FC</sub> = 244.1 Hz, <sup>2</sup>*J*<sub>FC</sub> = 15.6 Hz, C, C<sub>7</sub>), 144.3 (dd, <sup>1</sup>*J*<sub>FC</sub> = 236.9 Hz, <sup>2</sup>*J*<sub>FC</sub> = 10.6 Hz, C, C<sub>8</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>F<sub>2</sub>NO)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 186.0725, encontrada: 186.0752

**Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -8.6$  (*c* 1.3, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) [para (*S*)-**42e** en >99% *ee*] [lit.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -9.1$  (*c* 1.3, CHCl<sub>3</sub>) para (*R*)-**42a** en 97% *ee*]<sup>194</sup>

**Separación analítica de 42e (HPLC):**

Columna: Chiralcel OJ-H

Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-hexano/2-propanol 95:5

Flujo: 0.8 mL/min

Tiempos de retención: *t*<sub>R</sub> (*S*) = 24.4 min, *t*<sub>R</sub> (*R*) = 26.7 min

# **BLOQUE III**

ESTUDIOS DE TRANSAMINACIÓN



# INTRODUCCIÓN



Aunque ya han sido utilizadas en la parte final del Bloque II, la introducción de los distintos aspectos que afectan al mecanismo de acción de las transaminasas para la preparación de aminas ópticamente puras precisa de una discusión más amplia. Se ha considerado esta introducción del Bloque III como el lugar idóneo para abordar este tema por tratarse de las enzimas en las que se basan los estudios de la fase final de esta Tesis Doctoral.

### III.1. $\omega$ -Transaminasas: Biocatalizadores para la Síntesis de Aminas Quirales

Las transaminasas, también denominadas aminotransferasas (EC. 2.6.1.X), son enzimas dependientes de piridoxal-5'-fosfato (PLP) que juegan un papel muy importante en la naturaleza para la síntesis y degradación de aminas y aminoácidos ópticamente activos.<sup>204</sup>

Desde un punto de vista químico, su desarrollo se inició con procesos catalizados por células enteras, lo que permitía el reciclaje del cofactor, y su aplicación se acrecentó al expirar las correspondientes patentes y publicarse las primeras investigaciones académicas.<sup>205</sup> Su uso como biocatalizadores en la síntesis de aminas quirales a partir de cetonas ha experimentado un gran auge en los últimos años.<sup>206</sup>

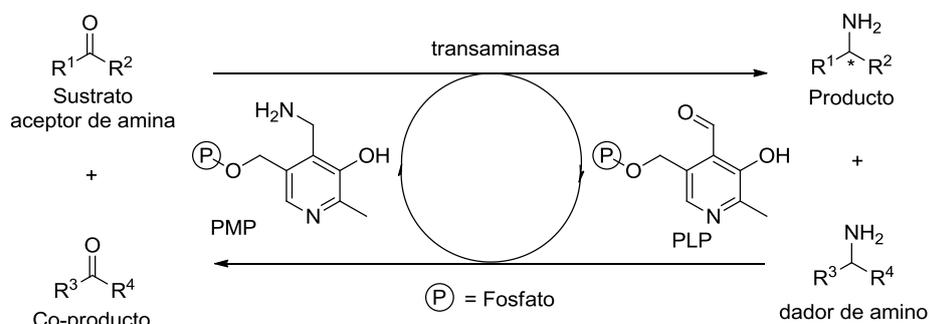
---

<sup>204</sup> M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 779-820.

<sup>205</sup> a) D. I. Stirling, G. W. Matcham, A. L. Zeitlin, United States Patent 5,300,437 Celgene Corporation **1994**; b) J.-S. Shin, B.-G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *55*, 348-358.

<sup>206</sup> Revisiones bibliográficas recientes: a) W. Kroutil, E.-M. Fischereeder, 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; b) M. S. Malik, E.-S. Park, J.-S. Shin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *94*, 1163-1171; c) S. Mathew, H. Yun, *ACS Catal.* **2012**, *2*,

Globalmente, durante la transaminación tiene lugar la transferencia del grupo amino de un dador de amino al grupo carbonílico de un  $\alpha$ -cetoácido, una cetona o un aldehído que actúa como aceptor de amino (Esquema 105). En el ciclo catalítico, el PLP se convierte inicialmente en piridoxamina-5'-fosfato (PMP) a expensas del dador de amino. El PMP actúa entonces como intermediario transfiriendo el grupo amino al sustrato y liberando de nuevo el PLP.



**Esquema 105.** Principio de transaminación catalizado por una transaminasa.

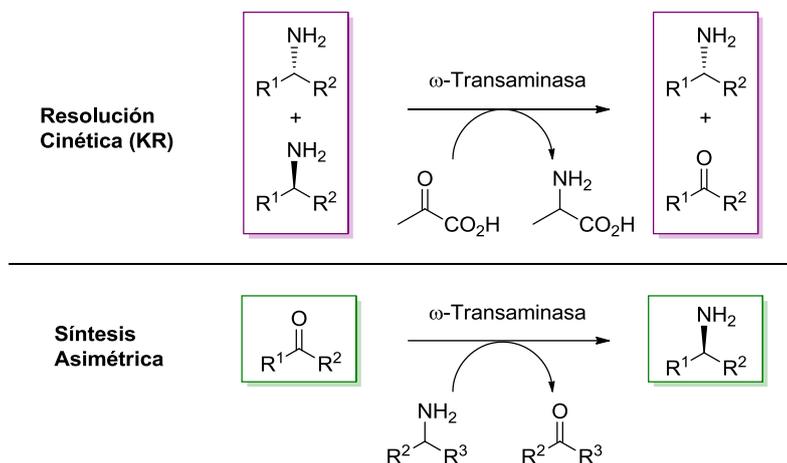
Esta clase de enzimas se puede dividir en cuatro subgrupos, de los cuales los I, III y IV engloban enzimas que exclusivamente transfieren el grupo amino unido a un carbono en posición  $\alpha$  de los aminoácidos, motivo por el cual se las conoce como  $\alpha$ -transaminasas ( $\alpha$ -TAs). Por el contrario, no existe tal limitación en las enzimas del subgrupo II, denominadas  $\omega$ -transaminasas ( $\omega$ -TAs), que pueden transferir el grupo amino desde un átomo de carbono que no soporte al grupo carboxílico.<sup>207</sup> Esto hace que la especificidad de sustrato de las  $\omega$ -TAs sea considerablemente más amplia que la correspondiente de las  $\alpha$ -TAs.

En función del material de partida (amina o cetona), las  $\omega$ -TAs pueden utilizarse en desaminaciones oxidativas enantioselectivas, o alternativamente en aminaciones reductivas estereoselectivas. En el primer caso tiene lugar una resolución cinética mientras que, en el

993-1001; d) D. Koszelewski, K. Tauber, K. Faber, W. Kroutil, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 324-332; e) M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42-51.

<sup>207</sup> P. Christen, D. E. Metzler, *Transaminases* **1985**, Wiley, New York.

segundo, se da la transformación de una cetona proquiral generándose un centro quiral en un proceso sintético asimétrico (Esquema 106), lo que supone una ventaja en cuanto al rendimiento teórico del proceso (100%) respecto al de las resoluciones (50%).<sup>208</sup> Además, la reacción de transaminación es de gran interés tanto académico como industrial debido a la mayor accesibilidad comercial de las cetonas frente a las aminas.



**Esquema 106.** Estrategias de acción de las  $\omega$ -TAs para la preparación de aminas quirales.

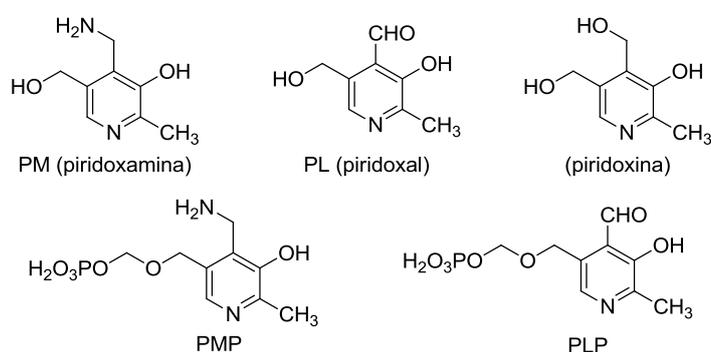
La enantioselectividad natural de gran parte de las  $\omega$ -TAs encontradas en muy diversas bacterias es específica hacia el enantiómero (*S*), a pesar de lo cual cada vez existen más ejemplos descritos de enzimas (*R*)-selectivas, lo que garantiza la posibilidad de obtener ambos enantiómeros de la amina.<sup>209</sup>

En lo que respecta a los grupos prostéticos de la catálisis, tanto el PMP como el PLP pertenecen a la familia de la vitamina B<sub>6</sub> (Esquema 107). Además de emplearse como co-enzimas en los procesos de transaminación en sistemas biológicos, existen también numerosos ejemplos en la bibliografía en los que se han sintetizado gran variedad

<sup>208</sup> M. Shon, R. Shanmugavel, G. Shin, S. Mathew, S.-H. Lee, H. Yun, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 12680-12683.

<sup>209</sup> E.-S. Park, M. S. Malik, J.-Y. Dong, J.-S. Shin, *ChemCatChem* **2013**, 5, 1734-1738.

de análogos quirales de piridoxamina para su estudio como biomiméticos en procesos de transaminación asimétrica, actuando como transaminasas artificiales.<sup>210</sup>



**Esquema 107.** Componentes de la vitamina B<sub>6</sub> (arriba) y sus derivados fosforilados (PMP y PLP, abajo).

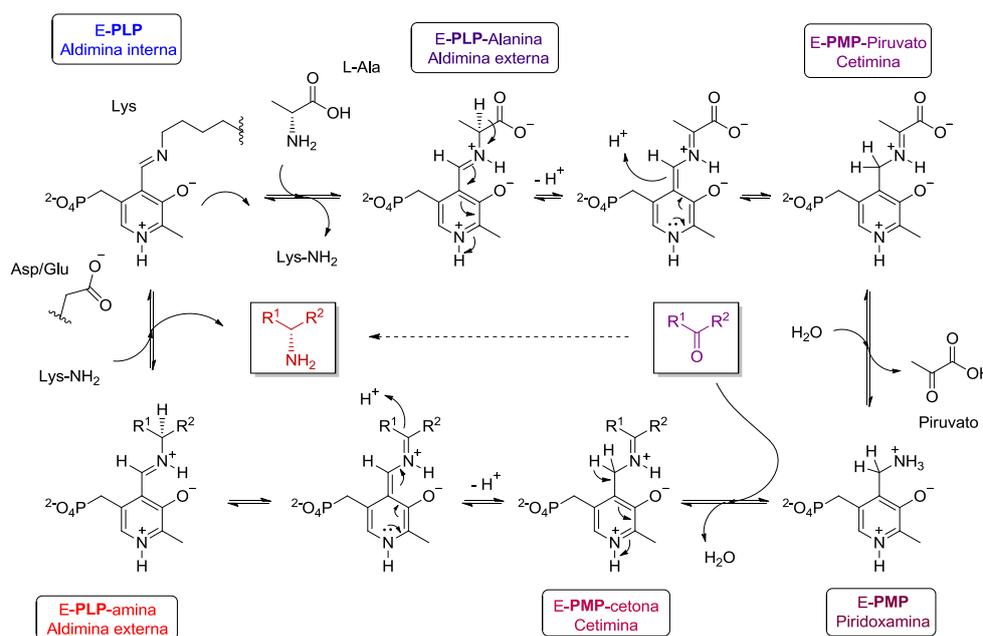
### III.2. Aspectos Mecanísticos de las $\omega$ -Transaminasas

Como se ha comentado en el apartado anterior, el mediador del proceso de transaminación es el grupo prostético PLP, el cual actúa como transporte molecular del amoníaco y los electrones interviniendo así en la transferencia del grupo amino entre el dador y el aceptor (cetona o aldehído). La secuencia de reacción detallada se describe en el Esquema 108 y comienza con el cofactor unido a un residuo de lisina de la enzima formando una base de Schiff, la aldimina interna (intermedio E-PLP). En una primera fase, el grupo amino del dador se transfiere al cofactor por medio de la aldimina externa (intermedio E-PLP-Alanina) y tienen lugar una serie de reagrupamientos para formarse el fosfato de piridoxamina (intermedio E-PMP), liberándose la forma ceto del dador, en este caso el piruvato. El grupo amino de este intermedio se transfiere a la molécula aceptor (la cetona) evolucionando hasta la formación de una nueva aldimina externa (intermedio E-PLP-amina) a través de un desplazamiento de hidrógeno [1,3] promovido por la transaminasa. En

---

<sup>210</sup> Y. Xie, H. Pan, M. Liu, X. Xiao, Y. Shi, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1740-1748.

un último paso, dicho intermedio se hidroliza generando la amina, producto de la reacción, a la par que se regenera el piridoxal fosfato.<sup>211</sup>



**Esquema 108.** Mecanismo de acción de las  $\omega$ -TAs.

Todos los pasos de esta secuencia mecánica son reversibles, lo que implica que el intermedio piridoxamina (E-PMP) podría también evolucionar en el sentido contrario transfiriéndose el grupo amino a la molécula dadora original y regenerándose los reactivos de partida. En esta introducción se describirán brevemente algunas de las estrategias comúnmente empleadas para favorecer termodinámicamente el equilibrio hacia la formación de la amina deseada.

Recientemente, estudios de  $^{15}\text{N}$ -RMN en estado sólido sobre diversas transaminasas han evidenciado la protonación del nitrógeno del PLP, una etapa de activación considerada como prerequisite para el

<sup>211</sup> S. Willies, *Practical Methods for Biocatalysis and Biotransformations 2*, Eds. J. Whittall, P. W. Sutton, 1<sup>st</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2012, pp. 61-64

paso inicial en la catálisis enzimática.<sup>212</sup> En dicho estudio se propone, además, la *O*-protonación como mecanismo alternativo de activación del PLP en aquellas enzimas para las que la *N*-protonación es inviable, ya que no todas las enzimas dependientes de PLP requieren de la electrofilia del anillo de piridina protonado para progresar hacia la formación de los intermedios carbaniónicos.<sup>213</sup> De hecho, se ha propuesto que la modulación de la electrofilia de este grupo ejerce gran influencia en el control de la especificidad de las reacciones catalizadas por este tipo de enzimas.

### III.3. Sistemas de Regeneración. Desplazando el Equilibrio.

En las reacciones de transaminación que parten de una cetona proquiral ocurre que el equilibrio del proceso se encuentra termodinámicamente desfavorecido hacia la formación de la amina, lo que representa una de las principales causas del desarrollo tardío de los procesos de síntesis asimétrica con transaminasas. Junto al problema del equilibrio, existen también limitaciones en la reactividad de las transaminasas debidas a su inhibición por parte de los productos o subproductos de la reacción enzimática.

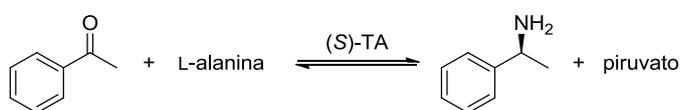
Una metodología eficaz para desplazar las reacciones y favorecer la evolución del sistema hacia la formación de los productos finales consiste en la retirada continua de los intermedios presentes en el equilibrio, lo que además evitaría problemas relativos a la inhibición de las enzimas. Shim y Kim utilizaron esta estrategia por primera vez en la reacción de transaminación entre acetofenona y L-alanina, con la transaminasa de *Vibrio fluvialis* JS17 ejerciendo las funciones de biocatalizador e incorporando en el medio la LDH para eliminar el

---

<sup>212</sup> M. Chan-Huot, A. Dos, R. Zander, S. Sharif, P. M. Tolstoy, S. Compton, E. Fogle, M. D. Toney, I. Shenderovich, G. S. Denisov, H.-H. Limbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18160-18175.

<sup>213</sup> W. R. Griswold, M. D. Toney, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14823-14830.

piruvato (Esquema 109).<sup>214</sup> Los mejores resultados se obtuvieron en las reacciones con células enteras, argumentando que el uso del extracto libre de LDH requería un sistema de regeneración del NADH, lo que incrementaba la complejidad del sistema.



**Esquema 109.** Reacción de transaminación de la acetofenona para formar (*S*)-metilbenzilamina.

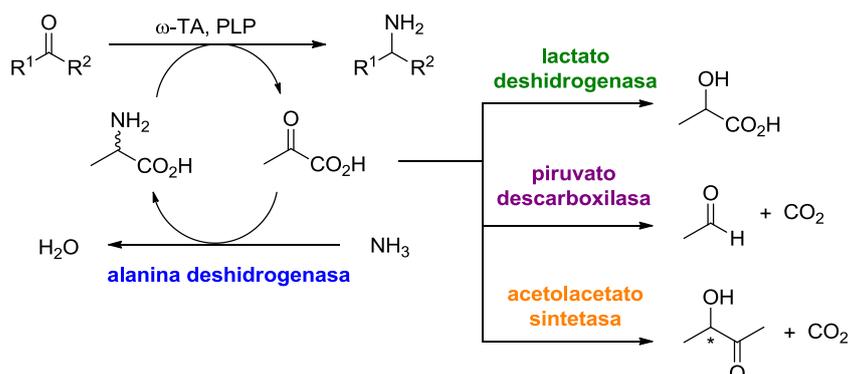
El éxito de esta metodología de acceso a los productos de aminación ha llevado al desarrollo de diversas alternativas, como la eliminación de co-productos volátiles, la variación de los dadores de amino,<sup>215</sup> el uso de cascadas multienzimáticas<sup>216</sup> o de reacciones espontáneas no enzimáticas.<sup>217</sup> Entre ellas, destaca el desplazamiento del equilibrio eliminando el piruvato de la reacción mediante el acoplamiento de una segunda reacción enzimática en la que se generen, a partir del mismo, subproductos de fácil supresión como el ácido láctico en el caso de la LDH o el acetaldehído y CO<sub>2</sub> empleando la piruvato descarboxilasa (PDC, Esquema 110). En lugar de eliminarlo, también es posible reciclar el piruvato como en el caso de la alanina deshidrogenasa (AlaDH) donde se genera sencillamente agua como subproducto, a la vez que se transforma el piruvato en la alanina. Este último sistema evita, además, la necesidad de emplear cantidades equimoleculares de alanina, ya que el propio sistema de eliminación del piruvato regenera este dador de amino.

<sup>214</sup> J.-S. Shin, B.-G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *65*, 206-211.

<sup>215</sup> A. P. Green, N. J. Turner, E. O'Reilly, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10714-10717.

<sup>216</sup> E. O'Reilly, C. Iglesias, D. Ghislieri, J. Hopwood, J. L. Galman, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2447-2450.

<sup>217</sup> R. C. Simon, N. Richter, E. Busto, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 129-143.



**Esquema 110.** Selección de técnicas de acoplamiento de enzimas para desplazar el equilibrio hacia la formación del producto en reacciones catalizadas por  $\omega$ -TAs.

Tal y como observaron Shin y Kim,<sup>214</sup> para hacer realmente aplicables estos sistemas puede ser necesario el acoplamiento de una tercera reacción enzimática que regenere el cofactor de los procesos laterales, ya que tanto la LDH como la AlaDH son dependientes de NADH. Otras veces, se precisa de esta tercera reacción enzimática para eliminar del medio algún producto que cause la inhibición de la transaminasa.

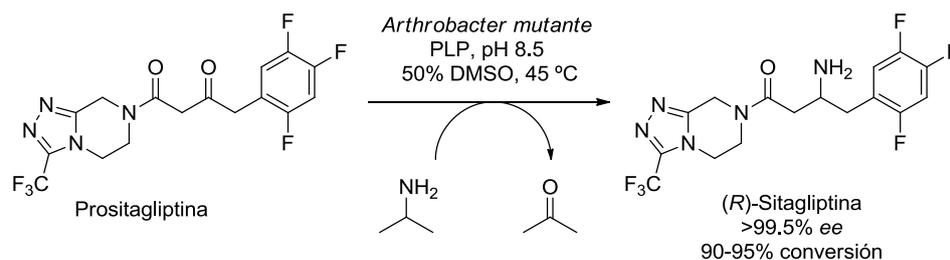
Recientemente, el uso de un exceso de isopropilamina como dador de amino ha suscitado gran interés para la comunidad investigadora.<sup>218</sup> En un sentido práctico, esta estrategia para desplazar el equilibrio tiene un gran valor por el bajo precio de este compuesto y la elevada volatilidad de la acetona generada como subproducto, además de no requerir otras enzimas o cosustratos adicionales.

<sup>218</sup> a) K. Fesko, K. Steiner, R. Breinbauer, H. Schwab, M. Schürmann, G. A. Strohmeier, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **2013**, *96*, 103-110; b) H. Mallin, M. Höhne, U.T. Bornscheuer, *J. Biotechnol.* **2014**, *191*, 32-37; c) L. H. Andrade, W. Kroutil, T. F. Jamison, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 6092-6095.

### III.4. Nuevas Transaminasas. Evolución Dirigida e Inmovilización

El conocimiento en profundidad de los aspectos estructurales de las enzimas es una de las mejores vías para el entendimiento de su reactividad, además de establecer el punto de partida para un diseño racional de los procesos de transaminación.

En este contexto, la ingeniería de la secuencia de aminoácidos de las proteínas y la introducción de mutaciones en su estructura son estrategias de tremenda utilidad para ampliar la capacidad de aceptación de un sustrato por parte una enzima dada e incluso superar limitaciones relativas a problemas de inhibición.<sup>219</sup> Savile y colaboradores demostraron el potencial de la ingeniería del centro activo de una transaminasa con la aplicación de esta técnica a la síntesis de la sitagliptina (Esquema 111).<sup>220</sup> La acomodación del sustrato fue excelente tras 27 mutaciones de la enzima nativa, obteniendo el producto enantioméricamente puro y con conversiones casi completas.



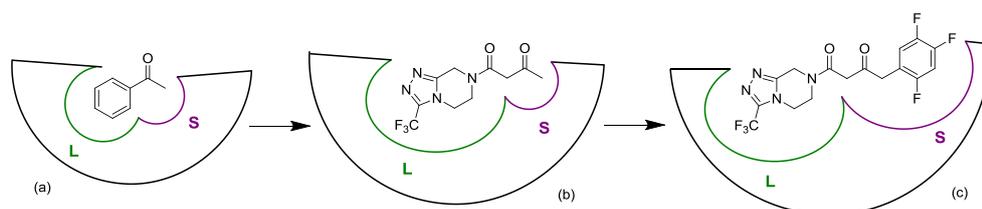
**Esquema 111.** Síntesis de la (*R*)-sitagliptina empleando la transaminasa de *Arthrobacter* sp. modificada.

La principal limitación relacionada con la especificidad de sustrato de las transaminasas radica en el hueco relativamente pequeño del centro activo, que en muchos casos se encuentra restringido a un

<sup>219</sup> G. A. Behrens, A. Hummel, S. K. Padhi, S. Schätzle, U. T. Bornscheuer, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2191-2215.

<sup>220</sup> C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science* **2010**, *329*, 305-308.

sustituyente no mayor que un metilo en la posición adyacente a la cetona. Para la consecución del reconocimiento de la prositagliptina como sustrato por parte de la  $\omega$ -TA de *Arthrobacter* sp. los autores rediseñaron los huecos de unión con el sustrato anulando las interferencias estéricas presentes en la enzima nativa (Figura 32). Frente a la síntesis química en la que está involucrado un paso de hidrogenación asimétrica a altas presiones catalizado por rodio, la aproximación empleando transaminasas aporta un incremento del rendimiento global del 13% y una reducción de residuos generados del 19%, evitando el uso de metales de transición y eliminando las elevadas presiones de hidrógeno.



**Figura 32.** Alteración del centro activo de la (*R*)-*Arthrobacter*: (a) interacción de la acetona con el centro activo nativo, consistente en un hueco grande (L, *large*) y uno pequeño (S, *small*); (b) primera modificación del hueco grande del centro activo; (c) segunda modificación dirigida al hueco pequeño del centro activo para la acomodación de la prositagliptina.

Algunos años antes, la evolución dirigida se había aplicado en el aislamiento de una mutante de la *Vibrio fluvialis* JS17 con la intención de reducir la inhibición de producto de cetonas alifáticas.<sup>221</sup> Los autores llegaron a resolver el 2-aminoheptano con excelente estereoselectividad y, posteriormente, rediseñaron la especificidad de sustrato de la *V. fluvialis* para la resolución cinética de aminas alifáticas empleando modelización de homología y generando nuevas enzimas mutantes sin observar pérdida en la actividad nativa frente a aminas aromáticas.<sup>222</sup> Sin embargo, persistía la limitación de la *V. fluvialis* para actuar como

<sup>221</sup> H. Yun, B.-Y. Hwang, J.-H. Lee, B.-G. Kim, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 4220-4224.

<sup>222</sup> B.-K. Cho, H.-Y. Park, J.-H. Seo, J. Kim, T.-J. Kang, B.-S. Lee, B.-G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99*, 275-284.

catalizador en la transaminación de  $\alpha$ -hidroxicetonas y aril-alquil cetonas con un sustituyente alquílico más voluminoso que un grupo metilo. Recientemente, esta restricción se ha superado a través de un estudio mutagénico realizado por Bornscheuer y colaboradores, generando nuevas mutantes capaces de aceptar cetonas voluminosas, incrementando la actividad enzimática hasta 30 veces para la preparación de la (*S*)-butilfenilamina y el (*R*)-fenilglicinol.<sup>223</sup>

Al igual que para otras enzimas, la posibilidad de inmovilizar transaminasas sobre soportes biocompatibles ofrece una serie de ventajas, entre las que indudablemente destaca el aumento de estabilidad y, por tanto, la mejora en la actividad enzimática.<sup>224</sup> Esta estabilidad afecta directamente al medio de reacción, abriendo la posibilidad de usar  $\omega$ -TAs en medio orgánico, lo cual facilita sus aplicaciones sintéticas, especialmente en procesos industriales. En este contexto, la inmovilización genera también un aumento de la productividad al simplificar notablemente los protocolos de aislamiento de los productos, pudiendo eliminarse el biocatalizador por simple filtración del crudo de reacción, tras la cual la enzima puede ser potencialmente reutilizable.

