



Universidad de Oviedo

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

Biocatálisis aplicada a la preparación
enantioselectiva de heterociclos
funcionalizados y compuestos con centros
estereogénicos cuaternarios

Tesis Doctoral

Ángela Villar Barro



Universidad de Oviedo

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

Biocatálisis aplicada a la preparación enantioselectiva de
heterociclos funcionalizados y compuestos con centros
estereogénicos cuaternarios

**Memoria presentada por Ángela Villar Barro para optar al grado de Doctor en
Química por la Universidad de Oviedo**



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Biocatálisis aplicada a la preparación enantioselectiva de heterociclos funcionalizados y compuestos con centros estereogénicos cuaternarios	Inglés: Biocatalysis applied to the enantioselective preparation of functionalized heterocycles and compounds with quaternary stereogenic centers
2.- Autor	
Nombre: Ángela Villar Barro	DNI/Pasaporte/NIE: -K
Programa de Doctorado: Síntesis y Reactividad Química	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo	

RESUMEN (en español)

El uso de la biocatálisis en síntesis orgánica ha experimentado un creciente auge debido a la alta quimio-, regio- y enantioselectividad que muestran las enzimas, lo que permite obtener moléculas con gran complejidad sintética de forma muy simple. Además, este tipo de transformaciones se producen en condiciones suaves de reacción y no agresivas con el medio ambiente, considerándose procesos que están dentro de la Química Sostenible.

Esta memoria, está dividida en una introducción y cuatro capítulos en los que se abordará la síntesis y resolución mediante el uso de lipasas como catalizadores, de diferentes compuestos de alto valor añadido.

Introducción: este apartado es un breve resumen acerca de la biocatálisis: aspectos generales, evolución histórica y su uso actual en la industria. Además, cada capítulo consta de una breve introducción específica.

Capítulo 1: este capítulo hace hincapié en la dificultad de la resolución de centros estereogénicamente impedidos. Se lleva a cabo la síntesis de aminoalcoholes mediante reducción de cianhidrinas derivadas de cetonas y se estudia su resolución enzimática mediante el uso de lipasas tanto por el grupo amino como por el hidroxilo terciario.

Capítulo 2: en este capítulo se lleva a cabo la síntesis y resolución de *trans*-3,4-bromohidrininas, así como de *trans*- y *cis*-3,4-aminoalcoholes derivados del tetrahidrofurano y de la pirrolidina. La resolución se realiza tanto mediante hidrólisis como mediante procesos de acilación utilizando diferentes lipasas como catalizadores. Además, se asigna la configuración absoluta de los compuestos ópticamente puros obtenidos, sintetizando a partir



de ellos los previamente descritos en la bibliografía lo que permite su comparación.

Los principales resultados de este capítulo han sido publicados en:

A. Villar-Barro, R. Brieva, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2013**, *24*, 694-698

A. Villar-Barro, R. Brieva, V. Gotor, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2014**, *22*, 5563-5568.

Capítulo 3: Se lleva a cabo una síntesis regioselectiva de derivados 3-amino-4-hidroxipiperidínicos ortogonalmente protegidos, obteniéndose productos de interés por su posible aplicación en la síntesis de compuestos farmacológicamente activos con elevados rendimientos. Además se consigue la resolución de los mismos de manera satisfactoria y la posterior derivatización de los compuestos enantiopuros para la asignación de la configuración mediante la comparación con los previamente descritos en la bibliografía.

Los resultados obtenidos han sido enviados para su publicación.

Capítulo 4: Se estudia la resolución enzimática de hidroxialquilpirrolidinas precursoras de inhibidores de la óxido nítrico sintasa. Además se lleva a cabo la resolución de otros regioisómeros del sustrato de interés lo que permite un estudio más amplio de la capacidad de las lipasas para la resolución de este tipo de estructuras.

Los resultados obtenidos se enviarán próximamente para su publicación.

RESUMEN (en Inglés)

The growing importance of biocatalysis in organic synthesis is due to the high quimio, -regio and enantioselectivity shown by enzymes that allows to get highly complex molecules in a very simple way. Moreover, this kind of transformations take place in mild reaction conditions and are non-aggressive to the environment. In general they are considered within the sustainable chemistry.