---

<sup>223</sup> A. Nobili, F. Steffen-Munsberg, H. Kohls, I. Trentin, C. Schulzke, M. Hçhne, U. T. Bornscheuer *ChemCatChem* **2015**, *7*, 757-760.

<sup>224</sup> a) M. D. Truppo, H. Strotman, G. Hughes, *ChemCatChem* **2012**, *4*, 1071-1074; b) S.-S. Yi, C.-w. Lee, J. Kim, D. Kyung, B.-G. Kim, Y.-S. Lee, *Process Biochem.* **2007**, *42*, 895-898; c) H. Mallin, H. Hçhne, U. T. Bornscheuer, *J. Biotechnol.* **2014**, *191*, 32-37; d) K. Deepankumar, S. P. Nadarajan, S. Mathew, S.-G. Lee, T. H. Yoo, E. Y. Hong, B.-G. Kim, H. Yun, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 417-421.



# CAPÍTULO 5

## DESARROLLO DE PROCESOS DE TRANSAMINACIÓN DE PIRIDINAS HALOGENADAS



# ANTECEDENTES



En este último capítulo se estudiarán procesos de transaminación empleando como sustratos dos familias de piridinas halogenadas. En primer lugar, se seleccionarán una serie de piridinas cloradas, compuestos versátiles en los cuales la facilidad de sustitución del átomo de cloro por otros grupos reactivos abre gran amplitud de posibilidades sintéticas. En una segunda parte se prepararán piridiletanaminas fluoradas ópticamente activas, compuestos de gran interés por su potencial aplicación en la síntesis de estructuras más complejas con actividad biológica.

## 5.1. Importancia de las Piridinas

La piridina y sus derivados son una familia de heterociclos nitrogenados con unas características químicas muy atractivas por la posibilidad de intervenir en transformaciones químicas a través del nitrógeno o del anillo aromático.

Esta dualidad ha impulsado el desarrollo de aplicaciones muy diversas. Entre ellas cabe destacar su actuación como ligandos en química de coordinación,<sup>225</sup> en estructuras supramoleculares<sup>226</sup> o incluso en organocatálisis,<sup>227</sup> como es el caso de la 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina (DMAP), uno de los catalizadores nucleofílicos más populares en reacciones químicas de transferencia de grupos acilos.<sup>228</sup> En este punto, son también dignas de mención las investigaciones referentes a la síntesis de análogos de cofactores de nicotinamida (NADH y NADPH), cuya aplicación en las áreas de Química Orgánica y Biocatálisis ha despertado un gran interés debido al elevado coste de dichos cofactores

---

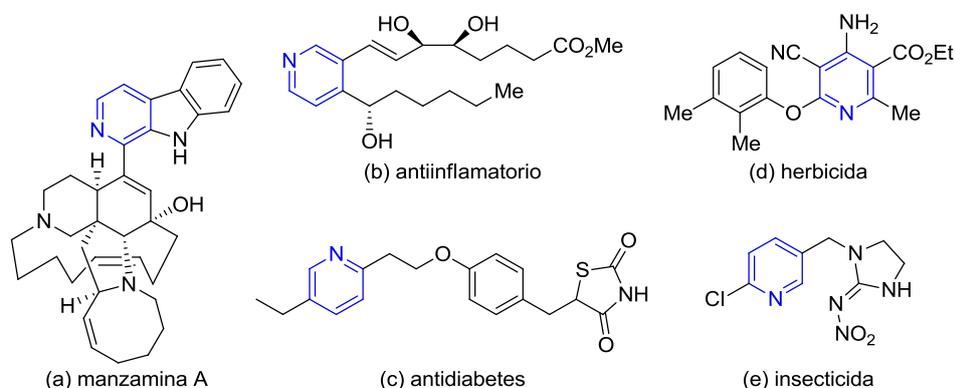
<sup>225</sup> S. Lin, X. Lu, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2536-2539.

<sup>226</sup> T. Šmejkal, B. Breit, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 311-315.

<sup>227</sup> B. Gao, Y. Zhao, J. Hu, J. Hu, *Org. Chem. Front.* **2015**, *2*, 163-168.

<sup>228</sup> N. D. Rycke, F. Couty, O. R. P. David, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 12852-12871.

naturales.<sup>229</sup> La sustitución del dinucleótido de adenina por un grupo arilo o alquilo más sencillo, así como el cambio en el grupo funcional amida del anillo de piridina son las bases sobre las que se asienta la preparación de estos miméticos para su empleo como cofactores en procesos redox.



**Figura 33.** Selección ilustrativa de ejemplos de derivados de piridina como productos naturales (a), fármacos (b, c) y agroquímicos (d, e).

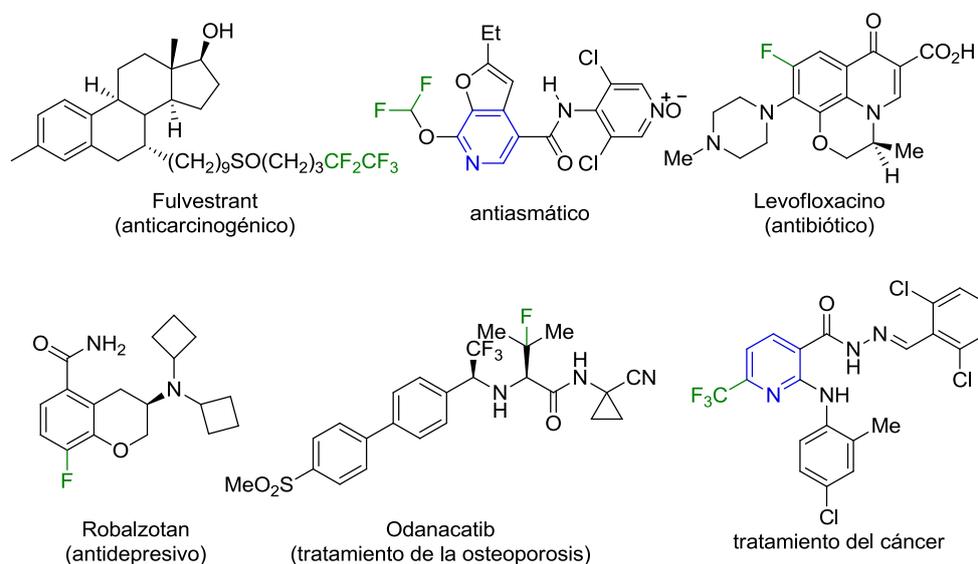
Sin embargo, el interés de las piridinas radica de una manera especial en sus propiedades biológicas. Así, su esqueleto se encuentra presente en múltiples compuestos con diversa actividad farmacológica e interés industrial (Figura 33).<sup>230</sup> Muchos de ellos basan su actividad en propiedades inhibitorias hacia distintas enzimas y, consecuentemente, existe una gran variedad de estudios acerca de su aplicabilidad como agentes terapéuticos.<sup>231</sup> Asimismo, existen algunos ejemplos elegantes

<sup>229</sup> C. E. Paul, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 788-797.

<sup>230</sup> a) C. Allais, J.-M. Grassot, J. Rodriguez, T. Constantieux, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 10829-10868; b) A. Dandia, R. Singh, S. Maheshwari, *Curr. Org. Chem.* **2014**, *18*, 2513-2529.

<sup>231</sup> Algunos ejemplos recientes: a) T. M. Kadayat, C. Park, K.-Y. Jun, T. B. T. Magar, G. Bist, H. Y. Yoo, Y. Kwon, E.-S. Lee, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 160-173; b) I. A. Yule, L. G. Czaplewski, S. Pommier, D. T. Davies, S. K. Narramore, C. W. G. Fishwick, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *86*, 31-38; c) O. Epstein, M. C. Bryan, A. C. Cheng, K. Derakhchan, T. A. Dineen, D. Hickman, Z. Hua, J. B. Human, C. Kreiman, I. E. Marx, M. M. Weiss, R. C. Wahl, P. H. Wen, D. A. Whittington, S. Wood, X. M. Zheng, R. T. Fremeau Jr., R. D. White, V. F. Patel, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9796-9810; d) S. Riaz, I. U. Khan, M. Yar, M. Ashraf, T. U. Rehman, A. Shaukat, S. B. Jamal, V. C. M. Duarte, M. J. Alves, *Bioorganic Chem.* **2014**, *57*, 148-154.

en la bibliografía en los que se ha analizado con detalle la interacción entre la molécula y el centro activo de las enzimas a las que inhiben.<sup>232</sup> Por otra parte y en relación con las piridinas que se estudiarán en la segunda sección de este capítulo, la presencia de sustituyentes fluorados en compuestos bioactivos está actualmente muy extendida por los efectos físicoquímicos que este elemento produce en las moléculas de las que forma parte (Figura 34).



**Figura 34.** Selección de ejemplos de fármacos fluorados, algunos de ellos conteniendo el esqueleto de piridina.

## 5.2. Biocatálisis Aplicada a la Síntesis de Derivados de Piridina

Existen una gran variedad de estrategias eficientes para la preparación asimétrica de compuestos en cuya estructura se encuentra presente el anillo de piridina, como procesos multicomponente o

<sup>232</sup> a) I. Span, K. Wang, W. Eisenreich, A. Bacher, Y. Zhang, E. Oldfield, M. Groll, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 7926-7932; b) M. B. Shah, J. Pascual, Q. Zhang, C. D. Stout, J. R. Halpert, *Mol. Pharmacol.* **2011**, *80*, 1047-1055.

reacciones de cicloadición catalizadas por metales.<sup>230a,233</sup> Sin embargo, en esta sección se prestará atención exclusivamente a los métodos biocatalíticos aplicados de manera sostenible para la obtención de piridinas en forma ópticamente activa.<sup>234</sup> Así, se han seleccionado una serie de ejemplos representativos que se clasifican en función del biocatalizador de la transformación.

### 5.2.1. Uso de Hidrolasas

Las hidrolasas, que se han utilizado ampliamente a lo largo de esta Tesis Doctoral, han participado como biocatalizadores activos en la preparación de piridinas enantioenriquecidas, principalmente a través de metodologías de resolución cinética mediante la acilación o la hidrólisis.<sup>234</sup> A continuación, se describen algunos ejemplos relevantes en los que se emplean hidrolasas, en su mayoría lipasas, en este tipo de procesos. Son especialmente significativos aquellos trabajos de investigación en los que se utilizan cloropiridinas como sustratos, dada su analogía con los derivados que se estudiarán en la primera parte de este capítulo.

En este contexto, entre los procesos de KR descritos en la bibliografía destaca la preparación de una serie de 4-cloro-2-(1-hidroxiálquil)piridinas, precursores directos de derivados de DMAP, que nuestro grupo de investigación llevó a cabo de forma enantioselectiva a través de un proceso quimioenzimático.<sup>235</sup> La quiralidad se introdujo mediante una reacción de transesterificación, utilizando la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PSL-C) como biocatalizador y acetato de vinilo como dador de acilo (Esquema 112). La resolución enzimática

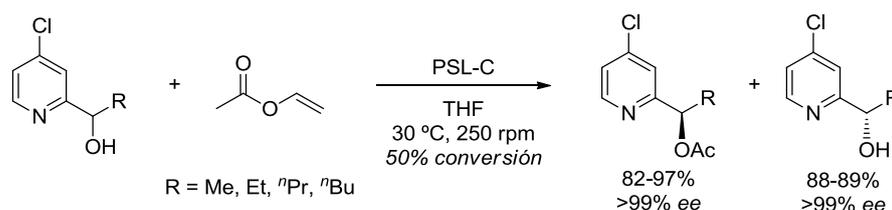
---

<sup>233</sup> a) J. M. Neely, T. Rovis, *Org. Chem. Front.* **2014**, *1*, 1010-1015; b) M. A. Halcrow, *New J. Chem.* **2014**, *38*, 1868-1882; c) D. L. Cominsa, K. Higuchib, D. W. Young, *Adv. Heterocycl. Chem.* **2013**, *110*, 175-235; d) T. L. S. Kishbaugh, *Prog. Heterocycl. Chem.*, **2013**, *25*, 319-355.

<sup>234</sup> V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor, *Targ. Heterocycl. Chem.* **2008**, *12*, 414-437.

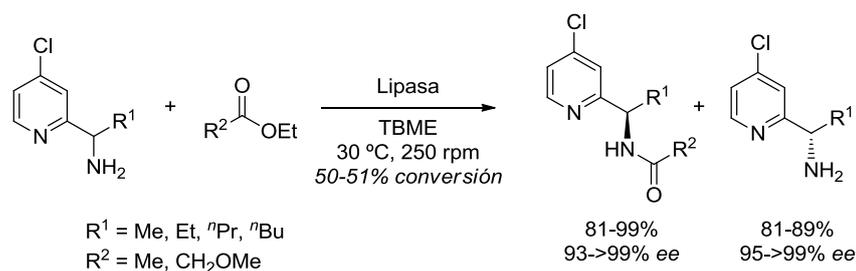
<sup>235</sup> E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3427-3435.

transcurrió con una enantioselectividad excelente, alcanzando la máxima conversión del 50% para todos los sustratos estudiados.



**Esquema 112.** Resolución cinética de 4-cloro-2-(1-hidroalquil)piridinas mediante un proceso de transesterificación enzimática catalizado por la PSL-C.

Más adelante, se extendió el mismo proceso de resolución cinética a piridinas 4-cloro-3-(1-hidroxisustituidas).<sup>236</sup> La CAL-B resultó ser el catalizador más eficiente para los derivados sustituidos en la posición C-3, utilizando el acetato de vinilo como reactivo y disolvente. Paralelamente, también se estudió la resolución cinética catalizada por lipasas de las correspondientes aminas de las cloropiridinas sustituidas en la posición C-2 (Esquema 113).<sup>237</sup> Los mejores resultados se obtuvieron empleando como biocatalizador la CAL-B para los derivados de metilo y etilo, mientras que para las piridinas con restos propilo y etilo se obtuvieron conversiones en torno al 50% con la PSL.



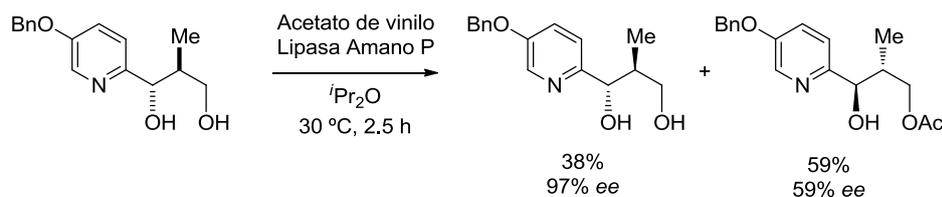
**Esquema 113.** Resolución cinética de 4-cloro-2-(1-aminoalquil)piridinas mediante un proceso de aminólisis empleando distintos ésteres de etilo en TBME.

Dirigiendo de nuevo la atención hacia los alcoholes, Akita y colaboradores han abordado la resolución cinética enzimática del diol

<sup>236</sup> E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 2626-2632.

<sup>237</sup> O. Torre, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1481-1488.

que se muestra en el Esquema 114. Los mejores resultados los proporcionó la lipasa Amano P de *Pseudomonas* sp. en presencia de acetato de vinilo como dador de acilo en éter diisopropílico.<sup>238</sup> Bajo esas condiciones, el correspondiente (1*R*,2*R*)-monoacetato se aisló con un rendimiento y exceso enantiomérico moderado, mientras que el (1*S*,2*S*)-diol remanente se obtuvo con buena pureza óptica, siendo posteriormente transformado en un precursor de la Nikomicina Z, un inhibidor de la sintetasa quitina con actividad antifúngica, insecticida y acaricida.

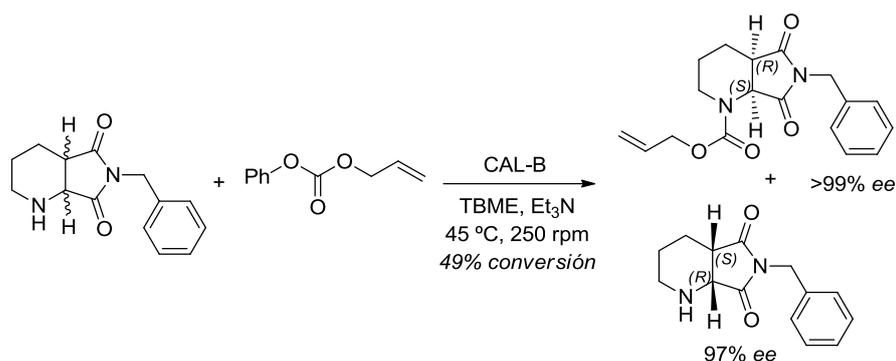


**Esquema 114.** Acilación regio- y estereoselectiva catalizada por la lipasa de Amano P del (±)-*anti*-1-(5-(benciloxi)piridin-2-il)-2-metilpropan-1,3-diol.

La (4*aR*,7*aS*)-6-benziltetrahydro-1*H*pirrolo[3,4-*b*]piridin-5,7-(6*H*,7*aH*)-diona es un intermedio clave en la síntesis del moxifloxacino, un fármaco perteneciente a la cuarta generación de fluoroquinolonas que actúan como agentes antibacterianos. Su preparación fue posible mediante la resolución cinética de la correspondiente dicetona racémica a través de un proceso de acilación de la amina secundaria cíclica catalizado por la CAL-B (Esquema 115).<sup>239</sup> El intermedio de interés se obtuvo en forma enantiopura tras la hidrólisis del acetato, producto de la reacción enzimática, para la que se observaron las mejores conversiones cercanas al 50% empleando 2.5 equiv de carbonato de alilo y fenilo en TBME y en presencia de un gran exceso de Et<sub>3</sub>N.

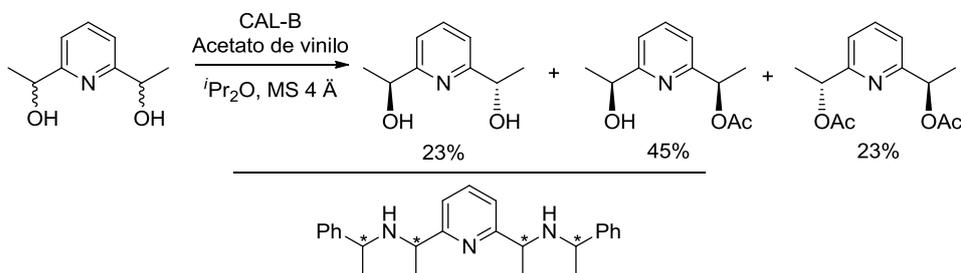
<sup>238</sup> H. Akita, Y. Takano, K. Nedu, K. Kato, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1705-1714.

<sup>239</sup> Y. Li, A. Wang, Y. Shen, P. Zhang, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2014**, *110*, 178-183.



**Esquema 115.** Resolución cinética de la *cis*-6-benziltetrahidro-1*H*-pirrolo[3,4-*b*]piridin-5,7-(6*H*,7*aH*)-diona empleando CAL-B en TBME a 45 °C y 250 rpm.

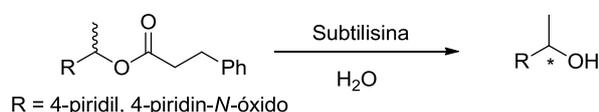
Las lipasas también resultan eficaces agentes de desimetrización de piridinas, como pone de manifiesto la obtención de 2,6-bis(1-hidroxietil)piridinas quirales. La síntesis procede a través de una acetilación cinética catalizada por la CAL-B en la que tienen lugar simultáneamente una resolución y una desimetrización (Esquema 116). A partir de los productos de la reacción enzimática y mediante sustituciones estereoespecíficas, los autores sintetizaron hasta diez 2,6-bis(1-(1-feniletilamino)etil)piridinas con una estereoquímica definida, algo que entraña gran dificultad ya que debido a la simetría de la molécula es posible la formación de ocho diastereoisómeros y cuatro enantiómeros.



**Esquema 116.** Acetilación catalizada por la CAL-B de la 2,6-bis(1-hidroxietil)piridina (arriba) aplicada a la síntesis de los distintos isómeros de 2,6-bis(1-(1-feniletilamino)etil)piridinas (abajo).

Cabe señalar que también se han utilizado otras hidrolasas en la preparación enzimática de piridinas ópticamente activas. Este es el caso

de proteasas de subtilisina, cuya reactividad frente a alcoholes secundarios se ha analizado en profundidad desde el punto de vista de la estereoselectividad del proceso (Esquema 117).<sup>240</sup> A través del estudio de la estructura de la subtilisina y experimentos de modelización del intermedio tetraédrico, Savile y Kazlauskas observaron una relación cuantitativa entre la enantioselectividad del proceso y la solvatación de los sustituyentes en el medio de reacción. Así, un sustituyente se situaría en el único hueco del centro activo, limitado por el tamaño, y el otro permanecería en el disolvente. De este estudio se derivan dos contribuciones de gran relevancia: por una parte, un incremento en la diferencia de polaridad entre los sustituyentes conduciría a un aumento de la enantioselectividad del proceso; por otra, el cambio del disolvente utilizado también podría estar dirigido a promocionar dicho aumento a través de una mejor solvatación.

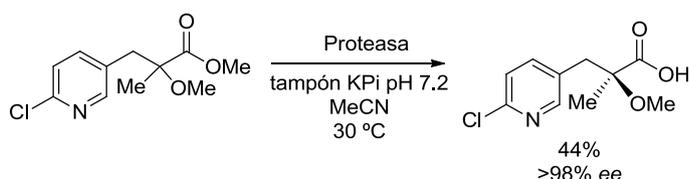


**Esquema 117.** Hidrólisis enzimática de derivados de piridina catalizada por la proteasa subtilisina.

Se ha descrito la síntesis de un receptor activado por proliferadores de peroxisomas, estructuras de gran interés farmacéutico, mediante la hidrólisis de un éster de metilo adyacente a un estereocentro cuaternario catalizada por la proteasa de páncreas bovino, formándose el correspondiente ácido carboxílico precursor del compuesto biológicamente activo (Esquema 118).<sup>241</sup> La ruta enzimática se presenta como alternativa a la resolución química con sales quirales o a un proceso de separación de diastereoisómeros.

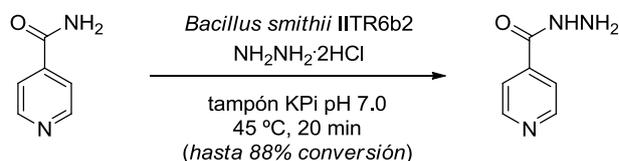
<sup>240</sup> C. K. Savile, R. J. Kazlauskas, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12228-12229.

<sup>241</sup> P. S. Humphries, Q.-Q. T. Do, D. M. Wilhite, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1765-1767.



**Esquema 118.** Hidrólisis enzimática de un metil éster catalizada por la proteasa de páncreas bovino para la preparación de un precursor de interés farmacológico.

Las nitrilasas son una clase de hidrolasas que permiten la transformación de grupos ciano en ácidos carboxílicos, mientras que las amidasas catalizan el proceso opuesto, es decir, la preparación de ácidos carboxílicos a partir de amidas.<sup>242</sup> Ambas clases de hidrolasas se usan a menudo como células enteras o en forma de microorganismos y, en este contexto, probablemente la biotransformación más estudiada sea la conversión de 3-cianopiridina en ácido nicotínico, una de las principales formas de vitamina B<sub>3</sub>.<sup>243</sup> Otra transformación relacionada es, por ejemplo, la preparación de isoniazida a partir de isonicotinamida, un importante fármaco para el tratamiento de la tuberculosis.<sup>244</sup> La actividad de aciltransferasa de la amidasa de *Bacillus smithii* utilizada en forma de células enteras quedó demostrada al utilizar como nucleófilo el dihidrocloruro de hidracina en medio acuoso (Esquema 119).



**Esquema 119.** Formación de isoniazida a partir de isonicotinamida empleando una amidasa.

<sup>242</sup> L. Martínková, V. Křen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 130-137.

<sup>243</sup> L. Cantarella, A. Gallifuoco, A. Malandra, L. Martínková, F. Pasquarelli, A. Spera, M. Cantarella, *Enzym. Microb. Technol.* **2010**, *47*, 64-70.

<sup>244</sup> S. Agarwal, M. Gupta, B. Choudhury, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *97*, 67-73.

## 5.2.2. Uso de Oxidorreductasas

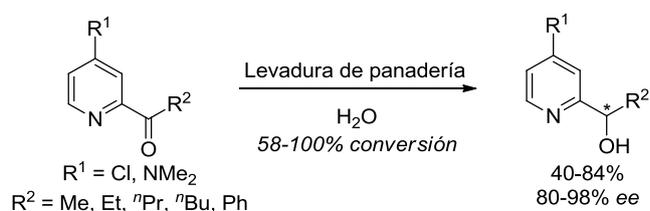
Este apartado se presentará subdividido en tres categorías, en función de la clase de enzima redox que cataliza el proceso: alcohol deshidrogenasas (ADHs), oxidasas, y un último apartado para otros tipos de oxidorreductasas que no se encuadran en las dos anteriores.

### 5.2.2.1. Alcohol Deshidrogenasas

Las ADHs son las oxidorreductasas para las cuales se ha encontrado mayor aplicación en la preparación de piridinas ópticamente activas, principalmente a través de procesos de biorreducción. En nuestro grupo de investigación se ha desarrollado la síntesis de piridinas 4-cloro-2-(1-hidroxisustituidas) así como de la 2-acetil-4-(*N,N*-dimetilamino)piridina mediante la biorreducción de las correspondientes cetonas mediada por la levadura de panadería (Esquema 120).<sup>245</sup> Se observaron conversiones de buenas a excelentes en todos los casos, excepto para el derivado de la DMAP donde fueron moderadas debido a problemas de solubilidad y, además, se necesitaron tiempos de reacción mayores. La reducción enzimática transcurrió con estereoselectividades entre moderadas y excelentes y condujo al aislamiento de los alcoholes de configuración (*S*), excepto en el derivado de fenilo con el cual se obtuvo el alcohol (*R*). Además, para las cetonas menos impedidas con sustituyentes metilo y etilo se obtuvieron excelentes valores de conversión con la *Lactobacillus brevis* (LB-ADH), permitiendo el aislamiento de los correspondientes (*R*)-alcoholes. Esta metodología se extendió con éxito a la biorreducción de cetonas análogas pero sustituidos en la posición C-3,<sup>236</sup> realizando en ambos casos posteriores transformaciones para el estudio de estos compuestos como potenciales catalizadores asimétricos, ampliando así el potencial de aplicación de estos derivados quirales.