In this Doctoral Thesis we carry out the synthesis and enzymatic resolution of several building blocks of complex molecules that exhibit interesting biological activities by use of lipases as catalyst.

Introduction: this section is an overview about biocatalysis, the enzymes' history and their use in the industry. Moreover, every chapter has a



short individual summary.

Chapter 1: This chapter shows the difficulty of the production of optically pure quaternary carbon centres. Here we describe the synthesis and the resolution of aminoalcohols obtained from ketone-derived cyanohydrins using enzymatic aminolysis or hydrolysis of their acylated derivatives.

Chapter 2: This chapter described the synthesis and enzymatic resolution of (\pm)-*trans*-3-bromo-4-hydroxytetrahydrofuran, *cis*- and *trans*-3-amino-4-hydroxytetrahydrofuran and their pyrrolidine analogues. We also established the absolute configuration of the optically pure heterocycles obtained by comparison their specific rotation signs with those reported in the literature.

The main results attained in this work have been published in:

A. Villar-Barro, R. Brieva, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2013**, *24*, 694-698

A. Villar-Barro, R. Brieva, V. Gotor, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2014**, *22*, 5563-5568.

Chapter 3: This chapter summarizes the synthesis of enantiopure *trans*-3-amino-4-hydroxypiperidines orthogonally protected. The key steps are a regioselective epoxide ring-opening with diallylamine and the enzymatic resolution of the resulting aminoalcohol. The absolute configuration of optically pure compounds is established.

This results attained in this work have been sent for their publication.

Chapter 4: In this chapter, we described the enzymatic processes for the preparation of the hydroxyalkylpyrrolidines that are precursors of inhibitors of the neuronal nitric oxide synthase. In addition, we also carry out the enzymatic resolution of other regioisomers in order to investigate the scope of the enzymatic resolution.

This results attained in this work will be sent for their publication.

A mis padres

“Ever tried, ever failed. No matter; try again, fail again, fail better.”

Samuel Beckett

Después de cinco años de aprendizaje e ilusión ha llegado el momento de cerrar una etapa más, sin embargo, este momento no hubiera sido posible sin las personas que han estado a mi lado todo este tiempo, para apoyarme en las dificultades y disfrutar de los buenos momentos. Esta tesis tiene un pedazo de todos y cada uno de vosotros.

En primera instancia quiero agradecer al Principado de Asturias por la financiación recibida mediante la concesión de la beca-contrato Severo-Ochoa así como la oportunidad de realizar una estancia en Alemania.

A mis directores, los Profesores Vicente Gotor Santamaría y Rosario Brieva. Al Profesor Vicente Gotor por haberme permitido formar parte de su grupo y por su apoyo a lo largo de todos estos años. A la Profesora Rosario Brieva, por su preocupación continua y el trato recibido.

I would like to thank Professor U. Bornscheuer for the warm welcome I received during my internship in his group.

A los doctores Iván Lavandera y Vicente Gotor Fernández, por su amabilidad y consejos científicos.

A mis compañeros del laboratorio, tanto los que están como los que ya se han ido. Han sido muchas fiestas, comidas, cafés y tardes de interminables columnas (con sus respectivos juegos, competiciones y conversaciones absurdas) que me hacen sonreír al pensar en estos 5 años. Expresiones como estorba, matapitos, cambia la cinta, las cosas que hay en Candás, Bruce W., tú no habías nacido, se tiene o no se tiene, Lionidas, ¿Cómo así?, tienen un significado especial en el laboratorio 349.

A mis amigas, por todos los buenos ratos vividos y por conseguir, tan fácilmente, que olvide los malos. La vida es mucho más alegre si se comparte con vosotras. Yeni, Carmen, Sara, admiro y envidio vuestra capacidad de transmitir alegría y tranquilidad, me

siento orgullosa de ser vuestra amiga. Rubén, gracias por tener siempre tiempo y paciencia para escucharme y darme ánimo. Bibi, solo las amigas de verdad perdonan y comprenden estos últimos meses de abandono.