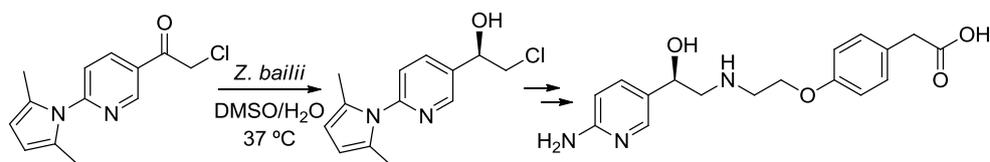
---

<sup>245</sup> E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, *17*, 1007-1016.



**Esquema 120.** Biorreducción de distintas dimetilamino- o cloropiridinas empleando levadura de panadería como catalizador.

Entre otras estrategias para la reducción quiral de la clorocetona representada en el Esquema 121, Scott y colaboradores consideraron la biorreducción de la misma con células enteras microbianas.<sup>246</sup> La *Zygosaccharomyces bailii* ATCC 38924 fue el organismo más selectivo para la transformación, obteniéndose la clorhidrina correspondiente con un rendimiento del 57% con un 98% *ee*. Los autores consiguieron elevar el rendimiento de la reacción a pequeña escala hasta un 76%. La piridina quiral funcionalizada producto de la biorreducción se utilizó como precursor en la síntesis a escala multi-gramo del receptor agonista  $\beta$ -3.



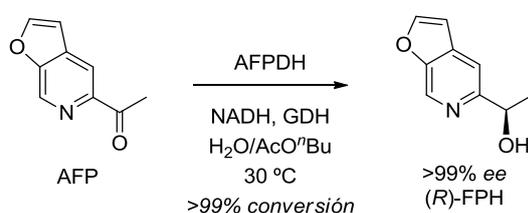
**Esquema 121.** Preparación de un receptor agonista adrenérgico  $\beta$ -3.

Más recientemente, una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADH (AFPDH) aislada de *Candida maris* ha acelerado la reducción estereoselectiva de la 5-acetilfuro[2,3-*c*]piridina (AFP), formándose la 5-((*R*)-1-hidroxietil)furo[2,3-*c*]piridina [(*R*)-FPH] en forma enantiopura, un compuesto de gran utilidad como precursor quiral en la preparación de compuestos de interés farmacológico (Esquema 122).<sup>247</sup> Para la regeneración del cofactor se utilizó la GDH de *Bacillus megaterium*,

<sup>246</sup> R. W. Scott, D. E. Fox, J. W. Wong, M. P. Burns, *Org. Process Res. Dev.* **2004**, *8*, 587-592.

<sup>247</sup> S. Kawano, M. Yano, J. Hasegawa, Y. Yasohara, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, *75*, 2155-2161.

para lo cual se estudió un proceso de crecimiento enzimático en *E. coli* en el que se desarrolló la co-expresión de genes de AFPDH y GDH, evitando así la inactivación del GDH por la (*R*)-FPH.



**Esquema 122.** Reducción enantioselectiva de la 5-acetilfuro[2,3-*c*]piridina.

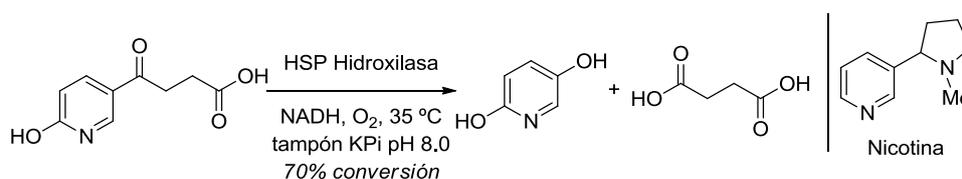
#### 5.2.2.2. Oxigenasas

Las oxigenasas son enzimas que catalizan la oxidación de un sustrato transfiriéndole oxígeno molecular de manera que puede incorporarse un átomo (monooxigenasas) o una molécula de oxígeno (dioxigenasas). Las hidroxilasas pertenecen a esta familia de enzimas, catalizando la formación de grupos hidroxilo en los sustratos sobre los que actúan. Así, la 6-hidroxi-3-succinoylpiridina hidroxilasa (HSP hidroxilasa) de *Agrobacterium tumefaciens* S33 participa en la ruta de degradación de la nicotina, el alcaloide principal del tabaco. La enzima cataliza un paso central como es la oxidación descarboxilativa de la 6-hidroxi-3-succinoylpiridina (HSP) formándose 2,5-dihidroxipiridina (2,5-DHP) y ácido succínico en presencia de NADH a pH 8.0, utilizando además formiato deshidrogenasa (FAD) para la regeneración del cofactor (Esquema 123).<sup>248</sup> El proceso es relevante no solo desde el punto de vista de la toxicidad directa hacia las personas, sino que también supone una prometedora aportación para el tratamiento biológico de los residuos del tabaco. Por este motivo, el papel de la HSP en la ruta de degradación de la nicotina ha sido estudiado en otras ocasiones, como es el caso de Wang y colaboradores, que aislaron la misma enzima de otro microorganismo, la *Pseudomonas putida*.<sup>249</sup> Además, cabe destacar que

<sup>248</sup> H. Li, K. Xie, H. Huang, S. Wang, *PLoS One* **2014**, *9*, e103324/1-e103324/8.

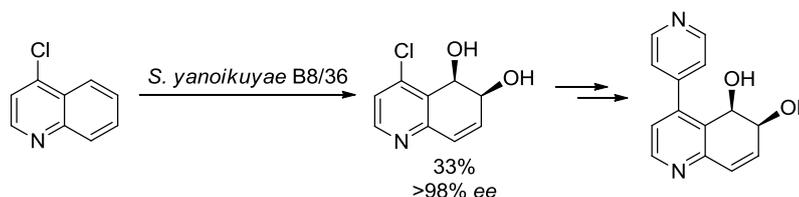
<sup>249</sup> H. Tang, Y. Yao, D. Zhang, X. Meng, L. Wang, H. Yu, L. Ma, P. Xu, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 39179-39186.

la 2,5-DHP producto de la reacción enzimática es un compuesto de elevado interés por ser precursor del ácido 5-aminolevulínico, utilizado como herbicida y en terapias contra el cáncer.



**Esquema 123.** Oxidación descarboxilativa de HSP a 2,5-DHP catalizada por la HSP hidroxilasa en la ruta de degradación de la nicotina.

La *cis*-dihidroxiación de la 4-cloroquinolina se ha realizado con una dioxigenasa bacteriana como biocatalizador (Esquema 124).<sup>250</sup> En concreto, la catálisis más eficiente se observó al utilizar células enteras de la *Sphingomonas yanoikuyae* B8/36, que dispone de un centro activo mayor que otras dioxigenasas estudiadas y dio lugar a la hidroxilación enantioselectiva, permitiendo el aislamiento del producto puro con rendimiento moderado. El 4-cloro-5,6-dihidroquinolina-5,6-diol producto de la reacción enzimática se empleó como precursor en la síntesis de 4,4'-bipiridinas quirales, compuestos de gran interés para la preparación de compuestos organometálicos y/o de coordinación quirales.



**Esquema 124.** Preparación de 4,4'-bipiridinas enantioméricamente puras mediante las *cis*-dihidroxiación bacteriana.

### 5.2.2.3. Otros Procesos Redox Enzimáticos

La enzima del puente de la berberina (BBE; del inglés, “berberine bridge enzyme”) es una enzima redox que cataliza la formación de enlaces carbono-carbono oxidativa transformando bencilisoquinolinas en

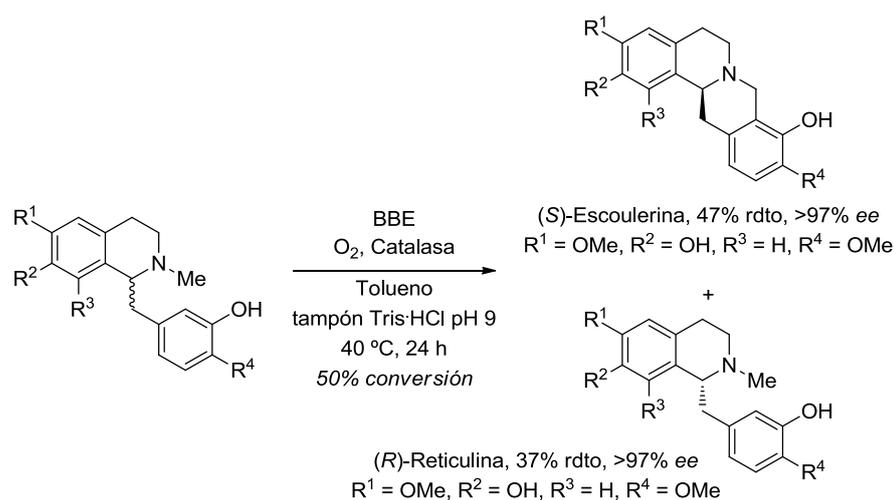
<sup>250</sup> L. Sbircea, N. D. Sharma, W. Clegg, R. W. Harrington, P. N. Horton, M. B. Hursthouse, D. C. Apperley, D. R. Boyd, S. L. James, *Chem. Commun.* **2008**, 5538-5540.

berberinas. Kroutil y colaboradores estudiaron por vez primera el uso de la BBE de *Eschscholzia californica* en sustratos no naturales, algo que suponía un desafío si se tiene en cuenta que las enzimas cuyo origen se encuentra en las plantas suelen presentar una estricta especificidad de sustrato.<sup>251</sup> En esa primera optimización de condiciones se determinó que, para evitar problemas de inhibición, era necesario el uso de una catalasa que consumiera el peróxido de hidrógeno generado en la reacción enzimática, y se observó que en todos los casos estudiados la enantioselectividad del proceso era perfecta, no superándose nunca el 50% de conversión. Seguidamente y en línea con lo anterior, los autores describieron la síntesis asimétrica catalizada por la BBE de distintos alcaloides con un perfil biológico interesante como la (*S*)-escoulerina, que puede actuar como analgésico, antiinflamatorio, hipnótico o sedante, o la (*R*)-reticulina, que presenta propiedades antiespasmódicas y es útil también para el tratamiento de la hipotensión.<sup>252</sup> Así, la KR oxidativa de la reticulina racémica y otras 1-bencil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolinas transcurrió con completa enantioselectividad tras 24 h a 40 °C en presencia de la catalasa (Esquema 125). El proceso tiene lugar a través de un acoplamiento C-C intramolecular por activación del grupo metilo unido al átomo de nitrógeno terciario a expensas de oxígeno molecular.

---

<sup>251</sup> J. H. Schrittwieser, V. Resch, J. H. Sattler, W.-D. Lienhart, K. Durchschein, A. Winkler, K. Gruber, P. Macheroux, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1068-1071.

<sup>252</sup> a) J. H. Schrittwieser, V. Resch, S. Wallner, W.-D. Lienhart, J. H. Sattler, J. Resch, P. Macheroux, W. Kroutil, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6703-6714; b) V. Resch, J. H. Schrittwieser, S. Wallner, P. Macheroux, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2377-2383.



**Esquema 125.** KR oxidativa catalizada por la BBE de 1-benzil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolinas racémicas aplicada a la síntesis de las (*S*)-escoulerina y (*R*)-reticulina.

### 5.2.3. Uso de Liasas

Las liasas son una clase de enzimas que catalizan la formación de enlaces carbono-carbono con elevados valores de estereoselectividad.<sup>253</sup> Dentro de esta familia de enzimas, las aldolasas y las hidroxinitrilo liasas (HNLs) son, sin lugar a dudas, las más versátiles para llevar a cabo transformaciones sintéticas, aunque en los últimos años también han despuntado otros biocatalizadores como herramientas de gran utilidad en síntesis orgánica.<sup>254</sup>

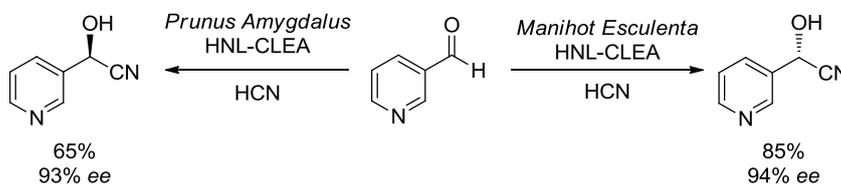
Uno de los pocos ejemplos existentes en la bibliografía en los que se usan carboxaldehídos heteroarílicos nitrogenados como sustratos para HNLs es la síntesis de cianohidrinan enantiocomplementarias a través de la hidrocianación del 3-piridincarboxaldehído (Esquema 126).<sup>255</sup> Los biocatalizadores del estudio se utilizaron en forma de agregados

<sup>253</sup> a) M. Müller, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 3161-3174; b) K. Fesko, M. Gruber-Khadjawi, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 1248-1272.

<sup>254</sup> a) V. Resch, J. H. Schrittwieser, E. Siirola, W. Kroutil, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 793-799; b) M. Müller, G. A Sprenger, M. Pohl, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 261-270.

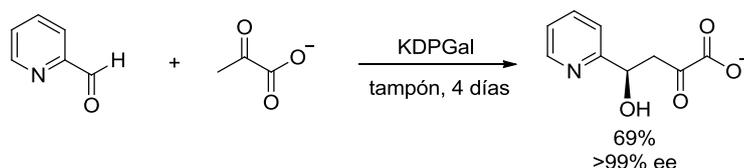
<sup>255</sup> C. Roberge, F. Fleitz, D. Pollard, P. Devine, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1473-1477.

enzimáticos por entrecruzamiento (CLEAs) lo que combinado con el uso de bajas temperaturas (5 °C), la cuidadosa optimización del medio de reacción (0.18 vol. % H<sub>2</sub>O/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) y la presencia de ácido cianhídrico, hizo posible la minimización de procesos laterales y la obtención de los productos finales con buenas conversiones y excesos enantioméricos.



**Esquema 126.** Empleo de HNL en la preparación estereoselectiva de cianohidrinas a partir de 3-piridincarboxaldehído.

Toone y colaboradores describieron el aislamiento, propiedades y utilidad sintética de la aldolasa de 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogalactonato (KDPPGal) dependiente de piruvato.<sup>256</sup> Frente a la inactividad reactiva del benzaldehído, el 2-piridincarboxaldehído resultó ser un excelente sustrato para esta enzima (Esquema 127), lo que es indicativo de una posible estabilización por puentes de hidrógeno cerca del centro activo gracias a la presencia del nitrógeno en la estructura de la molécula.



**Esquema 127.** Preparación del (*R*)-4-hidroxi-2-ceto-4-(2'-piridil)butirato catalizada por la aldolasa KDPPGal.

Recientemente, se ha modificado la aldolasa complementaria de 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato (KDPPG) con la intención de avanzar en la expansión de la especificidad de sustrato, principal limitación que presentan estas enzimas.<sup>257</sup> Mediante la introducción de mutaciones, los

<sup>256</sup> a) D. P. Henderson, I. C. Cotterill, M. C. Shelton, E. J. Toone, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 906-907; b) M. J. Walters, V. Srikannathasan, A. R. McEwan, J. H. Naismith, C. A. Fierke, E. J. Toone, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 710-720.

<sup>257</sup> M. Cheriyan, E. J. Toone, C. A. Fierke, *Biochemistry* **2012**, *51*, 1658-1668.

autores han desarrollado una mejora en la actividad de la KDPG frente al 2-piridincarboxaldehído, siendo ésta 3 veces superior a la correspondiente de la enzima nativa.

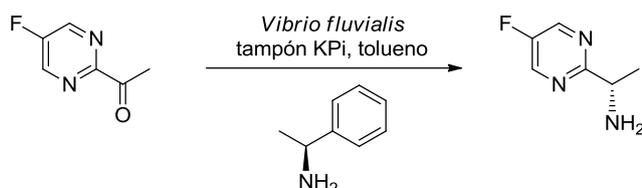
### 5.3. Aplicación de $\omega$ -Transaminasas en la Preparación de Estructuras Relacionadas

A continuación, se hará mención de una serie de ejemplos en los que se las  $\omega$ -transaminasas participan en la preparación estereoselectiva de distintos compuestos que, sin ser estrictamente piridinas, presentan un alto grado de semejanza estructural con ellas.

La preparación de la (*S*)-1-(5-fluoropirimidin-2-il)etilamina, un intermedio del inhibidor de quinasas JAK2 AZD1480, se ha desarrollado empleando la *Vibrio fluvialis* como biocatalizador y la (*S*)- $\alpha$ -metilbenzilamina como dador de amino (Esquema 128).<sup>258</sup> El proceso, enfocado desde un punto de vista industrial, destaca por las elevadas concentraciones de sustrato utilizadas, llevando la reacción a conversión completa para una concentración de cetona 0.35 M utilizando 1.1 equiv del dador de amino, tolueno como cosolvente y tras 20 h. La reacción se escaló con la enzima tanto en forma de células enteras como en un preparado líquido comercial, obteniéndose buenos rendimientos (66-77%) y excelentes excesos enantioméricos (97->99% *ee*) tras realizar una serie de transformaciones químicas (protección con Boc y formación del hidrocloreuro) para posibilitar el aislamiento del producto.

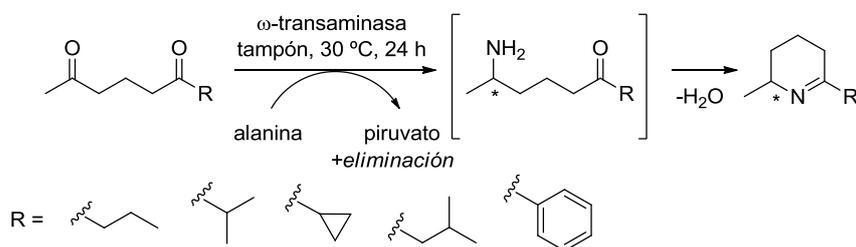
---

<sup>258</sup> R. E. Meadows, K. R. Mulholland, M. Schürmann, M. Golden, H. Kierkels, E. Meulenbroeks, D. Mink, O. May, C. Squire, H. Straatman, A. S. Wells, *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 1117-1122.



**Esquema 128.** Síntesis de la (*S*)-1-(5-fluoropirimidin-2-il)etilamina empleando la *Vibrio fluvialis* en combinación con la (*S*)- $\alpha$ -metilbenzilamina.

Kroutil y colaboradores desarrollaron por vez primera la monoaminación regioselectiva de distintas 1,5-dicetonas con  $\omega$ -transaminasas (*S*)- y (*R*)-selectivas para una concentración 50 mM de sustrato (Esquema 129).<sup>259</sup> En todos los casos estudiados la aminación tuvo lugar en la cetona menos impedida estéricamente, quedando sin modificar el otro grupo carbonilo. La amino cetona intermedia experimenta una ciclación espontánea, obteniéndose con excelentes conversiones y excesos enantioméricos ambos enantiómeros de las  $\Delta^1$ -piperideínas precursoras de piperidinas, dependiendo de la estereoselectividad de la enzima empleada. El estudio fue posteriormente ampliado empleando otras  $\omega$ -transaminasas, incluyendo la ArRmut 11, que acepta 2-propilamina como dador de amino y, por tanto, hace factible utilizar el proceso con fines industriales.<sup>260</sup>



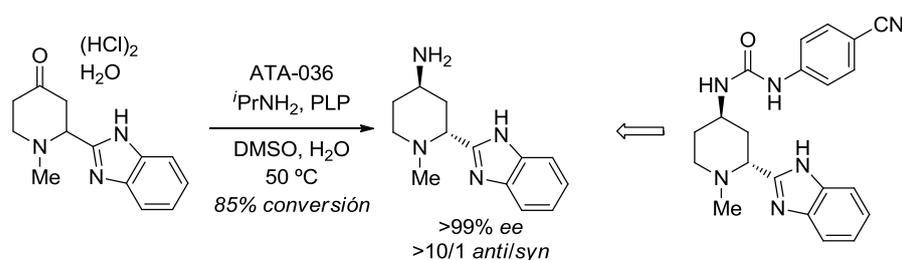
**Esquema 129.** Aminación regioselectiva de 1,5-dicetonas.

Se ha descrito la síntesis de la molécula representada en el Esquema 130, con potencial uso terapéutico para el tratamiento de distintos cánceres en humanos, a través de una  $\omega$ -transaminasa

<sup>259</sup>R. C. Simon, B. Grischek, F. Zepeck, A. Steinreiber, F. Belaj, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6713-6716.

<sup>260</sup>R. C. Simon, F. Zepeck, W. Kroutil, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 2859-2865.

comercial (ATA-036) como paso clave para la introducción de la quiralidad.<sup>261</sup> La reacción de transaminación enzimática de la 4-piperidona de partida genera no solo quiralidad en la posición C-4 en la que se forma la amina, sino también determina la configuración del estereocentro de la posición C-2 a través de un proceso de resolución cinética dinámica. Los autores proponen un mecanismo de apertura del ciclo mediante una retro-aza-Michael/aza-Michael para explicar la racemización que hace posible la DKR.



**Esquema 130.** Transaminación y DKR de la 4-(1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)-1-metilpiperidin-4-ona.

<sup>261</sup> Z. Peng, J. W. Wong, E. C. Hansen, A. L. A. Puchlopek-Dermenci, H. J. Clarke, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 860-863.

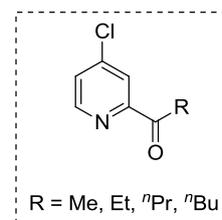


## **OBJETIVOS**



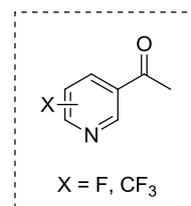
- Tras considerar la importancia de la estructura de piridina a nivel biológico y su versatilidad a nivel sintético, se han seleccionado dos familias de piridinas para el estudio de su reactividad como cetonas proquirales frente a transaminasas en procesos de síntesis asimétrica.

- Por una parte, se emplearán como sustratos una serie de piridinas cloradas, en cuya estructura se mantendrán fijas las posiciones del sustituyente clorado y del grupo acetilo, mientras que por otro lado se realizarán variaciones en la longitud del resto alquílico.



- Se pretende estudiar el nivel de aceptación de las transaminasas en el reconocimiento de sustituyentes alquílicos distintos al metilo, así como analizar la influencia que otros factores estructurales ejercen en la transaminación.

- En una segunda parte se estudiará la transaminación enzimática de una familia de piridinas en las que se introducirá una sustitución fluorada, variando en este caso la posición y el tipo de sustitución en el anillo de piridina.





## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



La discusión de resultados de este último capítulo se ha estructurado en función del sustituyente halogenado presente en el anillo de piridina. Así, en una primera parte se desarrollarán la síntesis y transaminación de una familia de piridinas cloradas para las que, además, se analizará la influencia de distintos factores estructurales, y en una segunda sección bien diferenciada se considerará una familia de piridinas fluoradas como sustratos en reacciones catalizadas por  $\omega$ -transaminasas. Las implicaciones enzimáticas de ambas partes, tanto en lo referente a optimización como a crecimiento de enzimas, se han desarrollado durante una estancia realizada en el centro universitario Karl Franzens de Graz, dentro del grupo de investigación del Profesor Wolfgang Kroutil.

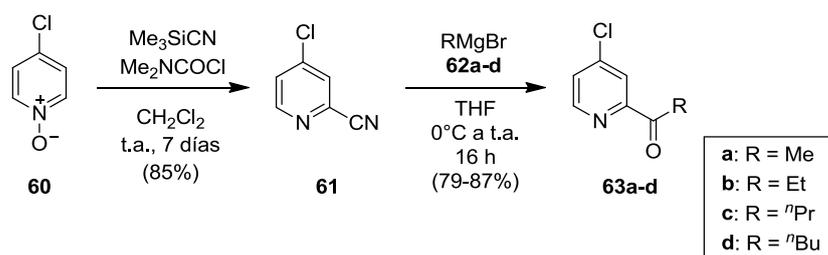
## **5.4. Piridinas Cloradas**

En esta primera sección se llevará a cabo la preparación de una familia de piridinas cloradas funcionalizadas como cetonas para actuar como sustratos en los posteriores estudios de transaminación, en los que se utilizarán las enzimas en forma de células enteras.

### **5.4.1. Síntesis Química de Piridinas Cloradas**

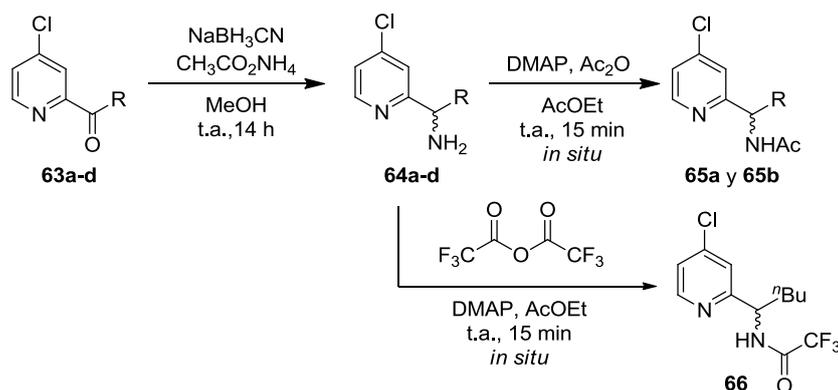
Las clorocetonas **63a-d** se sintetizaron en dos pasos de reacción a partir del *N*-óxido de 4-cloropiridina (**60**), siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía (Esquema 131).<sup>235</sup> En una primera etapa se obtuvo el picolinonitrilo (**61**) por reacción del compuesto comercial **60** con cianuro de trimetilsililo y cloruro de dimetilcarbamoilo. La presencia de la funcionalidad ciano facilitó la introducción de distintos restos alquilo en la molécula mediante la adición de los reactivos de

Grignard **62a-d**. De esta manera se prepararon las 2-(4-cloropiridil)cetonas alquiladas **63a-d** con buenos rendimientos.



**Esquema 131.** Síntesis de cetonas **63a-d**.

La aminación reductiva por métodos químicos de las piridinas **63a-d** condujo a las correspondientes aminas racémicas **64a-d** (Esquema 132), cuya síntesis fue preceptiva para su uso como material de referencia en las medidas de conversión de las reacciones enzimáticas, encontrando una buena separación en CG para los enantiómeros de la amina **64c**. La dificultad para establecer una metodología analítica adecuada para la determinación de los excesos enantioméricos de las aminas desprotegidas **64a**, **64b** y **64d** hizo necesaria su derivatización. Por ello, se generaron en el medio de reacción las acetamidas **65a** y **65b** para las que se encontraron separaciones apropiadas en CG con columnas quirales. En el caso de la amina **64d** no fue posible dicha separación, por lo que se derivatizó empleando anhídrido trifluoroacético, obteniéndose la trifluoroacetamida **66**. Tampoco se encontró un programa de temperatura adecuado para la separación de los enantiómeros de este derivado, por lo que consideró como alternativa el uso de HPLC quiral, consiguiendo finalmente buenas separaciones mediante esta técnica. Las condiciones y tiempos de retención para las separaciones optimizadas por CG y HPLC se recogen en la Parte Experimental de este capítulo.

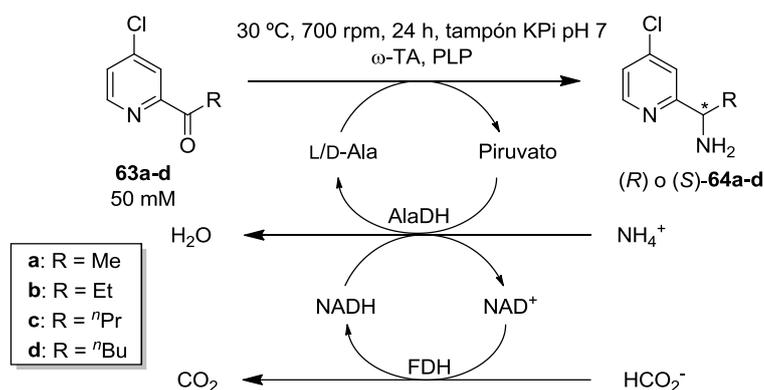


**Esquema 132.** Síntesis química del material de referencia para la medida de las conversiones (**64a-d**) y los excesos enantioméricos (**64c**, **65a**, **65b** y **66**).

#### 5.4.2. Estudios de Transaminación

Para la aminación enzimática de las cetonas **63a-d** se consideraron, en un primer momento, cinco  $\omega$ -TAs de distinta estereopreferencia con la pretensión de obtener ambos enantiómeros de las aminas **64a-d**. Para ello, se utilizó como dador de amino la L-alanina (L-Ala) para las enzimas (*S*)-selectivas y D-Ala para las (*R*)-selectivas. Como sistema de regeneración del piruvato se seleccionó el de la alanina deshidrogenasa (AlaDH), que requiere de la presencia de acetato de amonio en el medio, nicotinamida adenina dinucleótido ( $\text{NAD}^+$ ) como cofactor y formiato deshidrogenasa (FDH) para regenerar dicho cofactor, un proceso en cascada en el que únicamente se generan agua y  $\text{CO}_2$  como subproductos (Esquema 133).

Las reacciones se efectuaron en una disolución tampón de fosfatos a pH 7. Con ánimo de simplificar, cuando más adelante en el capítulo se haga referencia a esta última cascada se la denominará “*sistema de reciclaje*” en el correspondiente esquema de reacción.



**Esquema 133.** Transaminación enzimática de las cetonas **63a-d** empleando alanina como dador de amino y el sistema de reciclaje de la AlaDH.

El estudio preliminar se llevó a cabo con una concentración de sustrato 50 mM, a 30 °C y 700 rpm durante 24 h (Tabla 38). Así, con un resto metilo como sustituyente, con la piridina **63a** se obtuvieron conversiones completas hacia la formación de ambos enantiómeros de la correspondiente amina **64a** en forma enantiopura (entradas 1 y 2 para el enantiómero (*S*); entradas 4 y 5 para el enantiómero (*R*)). Los excelentes resultados observados incentivaron el escalado de la reacción, para el cual se usó como biocatalizador la Cv- $\omega$ -TA, alcanzándose una conversión >99% tras 24 h a 30 °C y 120 rpm y aislándose la amina (*S*)-**64a** con un 82% de rendimiento. La eficiencia catalítica de la Vf- $\omega$ -TA se estudió en detalle con fines sintéticos, reduciéndose la cantidad de transaminasa utilizada en el escalado del proceso hasta un cuarto de la cantidad que correspondería al escalado lineal de las condiciones a pequeña escala (32 mg de  $\omega$ -TA frente a 125 mg, ver Parte Experimental), obteniéndose la amina (*S*)-**64a** enantiopura con un 93% de rendimiento.

**Tabla 38.** Estudios de transaminación de las piridinas **63a-d** empleando L- o D-Ala como dador de amino y el sistema de regeneración de la AlaDH a 30 °C y 700 rpm durante 24 h.

Entrada	Compuesto	$\omega$ -TAs <sup>a</sup>	c (%) <sup>b,c</sup>	ee (%) <sup>b</sup>
1	<b>63a</b>	<i>Vibrio fluvialis</i> (S)	>99 (93)	>99
2	<b>63a</b>	<i>Chromobacterium violaceum</i> (S)	>99 (82)	>99
3	<b>63a</b>	<i>Arthrobacter citreus</i> (S)	44	>99
4	<b>63a</b>	<i>Arthrobacter</i> sp. (R)	>99	>99
5	<b>63a</b>	<i>Aspergillus terreus</i> (R)	>99	>99
6	<b>63b</b>	<i>Vibrio fluvialis</i> (S)	>99 (93)	>99
7	<b>63b</b>	<i>Chromobacterium violaceum</i> (S)	>99	>99
8	<b>63b</b>	<i>Arthrobacter citreus</i> (S)	40	89
9	<b>63b</b>	<i>Arthrobacter</i> sp. (R)	95	>99
10	<b>63b</b>	<i>Aspergillus terreus</i> (R)	97	>99
11	<b>63c</b>	<i>Vibrio fluvialis</i> (S)	72	>99
12	<b>63c</b>	<i>Chromobacterium violaceum</i> (S)	14	>99
13	<b>63c</b>	<i>Arthrobacter citreus</i> (S)	<1	--
14	<b>63c</b>	<i>Arthrobacter</i> sp. (R)	3	--
15	<b>63c</b>	<i>Aspergillus terreus</i> (R)	<1	--
16	<b>63d</b>	<i>Vibrio fluvialis</i> (S)	15	81 <sup>d</sup>
17	<b>63d</b>	<i>Chromobacterium violaceum</i> (S)	19	<1 <sup>d</sup>
18	<b>63d</b>	<i>Arthrobacter citreus</i> (S)	<1	--
19	<b>63d</b>	<i>Arthrobacter</i> sp. (R)	<1	--
20	<b>63d</b>	<i>Aspergillus terreus</i> (R)	<1	--

<sup>a</sup> Se indica entre paréntesis la estereopreferencia de la transaminasa.

<sup>b</sup> Determinado por CG.

<sup>c</sup> Se indican entre paréntesis los rendimientos aislados tras llevar a cabo el proceso a escala preparativa (50 mg de sustrato).

<sup>d</sup> Determinado por HPLC.

A continuación, se estudió la transaminación de **63b** (R = Et), para el cual se obtuvieron resultados excelentes en términos de conversión y estereoselectividad (entradas 6 y 7 para el enantiómero (S); entradas 9 y 10 para el enantiómero (R)). No obstante, para este sustrato más impedido se observó un leve descenso en los valores de conversión con las enzimas (R)-selectivas *Arthrobacter* sp. y At- $\omega$ -TA (95 y 97%, respectivamente). Además, la pureza óptica decreció en el caso de

utilizar la *Arthrobacter citreus* como biocatalizador (89% *ee*, entrada 8). Nuevamente, se realizó el escalado de la reacción para 50 mg de sustrato a 30 °C y 120 rpm, seleccionando la Vf- $\omega$ -TA para la catálisis. En este caso, se necesitaron 3/4 partes de la cantidad de enzima (88 mg) respecto a lo que correspondería en un escalado lineal de las condiciones a pequeña escala, para alcanzar una conversión total hacia la formación de la amina enantiopura (*S*)-**64b** con un 93% de rendimiento tras 24 h de reacción.

Sin embargo, al ampliar la longitud de la cadena alquílica se observó un importante cambio de tendencia en los resultados obtenidos. Por una parte, la amina (*S*)-**64c** se obtuvo en forma enantiopura y con buena conversión empleando la Vf- $\omega$ -TA como catalizador (entrada 11). Las conversiones fueron menores con otras enzimas (*S*)-selectivas como la Cv- $\omega$ -TA (14%, entrada 12), o alguna que no ha sido incluida en la Tabla 38 como la *Bacillus megaterium* (<1%), *Pseudomonas fluorescens* (<1%) o *Paracoccus denitrificans* (8%). Por otro lado, con todas las enzimas (*R*)-selectivas se obtuvieron conversiones muy bajas o nulas (entradas 14 y 15), incluso cuando se utilizó alguna enzima distinta como la *Hyphomonas neptunium*, con la que no se detectó el producto en el crudo de reacción.

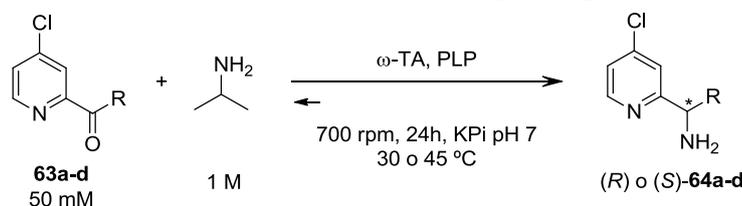
Lo mismo ocurrió para la cetona **63d**, para la cual no se observó conversión alguna hacia la formación de la amina (*R*)-**64d** (entradas 19 y 20), mientras que con las enzimas (*S*)-selectivas se obtuvieron conversiones bajas o nulas (entradas 16, 17 y 18). Además, no se observó enantiodiscriminación con la Cv- $\omega$ -TA (entrada 17) y disminuyó notablemente con la Vf- $\omega$ -TA (81% *ee*, entrada 16). Por este motivo, se contempló la opción de emplear enzimas evolucionadas genéticamente en la reacción de transaminación de las cetonas **63c** y **63d**, entre las que se incluyeron la mutante de la *Vibrio fluvialis*<sup>262</sup> y la mutante de la *Arthrobacter* sp. (ArRmut 11). Esta última se utilizó tanto en forma de

---

<sup>262</sup> F. Cabrirol, A. Gohel, S. H. Oh, D. Smith, B. Wong, J. Lalonde, WO 2011/159910 A2, Codexis, Inc.

células enteras como tras un proceso de semipurificación mediante sonicación para romper las paredes celulares. Ambas enzimas aceptan como dador de amino la isopropilamina, que se utilizó en una concentración elevada (1 M) para desplazar el equilibrio hacia la formación de las aminas **64a-d** (Tabla 39).

**Tabla 39.** Estudios de transaminación de las cloropiridinas **63a-d** empleando isopropilamina como dador de amino a 30 o 45 °C y 700 rpm durante 24 h.



Entrada	Cetona	$\omega$ -TAs <sup>a</sup>	c (%) <sup>b,c</sup>	ee (%) <sup>b</sup>
1	<b>63a</b>	ArRmut 11 semipurificada (R)	98	99
2	<b>63b</b>	ArRmut 11 semipurificada (R)	97	>99
3	<b>63c</b>	<i>Vibrio fluvialis</i> mutante (S)	<1	--
4	<b>63c</b>	ArRmut 11 (R)	14	>99
5	<b>63c</b>	ArRmut 11 semipurificada (R)	96 (68)	>99
6	<b>63d</b>	<i>Vibrio fluvialis</i> mutante (S)	<1	--
7	<b>63d</b>	ArRmut 11 (R)	64	>99 <sup>d</sup>
8	<b>63d</b>	ArRmut 11 semipurificada (R)	87	>99 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Se indica entre paréntesis la estereopreferencia de la transaminasa.

<sup>b</sup> Determinado por CG.

<sup>c</sup> Se indican entre paréntesis los rendimientos aislados tras llevar a cabo el proceso a escala preparativa (50 mg de sustrato).

<sup>d</sup> Determinado por HPLC.

Las reacciones catalizadas por la *Vibrio fluvialis* mutante se realizaron a 30 °C, y en ellas no se observó la formación del producto para ninguno de los sustratos **63c** o **63d** (entradas 3 y 6). Por el contrario, la ArRmut 11 catalizó el proceso a 45 °C de forma completamente estereoselectiva hacia la formación de las aminas (*R*)-**64c** y (*R*)-**64d** (entradas 4 y 7, respectivamente), obteniéndose esta última con una conversión moderada (64%, entrada 7). Tras la semipurificación de la enzima, la reacción de transaminación tuvo lugar hasta la consumición de prácticamente la totalidad de la cetona de

partida **63c** (entrada 5) y con una conversión muy buena para la cetona **63d** (87%, entrada 6), en ambos casos con excelente estereodiscriminación. El escalado para 50 mg de **63c** condujo a la amina enantiopura (*R*)-**64c** con un 68% de rendimiento. Por último, la reacción con la preparación enzimática semipurificada se extendió a los sustratos **63a** y **63b**, que se desarrollaron de forma casi cuantitativa y completamente estereoselectiva (entradas 1 y 2).

### 5.4.3. Estudios de Reactividad

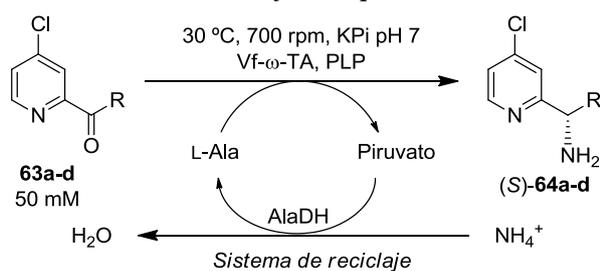
Una vez superada la barrera de conversión para aquellos sustratos cuya aceptación por parte de las transaminasas fue problemática en los primeros estudios y habiendo, por tanto, alcanzado conversiones de buenas a excelentes para las cloropiridinas **63a-d**, se decidió explorar la influencia de una serie de factores estructurales en los experimentos enzimáticos de transaminación. Los distintos estudios realizados se encuentran subdivididos en tres secciones, en función del elemento objeto de análisis. En primer lugar, se medirá la conversión de la reacción de transaminación a tiempos cortos de reacción a fin de analizar el efecto de la longitud de la cadena. A continuación, se examinarán los parámetros estructurales que puedan ejercer algún tipo de influencia en la interacción entre enzima y sustrato, como la posición del grupo acetilo y la presencia de los átomos de cloro y nitrógeno. Por último, se analizará la estabilidad termodinámica de los productos y el estado del equilibrio en las reacciones catalizadas por la ArRmut 11 semipurificada.

#### 5.4.3.1. Efecto de la Longitud de la Cadena Alquílica

Para este primer estudio estructural se emplearon 10 mg de  $V\alpha$ -TA para 0.05 mmol de sustrato y se detuvieron las reacciones a las 1, 3, 5 y 7 h. La selección de esa transaminasa en particular estuvo motivada por los excelentes resultados obtenidos para los sustratos **63a** y **63b**, y en vista del buen valor de actividad observado incluso para el derivado con el resto propilo **63c**. Los datos experimentales adquiridos se encuentran recogidos en la Tabla 40.

El derivado metilado **63a** mostró una reactividad muy elevada, obteniéndose una conversión del 79% con tan solo 1 h de reacción (entrada 1), valor que se incrementó hasta más de un 90% a las 3 h de reacción (entrada 5) y, tras 7 h, ya se había alcanzado prácticamente la conversión completa (entrada 13). Por su parte, la cetona **63b** exhibió una cinética considerablemente más lenta con conversiones similares a las obtenidas para el derivado **63c** a las 1 y 3 h (entradas 2, 3, 6 y 7). Transcurridas 5 y 7 h la diferencia entre estos dos sustratos se hizo más patente, siendo aproximadamente el doble la actividad mostrada hacia la formación de (*S*)-**64b**. En consonancia con lo observado a las 24 h de reacción (ver Tabla 38), se obtuvieron conversiones muy bajas en la transaminación de la cetona **63d**, alcanzándose un valor máximo del 4% de conversión a las 7 h. En todos los casos en los que se midieron, los excesos enantioméricos se mantuvieron excelentes.

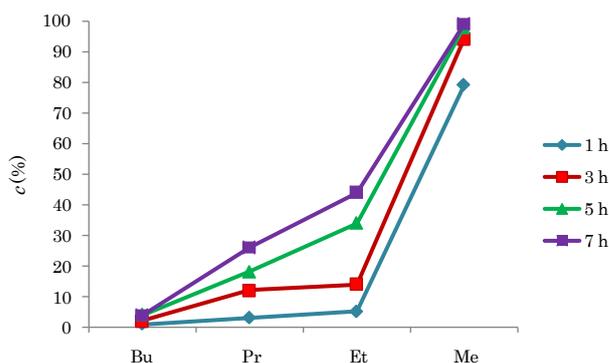
**Tabla 40.** Estudios de transaminación de las cetonas **63a-d** a tiempos cortos de reacción, empleando Vf- $\omega$ -TA a 30 °C y 700 rpm.



Entrada	Cetona	t (h)	c (%) <sup>a</sup>	ee (%) <sup>a</sup>
1	<b>63a</b>	1	79	>99
2	<b>63b</b>	1	5	>99
3	<b>63c</b>	1	3	--
4	<b>63d</b>	1	<1	--
-----				
5	<b>63a</b>	3	94	>99
6	<b>63b</b>	3	14	>99
7	<b>63c</b>	3	12	>99
8	<b>63d</b>	3	2	--
-----				
9	<b>63a</b>	5	98	>99
10	<b>63b</b>	5	34	>99
11	<b>63c</b>	5	18	>99
12	<b>63d</b>	5	4	--
-----				
13	<b>63a</b>	7	99	>99
14	<b>63b</b>	7	44	>99
15	<b>63c</b>	7	26	>99
16	<b>63d</b>	7	4	--

<sup>a</sup> Determinado por CG.

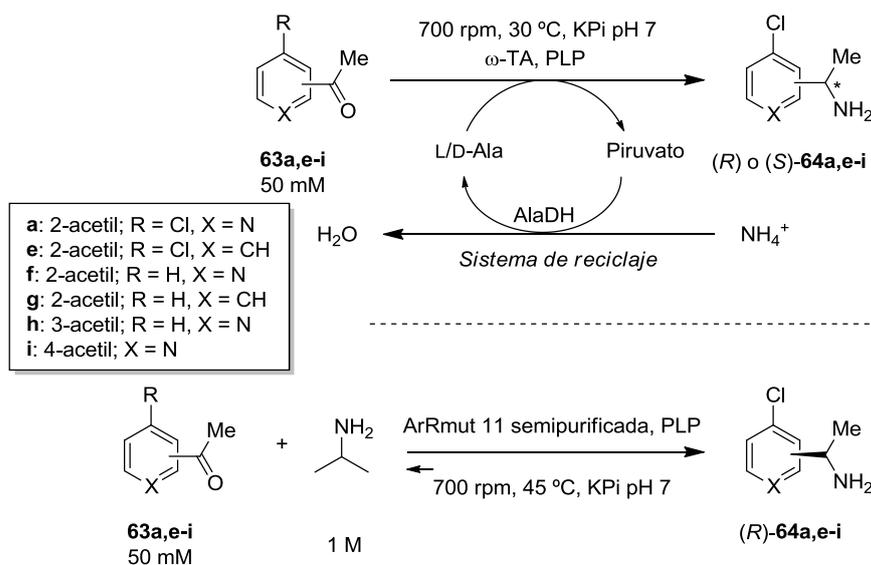
Todos los datos que se han discutido anteriormente se encuentran recogidos gráficamente en la Figura 35 con el fin de apreciar de forma visual las diferencias en la reactividad de los sustratos dependiendo de la longitud de la cadena.



**Figura 35.** Representación gráfica de la reactividad de la Vf- $\omega$ -TA en función de la longitud de la cadena tras 1, 3, 5 y 7 h.

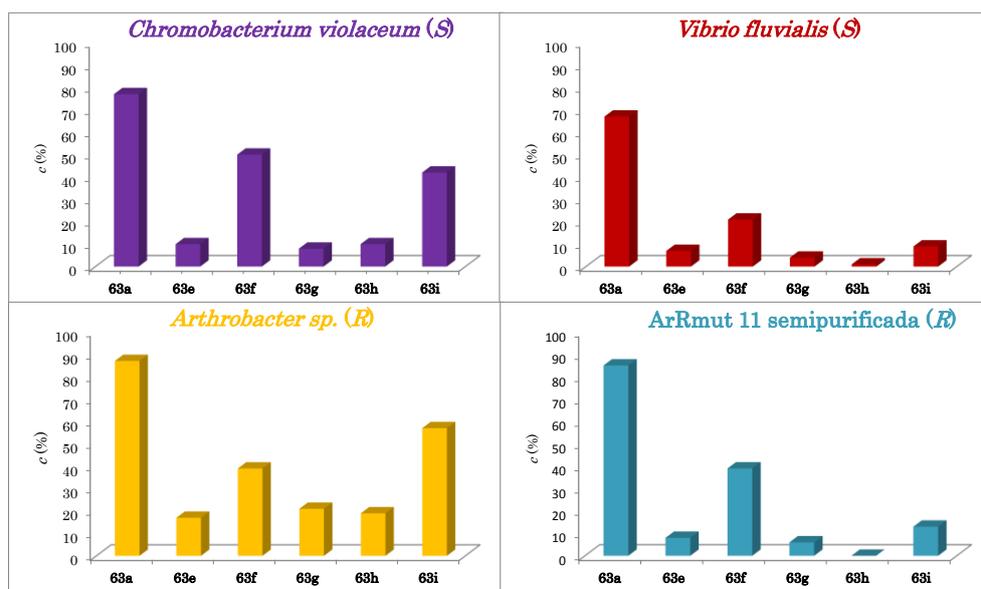
#### 5.4.3.2. Efecto de la Sustitución y la Posición del Grupo Acetilo

Una vez completada la comparación entre las distintas piridinas cloradas que se han venido utilizando como sustratos en los estudios enzimáticos a lo largo de este capítulo, el estudio de reactividad trascendió a otros factores estructurales presentes en el anillo aromático. Para ello, se designó como sustrato modelo el derivado metilado **63a** y se seleccionaron otros cinco sustratos para su análisis, en el que se utilizaron dos enzimas (*S*-selectivas y dos (*R*)-selectivas como biocatalizadores en los experimentos de transaminación. Cabe destacar que, con la intención de evidenciar el carácter general de este estudio, se contemplaron tanto enzimas de distinta selectividad como distintas condiciones de reacción, ya que en el caso de la ArRmut 11 semipurificada se emplea un dador de amino diferente para el cual no son necesarios cofactores o sistemas de reciclaje y la reacción tiene lugar a mayor temperatura (Esquema 134).



**Esquema 134.** Transaminación enzimática de **63a,e-i** empleando Ala como dador de amino y el sistema de reciclaje de la AlaDH (arriba); o isopropilamina como dador y ArRmut 11 semipurificada como biocatalizador (abajo).

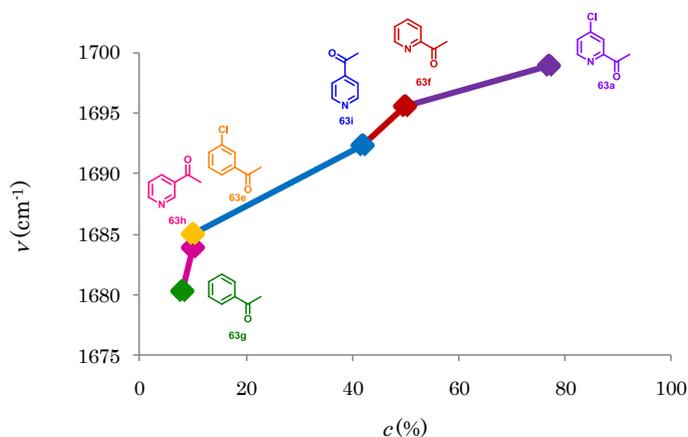
En una primera instancia, se llevaron a cabo las reacciones de transaminación empleando la Cv- $\omega$ -TA (20 mg) como biocatalizador para una concentración de sustrato 50 mM y se dejó avanzar la reacción durante 3 h, obteniéndose conversiones excesivamente elevadas en algunos casos y siendo necesario, por tanto, un reajuste de las condiciones de reacción para manejar unos valores más representativos. Tras una pequeña optimización, se establecieron como condiciones óptimas el uso de 10 mg de  $\omega$ -TA y 1 h de reacción, considerando también como catalizadores la Vf- $\omega$ -TA, la *Arthrobacter* sp. y la ArRmut 11 semipurificada (Figura 36).



**Figura 36.** Representación gráfica de la actividad de distintas transaminasas para los sustratos **63a,e-i**.

A pesar de las pequeñas e innegables diferencias en el comportamiento de estas enzimas, se aprecian ciertas tendencias comunes en su reactividad. Así, si se compara el sustrato modelo **63a** con la 2-acetilpiridina (**63f**) se pone de manifiesto una importante caída en los valores de conversión debida a la ausencia del átomo de cloro. Este descenso es realmente acusado al comparar **63a** con la 3-cloroacetofenona (**63e**). La dramática influencia del átomo de nitrógeno es también clara al analizar los resultados correspondientes a la acetofenona (**63g**), para la que se obtuvieron conversiones bajas con todas las transaminasas estudiadas. La 3-acetilpiridina (**63h**) mostró una tendencia similar, exhibiendo baja reactividad en todos los casos debida al cambio del grupo acetilo a la posición C-3, lo que llevó incluso a nulas conversiones con la ArRmut 11 en su versión semipurificada. Mejores valores se obtuvieron, al menos con algunas enzimas, para la 4-acetilpiridina (**63i**), aunque incluso en el mejor de los casos la diferencia es muy significativa respecto a las conversiones observadas para el sustrato **63a**.