A las chicas de la vitamina, por enseñarme los misterios de la cromatografía y porque sabéis que sin vuestra ayuda y consejos esto no hubiese sido posible. Tras estos 5 años no solo me llevo una tesis, sino las dos mejores amigas que todo el mundo sueña con tener, simplemente, moláis más.

A Katu, por ser un ejemplo diario de bondad, optimismo y superación, y por ello, un espejo en el que mirarse. Los mejores momentos de mi vida han sucedido solo por tenerte a mi lado, gracias. Tampoco puedo olvidarme de Ángeles, gracias por vivir mis éxitos o fracasos como si de una hija se tratase.

A Jokin, por el día a día, por enseñarme a ver el cielo más azul, por ser mi compañero y darme tu energía, no cabe en una vida, mi gratitud.

A mis padres, por su apoyo incondicional durante estos diez años, sus frases de aliento, su disposición permanente a ayudarme y la confianza depositada en mí. Mamá, gracias por enseñarme que con esfuerzo y constancia todo se consigue.

Gracias a todos

Abreviaturas

Å	→ Angstroms
Ac	→ Acetilo
AcOEt	→ Acetato de etilo
AcOVin	→ Acetato de vinilo
AK	→ La lipasa de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Alil₂NH	→ Dialilamina
Alloc	→ Aliloxicarbonilo
APCI⁺	→ Ionización química a presión atmosférica en modo positivo
Ar	→ Arilo
Asp	→ Ácido aspártico o aspartato
Bn	→ Bencilo
Boc	→ <i>tert</i>-Butoxicarbonilo
Boc₂O	→ <i>ditert</i>-butildicarbonato
Bu	→ Butilo
^tBu	→ <i>tert</i>-Butilo
^tBuOH	→ <i>tert</i>-Butanol
ⁿBuLi	→ Butillitio
Bz	→ Benzoílo
°C	→ Grados Celsius
c	→ Cuatriplete
c	→ Conversión
CAL-A	→ Lipasa de <i>Candida antarctica</i> tipo A
CAL-B	→ Lipasa de <i>Candida antarctica</i> tipo B
Cbz	→ Benciloxicarbonilo

CH₂Cl₂	→ Diclorometano
CH₃CN	→ Acetonitrilo
cm	→ Centímetros
mCPBA	→ ácido metacloroperbenzoico
¹³C-RMN	→ Resonancia magnética nuclear de carbono
δ	→ Desplazamiento químico
d	→ Doblete
DIAD	→ Azodicarboxilato de dietilo
dd	→ Doble doblete
ddd	→ Doble doblete desdoblado
DEPT	→ Aumento de distorsión por transferencia de polarización (Distorsion Enhancement by Polarization Transfer)
ΔG	→ Energía libre de Gibbs
DMAP	→ 4-(<i>N,N</i>)-Dimetilamino piridina
DMSO	→ Dimetilsulfóxido
dt	→ Doble triplete
<i>E</i>	→ Razón enantiomérica
E_a	→ Energía de activación
<i>ee</i>	→ Exceso enantiomérico
<i>ee</i>_S	→ Exceso enantiomérico de sustrato
<i>ee</i>_P	→ Exceso enantiomérico de producto
EM	→ Espectrometría de masas
eq.	→ Equivalentes
ES	→ Esterasa
ESI⁺	→ Ionización por electrospray en modo positivo

Et	→ Etilo
Et₃N	→ Trietilamina
EtOH	→ Etanol
g	→ Gramo
Glu	→ Ácido glutámico o glutamato
¹H-RMN	→ Resonancia magnética nuclear de protón
h	→ Horas
His	→ Histidina
HPLC	→ Cromatografía líquida de alta eficacia (High-Performance Liquid Chromatography)
HRMS	→ Espectrometría de masas de alta resolución (High Resolution Mass Spectrometry)
Hz	→ Hertzios
EI⁺	→ Ionización por impacto electrónico en modo positivo
IPA	→ Isopropanol
IR	→ Espectroscopía de infrarrojo
IT	→ Intermediario tetrahédrico
<i>J</i>	→ Constante de acoplamiento
<i>K</i>_{cat}	→ Constante de velocidad
<i>K</i>_M	→ Constante de Michaelis Menten
KR	→ Resolución cinética (Kinetic Resolution)
LiClO₄	→ Perclorato de litio
m	→ Multiplete
μL	→ Microlitro

M	→ Molaridad
Me	→ Metilo
MeCN	→ Acetonitrilo
MeOH	→ Metanol
Me₃P	→ Trimetilfosfina
mg	→ Miligramo
MHz	→ Megahertzio
Min	→ Minuto
mL	→ Mililitro
mmol	→ Milimol
m/z	→ Relación masa/carga
pNBA	→ ácido <i>p</i>-nitrobenzoico
NDMBA	→ Ácido <i>N,N'</i>-dimetilbarbitúrico
v	→ Frecuencia
N	→ Concentración normal
Nu	→ Nucleófilo
Pd(OAc)₂	→ Acetato de paladio
PF	→ Punto de fusión
Ph	→ Fenilo
Ph₃P	→ Trifenilfosfina
PPL	→ Lipasa de páncreas porcino
ppm	→ Partes por millón
Pr	→ Propilo
<i>i</i>Pr	→ Isopropilo

PSL → Lipasa de *Pseudomonas cepacia*, actualmente conocida como *Burkholderia cepacia*

PSL-D → PSL inmovilizada sobre diatomita, comercializada por Sigma-Aldrich

PSL IM → SL inmovilizada sobre diatomita, comercializada por Amano Enzyme Europe Ltd.

Py → Piridina

q → Quintuplete

Rto. → Rendimiento

Ref. → Referencia

RMN → Resonancia magnética nuclear

rpm → Revoluciones por minuto

R_f → Factor de retención

s → Singulete

sa → Singulete ancho

Ser → Serina

t → Triplete

t → Tiempo

T → Temperatura

t.a. → Temperatura ambiente

TBAF → Fluoruro de tetrabutilamonio

TBDMS → *tert*butildimetilsililo

***t*BuOMe** → *tert*butilmetil éter

THF → Tetrahidrofurano

TMS → Trimetilsililo

TLC → **Cromatografía de capa fina (Thin Layer Chromatography)**

t_R → **Tiempo de retención**

U → **Unidades enzimáticas**

uma → **Unidad de masa atómica**

UV → **Ultravioleta**

W → **Vatios**

Índice

Resumen.....	1
Summary.....	5
Introducción.....	9
0.1. Biocatálisis.....	11
0.1.1. Biocatálisis a lo largo de la historia	11
0.1.2. Biocatálisis en la Industria	12
0.2. Química Sostenible.....	14
0.2.1. Enzimas en disolvente orgánico.....	17
0.2.2. Inmovilización de enzimas.....	18
0.3. Lipasas	19
0.3.1. Mecanismo de actuación.....	20
0.3.2. Estructura de las lipasas	22
0.3.3. Enantioselectividad y reconocimiento quiral	23
0.4. Medida de la razón enantiomérica	25
0.5. Objetivos generales.....	26
Capítulo 1: Estudio de la resolución enzimática de 6-bromo-2,2,-dimetil-4-aminometil-4-hidroxicromanona y aminoalcoholes de estructura análoga.....	29
1.1. Preparación de compuestos con centros estereogénicos cuaternarios	33
1.2. Procesos biocatalíticos	39
1.2.1. Epóxido hidrolasas, deshalogenasas e hidroxinitriliasas	39
1.2.1.1. Epóxido hidrolasas.....	39
1.2.1.2. Deshalogenasas.....	40