Los datos espectroscópicos de estos sustratos revelaron una correlación entre la conversión de la transaminación y la frecuencia vibracional de la banda del carbonilo (C=O) en forma de relación positiva, es decir, las mayores conversiones están relacionadas con las mayores frecuencias de vibración. En la Figura 37 se muestra cómo las frecuencias menores se corresponden con los sustratos no piridinas **63e** y **63g**, así como la piridina **63h**, para los cuales la conversión de la reacción de transaminación catalizada por la Cv- $\omega$ -TA tras 1 h fue menor o igual al 10%. Por su parte, en el espectro de IR se observó la banda de C=O de las piridinas acetiladas en la posición 2 y 4 (**63i** y **63f**, respectivamente) y de la cloropiridina modelo **63a** a frecuencias superiores a 1690  $\text{cm}^{-1}$ , siendo estos sustratos los que mostraron una mayor reactividad en el proceso enzimático.

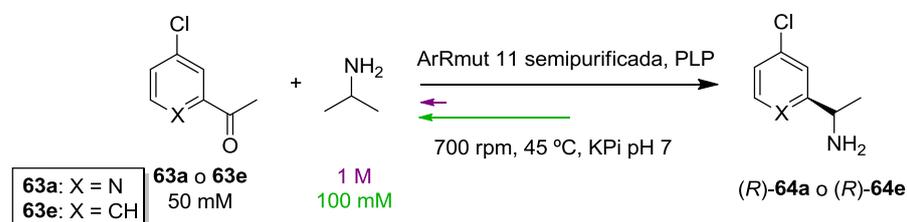


**Figura 37.** Representación gráfica de la frecuencia de vibración de la banda C=O frente a la conversión en la reacción de transaminación de **63a,e-i** empleando Cv- $\omega$ -TA como biocatalizador y el sistema de la AlaDH a 700 rpm y 30 °C durante 1 h.

Por el contrario, no fue posible establecer una relación entre las conversiones y la frecuencia de resonancia del carbonilo, algo en cierta manera esperable debido a que el desplazamiento químico en el experimento de  $^{13}\text{C}$ -RMN no solo se ve influenciado por el entorno electrónico, sino que también existen otros factores que pueden desempeñar un papel importante.

## 5.4.3.3. Equilibrio con la ArRmut 11

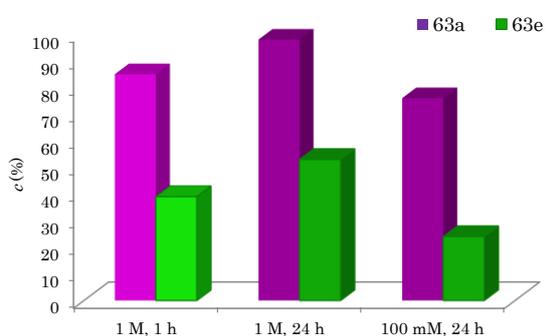
Las buenas conversiones obtenidas para el sustrato **63a** en la reacción de transaminación catalizado por la ArRmut 11 semipurificada tras solo 1 h de reacción (85%), siendo éste un proceso en equilibrio, llevaron a pensar en algún tipo de estabilidad termodinámica del producto **64a**. De ser así, dicha estabilidad provocaría el desplazamiento del equilibrio hacia la formación de los productos, de manera que podría emplearse menos cantidad de isopropilamina. En consecuencia, la reacción efectuó en presencia de isopropilamina en una concentración 100 mM y se compararon los resultados con los obtenidos para una concentración 1 M de este dador de amino. Asimismo, se realizó el mismo experimento utilizando como sustrato la 3-cloroacetofenona (**63e**) con la intención de comparar ambos procesos (Esquema 135).



**Esquema 135.** Transaminación enzimática de **63a** y **63e** catalizada por la ArRmut 11 semipurificada a 45 °C y 700 rpm, variando la concentración de isopropilamina necesaria para desplazar el equilibrio hacia la formación de productos.

Existen importantes diferencias entre la reactividad observada para ambos sustratos (Figura 38). Por una parte y tal y como se ha discutido en el apartado anterior, la cinética de la reacción de transaminación es mucho más rápida para el sustrato **63a**, lo que se deduce de los valores de conversión obtenidos tras 1 h empleando 1 M de isopropilamina. Pero cuando la concentración de isopropilamina es 100 mM, la cetona **63e** alcanza solo un 24% de conversión tras 24 h, mientras que **63a** promueve la reacción hasta un 76%. Los valores obtenidos para **63e** son consistentes con la existencia de un equilibrio. Incluso con tan poco exceso de dador de amina, se consigue un buen valor de conversión con

**63a**, lo que implica que aun en esas condiciones el equilibrio está desplazado a la formación de los productos o, dicho de otro modo, la amina (*R*)-**64a** está más favorecida termodinámicamente.



**Figura 38.** Representación gráfica de la conversión en la reacción de transaminación de **63a** y **63e** catalizada por la ArRmut 11 semipurificada empleando distintas concentraciones de isopropilamina a 1h (tonalidades claras) o 24 h (tonalidades oscuras).

#### 5.4.4. Determinación de la Configuración Absoluta

La configuración absoluta de las aminas enantiopuras **64a-d** se estableció mediante la medida de sus rotaciones ópticas específicas y posterior comparación con los valores descritos en la bibliografía,<sup>237</sup> encontrando en todos los casos que la estereoselectividad observada coincide con la estereopreferencia esperada para cada transaminasa (ver Parte Experimental).

### 5.5. Piridinas Fluoradas

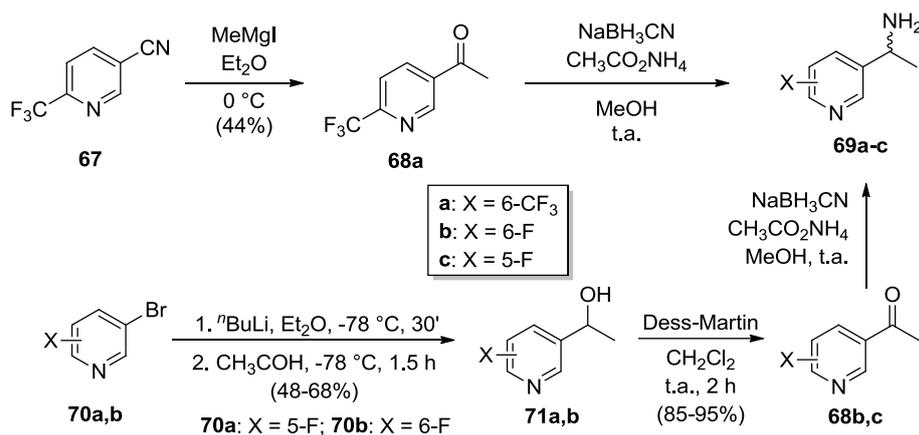
A continuación, se abordará la síntesis y transaminación enzimática de una familia de piridinas fluoradas, un estudio para el cual todos los sustratos empleados serán metil cetonas y que, ciertamente, se puede considerar de forma independiente a lo discutido hasta ahora en este capítulo. La selección de estas piridinas en particular surge a raíz de trabajos en curso en nuestro grupo de investigación, donde ya se había

analizado con éxito su validez como sustratos en procesos de resolución cinética clásica mediante la acilación catalizada por lipasas.

### **5.5.1. Síntesis Química de Piridinas Fluoradas**

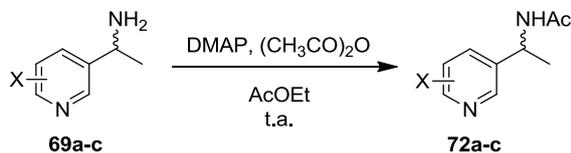
El diseño de la ruta sintética para la preparación de las fluoropiridinas que se estudiarán a continuación se puso a punto en nuestro laboratorio por la Dra. María Rodríguez-Mata durante el desarrollo de su Tesis Doctoral, y se ha reproducido con ligeros cambios que pretenden mejorar los rendimientos obtenidos en determinadas etapas. En cualquier caso, se ha de señalar que en algunos de los pasos de la síntesis el rendimiento se ha visto afectado en mayor o menor medida por la volatilidad de los productos, lo que ha dificultado el aislamiento de los mismos.

Basándose en la disponibilidad comercial de los productos de partida y de la viabilidad de los procesos, se han empleado dos caminos de reacción diferentes para la síntesis de las cetonas **68a-c** (Esquema 136). Así, la preparación de la cetona de la piridina trifluorometilada **68a** se realizó en un solo paso de reacción a partir del derivado **67**, comercialmente disponible. La adición de yoduro de metilmagnesio al grupo ciano de dicho derivado condujo al aislamiento de la correspondiente cetona **68a** con un rendimiento moderado. Por otra parte, los sustratos fluorados en las posiciones C-6 y C-5 **68b** y **68c**, respectivamente, se sintetizaron en dos etapas mediante un primer proceso de hidroxialquilación a partir de las correspondientes piridinas bromadas **70a** y **70b** y una subsiguiente oxidación de los intermedios **71a** y **71b** empleando el reactivo de Dess-Martin.



**Esquema 136.** Síntesis de las cetonas **68a-c**, sustratos de los experimentos de transaminación enzimática, y de las correspondientes aminas **69a-c** como material de referencia para la medida de las conversiones.

La preparación de las aminas racémicas **69a-c** en la última etapa de la síntesis fue común para los tres sustratos fluorados y tuvo lugar a través de un proceso de aminación reductiva química empleando acetato de amonio y cianoborohidruro de sodio como agente reductor. Al igual que ocurría con las piridinas cloradas, no fue posible encontrar una separación analítica adecuada para las aminas **69a-c**, por lo que se derivatizaron *in situ* obteniendo las correspondientes acetamidas **72a-c** (Esquema 137), cuyos enantiómeros se separaron con éxito mediante la técnica de CG con columnas de relleno quiral.



**Esquema 137.** Derivatización de las aminas **69a-c** para la medida de los excesos enantioméricos.

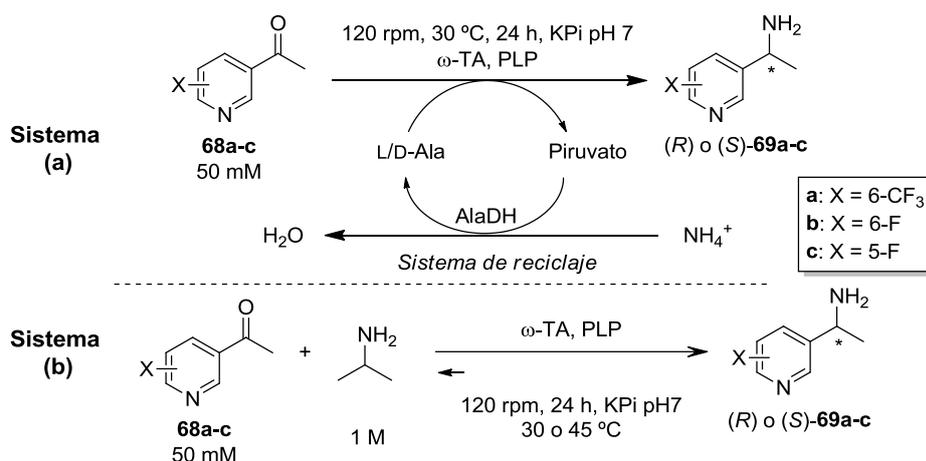
### 5.5.2. Estudios de Transaminación

Seguidamente, se procedió al estudio de la aminación enzimática de las cetonas **68a-c** considerando una serie de biocatalizadores representativos para una concentración de sustrato 50 mM, empleando

como dadores de amino la alanina o isopropilamina dependiendo de la transaminasa utilizada (Tabla 41). La solubilidad de estos sustratos sólidos es muy limitada por lo que, con el propósito de mejorar las condiciones para su difusión en la mezcla de reacción, se sustituyó la agitación empleada hasta el momento de 700 rpm en un agitador de tubos de microcentrífuga por una agitación de 120 rpm en un agitador orbital de mayor tamaño.

En la aminación de **68a** se obtuvieron buenos valores de conversión con las enzimas (*S*)-selectivas Vf- $\omega$ -TA y Cv- $\omega$ -TA, generándose la amina (*S*)-**69a** en forma enantiopura (entradas 1 y 2). Una vez más, los peores resultados se obtuvieron con la *Arthrobacter citreus*, que dio lugar a conversiones moderadas (entrada 3). En cuanto a las transaminasas (*R*)-selectivas, destaca la excelente conversión observada empleando la *Arthrobacter* sp. como catalizador, proceso en que condujo a la amina (*R*)-**69b** enantiopura en una extensión del 94% (entrada 4). La conversión también fue elevada con total estereoselectividad en el caso de la ArRmut 11 semipurificada, que trabaja a 45 °C y acepta isopropilamina como dador de amino (entrada 5). Para el derivado fluorado en la posición C-6 **68b** se observó, en general, una menor reactividad en el proceso de transaminación, aunque la selectividad se mantuvo excelente formándose las aminas (*S*)- o (*R*)-**69c** enantiopuras en todos los casos estudiados (entradas 6-11). Las mejores conversiones fueron moderadas con las enzimas (*S*)-selectivas Cv- $\omega$ -TA y la mutante de la Vf- $\omega$ -TA (entradas 7 y 9, respectivamente), y buenas en el caso de la enzima (*R*)-selectiva *Arthrobacter* sp. (entrada 10). Por último, para el derivado **68c**, con un flúor en la posición C-5, las conversiones fueron más elevadas y superiores al 80% tanto para la amina (*S*)-**69c** con la Vf- $\omega$ -TA y Cv- $\omega$ -TA (entradas 12 y 13) como para su homólogo (*R*)-**69c** empleando la *Arthrobacter* sp. (entrada 16), en todos los casos en forma enantiopura.

**Tabla 41.** Estudios de transaminación de las fluoropiridinas **68a-c** empleando alanina o isopropilamina como dador de amino a 120 rpm durante 24 h.



Entrada	Compuesto	$\omega$ -TAs <sup>a</sup>	Sistema	c (%) <sup>b</sup>	ee (%) <sup>b</sup>
1	<b>68a</b>	Vf (S)	(a)	69	>99
2	<b>68a</b>	Cv (S)	(a)	80	>99
3	<b>68a</b>	<i>Arthrobacter citreus</i> (S)	(a)	36	>99
4	<b>68a</b>	<i>Arthrobacter</i> sp. (R)	(a)	94	>99
5	<b>68a</b>	ArRmut 11 semipur.(R)	(b)	85	>99
6	<b>68b</b>	Vf (S)	(a)	26	>99
7	<b>68b</b>	Cv (S)	(a)	45	>99
8	<b>68b</b>	<i>Arthrobacter citreus</i> (S)	(a)	<1	--
9	<b>68b</b>	Vf mutante (S)	(b)	56	>99
10	<b>68b</b>	<i>Arthrobacter</i> sp. (R)	(a)	75	>99
11	<b>68b</b>	ArRmut 11 semipur.(R)	(b)	6	--
12	<b>68c</b>	Vf (S)	(a)	89	>99
13	<b>68c</b>	Cv (S)	(a)	80	>99
14	<b>68c</b>	<i>Arthrobacter citreus</i> (S)	(a)	36	>99
15	<b>68c</b>	Vf mutante (S)	(b)	66	>99
16	<b>68c</b>	<i>Arthrobacter</i> sp. (R)	(a)	85	>99
17	<b>68c</b>	ArRmut 11 semipur. (R)	(b)	69	>99

<sup>a</sup> Se indica entre paréntesis la estereopreferencia de la transaminasa.

<sup>b</sup> Determinado por CG.

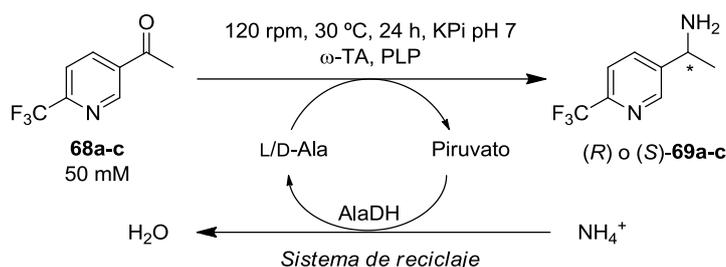
Los valores de conversión obtenidos resultaron prometedores, incluso algunos podrían considerarse satisfactorios, si bien en ningún

caso se alcanzó conversión completa. Una causa probable para esta limitación podría ser la escasa solubilidad del sustrato en el medio de reacción, por lo que se realizaron distintos experimentos relacionados con una mejora de este factor empleando como sustrato modelo la piridina trifluorometilada **68a** (Tabla 42). En primer lugar, para aumentar la conversión incrementando la solubilidad del sustrato se consideró la opción de añadir un cosolvente orgánico miscible en agua, seleccionando para ello la dimetilformamida (DMF, 10% v/v).<sup>263</sup> Sin embargo, esta medida provocó el efecto contrario, observándose un descenso drástico en la conversión del proceso (entradas 1-3). Aunque no tan extremo, también fue significativa la disminución de la conversión al emplear el doble de enzima (entrada 4), algo que puede ser atribuido a problemas en la agitación por un exceso de sólidos no miscibles en el medio. Por ello, se barajó la opción de romper las paredes celulares mediante ciclos de sonicación del crudo enzimático, obteniendo así las células en forma de extractos libres de tal manera que se disolverían en el medio de reacción y sería posible añadir más cantidad de enzima. Desafortunadamente, las conversiones decrecieron de nuevo (entradas 6 y 7), probablemente por causa de una pérdida de actividad debida a la sonicación, especialmente marcada en el caso de la Cv- $\omega$ -TA (entrada 6).

---

<sup>263</sup> R. C. Simon, C. S. Fuchs, H. Lechner, F. Zepeck, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 3397-3402.

**Tabla 42.** Estudio de optimización para incrementar la conversión del proceso de transaminación enzimática de **68a** empleando alanina como dador de amino y el sistema de regeneración de la AlaDH a 120 rpm y 30 °C.



Entrada	$\omega$ -TAs <sup>a</sup>	$\omega$ -TA (mg)	Cosolvente	c (%) <sup>b</sup>
1	Vf (S)	20	DMF	4
2	Cv (S)	20	DMF	27
3	<i>Arthrobacter</i> sp. (R)	20	DMF	<1
4	Cv (S)	40	--	63
6	Cv, extracto libre (S)	20	--	2
7	<i>Arthrobacter</i> sp., extracto libre (R)	20	--	75

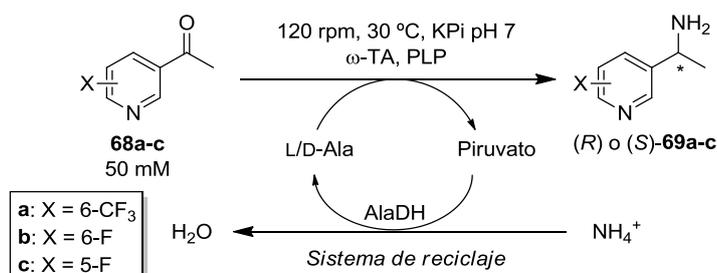
<sup>a</sup> Se indica entre paréntesis la estereopreferencia de la transaminasa.

<sup>b</sup> Determinado por CG.

Por último, se introdujo un paso previo en el cual la enzima se suspende en la solución tampón a pH 7 y se agita durante 30 min a 30 °C y 120 rpm (ver Parte Experimental). Gracias a este experimento de rehidratación se obtuvo una mejora importante en las conversiones observadas (Tabla 43), hasta el punto de alcanzarse conversiones completas hacia la formación de las aminas enantiopuras (*S*)- y (*R*)-**69a** y **69c** (entradas 1 y 2 para **69a**; entradas 6 y 7 para **69c**), y muy buenas para la reacción de transaminación de **68b** (entradas 3 y 4). Por tanto, los escalados de las reacciones se efectuaron bajo estas condiciones óptimas. La amina (*R*)-**69a** enantiopura se aisló con buen rendimiento empleando la transaminasa *Arthrobacter* sp. como biocatalizador (88%, entrada 2). Asimismo, los rendimientos aislados fueron buenos para la preparación en forma enantiopura de las aminas (*S*)- y (*R*)-**69c** al utilizar la Cv- $\omega$ -TA o la transaminasa de *Arthrobacter* sp. (71 y 79%, respectivamente, entradas 6 y 7). Por su parte, el aislamiento de la amina (*S*)-**69b** tras la correspondiente purificación del crudo de reacción

por cromatografía de columna en gel de sílice tuvo lugar con un rendimiento moderado utilizando como catalizador la Cv- $\omega$ -TA (40%, entrada 3), que puede ser en parte atribuido a la elevada volatilidad de este compuesto, algo ya observado en la síntesis química del material de partida.

**Tabla 43.** Transaminación de **68a-c** empleando alanina como dador de amino y el sistema de regeneración de la AlaDH a 120 rpm y 30 °C tras un paso previo de rehidratación enzimática.



Entrada	Compuesto	$\omega$ -TAs <sup>a</sup>	c (%) <sup>b,c</sup>	ee (%) <sup>b</sup>
1	<b>68a</b>	<i>Chromobacterium violaceum</i> (S)	>99	>99
2	<b>68a</b>	<i>Arthrobacter</i> sp. (R)	>99 (88)	>99
3	<b>68b</b>	<i>Chromobacterium violaceum</i> (S)	88 (40)	>99
4	<b>68b</b>	<i>Arthrobacter</i> sp. (R)	92	>99
5	<b>68c</b>	<i>Vibrio fluvialis</i> (S)	90	>99
6	<b>68c</b>	<i>Chromobacterium violaceum</i> (S)	99 (71)	>99
7	<b>68c</b>	<i>Arthrobacter</i> sp. (R)	99 (79)	>99

<sup>a</sup> Se indica entre paréntesis la estereopreferencia de la transaminasa.

<sup>b</sup> Determinado por CG.

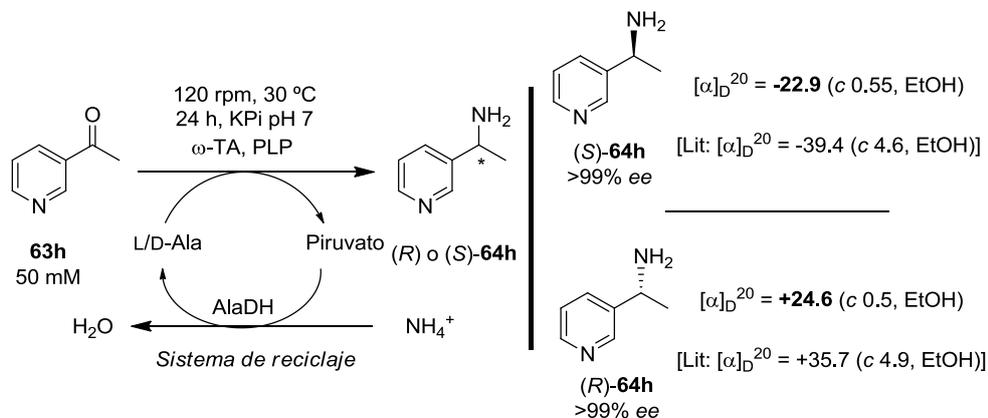
<sup>c</sup> Se indican entre paréntesis los rendimientos aislados tras llevar a cabo el proceso a escala preparativa (50 mg de sustrato).

### 5.5.3. Determinación de la Configuración Absoluta

La configuración absoluta de las aminas **69a-c** se determinó mediante dicroísmo circular (DC) y la medida de la rotación óptica de los productos de interés. Para el experimento de DC, se seleccionó la piridina **64h** como compuesto de referencia que se encuentra descrito en la bibliografía y que guarda semejanza estructural con las fluoropiridinas estudiadas en esta sección. Así, la determinación se

realizará utilizando una metodología empírica por comparación cualitativa de los espectros de dicroísmo medidos para ambos enantiómeros del sustrato de referencia **64h** con los correspondientes espectros de las aminas problema **69a-c**.

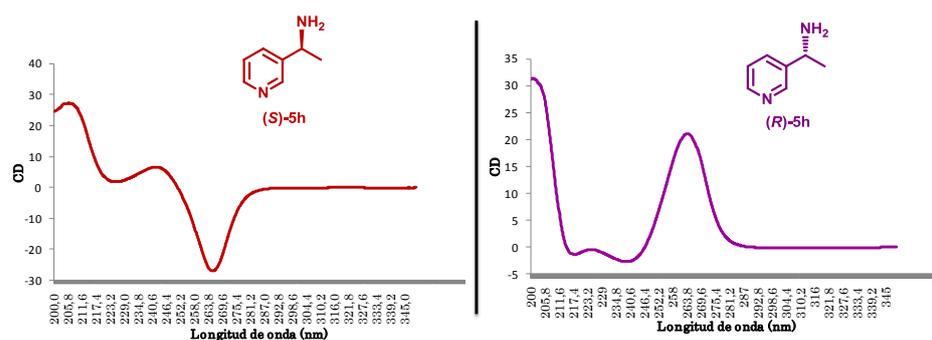
En primer lugar, se realizó el escalado de la reacción de transaminación de **63h** con la Cv- $\omega$ -TA y la *Arthrobacter* sp. Tras la purificación del crudo de reacción por cromatografía de columna en gel de sílice, se aislaron las aminas (*S*)- y (*R*)-**64h**. A continuación, se realizó la medida de la rotación óptica específica de ambos compuestos y se comparó el valor obtenido con el descrito en la bibliografía,<sup>264</sup> lo que permitió definir la configuración absoluta de cada enantiómero (Esquema 138).



**Esquema 138.** Reacción de transaminación de **64h** y determinación de la configuración enantiómero de ambos enantiómeros de **64h** por comparación con los valores descritos en la bibliografía.

A continuación, en los experimentos de DC se obtuvieron los espectros recogidos en la Figura 39, donde se observa un mínimo negativo para el enantiómero (*S*)-**64h** a 265.6 nm y un máximo positivo para el homólogo correspondiente (*R*)-**64h** a 264.2 nm.

<sup>264</sup> H. E. Smith, L. J. Schaad, R. B. Banks, C. J. Wiant, C. F. Jordan, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 811-818.



**Figura 39.** Espectros de dicroísmo circular adquiridos para los compuestos de referencia (*S*)- y (*R*)-**64h**.

Las medidas de DC de las aminas enantiopuras **68a-c** se realizaron en las mismas condiciones, obteniéndose los espectros de DC recogidos en la Figura 40. El espectro de DC de **69a** presenta un máximo a 265.2 nm y el de la amina **69c** otro máximo a 272.2 nm, ambos positivos. La analogía con el espectro adquirido para (*R*)-**64h** es innegable, por lo que se concluyó que la configuración absoluta de las piridinas **69a** y **69c** sometidas a medida es (*R*). Por su parte, la piridina **69b** presentó dos mínimos negativos a 223.4 y 272.0 nm, definiendo su configuración absoluta como (*S*).

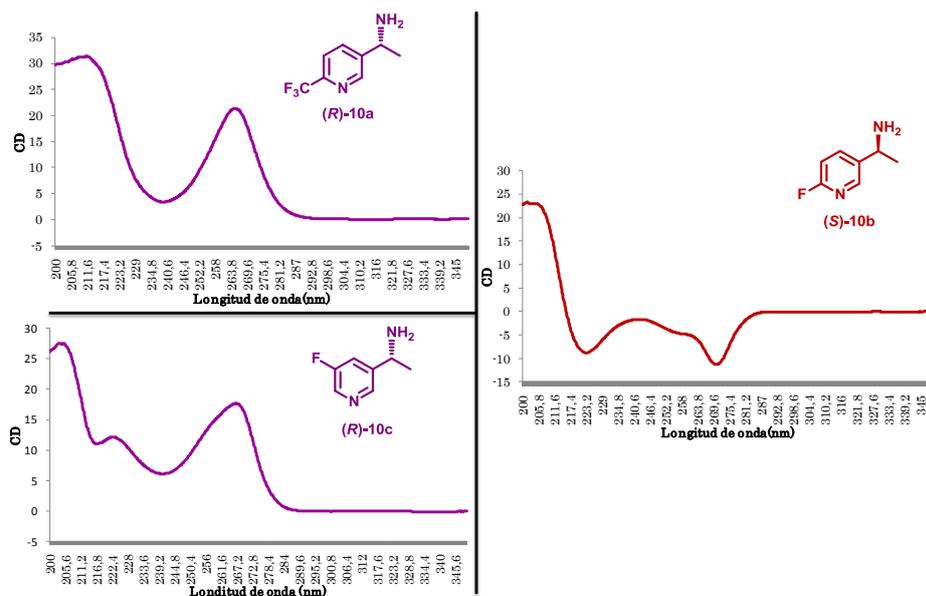


Figura 40. Espectros de dicroísmo circular de las aminas enantiopuras (*R*)-69a, (*S*)-69b y (*R*)-69c.

Finalmente, se midió la rotación óptica específica de las fluoropiridinas para las cuales se habían realizado los escalados de las transaminaciones enzimáticas y que se encuentran recogidos en la Figura 41.

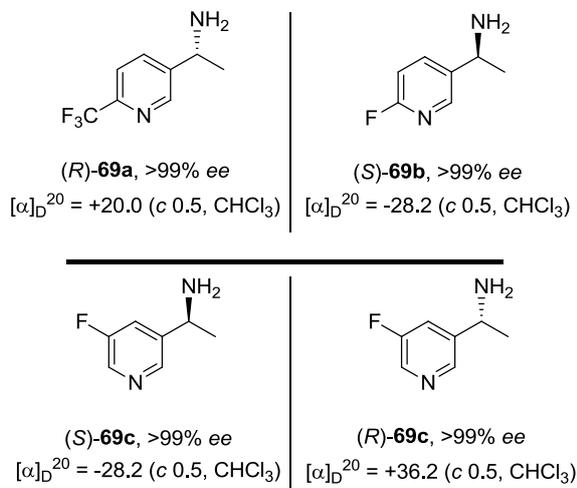


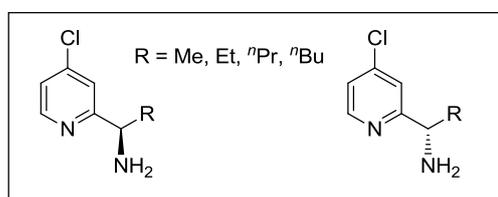
Figura 41. Medidas de la rotación óptica específica de los compuestos (*R*)-69a, (*S*)-69b, (*S*)-69c y (*R*)-69c.

## **CONCLUSIONES**



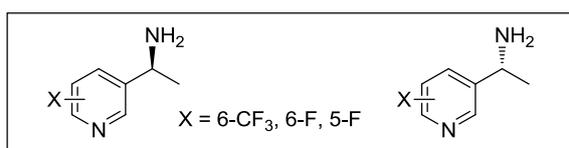
✓ Se ha estudiado la síntesis asimétrica de una serie de piridinas cloradas sustituidas en la posición C-2 a través de procesos de transaminación. Se ha encontrado una actividad excelente para las cetonas proquirales con restos metilo y alquilo. En función de la selectividad de la enzima empleada, se han obtenido ambos enantiómeros de las correspondientes aminas en forma enantiopura y con excelentes conversiones.

✓ Se han observado buenas conversiones en la preparación de la amina enantiopura de configuración (*S*)- sustituida con un grupo propilo. El enantiómero contrario, así como la (*R*)-amina del derivado de butilo se obtuvieron con muy buenas conversiones y excelentes excesos enantioméricos empleando la enzima mutada ArRmut 11 y la isopropilamina como dador de amino.



✓ Se ha observado una gran influencia de distintos parámetros estructurales en los procesos de transaminación, en los que el derivado metilado ha mostrado una reactividad superior frente a otros sustratos.

✓ Por último, se han sintetizado ambos enantiómeros de una familia de piridinas fluoradas en forma enantiopura empleando transaminasas de selectividades opuestas, alcanzando excelentes conversiones una vez superados los problemas de difusión. La configuración absoluta de las aminas enantiopuras ha sido determinada de forma inequívoca empleando la técnica de dicroísmo circular.





# PARTE EXPERIMENTAL



## 5.6. General

El acetaldehído empleado en la síntesis de las bromo piridinas **70a** y **70b** fue destilado previamente a su uso.

## 5.7. Técnicas de Análisis

Las técnicas de cromatografía en gel de sílice, espectroscopía IR, RMN, HRMS, punto de fusión y rotación óptica específica se realizaron según se ha descrito en los capítulos anteriores.

### 5.7.1. Cromatografía de Gases (CG)

Las condiciones y tiempos de retención para las medidas de conversión y excesos enantioméricos de los compuestos estudiados en la primera sección en este capítulo se muestran en la Tabla 44.

**Tabla 44.** Separación analítica por CG de las cloropiridinas y los compuestos empleados en los estudios de la primera sección de este capítulo **63a-i**, **64a-i**, **65a-b,e-i**.

Compuesto	Columna	Programa de Temperatura <sup>a</sup>	<i>t<sub>R</sub></i> (min)
<b>63a</b>	DB-1701	100/0/10/200/0	4.3
<b>63b</b>	DB-1701	100/0/10/200/0	5.4
<b>63c</b>	DB-1701	100/0/10/200/0	6.3
<b>63d</b>	DB-1701	100/0/10/240/0	7.5
<b>64a</b>	DB-1701	100/0/10/200/0	5.0
<b>64b</b>	DB-1701	100/0/10/200/0	6.0
<b>64c</b>	DB-1701	100/0/10/200/0	6.9
<b>64d</b>	DB-1701	100/0/10/240/0	8.0
<b>65a</b>	ChiralSil	100/2/3/180/0	21.9 (S) y 22.4 (R)
<b>65b</b>	ChiralSil	100/2/3/180/0	23.3 (S) y 23.7 (R)
<b>64c</b>	ChiralSil	100/2/3/180/0	15.7 (R) y 16.1 (S)
<b>63e</b>	DB-1701	100/0/10/200/0	5.2
<b>63f</b>	DB-1701	100/0/10/200/0	3.1
<b>63g</b>	DB-1701	100/0/10/200/0	3.1
<b>63h</b>	DB-1701	100/0/10/200/0	4.3
<b>63i</b>	DB-1701	100/0/10/200/0	5.7
<b>64e</b>	DB-1701	100/0/10/200/0	5.4
<b>64f</b>	DB-1701	100/0/10/200/0	3.4
<b>64g</b>	DB-1701	100/0/10/200/0	3.6

Compuesto	Columna	Programa de Temperatura <sup>a</sup>	<i>t<sub>R</sub></i> (min)
64h	DB-1701	100/0/10/200/0	4.6
64i	DB-1701	100/0/10/200/0	6.4
65e	ChiralSil	100/2/3/180/0	21.9 (S) y 22.5 (R)
65f	ChiralSil	90/5/2/150/0/10/200/3	29.6 (S) y 28.6 (R)
65g	ChiralSil	100/2/3/180/0	19.0 (S) y 19.9 (R)
65h	ChiralSil	90/5/2/160/0/5/200/2	40.1 (S) y 40.8 (R)
65i	ChiralSil	90/5/2/160/0/5/200/2	39.7 (S) y 40.2 (R)

<sup>a</sup> T<sub>i</sub> (°C)//tiempo (min)//rampa (°C/min)//T<sub>f</sub> (°C)//tiempo (min)

Por su parte, las condiciones de CG y los tiempos de retención para las medidas de conversión y excesos enantioméricos de las fluoropiridinas estudiadas en la segunda sección en este Capítulo, se muestran en la Tabla 45.

**Tabla 45.** Separación analítica por CG de las piridinas **68a-c**, **69a-c**, **72a-c**, estudiadas en la segunda sección de este Capítulo.

Compuesto	Columna	Programa de Temperatura <sup>a</sup>	<i>t<sub>R</sub></i> (min)
68a	DB-1701	100/0/10/240/0	4.3
68b	DB-1701	100/0/10/240/0	4.2
68c	DB-1701	100/0/10/240/0	3.5
69a	DB-1701	100/0/10/240/0	5.1
69b	DB-1701	100/0/10/240/0	4.9
69c	DB-1701	100/0/10/240/0	4.2
72a	ChiralSil	100/2/3/180/0	24.3 (S) y 24.7 (R)
72b	ChiralSil	100/2/3/180/0	25.1(S) y 25.4 (R)
72c	ChiralSil	100/2/3/180/0	22.4 (S) y 22.8 (R)

<sup>a</sup> T<sub>i</sub> (°C)//tiempo (min)//rampa (°C/min)//T<sub>f</sub> (°C)//tiempo (min)

### 5.7.2. Dicroísmo Circular (DC)

Los espectros de DC se adquirieron en un espectropolarímetro Jasco J-715 y una cuveta de 1 mm de cuarzo a 21 °C. Todas las muestras se disolvieron en etanol puro en una proporción del 0.2% en peso/volumen. Otros parámetros importantes para la medida fueron:

Sensitividad: Estándar (100 mdeg)

Inicio: 350 nm

Final: 180 nm

Modo de escanear: Continuo

Velocidad de escaneo: 200 nm/min

Respuesta: 2 segundos

Anchura de banda: 5.0 nm

## 5.8. Procedimientos Sintéticos

Las piridinas cloradas **63a-d**, así como el intermedio **61** empleado para su síntesis, fueron preparadas siguiendo el procedimiento descrito en la bibliografía.<sup>245</sup>

### 5.8.1. Síntesis de las Aminas Racémicas **64a-d**

En un matraz schlenk se disuelve, bajo atmósfera de nitrógeno, la correspondiente cetona **63a-d** (0.25 mmol) en MeOH seco (1 mL) y se añaden, sucesivamente, acetato de amonio (195 mg, 2.53 mmol) y cianoborohidruro de sodio (32 mg, 0.51 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 14 h, tras las cuales el disolvente se evapora a presión reducida. El crudo de reacción obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) aislándose las correspondientes aminas racémicas **64a-d** (%).

### 5.8.2. Procedimiento General para las Reacciones de Transaminación de las Cetonas **63a-d** Empleando el Sistema de Regeneración de la Alanina Deshidrogenasa

En un tubo de microcentrífuga que contiene una suspensión de las cetonas **63a-d** (0.05 mmol, 50 mM) en una disolución tampón de fosfatos 100 mM pH 7 (440 µL) se añaden sucesivamente formiato de amonio (100 µL de una disolución 1.5 M en tampón de fosfatos 100 mM pH 7; 150 mM de concentración final), L- o D-alanina (250 µL de una disolución 1 M en tampón de fosfatos 100 mM pH 7; 250 mM de concentración final), NAD<sup>+</sup> (100 µL de una disolución 10 mM en tampón de fosfatos 100 mM pH 7; 1 mM de concentración final), PLP (100 µL de una disolución 10 mM en tampón de fosfatos 100 mM pH 7; 1 mM de concentración final), las células de *E. coli*/ω-TAs (20 mg), FDH (2.6 mg, 11 U) y AlaDH (10 µL). La mezcla resultante se agita a 30 °C y 700 rpm durante 24 h. La reacción se detiene añadiendo una disolución acuosa de NaOH 4 M (400 µL), se extrae con AcOEt (3 x 500 µL), las fases orgánicas se combinan y se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El crudo de reacción se

analiza mediante el empleo de la técnica de CG para calcular la conversión y, tras una derivatización *in situ*, el exceso enantiomérico.

### 5.8.3. Procedimiento General para las Reacciones de Transaminación de las Cetonas 63a-d y Empleando Isopropilamina

En un tubo de microcentrífuga se suspenden las cetonas **63a-d** (0.05 mmol, 50 mM) en una disolución tampón de fosfatos 100 mM pH 7 (500  $\mu$ L) en la que están integrados el PLP (1 mM; 0.5 mM de concentración final) y la isopropilamina (2 M; 1 M de concentración final). Sobre la suspensión resultante se añade la ArRmut 11 semipurificada (500  $\mu$ L) y la mezcla se agita a 45 °C y 700 rpm durante 24 h. La reacción se detiene añadiendo una disolución acuosa de NaOH 4 M (400  $\mu$ L), se extrae con AcOEt (3 x 500  $\mu$ L), las fases orgánicas se combinan y se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El crudo de reacción se analiza mediante el empleo de la técnica de CG para calcular la conversión y, tras una derivatización *in situ*, el exceso enantiomérico.

### 5.8.4. Procedimiento General para la Aminación Reductiva con Transaminasas a Escala Preparativa de las Cetonas 63a y 63b Empleando el Sistema de Regeneración de la Alanina Deshidrogenasa

El escalado de la reacción se llevó a cabo mediante el incremento lineal de las cantidades descritas en el apartado (5.8.2), con la salvedad de que la cantidad de  $\omega$ -TA se redujo para la cetona **63a**. Así, sobre una suspensión de las cetonas **63a** y **63b** (0.32 mmol, 50 mM) en una disolución tampón de fosfatos 100 mM pH 7 (2.8 mL) se añaden sucesivamente formiato amónico (643  $\mu$ L de una disolución 1.5 M en tampón de fosfatos 100 mM pH 7; 150 mM de concentración final), L- o D-alanina (1.6 mL de una disolución 1 M en tampón de fosfatos 100 mM pH 7; 250 mM de concentración final), NAD<sup>+</sup> (643  $\mu$ L de una disolución 10 mM en tampón de fosfatos 100 mM pH 7; 1 mM de concentración

final), PLP (643  $\mu$ L de una disolución 10 mM en tampón de fosfatos 100 mM pH 7; 1 mM de concentración final), las células de *E. coli* $\omega$ -TAs (32 mg para **63a**, 125 mg para **63b**), FDH (16.4 mg, 69 U) y alanina AlaDH (63  $\mu$ L). La mezcla resultante se agita a 30 °C y 120 rpm durante 24 h. La reacción se detiene añadiendo una disolución acuosa de NaOH 4 M hasta pH  $\approx$  10, se extrae con AcOEt (3 x 10 mL), las fases orgánicas se combinan y se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Las aminas enantiopuras se aíslan como líquidos incoloros (82-93%, >99% *ee*).

#### **5.8.5. Aminación Reductiva a Escala Preparativa de la Cetona **63c** Catalizada por la ArRmut 11 Semipurificada**

En un tubo falcon se suspende la cetona **63c** (50 mg, 0.27 mmol) en una disolución tampón de fosfatos 100 mM pH 7.5 (2.7 mL) en la que están integrados el PLP (1 mM; 0.5 mM de concentración final) y la isopropilamina (2 M; 1 M de concentración final). Se añade entonces la transaminasa ArRmut 11 semipurificada (2.7 mL) y la mezcla se agita a 45 °C y 120 rpm durante 24 h. La reacción se detiene añadiendo una disolución acuosa de NaOH 4 M (1.5 mL), se extrae con AcOEt (3 x 10 mL), las fases orgánicas se combinan, se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtran y el disolvente se evapora a presión reducida, obteniéndose la amina **64c** enantiopura (68%).

#### **5.8.6. Síntesis de la Cetona Trifluorometilada **68a****

Sobre una disolución del carbonitrilo **67** (317 mg, 1.84 mmol) en éter dietílico seco (6.1 mL) se añade gota a gota, a 0 °C y bajo atmósfera de nitrógeno una disolución 3 M de yoduro de metil magnesio en Et<sub>2</sub>O (2.4 mL, 7.34 mmol). Se añade 1 mL más de Et<sub>2</sub>O para lavar los restos del embudo de adición y se agita a temperatura ambiente durante 4 h. En este tiempo se observa una transición de la disolución amarilla inicial a una color marrón-rojizo intenso. La reacción se vierte a 0 °C sobre una disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl en agua (6 mL) y se añade HCl concentrado hasta medio muy ácido (pH 1). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante una noche y se lleva a pH 9 con una

disolución acuosa de amoníaco. Finalmente, se extrae con Et<sub>2</sub>O (3 x 15 mL), las fases orgánicas se combinan, se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtran y el disolvente se elimina por evaporación a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice neutro (20% AcOEt/Hexano), obteniéndose la cetona **68a** como un aceite amarillo pálido (153 mg, 44%).

#### 5.8.7. Procedimiento General para la Síntesis de los Alcoholes Fluorados **71a** y **71b**

Sobre una disolución de la bromo piridina **70a** y **70b** (2.56 mmol) en éter dietílico seco (13 mL) a -78 °C se añade, gota a gota y bajo atmósfera de argón, una disolución 1.6 M de butil-litio en hexano (1.76 mL, 2.81 mmol). La mezcla se agita a esa temperatura durante 30 min y a la suspensión amarilla formada se le añade lentamente y manteniendo la atmósfera inerte, una disolución de acetaldehído (360 µL, 6.39 mmol) en Et<sub>2</sub>O (1 mL), agitando la disolución resultante a -78 °C durante 1.5 h adicionales. Sobre la suspensión de color naranja formada se añade H<sub>2</sub>O (10 mL) y se deja que alcance temperatura ambiente. Se añade una disolución acuosa de HCl 1 M hasta pH 8 y el producto se extrae con Et<sub>2</sub>O (8 x 10 mL). Las fases orgánicas se combinan, se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtran y el disolvente se elimina por evaporación a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice neutro (80% AcOEt/Hexano), obteniéndose los alcoholes **71a** y **71b** como aceites amarillentos.

#### 5.8.8. Procedimiento General para la Síntesis de las Cetonas Fluoradas **68b** y **68c**

Sobre una disolución de los alcoholes **71a** y **71b** (4.17 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (42 mL) se añade el reactivo de Dess-Martin (2.65 g, 6.25 mmol) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h. La reacción se detiene por adición de una disolución acuosa de NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, y se agita durante 5 min adicionales hasta que se observa la desaparición del

sólido formado. La mezcla se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 mL), obteniéndose las cetonas **68b** y **68c** como sólidos amarillentos (85-95%).

#### **5.8.9. Procedimiento General para la Síntesis de las Aminas Racémicas 69a-c**

En un matraz schlenk se disuelve, bajo atmósfera de nitrógeno, la correspondiente cetona **68a-c** (0.43 mmol) en MeOH seco (1.4 mL) y se añaden, sucesivamente, acetato de amonio (335 mg, 4.34 mmol) y cianoborohidruro de sodio (55 mg, 0.87 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 14 h, tras las cuales el disolvente se evapora a presión reducida. El crudo de reacción obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) aislándose las correspondientes aminas racémicas **69a-c** (%).

#### **5.8.10. Procedimiento General para las Reacciones de Transaminación de las Cetonas 68a-c Empleando el Sistema de Regeneración de la Alanina Deshidrogenasa**

En un tubo de microcentrífuga se suspenden las células de *E. coli* ω-TAs (20 mg) en una disolución tampón de fosfatos de potasio 100 mM pH 7 (440 µL) y se agita a 30 °C y 120 rpm durante 30 min. Sobre la suspensión resultante se añaden sucesivamente las cetonas **68a-c** (0.05 mmol, 50 mM), formiato de amonio (100 µL de una disolución 1.5 M en tampón de fosfatos 100 mM pH 7; 150 mM de concentración final), L- o D-alanina (250 µL de una disolución 1 M en tampón de fosfatos 100 mM pH 7; 250 mM de concentración final), NAD<sup>+</sup> (100 µL de una disolución 10 mM en tampón de fosfatos 100 mM pH 7; 1 mM de concentración final), PLP (100 µL de una disolución 10 mM en tampón de fosfatos 100 mM pH 7; 1 mM de concentración final), FDH (2.6 mg, 11 U) y alanina deshidrogenasa (10 µL). La mezcla resultante se agita a 30 °C y 700 rpm durante 24 h. La reacción se detiene añadiendo una disolución acuosa de NaOH 4 M (400 µL), se extrae con AcOEt (3 x 500 µL), las fases orgánicas se combinan y se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El crudo de reacción se

analiza mediante el empleo de la técnica de CG para calcular la conversión y, tras una derivatización *in situ*, el exceso enantiomérico.

#### **5.8.11. Procedimiento General para las Reacciones de Transaminación de las Cetonas 68a-c Empleando Isopropilamina**

En un tubo de microcentrífuga se suspenden las cetonas **68a-c** (0.05 mmol, 50 mM) en una disolución tampón de fosfatos de potasio 100 mM pH 7 (500  $\mu$ L) en la que están integrados el PLP (1 mM; 0.5 mM de concentración final) y la isopropilamina (2 M; 1 M de concentración final). Sobre la suspensión resultante se añade la ArRmut 11 semipurificada (500  $\mu$ L) y la mezcla se agita a 45 °C y 700 rpm durante 24 h. La reacción se detiene añadiendo una disolución acuosa de NaOH 4 M (400  $\mu$ L), se extrae con AcOEt (3 x 500  $\mu$ L), las fases orgánicas se combinan y se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El crudo de reacción se analiza mediante el empleo de la técnica de CG para calcular la conversión y, tras una derivatización *in situ*, el exceso enantiomérico.

#### **5.8.12. Procedimiento General para la Aminación Reductiva con Transaminasas a Escala Preparativa de las Cetonas 68a-c Empleando el Sistema de Regeneración de la Alanina Deshidrogenasa**

El escalado de la reacción se llevó a cabo mediante el incremento lineal de las cantidades descritas en el apartado (5.8.10). Así, se suspendieron las células de *E. coli* $\omega$ -TAs (144 mg) en una disolución tampón de fosfatos 100 mM pH 7 (3.8 mL) y la mezcla se agitó a 30 °C y 120 rpm durante 30 min. Sobre ella, se añaden sucesivamente las cetonas **68a-c** (0.36 mmol, 50 mM), formiato amónico (720  $\mu$ L de una disolución 1.5 M en tampón de fosfatos 100 mM pH 7; 150 mM de concentración final), L- o D-alanina (1.8 mL de una disolución 1 M en tampón de fosfatos 100 mM pH 7; 250 mM de concentración final), NAD<sup>+</sup> (720  $\mu$ L de una disolución 10 mM en tampón de fosfatos 100 mM pH 7; 1 mM de concentración final), PLP (720  $\mu$ L de una disolución 10

mM en tampón de fosfatos 100 mM pH 7; 1 mM de concentración final), FDH (19 mg, 79 U) y alanina AlaDH (72  $\mu$ L). La mezcla resultante se agita a 30 °C y 120 rpm durante 24 h. La reacción se detiene añadiendo una disolución acuosa de NaOH 4 M hasta pH  $\approx$  10, se extrae con AcOEt (3 x 10 mL), las fases orgánicas se combinan y se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Las aminas **69a-c** enantiopuras se aíslan como líquidos incoloros (40-88%, >99% *ee*).