Índice

1.2.2. Lipasas y esterasas	40
1.2.3. Resoluciones enzimáticas a través de grupos funcionales alejados del centro estereogénico	43
1.3. Síntesis de los precursores	53
1.3.1. Resolución mediante reacciones de aminólisis	55
1.3.1.1. Resolución del sustrato (±)-4a	55
1.3.1.2. Resolución del sustrato (±)-4b	57
1.3.1.3. Resolución del sustrato (±)-4c	58
1.3.2. Resolución mediante procesos de hidrólisis	59
1.3.3. Estudios de solubilidad	59
1.3.4. Estudios del cosolvente	60
1.3.5. Estudio de la actividad de las hidrolasas	61
1.3.6. Hidrólisis enzimática del sustrato (±)-7a	62
1.3.7. Hidrólisis enzimática del sustrato (±)-7b-c	63
1.4. General.....	71
1.4.1. Biocatalizadores	71
1.4.2. Disolventes.....	71
1.5. Técnicas de análisis.....	72
1.5.1. Cromatografía en gel de sílice	72
1.5.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	72
1.5.3. Espectroscopía de infrarojo (IR)	72
1.5.4. Espectrometría de masas.....	73
1.5.5. Puntos de fusión	73
1.5.6. Resonancia magnética nuclear (RMN)	73
1.5.7. Rotación específica.....	73
1.6. Procedimientos sintéticos	74

1.6.1. Procedimiento general para aminólisis enzimática....	74
1.6.2. Procedimiento general para la hidrólisis enzimática .	74
1.6.3. Síntesis de 6-bromo-2,2-dimetil-4-cromanona. 2c	74
1.6.4. Síntesis de las trimetilsililoxicianhidrinas (±)-3a-c	75
1.6.5. Síntesis de los aminoalcoholes (±)-4a-c.....	75
1.6.6. Síntesis de las amidas (±)-5a-c.....	75
1.6.7. Síntesis de los carbamatos (±)-6a-c.....	76
1.6.8. Síntesis de los ésteres (±)-7a-c.....	76
1.7. Datos experimentales	76

Capítulo 2: Síntesis y resolución de bromohidrinas y aminoalcoholes tetrahidrofuránicos y pirrolidínicos sustituidos en las posiciones 3 y 4 del anillo.....93

2.1. Importancia de las pirrolidinas quirales	97
2.2. Importancia de los tetrahidrofuranos quirales	100
2.3. Preparación de aminoalcoholes tetrahidrofuránicos y pirrolidínicos ópticamente puros	105
2.3.1. Síntesis a partir de productos naturales.....	105
2.3.2. Catálisis asimétrica	106
2.3.3. Resolución enzimática de 3,4-dihidroxitetrahydrofurano.....	108
2.3.4. Resolución enzimática de 3,4-dihidroxipirrolidina ..	108
2.3.5. Resolución enzimática de <i>trans</i> -3-amino-4-hidroxipirrolinida	109
2.4. Síntesis y resolución de bromohidrinas heterocíclicas ..	117

Índice

2.4.1. Síntesis y resolución de <i>trans</i> -3-bromo-4-hidroxi-tetrahydrofurano.....	117
2.4.2. Síntesis y resolución de <i>trans</i> -3-bromo-4-hidroxi-pirrolidinas.....	120
2.4.3. Asignación de la configuración absoluta	124
2.4.3.1. Configuración absoluta del compuesto <i>trans</i> -3-bromo-4-fenilacetoxitetrahydrofurano	124
2.4.3.2. Configuración absoluta del compuesto <i>trans</i> -1-benciloxicarbonil-3-bromo-4-hidroxipirrolidina	125
2.5. Síntesis y resolución de 3-amino-4-hidroxi-tetrahydrofuranos y pirrolidinas.....	126
2.5.1. Síntesis y resolución de (\pm)- <i>cis</i> -3-amino-4-hidroxi-tetrahydrofurano.....	126
2.5.2. Síntesis y resolución de (\pm)- <i>trans</i> -3-amino-4-hidroxi-tetrahydrofurano.....	129
2.5.3. Síntesis y resolución de (\pm)- <i>cis</i> -3-amino-4-hidroxi-pirrolidina	131
2.5.4. Asignación de la configuración absoluta	135
2.5.4.1. Configuración absoluta del compuesto <i>cis</i> -3- <i>tert</i> -butoxicarbonilamino-4-hidroxitetrahydrofurano	135
2.5.4.2. Configuración absoluta del compuesto <i>trans</i> -3- <i>tert</i> -butoxicarbonilamino-4-hidroxitetrahydrofurano	136
2.5.4.3. Configuración absoluta del compuesto <i>cis</i> -1-benciloxicarbonil-3- <i>tert</i> -butoxicarbonilamino-4-hidroxipirrolidina.....	136
2.6. General.....	145
2.6.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	145
2.7. Procedimientos sintéticos	145
2.7.1. Procedimiento general para hidrólisis enzimática....	145