## 5.9. Datos Experimentales

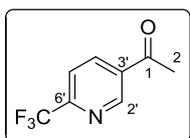
Los datos experimentales de las piridinas cloradas **63a-d**<sup>245</sup> y **64a-d**,<sup>237</sup> así como del intermedio **61**<sup>235</sup> empleado para su síntesis, están en concordancia con lo que se encuentra descrito en la bibliografía. Los valores de rotación óptica obtenidos para las aminas **64a-c** se recogen a continuación:

**64a: Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -23.4$  (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>) [para (*S*)-**64a** en >99% *ee*] [lit.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -20.4$  (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>) para (*S*)-**64a** en >99% *ee*]<sup>237</sup>

**64b: Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -5.8$  (*c* 0.6, CHCl<sub>3</sub>) [para (*S*)-**64b** en >99% *ee*] [lit.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -5.1$  (*c* 0.6, CHCl<sub>3</sub>) para (*S*)-**64b** en >99% *ee*]<sup>237</sup>

**64c: Rotación Óptica Específica:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +10.8$  (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>) [para (*R*)-**64c** en >99% *ee*] [lit.  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -9.1$  (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>) para (*S*)-**64c** en 98% *ee*]<sup>237</sup>

**1-(6-(Trifluorometil)piridin-3-il)etanona (68a)**



**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>F<sub>3</sub>NO

**Aspecto Físico:** Sólido amarillento

**Rendimiento:** 44%

**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt/Hexano): 0.31

**Peso Molecular:** 189.13 g/mol

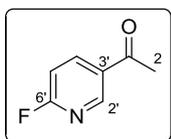
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.69 (s, 3H, H<sub>2</sub>), 7.81 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.0 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 8.40 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.1 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.6 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 9.17 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.3 Hz, 1H, H<sub>2</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 27.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>), 120.7 (d, J<sub>FC</sub> = 2.5 Hz, CH, C<sub>5</sub>), 121.2 (q, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 274.6 Hz, C, CF<sub>3</sub>), 134.0 (C, C<sub>3</sub>), 137.3 (CH, C<sub>4</sub>), 150.0 (CH, C<sub>2</sub>), 151.3 (q, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 35.2 Hz, C, C<sub>6</sub>), 195.6 (C, C<sub>1</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>F<sub>3</sub>NO)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 190.0474, encontrada: 190.0479

---

**1-(6-Fluoropiridin-3-il)etanona (68b)**



**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>FNO

**Aspecto Físico:** Aceite amarillento

**Rendimiento:** 95%

**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt/Hexano): 0.33

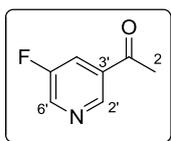
**Peso Molecular:** 139.13 g/mol

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.62 (s, 3H, H<sub>2</sub>), 7.02 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 2.6 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 8.36 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.5 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 7.7 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.6 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 8.80 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.4 Hz, 1H, H<sub>2</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 26.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>), 110.1 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 37.3 Hz, CH, C<sub>5</sub>), 131.1 (d, <sup>4</sup>J<sub>FC</sub> = 4.4 Hz, C, C<sub>3</sub>), 141.3 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 9.4 Hz, CH, C<sub>4</sub>), 149.5 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 16.4 Hz, CH, C<sub>2</sub>), 165.7 (d, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 246.4 Hz, C, C<sub>6</sub>), 195.0 (C, C<sub>1</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>FNO)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 140.0506, encontrada: 140.0512

1-(5-Fluoropiridin-3-il)etanon (68c)



**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>FNO

**Aspecto Físico:** Sólido amarillento

**Rendimiento:** 85%

**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt/Hexano):

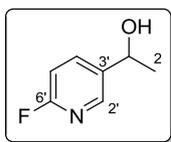
**Peso Molecular:** 139.13 g/mol

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.64 (s, 3H, H<sub>2</sub>), 7.90 (ddd, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 8.7, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.8 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.7 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 8.63 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.7 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 8.96 (s, 1H, H<sub>2</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 27.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>), 121.8 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 18.7 Hz, CH, C<sub>4</sub>), 133.7 (C, C<sub>3</sub>), 142.4 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 23.6 Hz, CH, C<sub>6</sub>), 145.7 (d, <sup>4</sup>J<sub>FC</sub> = 4.0 Hz, CH, C<sub>2</sub>), 159.6 (d, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 259.4 Hz, C, C<sub>5</sub>), 195.4 (C, C<sub>1</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>FNO)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 140.0506, encontrada: 140.0510

1-(6-Fluoropiridin-3-il)etanol (71a)



**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>FNO

**Aspecto Físico:** Aceite amarillento

**Rendimiento:** 68%

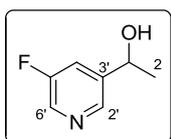
**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt/Hexano):

**Peso Molecular:** 141.14 g/mol

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.48 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 3H, H<sub>2</sub>), 2.57 (sa, OH), 4.93 (q, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 6.89 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 2.7 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.82 (dt, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 8.1 Hz, <sup>4</sup>J<sub>FH</sub> = 8.1 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.5 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 8.12 (s, 1H, H<sub>2</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): 25.4 (CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>), 67.3 (d, <sup>5</sup>J<sub>FC</sub> = 1.0 Hz, CH, C<sub>1</sub>), 109.5 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 37.1 Hz, CH, C<sub>5</sub>), 138.9 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 8.1 Hz, CH, C<sub>4</sub>), 139.0 (C, C<sub>3</sub>), 144.9 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 14.4 Hz, CH, C<sub>2</sub>), 163.0 (d, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 238.8 Hz, C, C<sub>6</sub>) ppm

1-(5-Fluoropiridin-3-il)etanol (71b)



Fórmula empírica: C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>FNO

Aspecto Físico: Aceite amarillo

Rendimiento: 48%

*R<sub>f</sub>* (100% AcOEt): 0.49

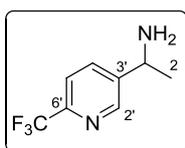
Peso Molecular: 141.14 g/mol

<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.40 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 3H, H<sub>2</sub>), 4.86 (q, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.5 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 5.05 (sa, 1H, OH), 7.41 (dt, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 9.3 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.2 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 8.12 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.6 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 8.18 (s, 1H, H<sub>2</sub>) ppm

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 25.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>), 66.6 (CH, C<sub>1</sub>), 120.4 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 18.3 Hz, CH, C<sub>4</sub>), 136.1 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 24.0 Hz, CH, C<sub>6</sub>), 142.6 (d, <sup>4</sup>J<sub>FC</sub> = 3.6 Hz, CH, C<sub>2</sub>), 144.2 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 2.5 Hz, C, C<sub>3</sub>), 159.7 (d, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 256.7 Hz, C, C<sub>5</sub>) ppm

HRMS (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>FNO)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 142.0663, encontrada: 142.0674

1-(6-(Trifluorometil)piridin-3-il)etanamina (69a)



Fórmula empírica: C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>

Aspecto Físico: Aceite amarillo

Rendimiento:

*R<sub>f</sub>* (10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.18

Peso Molecular: 190.17 g/mol

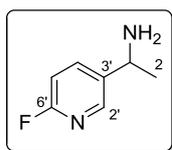
<sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.56 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 3H, H<sub>1</sub>), 4.38 (1H, H<sub>1</sub>), 6.93 (dd, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 8.6 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.9 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.92-7.98 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 8.24 (s, 1H, H<sub>2</sub>) ppm

<sup>13</sup>C-RMN (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 22.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>), 48.8 (CH, C<sub>1</sub>), 120.8 (CH, C<sub>5</sub>), 121.2 (q, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 274.1 Hz, C, CF<sub>3</sub>), 136.4 (CH, C<sub>4</sub>), 138.8 (C, C<sub>3</sub>), 148.2 (q, C, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 35.1 Hz, C<sub>6</sub>), 148.9 (CH, C<sub>2</sub>) ppm

HRMS (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 191.0791, encontrada: 191.0787

Rotación Óptica Específica: [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +20.0 (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>) [para (*R*)-69a en >99% *ee*]

1-(6-Fluoropiridin-3-il)etanamina (69b)



**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>FN<sub>2</sub>

**Aspecto Físico:** Aceite amarillento

**Rendimiento:**

**R<sub>f</sub>** (20% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.18

**Peso Molecular:** 140.16 g/mol

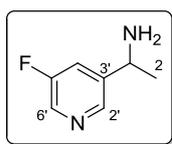
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.56 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.8 Hz, 3H, H<sub>1</sub>), 4.38 (1H, H<sub>1</sub>), 6.93 (dd, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 8.6 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.9 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 7.92-7.98 (m, 1H, H<sub>4</sub>), 8.24 (s, 1H, H<sub>2</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 21.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>), 48.1 (CH, C<sub>1</sub>), 110.0 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 37.5 Hz, CH, C<sub>5</sub>), 140.0 (C, C<sub>3</sub>), 140.1 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 8.1 Hz, CH, C<sub>4</sub>), 146.6 (d, <sup>3</sup>J<sub>FC</sub> = 14.8 Hz, CH, C<sub>2</sub>), 163.5 (d, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 240.2 Hz, C, C<sub>6</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>FN<sub>2</sub>)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 141.0823, encontrada: 141.0835

**Rotación Óptica Específica:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -28.2 (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>) [para (*S*)-69b en >99% *ee*]

1-(5-Fluoropiridin-3-il)etanamina (69c)



**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>FN<sub>2</sub>

**Aspecto Físico:** Aceite amarillento

**Rendimiento:**

**R<sub>f</sub>** (30% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.38

**Peso Molecular:** 140.16 g/mol

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.38 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, 3H, H<sub>2</sub>), 1.82 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.21 (q, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> = 6.6 Hz, 1H, H<sub>1</sub>), 7.45 (dt, <sup>3</sup>J<sub>FH</sub> = 9.6 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.0 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 8.32 (d, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.8 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 8.38 (t, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 1.8 Hz, 1H, H<sub>2</sub>) ppm

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 25.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>), 48.6 (CH, C<sub>1</sub>), 120.3 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 18.1 Hz, CH, C<sub>4</sub>), 136.7 (d, <sup>2</sup>J<sub>FC</sub> = 23.4 Hz, CH, C<sub>6</sub>), 143.9 (d, <sup>4</sup>J<sub>FC</sub> = 3.7 Hz, CH, C<sub>2</sub>), 144.8 (C, C<sub>3</sub>), 159.9 (d, <sup>1</sup>J<sub>FC</sub> = 256.5 Hz, C, C<sub>5</sub>) ppm

**HRMS** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*) (C<sub>7</sub>H<sub>10</sub>FN<sub>2</sub>)<sup>+</sup> (M+H)<sup>+</sup>: calculada 141.0823, encontrada: 141.0823

**Rotación Óptica Específica:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +36.2 (*c* 0.5, CHCl<sub>3</sub>) [para (*R*)-69c en >99% *ee*]



## **REFERENCIAS**



1. P. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301-312.
2. a) T. Hudlicky, J. W. Reed, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3117-3132; b) S. Friedrich, F. Hahn, *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1473-1508; c) H. Lechner, D. Pressnitz, W. Kroutil, *Biotechnol. Adv.* **2015**, doi:10.1016/j.biotechadv.2015.01.012; d) L. E. Iglesias, E. S. Lewkowicz, R. Medici, P. Bianchi, A. M. Iribarren, *Biotechnol. Adv.* **2015**, doi:10.1016/j.biotechadv.2015.03.009.
3. C. M. Clouthier, J. N. Pelletier, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585-1605.
4. J. Schüürmann, P. Quehl, G. Festel, J. Jose, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 8031-8046.
5. G. Yang, Y. Ding, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5604-5612.
6. a) Y. Miao, M. Rahimi, E. M. Geertsema, G. J. Poelarends, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *25*, 115-123; b) C. Pandya, J. D. Farelli, D. Dunaway-Mariano, K. N. Allen, *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 30229-30236.
7. a) Y. Li, P. C. Cirino, *Biotechnol. Bioeng.* **2014**, *111*, 1273-1287; b) K. B. Otte, B. Hauer, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *35*, 16-22; c) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185-194; d) H. Renata, Z. J. Wang, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 3351-3367.
8. H.-J. Federsel, *Green Chem.* **2013**, *15*, 3105-3115.
9. W. Aehle, J. Eck, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 67-87.
10. A. Zaks, A. M. Klivanov, *Science* **1984**, *224*, 1249-1251.
11. H. Gröger, W. Hummel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 171-179.
12. a) G. Sumbita, *Res. J. Chem. Sci.* **2014**, *4*, 103-116; b) M. J. Hernáiz, A. R. Alcántara, J. I. García, J. V. Sinisterra, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 9422-9437.
13. Z. J. Dijkstra, R. Merchant, J. T. F. Keurentjes, *J. Supercrit. Fluids* **2007**, *41*, 102-108.
14. a) A. P. Abbott, G. Capper, D. L. Davies, R. K. Rasheed, V. Tambyrajah, *Chem. Commun.* **2003**, 70-71; b) P. Domínguez de María, *Environmentally Friendly Syntheses Using Ionic Liquids*, Eds. J. Dupont, T. Itoh, P. Lozano, S. Malhotra, Taylor & Francis Group, **2015**, pp. 67-86.
15. a) W.-W. Gao, F.-X. Zhang, G.-X. Zhang, C.-H. Zhou, *Biochem. Eng. J.* **2015**, *99*, 67-84; b) J. V. Rodrigues, D. Ruivo, A. Rodríguez, F. J. Deive, J. M. S. S. Esperança, I. M. Marrucho, C. M. Gomes, L. P. N. Rebelo, *Green Chem.* **2014**, *16*, 4520-4523; c) S. P. M. Ventura, L. D. F. Santos, J. A. Saraiva, J. A. P. Coutinho, *Green Chem.* **2012**, *14*, 1620-1625.
16. R. A. Sheldon, A. van Pelt, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223-6235.

## Referencias

---

17. a) J. M. Palomo, *Curr. Org. Synth.* **2009**, *6*, 1-14; b) R. C. Rodrigues, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernández-Lafuente, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6290-6307; c) F. Secundo, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6250-6261.
18. S. Datta, L. R. Christena, Y. R. S. Rajaram, *3 Biotech* **2013**, *3*, 1-9.
19. a) R. A. Sheldon, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 213-223; b) G.-W. Zheng, H.-L. Yu, C.-X. Li, J. Pan, J.-H. Xu, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *70*, 138-143.
20. F. Bordusa, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4817-4867.
21. L. Hedstrom, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501-4523; b) F. Lecaille, J. Kaleta, D. Brömme, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4459-4488; c) W. T. Lowther, B. W. Matthews, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4581-4607; d) B. M. Dunn, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4431-4458.
22. a) K. Jellouli, O. Ghorbel-Bellaaj, H. B. Ayed, L. Manni, R. Agrebi, M. Nasri, *Process Biochem.* **2011**, *46*, 1248-1256; b) W. Rachadech, A. Navacharoen, W. Ruangsit, T. Pongtharankul, A. S. Vangnai, *Microbiology* **2010**, *79*, 620-629.
23. T. Nuijens, J. A. W. Kruijtzter, C. Cusan, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, P. J. L. M. Quaedflieg, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2719-2721.
24. K. McClean, C. Preston, D. Spence, P. W. Sutton, J. Whittall, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 215-218.
25. M. K. Sethi, S. R. Bhandya, R. Shukla, A. Kumar, N. Maddur, V. S. N. J. Mittapalli, V. S. Rawat, R. K. Yerramalla, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2014**, *108*, 77-81.
26. Algunos ejemplos: a) P. Vossenbergh, H. H. Beeftink, T. Nuijens, P. J. L. M. Quaedflieg, M. A. C. Stuart, J. Tramper, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *78*, 24-31; b) T. Nuijens, C. Cusan, A. C. H. M. Schepers, J. A. W. Kruijtzter, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, P. J. L. M. Quaedflieg, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *71*, 79-84; c) T. Nuijens, E. Piva, J. A. W. Kruijtzter, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, P. J. L. M. Quaedflieg, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 1039-1044; d) P. Vossenbergh, H. H. Beeftink, T. Nuijens, M. A. C. Stuart, J. Tramper, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *75*, 43-49.
27. P. Vlieghe, V. Lisowski, J. Martinez, M. Khrestchatisky, *Drug Discovery Today* **2010**, *15*, 40-56.
28. T. Nuijens, E. Piva, J. A. W. Kruijtzter, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, P. J. L. M. Quaedflieg, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 3777-3779.
29. C. G. Boeriu, A. E. Frissen, E. Boer, K. van Kekem, D.-J. van Zoelen, I. F. Eggen, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *66*, 33-42.
30. H. Schröder, G. A. Strohmeier, M. Leypold, T. Nuijens, P. J. L. M. Quaedflieg, R. Breinbauer, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 1799-1807.

31. C. I. Butré, S. Sforza, P. A. Wierenga, H. Gruppen, *Int. Dairy J.* **2015**, *44*, 44-53.
32. C. I. Butré, S. Sforza, H. Gruppen, P. A. Wierenga, *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 5827-5841.
33. C. I. Butré, S. Sforza, H. Gruppen, P. A. Wierenga, *J. Agric. Food. Chem.* **2014**, *62*, 10230-10239.
34. H.-Y. Wang, C. Li, N. Wang, K. Li, X.-W. Feng, T. He, X.-Q. Yu, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1905-1910.
35. P. Ferraboschi, M. De Mieri, F. Galimberti, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 2136-2141.
36. H. Zhao, L. Jackson, Z. Song, O. Olubajo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2491-2498.
37. L. Borén, B. Martín-Matute, Y. Xu, A. Córdova, J.-E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 225-232.
38. a) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504-4523; b) Q. Wu, B.-K. Liu, X.-F. Lin, *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 1966-1968; c) M. S. Humble, P. Berglund, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3391-3401; d) M. Kapoor, M. N. Gupta, *Process Biochem.* **2012**, *47*, 555-569; e) Z. Guan, L.-Y. Li, Y.-H. He, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 16801-16814.
39. K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231-238.
40. a) A. S. Bommarius, J. K. Blum, M. J. Abrahamson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 194-200; b) M. Wang, T. Si, H. Zhao, *Bioresour. Technol.* **2012**, *115*, 117-125; c) M. T. Reetz, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7530-7548; d) U. T. Bornscheuer, *Synlett* **2013**, *24*, 150-156.
41. a) M. Müller, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 3161-3174; b) K. Fresko, M. Gruber-Khadjawi, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 1248-1272.
42. a) P. Clapés, W.-D. Fressner, G. A. Sprenger, A. K. Samland, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 154-167; b) M. Dadashipour, Y. Asano, *ACS Catal.* **2011**, *1*, 1121-1149; c) M. Müller, G. A. Sprenger, M. Pohl, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 261-270.
43. Y. Miao, M. Rahimi, E. M. Geertsema, G. J. Poelarends, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *25*, 115-123.
44. V. Resch, J. H. Schrittwieser, E. Siirola, W. Kroutil, *Curr. Opin. Chem. Biotechnol.* **2011**, *22*, 783-799.
45. C. L. Windle, M. Müller, A. Nelson, A. Berry, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 25-33.
46. N. Sharma, U. K. Sharma, R. Kumar, N. Katoch, R. Kumar, A. K. Sinha, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 871-878.

## Referencias

---

47. Z. Guan, J.-P. Fu, Y.-H. He, *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 4959-4961.
48. J. Zheng, B.-H. Xie, Y.-L. Chen, J.-F. Cao, Y. Yang, Z. Guan, Y.-H. He, *Z. Naturforsch.* **2014**, *69c*, 170-180.
49. Z.-B. Xie, N. Wang, L.-H. Zhou, F. Wang, T. He, Z.-G. Le, X.-Q. Yu, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 1935-1940.
50. Z.-B. Xie, N. Wang, G.-F. Jiang, X.-Q. Yu, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 945-948.
51. M. Kapoor, A. B. Majumder, M. N. Gupta, *Catal. Lett.* **2015**, *145*, 527-532.
52. C. Li, Y.-J. Zhou, N. Wang, X.-W. Feng, K. Li, X.-Q. Yu, *J. Biotechnol.* **2010**, *150*, 539-545.
53. L.-Y. Li, D.-C. Yang, Z. Guan, Y.-H. He, *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1659-1667.
54. H.-H. Li, Y.-H. He, Z. Guan, *Catal. Commun.* **2011**, *12*, 580-582.
55. Y.-H. He, H.-H. Li, Y.-L. Chen, Y. Xue, Y. Yuan, Z. Guan, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 712-719.
56. B.-H. Xie, W. Li, Y. Liu, H.-H. Li, Z. Guan, Y.-H. He *Tetrahedron* **2012**, *68*, 3160-3164.
57. Y.-L. Chen, W. Li, Y. Liu, Z. Guan, Y.-H. He, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *87*, 83-87.
58. Y. Yuan, Z. Guan, Y.-H. He, *Sci. China Chem.* **2013**, *56*, 939-944.
59. J.-P. Fu, N. Gao, Y. Yang, Z. Guan, Y.-H. He, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *97*, 1-4.
60. W. Haoran, W. Zhi, Z. Hong, C. Ge, Y. Hong, W. Lei, *Green Chem. Lett. Rev.* **2014**, *7*, 145-149.
61. a) H.-H. Li, Y.-H. He, Z. Guan, *Green. Chem.* **2011**, *13*, 185-189; b) Z. Q. Liu, Z.-W. Xiang, Z. Shen, Q. Wu, X.-F. Lin, *Biochemie* **2014**, *101*, 156-160.
62. Y. Alvarez-Casao, E. Marques-Lopez, R. P. Herrera, *Symmetry* **2011**, *3*, 220-245.
63. S. E. Milner, T. S. moody, A. R. Maguire, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 3059-3067.
64. Z.-G. Le, L.-T. Guo, G.-F. Jiang, X.-B. Yiang, H.-Q. Liu, *Green Chem. Lett. Rev.* **2013**, *6*, 277-281.
65. E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 236-240.
66. D. F. Izquierdo, O. Barbosa, M. I. Burguete, P. Lozano, S. V. Luis, R. Fernández-Lafuente, E. García-Verdugo, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 6219-6225.
67. N. Gao, Y.-L. Chen, Y.-H. He, Z. Guan, *RSC Adv.* **2013**, *3*, 16850-16856.

68. J.-L. Wang, X. Li, H.-Y. Xie, B.-K. Liu, X.-F. Lin, *J. Biotechnol.* **2010**, *145*, 240-243.
69. F. Xu, J. Wang, B. Liu, Q. Wu, X. Lin, *Green. Chem.* **2011**, *13*, 2359-2361.
70. M. T. Reetz, R. Mondière, J. D. Carballeira, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1679-1681.
71. K. Asano, S. Matsubara, *Synthesis* **2009**, 3219-3226.
72. X.-h. Cai, B. Xie, *Arkivoc* **2013**, *i*, 264-293.
73. T. He, K. Li, M.-Y. Wu, X.-W. Feng, N. Wang, H.-Y. Wang, C. Li, X.-Q. Yu, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *67*, 189-194.
74. S.-J. Chai, Y.-F. Lai, H. Zheng, P.-F. Zhang, *Helv. Chim. Acta* **2010**, *93*, 2231-2236.
75. X.-Y. Chen, G.-J. Chen, J.-L. Wang, Q. Wu, X.-F. Lin, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 864-868.
76. Y. Xue, L.-P. Li, Y.-H. He, Z. Guan, *Sci. Rep.* **2012**, *2*, 761.
77. Z. Guan, J. Song, Y. Xue, D.-C. Yang, Y.-H. He, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, *111*, 16-20.
78. O. Torre, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Commun.* **2004**, 1724-1725.
79. K. P. Dhake, P. J. Tambade, R. S. Singhal, B. M. Bhanage, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *67*, 2681-2688.
80. J. D. Rivera-Martínez, J. Escalante, A. López-Munguía, A. Marty, E. Castillo, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, *112*, 76-82.
81. L. N. Monsalve, F. Gillanders, A. Baldessari, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 1164-1170.
82. P. Steunenberg, M. Sijm, H. Zuilhof, J. P. M. Sanders, E. L. Scott, M. C. R. Franssen, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 3802-3813.
83. S. Bonte, I. O. Guinea, I. Baussanne, J.-P. Xuereb, R. Dinica, M. Demeunynck, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 5495-5500.
84. a) G. Carrea, S. Riva, *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Medium*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2008**; b) P. Lozano, *Green Chem.* **2010**, *12*, 555-569; c) M. J. Hernáiz, A. R. Alcántara, J. I. García, J. V. Sinisterra, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 9422-9437.
85. B. Johnvesly, G.R. Naik, *Process Biochem.* **2001**, *37*, 139-144.
86. H. Inoue, M. Kikuchi, J.-i. Ito, N. Nishiyama, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 493-499.
87. a) R. D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608-1633; b) A. Pandey, S. Benjamin, C. R. Soccol, P. Nigam, N. Krieger, V. T. Soccol,

## Referencias

---

- Biotechnol. Appl. Biochem.* **1999**, *29*, 119-131; c) K.-E. Jaeger, T. Eggert, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 390-397; d) V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *40*, 111-120; e) B. Joseph, P. W. Ramteke, G. Thomas, *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 457-470; f) S. D. Schreck, A. M. Grunden, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 1011-1021.
- 88.** a) A. M. Klibanov, *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 141-144; b) M. Paravidino, P. Böhm, H. Gröger, U. Hanefeld, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 251-362.
- 89.** a) V. Gotor, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2189-2197; b) S. M. Roberts, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2001**, 1475-1499.
- 90.** S. Sharma, S. S. Kanwar, *Sci. World J.* **2014**, 625258/1-625258/16.
- 91.** K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 5<sup>th</sup> Ed., Springer, New York, **2004**, pp. 1-28.
- 92.** P.-Y. Stergiou, A. Foukis, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L. G. Theodorou, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, E. M. Papamichael, *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31*, 1846-1859.
- 93.** A. Aloulou, J. A. Rodriguez, S. Fernandez, D. van Oosterhout, D. Puccinelli, F. Carrière, *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1761*, 995-1013.
- 94.** a) E. García-Urdiales, I. Lavandera, V. Gotor, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 43-66; b) R. L. O. R. Cunha, E. A. Ferreira, C. S. Oliveira, A. T. Omori, *Biotechnol. Adv.* **2015**, en prensa, 10.1016/j.biotechadv.2014.12.009; c) M. Rachwalski, N. Vermue, F. P. J. T. Rutjes, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 9268-9282.
- 95.** E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, PR110-PR180.
- 96.** a) A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor, *Curr. Green Chem.* **2015**, *2*, 192-211; b) O. Verho, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3996-4009; c) A. S. de Miranda, L. S. M. Miranda, R. O. M. A. de Souza, *Biotechnol. Adv.* **2015**, en prensa, 10.1016/j.biotechadv.2015.02.015.
- 97.** a) R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665; b) Q. Jing, R. J. Kazlauskas, *Chirality* **2008**, *20*, 724-735.
- 98.** a) M. T. Reetz, M. Puls, J. D. Carballeira, A. Vogel, K.-E. Jaeger, T. Eggert, W. Thiel, M. Bocola, N. Otte, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 106-112; b) B. Ravi, U. Banerjee, S. Mehrotra, R. Mehrotra, *Curr. Chem. Biol.* **2013**, *7*, 114-120.
- 99.** a) M. Hall, A. S. Bommarius, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4088-4110; b) D. Monti, G. Ottolina, G. Carrea, S. Riva, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4111-4140; c) D.

Gamenara, G. A. Seoane, P. Saenz-Méndez, P. D. de María, *Redox Biocatalysis. Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons: Hoboken, 2012.