2.7.2. Procedimiento general para la acilación enzimática	145
2.7.3. Síntesis del compuesto 1-benciloxicarbonil-2,5-dihidropirrol. 19	146
2.7.4. Procedimiento general para la preparación de las bromohidrinas (±)- <i>trans</i> -16 y (±)- <i>trans</i> -20	146
2.7.5. Síntesis de los ésteres (±)- <i>trans</i> -17a,b y (±)- <i>trans</i> -21a-c	147
2.7.6. Síntesis de (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3-azido-4-fenilacetoxitetra-hidrofurano. (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-22	147
2.7.7. Síntesis de (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3-azido-4-hidroxitetra-hidrofurano. (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-23	147
2.7.8. Síntesis de (±)- <i>trans</i> -3-azido-4-hidroxitetra-hidro-furano. (±)- <i>trans</i> -23	148
2.7.9. Síntesis de (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-1-benciloxicarbonil-3-bromo-4-(<i>tert</i> -butildimetilsililoxi)pirrolidina. (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-24	148
2.7.10. Síntesis de (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1-benciloxicarbonil-3-azido-4-(<i>tert</i> -butildimetilsililoxi)pirrolidina. (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-25	148
2.7.11. Síntesis de (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-1-benciloxicarbonil-3-azido-4-hidroxipirrolidina. (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-26	149
2.7.12. Síntesis del compuesto 3,4-epoxitetrahidrofurano.	149
2.7.13. Procedimiento general para síntesis de (±)- <i>cis</i> -28, (±)- <i>trans</i> -28 y (±)- <i>cis</i> -31a-c	149
2.7.14. Procedimiento general para la síntesis de (±)- <i>cis</i> - y (±)- <i>trans</i> -3- <i>tert</i> -butoxicarbonil-amino-4-hidroxitetra-hidro-furano y (±)- <i>cis</i> -1-benciloxicarbonil-3- <i>tert</i> -butoxicarbonil-amino-4-hidroxipirrolidina [(±)- <i>cis</i> -27 (±)- <i>trans</i> -27 y (±)- <i>cis</i> -30]	150

Índice

2.7.15. Síntesis de (3S,4S)-3-amino-4-hidroxitetra- hidrofurano (3S,4S)-32 y (3R,4S)-3-amino-4-hidroxi- tetrahydrofurano (3R,4S)-32.....	150
2.7.16. Síntesis de (3S,4R)-1-benciloxycarbonil-3-amino-4- hidroxipirrolidina (3S,4R)-33	151
2.8 Datos experimentales	151
Capítulo 3: Síntesis quimioenzimática selectiva de trans-3- amino-4-hidroxipiperidinas enantiopuras ortogonalmente protegidas.....	175
3.1. Importancia de las 3,4-aminohidroxi-piperidinas	179
3.2. Síntesis regioselectiva de 3-amino-4-hidroxipiperidinas y 4- amino-3-hidroxipiperidinas.....	185
3.3. Importancia del grupo protector	186
3.4. Obtención de las 3,4-aminohidroxipiperidinas ópticamente puras	188
3.5. Resoluciones enzimáticas.....	189
3.6. Síntesis y resolución de (±)- <i>trans</i> -4-amino-3- hidroxipiperidinas	199
3.7. Síntesis y resolución del derivado (±)- <i>trans</i> -3-amino-4- hidroxipiperidina	204
3.8. Estudio de la resolución de los derivados benciloxycarbonilados de la piperidina	208
3.9. Asignación de la configuración absoluta	210
3.10. Síntesis del derivado (3R,4S)-1-benciloxycarbonil-4- hidroxi-3- <i>tert</i> -butoxicarbonil-aminopiperidina	213
3.11. General.....	221