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

101. J. B. Jones, I. J. Jakovac, *Can. J. Chem.* **1982**, *60*, 19-28.

102. C. M. Nealon, M. M. Musa, J. M. Patel, R. S. Phillips, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 2100-2114.

103. V. Uppada, S. Bhaduri, S. B. Noronha, *Curr. Sci.* **2014**, *106*, 946-957.

104. S. Kara, J. H. Schrittwieser, F. Hollmann, M. B. Ansorge-Schumacher, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 1517-1529.

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

106. a) F. Andersson, E. Hedenström, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1952-1957; b) Z. Zhang, W. Wu, J. Liao, J. Li, H. Jiang, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 6708-6711; c) M. F. A. Adamo, V. K. Aggarwal, M. A. Sage, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8317-8318; d) X. Pan, Z. Liu, *Tetrahedron* **2014**, *70*, 4602-4610; e) J.-S. Yu, F.-M. Liao, W.-M. Gao, K. Liao, R.-L. Zuo, J. Zhou, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1-6.

107. a) B. Kasprzyk-Hordern, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4466-4503; b) B. Testa, G. Vistoli, A. Pedretti, J. Caldwell, *Helv. Chim. Acta* **2013**, *96*, 747-798.

108. a) P. Hoyos, V. Pace, M. J. Hernáiz, A. R. Alcántara, *Curr. Green Chem.* **2014**, *1*, 155-181; b) J.-M. Choi, S.-S. Han, H.-S. Kim, *Biotechnol. Adv.* **2015**, doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.014; c) S. Wenda, S. Illner, A. Mell, U. Kragl, *Green Chem.* **2011**, *13*, 3007-3047; d) N. Ran, L. Zhao, Z. Chen, J. Tao, *Green Chem.* **2008**, *10*, 361-372.

109. a) A. C. Marr, S. Liu, *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 199-204; b) C. A. Martinez, S. Hu, Y. Dumond, J. Tao, P. Kelleher, L. Tully, *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 392-398.

110. a) D. Ghislieri, N. J. Turner, *Top. Catal.* **2014**, *57*, 284-300; b) H. Kohls, F. Steffen-Munsberg, M. Höhne, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 180-192; c) B. M. Nestl, S. C. Hammer, B. A. Nebel, B. Hauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3070-3095; d) N. J. Turner, M. D. Truppo, *Chiral Amine Synthesis*, Ed. T. C. Nugent, 1<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2010**, pp. 431-459.

111. J. Paetzold, J. E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17620-17621.

112. M. J. Abrahamson, E. Vázquez-Figueroa, N. B. Woodall, J. C. Moore, A. S. Bommarius, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3969-3972.

113. a) D. Crich, A. Banerjee, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 151; b) A. A. Patchett, R. P. Nargund, *Annu. Rep. Med. Chem.* **2000**, *35*, 289-298.

## Referencias

---

114. a) R. Neelamegam, T. Hellenbrand, F. A. Schroeder, C. Wang, J. M. Hooker, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 1488-1494; b) R. Silvestri, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 625-627.
115. a) D. Liu, G. Zhao, L. Xiang, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3975-3984; b) S. Anas, H. B. Kagan, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 2193-2199; c) D. J. Trigg, J. M. Mitchell, R. Filler, *CNS Drug Reviews* **1998**, *4*, 87.
116. Algunos ejemplos recientes: a) Y. Duan, L. Li, M.-W. Chen, C.-B. Yu, H.-J. Fan, Y.-G. Zhou, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 7688-7700; b) C. Li, J. Chen, G. Fu, D. Liu, Y. Liu, W. Zhang, *Tetrahedron* **2013**, 6839-6844; c) Y. Duan, M.-W. Chen, Q.-A. Chen, C.-B. Yu, Y.-G. Zhou *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 1235-1238; d) Y.-C. Xiao, C. Wang, Y. Yao, J. Sun, Y.-C. Chen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 10661-10664.
117. D.-S. Wang, Q.-A. Chen, W. Li, C.-B. Yu, Y.-G. Zhou, X. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 8909-8911.
118. J. L. Núñez-Rico, H. Fernández-Pérez, A. Vidal-Ferran, *Green Chem.* **2014**, *16*, 1153-1157.
119. Y. Duan, M.-W. Chen, Z.-S. Ye, D.-S. Wang, Q.-A. Chen, Y.-G. Zhou, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 7193-7197.
120. L. Chen, C. Wang, L. Zhou, J. Sun, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 2224-2230.
121. F. O. Arp, G. C. Fu, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14264-14265.
122. X. L. Hou, B. H. Zheng, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1789-1791.
123. K. Saito, Y. Shibata, M. Yamanaka, T. Akiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11740-11743.
124. K. H. Kang, J. Do, Y. S. Park, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 808-812.
125. K.-H. Kang, Y. Kim, C. Im, Y.-S. Park, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 2542-2549.
126. E. Ascic, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 4666-4669.
127. Algunos ejemplos: a) E. Busto, L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 4057-4064; b) R. Lihammar, R. Millet, J.-E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 12114-12120; c) R. Amin, J.-X. Chen, I. C. Cotterill, D. Emrich, D. Ganley, Y. L. Khmelnitsky, M. D. McLaws, P. C. Michels, C. E. Schwartz, D. Thomas, J. Yan, Q. Yang, *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 915-920.
128. Algunos ejemplos recientes: a) T. Kida, T. Iwamoto, H. Asahara, T. Hinoue, M. Akashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 3371-3374; b) K. P. J. Gustafson, R. Lihammar, O. Verho, K. Engström, J.-E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3747-3751; c) D. Méndez-Sánchez, N. Ríos-Lombardía, S. García-Granda, J. Montejo-Bernardo, A. Fernández-González, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Tetrahedron: Asymmetry* **2014**, *25*, 381-386.

129. E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3998-4035.
130. H. Kohls, F. Steffen-Munsberg, M. Höhne, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 180-192.
131. G. Asensio, C. Andreu, J. A. Marco, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4197-4198.
132. B. Herradón, S. Valverde, *Synlett* **1995**, 599-602.
133. H. K. Chenault, J. Dahmer, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6354-6364.
134. B. Morgan, A. Zaks, D. R. Dodds, J. Liu, R. Jain, S. Megati, F. G. Njoroge, V. M. Girijavallabhan, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5451-5459.
135. A. Hietanen, K. Lundell, L. Kanerva, A. Liljeblad, *Arkivoc* **2012**, *v*, 60-74.
136. B. Orsat, P. B. Alper, W. Moree, C.-P. Mak, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 712-713.
137. W. Ding, M. Li, R. Dai, Y. Deng, *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 1376-1379.
138. M. Stirling, J. Blacker, M. I. Page, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1247-1250.
139. V. Gotor-Fernández, P. Fernández-Torres, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2558-2564.
140. a) G. W. Gribble, J. H. Hoffman, *Synthesis* **1977**, 849-860; b) F. Yamada, A. Kawanishi, A. Tomita, M. Somei, *Arkivoc* **2003**, *viii*, 102-111.
141. A. Kulkarni, W. Zhou, B. Török, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5124-5127.
142. A. G. H. Wee, B. Liu, L. Zhang, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4404-4414.
143. P. Domínguez de María, C. Carboni-Oerlemans, B. Tuin, G. Bargeman, A. van der Meer, R. van Gemert, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2005**, *37*, 36-46.
144. C.-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *102*, 7294-7299.
145. B. Kasprzyk-Hordern, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4466-4503.
146. a) M. Ordóñez, H. Rojas-Cabrera, C. Cativiela, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 17-49; b) T. E. Ali, *Arkivoc* **2014** (*i*), 21-91; c) A. Lemos, *Molecules* **2009**, *14*, 4098-4119; d) M. Ordóñez, J. L. Viveros-Ceballos, C. Cativiela, A. Arizpe, *Curr. Org. Synth.* **2012**, *9*, 310-341.
147. a) A. Mucha, P. Kafarski, L. Berlicki, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 5955-5980; b) S. J. Hecker, M. D. Erion, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 2328-2345.
148. E. Sabidó, T. Tarragó, S. Niessen, B. F. Cravatt, E. Giralt, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2361-2366.

## Referencias

---

149. K. Senten, L. Daniëls, P. V. der Veken, I. D. Meester, A.-M. Lambeir, S. Scharpé, A. Haemers, K. Augustyns, *J. Comb. Chem.* **2003**, *5*, 336-344.
150. B. F. Gilmore, L. Carson, L. L. McShane, D. Queen, W. A. Coulter, B. Walker, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *347*, 373-379.
151. P. V. der Veken, A. Soroka, I. Brandt, Y.-S. Chen, M.-B. Maes, A.-M. Lambeir, X. Chen, A. Haemers, S. Scharpé, K. Augustyns, I. D. Meester, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5568-5570.
152. a) N. Gruenfeld, J. L. Stanton, A. M. Yuan, F. H. Ebetino, L. J. Browne, C. Gude, C. F. Huebner, *J. Med. Chem.* **1983**, *26*, 1277-1282; b) D. Liu, G. Zhao, L. Xiang, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3975-3984; c) W.-G. Kim, J.-P. Kim, H. Koshino, K. Shin-Ya, H. Seto, I.-D. Yoo, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 4309-4316; d) N. Toda, M. Ori, K. Takami, K. Tago, H. Kogen, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 269-271.
153. F. J. Sayago, P. Laborda, M. I. Calaza, A. I. Jiménez, C. Cativiela, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2011-2028.
154. a) J. H. Lee, S. R. Byeon, Y. Kim, S. J. Lim, S. J. Oh, D. H. Moon, K. H. Yoo, B. Y. Chung, D. J. Kim, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5701-5704; b) T. Lübbers, P. Angehrn, H. Gmünderb, S. Herzig, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4708-4714; c) U. C. Yoon, Y. X. Jin, S. W. Oh, C. H. Park, J. H. Park, C. F. Campana, X. Cai, E. N. Duesler, P. S. Mariano, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10664-10671; d) A. J. Grenning, J. K. Synder, J. A. Porco Jr. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 792-795.
155. M. Ordóñez, F. J. Sayago, C. Cativiela, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 6369-6412.
156. M. Ordóñez, J. L. Viveros-Ceballos, C. Cativiela, F. J. Sayago *Tetrahedron* **2015**, *71*, 1745-1784.
157. Q. Tao, G. Tang, K. Lin, Y.-F. Zhao, *Chirality* **2008**, *20*, 833-838.
158. S. Hirata, M. Kuriyama, O. Onomura, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 9411-9416.
159. J. Miguélez-Ramos, V. R. Batchu, A. Boto, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 846-852.
160. Q. Chen, J. Li, C. Yuan, *Synthesis* **2008**, 2986-2990.
161. F. A. Davis, J. Zhang, Y. Wu, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 2054-2057.
162. a) F. A. Davis, H. Xu, Y. Wu, J. Zhang, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2273-2276; b) F. A. Davis, J. Zhang, H. Qiu, Y. Wu, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1433-1436.
163. Q. Chen, C. Yuan, *Synthesis* **2008**, *7*, 1085-1093.
164. J. Han, R. S. Paton, B. Xu, G. B. Hammond, *Synthesis* **2013**, *45*, 463-470.
165. a) D. G. Piotrowska, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 279-287; b) D. G. Piotrowska, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2323-2329; c) Y. Yamashita, T. Imaizumi, X.-X. Guo, S. Kobayashi, *Chem.-Asian J.* **2011**, *6*, 2550-2559.

166. S. Filippone, E. E. Maroto, A. Martín-Domenech, M. Suarez, N. Martín, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 578-582.
167. Y. Yamashita, X.-X. Guo, R. Takashita, S. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 3262-3263.
168. W.-Y. Han, J.-Q. Zhao, Z.-J. Wu, X.-M. Zhang, W.-C. Yuan, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 10541-10547.
169. J. L. Viveros-Ceballos, C. Cativiela, M. Ordóñez, *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 1479-1484.
170. B. Kaboudin, J.-Y. Kato, H. Aoyama, T. Yokomatsu, *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24*, 1562-1566.
171. S. Alatorre-Santamaría, M. Rodríguez-Mata, V. Gotor-Fernández, M. C. de Mattos, F. J. Sayago, A. I. Jiménez, C. Cativiela, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1714-1719.
172. R. Morán-Ramallal, V. Gotor-Fernández, P. Laborda, F. J. Sayago, C. Cativiela, V. Gotor, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1696-1699.
173. A. Arizpe, F. J. Sayago, A. I. Jiménez, M. Ordóñez, C. Cativiela, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3074-3081.
174. A. Arizpe, F. J. Sayago, A. I. Jiménez, M. Ordóñez, C. Cativiela, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 6732-6738.
175. a) N. Siddiqui, R. Ali, M. S. Alam, W. Ashan, *J. Chem. Pharm. Res.* **2010**, *2*, 309-316; b) J. Ilaš, P. Š. Anderluh, M. S. Dolenc, D. kikelj, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7325-7348.
176. B. Achari, S. B. Mandal, P. K. Dutta, C. Chowdhury, *Synlett* **2004**, *14*, 2449-2467.
177. a) J. Ilaš, P. Š. Anderluh, M. S. Dolenc, D. kikelj, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 7325-7348; b) S. K. Singh, A. K. Bajpai, R. Saini, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 7132-7135.
178. J. Liu, Q. Shen, J. Yu, M. Zhu, J. Han, L. Wang, *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 6933-6939.
179. R. K. Rao, I. Karthikeyan, G. Sekar, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 9090-9094.
180. L. Chouguiat, R. Boulcina, B. Carboni, A. Demonceau, A. Debache, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 5124-5128.
181. E. N. Koini, N. Avlonitis, E. S. Martins-Duarte, W. de Souza, R. C. Vommaro, T. Calogeropoulou, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 10302-10309.
182. J. G. de Vries, N. Mršić, *Catal. Sci. Technol.* **2011**, *1*, 727-735.
183. D. S. Kundu, J. Schmidt, C. Bleschke, A. Thomas, S. Blechert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5456-5459.

## Referencias

---

184. K. Gao, C.-B. Yu, D.-S. Wang, Y.-G. Zhou, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 483-488.
185. Y. Jiang, L.-X. Liu, W.-C. Yuan, X.-M. Zhang, *Synlett* **2012**, *23*, 1797-1800.
186. X.-W. Liu, C. Wang, Y. Yan, Y.-Q. Wang, J. Sun, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 6276-6280.
187. Y.-Q. Wang, Y. Zhang, K. Pan, J. You, J. Zhao, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 3381-3386.
188. 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.
189. 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.
190. 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.
191. D. A. Gruzdev, G. L. Levit, V. P. Krasnov, *Tetrahedron: Asymmetry* **2012**, *23*, 1640-1646.
192. D. A. Gruzdev, E. N. Chulakov, G. L. Levit, M. A. Ezhikova, M. I. Kodess, V. P. Krasnov, *Tetrahedron Asymmetry* **2013**, *24*, 1240-1246.
193. R. K. Rao, G. Sekar, *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 948-954.
194. J. F. Bower, P. Szeto, T. Gallagher, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 3283-3286.
195. M. K. Parai, G. Panda, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4703-4705.
196. M. Rueping, M. Stoeckel, E. Sugiono, T. Theissmann, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 6565-6568.
197. K. Satoh, M. Inenaga, K. Kanai, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 2657-2662.
198. M. Breznik, V. Hrast, A. Mrcina, D. Kikelj, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 153-167.
199. S. B. Kang, E. J. Ahn, Y. Kim, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 9317-9320.
200. 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, S.-L. Kim, D.-I. Kim, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2001**, *6*, 179-182.

- 201.** M. López-Iglesias, E. Busto, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 8049-8055.
- 202.** a) G. F. Breen, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1427-1430; b) M. Stirling, J. Blacker, M. I. Page, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1247-1250.
- 203.** M. O. Kitching, T. E. Hurst, V. Snieckus, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2925-2929.
- 204.** M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 779-820.
- 205.** a) D. I. Stirling, G. W. Matcham, A. L. Zeitlin, United States Patent 5,300,437 Celgene Corporation **1994**; b) J.-S. Shin, B.-G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *55*, 348-358.
- 206.** Revisión bibliográfica reciente: a) W. Kroutil, E.-M. Fischereder, C. S. Fuchs, H. Lechner, F. G. Mutti, D. Pressnitz, A. Rajagopalan, J. H. Sattler, R. C. Simon, E. Sirola, *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 751-759; b) M. S. Malik, E.-S. Park, J.-S. Shin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *94*, 1163-1171; c) S. Mathew, H. Yun, *ACS Catal.* **2012**, *2*, 993-1001; d) D. Koszelewski, K. Tauber, K. Faber, W. Kroutil, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 324-332; e) M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42-51.
- 207.** P. Christen, D. E. Metzler, *Transaminases* **1985**, Wiley, New York.
- 208.** M. Shon, R. Shanmugavel, G. Shin, S. Mathew, S.-H. Lee, H. Yun, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 12680-12683.
- 209.** E.-S. Park, M. S. Malik, J.-Y. Dong, J.-S. Shin, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 1734-1738.
- 210.** Y. Xie, H. Pan, M. Liu, X. Xiao, Y. Shi, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 1740-1748.
- 211.** S. Willies, *Practical Methods for Biocatalysis and Biotransformations 2*, Eds. J. Whittall, P. W. Sutton, 1<sup>st</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 61-64.
- 212.** M. Chan-Huot, A. Dos, R. Zander, S. Sharif, P. M. Tolstoy, S. Compton, E. Fogle, M. D. Toney, I. Shenderovich, G. S. Denisov, H.-H. Limbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 18160-18175.
- 213.** W. R. Griswold, M. D. Toney, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14823-14830.
- 214.** J.-S. Shin, B.-G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *65*, 206-211.
- 215.** A. P. Green, N. J. Turner, E. O'Reilly, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10714-10717.
- 216.** E. O'Reilly, C. Iglesias, D. Ghislieri, J. Hopwood, J. L. Galman, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2447-2450.

## Referencias

---

217. R. C. Simon, N. Richter, E. Busto, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 129-143.
218. a) K. Fesko, K. Steiner, R. Breinbauer, H. Schwab, M. Schürmann, G. A. Strohmeier, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **2013**, *96*, 103-110; b) H. Mallin, M. Höhne, U.T. Bornscheuer, *J. Biotechnol.* **2014**, *191*, 32-37; c) L. H. Andrade, W. Kroutil, T. F. Jamison, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 6092-6095.
219. G. A. Behrens, A. Hummel, S. K. Padhi, S. Schätzle, U. T. Bornscheuer, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2191-2215.
220. C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science* **2010**, *329*, 305-308.
221. H. Yun, B.-Y. Hwang, J.-H. Lee, B.-G. Kim, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 4220-4224.
222. B.-K. Cho, H.-Y. Park, J.-H. Seo, J. Kim, T.-J. Kang, B.-S. Lee, B.-G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *99*, 275-284.
223. A. Nobili, F. Steffen-Munsberg, H. Kohls, I. Trentin, C. Schulzke, M. Hçhne, U. T. Bornscheuer *ChemCatChem* **2015**, *7*, 757-760.
224. a) M. D. Truppo, H. Strotman, G. Hughes, *ChemCatChem* **2012**, *4*, 1071-1074; b) S.-S. Yi, C.-w. Lee, J. Kim, D. Kyung, B.-G. Kim, Y.-S. Lee, *Process Biochem.* **2007**, *42*, 895-898; c) H. Mallin, H. Höhne, U. T. Bornscheuer, *J. Biotechnol.* **2014**, *191*, 32-37; d) K. Deepankumar, S. P. Nadarajan, S. Mathew, S.-G. Lee, T. H. Yoo, E. Y. Hong, B.-G. Kim, H. Yun, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 417-421.
225. S. Lin, X. Lu, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 2536-2539.
226. T. Šmejkal, B. Breit, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 311-315.
227. B. Gao, Y. Zhao, J. Hu, J. Hu, *Org. Chem. Front.* **2015**, *2*, 163-168.
228. N. D. Rycke, F. Couty, O. R. P. David, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 12852-12871.
229. C. E. Paul, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 788-797.
230. a) C. Allais, J.-M. Grassot, J. Rodriguez, T. Constantieux, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 10829-10868; b) A. Dandia, R. Singh, S. Maheshwari, *Curr. Org. Chem.* **2014**, *18*, 2513-2529.
231. Algunos ejemplos recientes: a) T. M. Kadayat, C. Park, K.-Y. Jun, T. B. T. Magar, G. Bist, H. Y. Yoo, Y. Kwon, E.-S. Lee, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 160-173; b) I. A. Yule, L. G. Czaplewski, S. Pommier, D. T. Davies, S. K. Narramore, C. W. G. Fishwick, *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *86*, 31-38; c) O. Epstein, M. C. Bryan, A. C. Cheng, K. Derakhchan, T. A. Dineen, D. Hickman, Z. Hua, J. B. Human, C. Kreiman, I. E. Marx, M. M. Weiss, R. C. Wahl, P. H. Wen, D. A. Whittington, S. Wood, X. M. Zheng, R. T. Fremeau Jr., R. D. White,

- V. F. Patel, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 9796-9810; d) S. Riaz, I. U. Khan, M. Yar, M. Ashraf, T. U. Rehman, A. Shaikat, S. B. Jamal, V. C. M. Duarte, M. J. Alves, *Bioorganic Chem.* **2014**, *57*, 148-154.
- 232.** a) I. Span, K. Wang, W. Eisenreich, A. Bacher, Y. Zhang, E. Oldfield, M. Groll, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 7926-7932; b) M. B. Shah, J. Pascual, Q. Zhang, C. D. Stout, J. R. Halpert, *Mol. Pharmacol.* **2011**, *80*, 1047-1055.
- 233.** a) J. M. Neely, T. Rovis, *Org. Chem. Front.* **2014**, *1*, 1010-1015; b) M. A. Halcrow, *New J. Chem.* **2014**, *38*, 1868-1882; c) D. L. Cominsa, K. Higuchib, D. W. Young, *Adv. Heterocycl. Chem.* **2013**, *110*, 175-235; d) T. L. S. Kishbaugh, *Prog. Heterocycl. Chem.*, **2013**, *25*, 319-355.
- 234.** V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor, *Targ. Heteocycl. Chem.* **2008**, *12*, 414-437.
- 235.** E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3427-3435.
- 236.** E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 2626-2632.
- 237.** O. Torre, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1481-1488.
- 238.** H. Akita, Y. Takano, K. Nedu, K. Kato, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1705-1714.
- 239.** Y. Li, A. Wang, Y. Shen, P. Zhang, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2014**, *110*, 178-183.
- 240.** C. K. Savile, R. J. Kazlauskas, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12228-12229.
- 241.** P. S. Humphries, Q.-Q. T. Do, D. M. Wilhite, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 1765-1767.
- 242.** L. Martínková, V. Křen, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 130-137.
- 243.** L. Cantarella, A. Gallifuoco, A. Malandra, L. Martínková, F. Pasquarelli, A. Spera, M. Cantarella, *Enzym. Microb. Technol.* **2010**, *47*, 64-70.
- 244.** S. Agarwal, M. Gupta, B. Choudhury, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *97*, 67-73.
- 245.** E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, *17*, 1007-1016.
- 246.** R. W. Scott, D. E. Fox, J. W. Wong, M. P. Burns, *Org. Process Res. Dev.* **2004**, *8*, 587-592.
- 247.** S. Kawano, M. Yano, J. Hasegawa, Y. Yasohara, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, *75*, 2155-2161.
- 248.** H. Li, K. Xie, H. Huang, S. Wang, *PLoS One* **2014**, *9*, e103324/1-e103324/8.

## Referencias

---

249. H. Tang, Y. Yao, D. Zhang, X. Meng, L. Wang, H. Yu, L. Ma, P. Xu, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 39179-39186.
250. L. Sbircea, N. D. Sharma, W. Clegg, R. W. Harrington, P. N. Horton, M. B. Hursthouse, D. C. Apperley, D. R. Boyd, S. L. James, *Chem. Commun.* **2008**, 5538-5540.
251. J. H. Schrittwieser, V. Resch, J. H. Sattler, W.-D. Lienhart, K. Durchschein, A. Winkler, K. Gruber, P. Macheroux, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1068-1071.
252. a) J. H. Schrittwieser, V. Resch, S. Wallner, W.-D. Lienhart, J. H. Sattler, J. Resch, P. Macheroux, W. Kroutil, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 6703-6714; b) V. Resch, J. H. Schrittwieser, S. Wallner, P. Macheroux, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2377-2383.
253. a) M. Müller, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 3161-3174; b) K. Fesko, M. Gruber-Khadjawi, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 1248-1272.
254. a) V. Resch, J. H. Schrittwieser, E. Siirola, W. Kroutil, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 793-799; b) M. Müller, G. A Sprenger, M. Pohl, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 261-270.
255. C. Roberge, F. Fleitz, D. Pollard, P. Devine, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1473-1477.
256. a) D. P. Henderson, I. C. Cotterill, M. C. Shelton, E. J. Toone, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 906-907; b) M. J. Walters, V. Srikannathasan, A. R. McEwan, J. H. Naismith, C. A. Fierke, E. J. Toone, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 710-720.
257. M. Cheriyan, E. J. Toone, C. A. Fierke, *Biochemistry* **2012**, *51*, 1658-1668.
258. R. E. Meadows, K. R. Mulholland, M. Schürmann, M. Golden, H. Kierkels, E. Meulenbroeks, D. Mink, O. May, C. Squire, H. Straatman, A. S. Wells, *Org. Process Res. Dev.* **2013**, *17*, 1117-1122.
259. R. C. Simon, B. Grischek, F. Zepeck, A. Steinreiber, F. Belaj, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6713-6716.
260. R. C. Simon, F. Zepeck, W. Kroutil, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 2859-2865.
261. Z. Peng, J. W. Wong, E. C. Hansen, A. L. A. Puchlopek-Dermenci, H. J. Clarke, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 860-863.
262. F. Cabirol, A. Gohel, S. H. Oh, D. Smith, B. Wong, J. Lalonde, WO 2011/159910 A2, Codexis, Inc.
263. R. C. Simon, C. S. Fuchs, H. Lechner, F. Zepeck, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 3397-3402.