3.11.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ...	221
3.12. Procedimientos sintéticos.....	221
3.12.1. Procedimiento general para las acilaciones enzimáticas	221
3.12.2. Procedimiento general para las hidrólisis enzimáticas	222
3.12.3. Síntesis de 1-bencil-1,2,3,6-tetrahidropiridina. 42	222
3.12.4. Síntesis de 1-bencil-3,4-epoxipiperidina (±)-43	222
3.12.5. Síntesis 1-bencil-4-amino-3-hidroxipiperidinas (±)- <i>trans</i> -44, (±)- <i>trans</i> -46.	223
3.12.6. Síntesis del derivado (±)- <i>trans</i> -1-bencil-3-hidroxi-4- <i>tert</i> -butoxicarbonilaminopiperidina. (±)- <i>trans</i> -47.	223
3.12.7. Síntesis del derivado (±)- <i>trans</i> -1-bencil-4-amino-3-hidroxipiperidina. (±)- <i>trans</i> -48	223
3.12.8 Procedimiento general para los derivados acilados (±)- <i>trans</i> -45a,b, (±)- <i>trans</i> -50a,b, (±)- <i>trans</i> -56, (±)- <i>trans</i> -57.	224
3.12.9. Síntesis de los derivados (±)- <i>trans</i> -49, (±)- <i>trans</i> -54, (±)- <i>trans</i> -55	224
3.12.10. Síntesis del compuesto (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-1-benciloxi-carbonil-4-hidroxi-3- <i>tert</i> -butoxicarbonilaminopiperidina. (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-51	225
3.12.11. Síntesis del compuesto 1-benciloxicarbonil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina. 52.....	225
3.12.12. Síntesis de 1-benciloxicarbonil—3,4-epoxipiperidina. (±)-53	225
3.12.13. Síntesis del derivado (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-4-acetoxi-1-benciloxicarbonil-3-(dialilamino)piperidina. (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-56	226

Índice

3.12.14. Síntesis del derivado (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-4-acetoxi-1-benciloxicarbonil-3- <i>tert</i> -butoxicarbonilaminopiperidina. (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-58.	226
3.12.15. Síntesis del derivado (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-1-benciloxicarbonil-3- <i>tert</i> -butoxicarbonilamino-4-hidroxi-piperidina. (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-51.	227
3.13. Datos experimentales	228
Capítulo 4: Síntesis enantioselectiva de segmentos pirrolidínicos de inhibidores de la óxido nítrico neuronal sintasa.....	247
4.1. Importancia de las óxido nítrico sintasas (NOS)	251
4.2. Síntesis de 3-(aminopirimidil)metil-4-hidroxi-pirrolidinas	255
4.2.1. Resoluciones de hidroxiarilpirrolidinas y derivados de las mismas	258
4.3. Resoluciones enzimáticas.....	258
4.4. Síntesis de los sustratos	267
4.4.1. Síntesis de los ésteres derivados de los sustratos (±)- <i>trans</i> -66 y (±)- <i>trans</i> -67	267
4.4.2. Síntesis de los compuestos (±)- <i>trans</i> -70, (±)- <i>cis</i> -70 y sus ésteres derivados.....	268
4.4.3. Síntesis de los compuestos (±)- <i>cis</i> -67, (±)- <i>trans</i> -77, (±)- <i>cis</i> -77 y sus ésteres derivados.....	270
4.5. Resoluciones enzimáticas de las hidroxipirrolidinas sintetizadas.....	273
4.5.1. Resolución enzimática del sustrato (±)- <i>trans</i> -72 y sus derivados.....	273

4.5.2. Resolución enzimática del sustrato (\pm)- <i>trans</i> -70 y sus derivados.....	276
4.5.3. Resolución enzimática del sustrato (\pm)- <i>cis</i> -70 y sus derivados.....	279
4.5.4. Resolución enzimática del sustrato (\pm)- <i>trans</i> -67 y sus derivados.....	282
4.5.5. Resolución enzimática del sustrato (\pm)- <i>cis</i> -67 y sus derivados.....	284
4.5.6. Resolución enzimática del sustrato (\pm)- <i>trans</i> -77 y sus derivados.....	286
4.5.7. Resolución enzimática del sustrato (\pm)- <i>cis</i> -77 y sus derivados.....	288
4.6. Resumen de las condiciones de reacción más favorables	289
4.7. Asignación de la configuración	291
4.7.1. Asignación de la configuración del derivado (\pm)- <i>trans</i> -70	292
4.7.2. Asignación de la configuración del derivado (\pm)- <i>trans</i> -66	293
4.8. General.....	301
4.8.1. Biocatalizadores	301
4.9. Procedimientos sintéticos	301
4.9.1. Síntesis del compuesto 2-(<i>tert</i> -butoxicarbonil-amino)-4,6-dimetilpiridina. 63.....	301
4.9.2. Síntesis del compuesto 1- <i>tert</i> -butoxicarbonil-3,4-epoxipirrolidina. 65	301
4.9.3. Síntesis de los compuestos (\pm)- <i>trans</i> -66 y (\pm)- <i>trans</i> -67	302

Índice

4.9.4. Síntesis de los derivados acilados (±)-<i>trans</i>-72, (±)-<i>trans</i>-73, (±)-<i>trans</i>-74a,b, (±)-<i>cis</i>-74a,b, (±)-<i>cis</i>-73, (±)-<i>trans</i>-78, (±)-<i>cis</i>-78.....	302
4.9.5. Síntesis de los compuestos (±)-<i>cis</i>-67, (±)-<i>cis</i>-70 y (±)-<i>cis</i>-77	303
4.9.6. Síntesis de los derivados (±)-<i>trans</i>-68 y (±)-<i>trans</i>-75.	303
4.9.7. Síntesis de los derivados (±)-<i>trans</i>-69 y (±)-<i>trans</i>-76.	304
4.9.8. Síntesis de los derivados (±)-<i>trans</i>-70 y (±)-<i>trans</i>-77.	304
4.9.9. Síntesis del derivado 1-<i>tert</i>-Butoxicarbonil-3-{{6-[bis(<i>tert</i>-butoxicarbonil)amino]-4-metilpiridin-2-il}metil}4-hidroxipirrolidina (3<i>R</i>,4<i>S</i>)-70	304
4.9.10. Procedimiento general para las acilaciones enzimáticas	305
4.9.11. Procedimiento general para las hidrólisis enzimáticas	305
4.10. Datos experimentales	305
Referencias.....	327

Resumen

El uso de la biocatálisis en síntesis orgánica ha experimentado un creciente auge debido a la alta quimio-, regio- y enantioselectividad que muestran las enzimas, lo que permite obtener moléculas con gran complejidad sintética de forma muy simple. Además, este tipo de transformaciones se producen en condiciones suaves de reacción y no agresivas con el medio ambiente, considerándose procesos que están dentro de la Química Sostenible.

Esta memoria, está dividida en una introducción y cuatro capítulos en los que se abordará la síntesis y resolución mediante el uso de lipasas como catalizadores, de diferentes compuestos de alto valor añadido.

Introducción: este apartado es un breve resumen acerca de la biocatálisis: aspectos generales, evolución histórica y su uso actual en la industria. Además, cada capítulo consta de una breve introducción específica.

Capítulo 1: este capítulo hace hincapié en la dificultad de la resolución de centros estereogénicamente impedidos. Se lleva a cabo la síntesis de aminoalcoholes mediante reducción de cianhidrinas derivadas de cetonas y se estudia su resolución enzimática mediante el uso de lipasas tanto por el grupo amino como por el hidroxilo terciario.

Capítulo 2: en este apartado se lleva a cabo la síntesis y resolución de *trans*-3,4-bromohidrinas, así como de *trans*- y *cis*-3,4-aminoalcoholes derivados del tetrahydrofurano y de la pirrolidina. La resolución se realiza tanto mediante hidrólisis como mediante procesos de acilación utilizando diferentes lipasas como catalizadores. Además, se asigna la configuración absoluta de los compuestos ópticamente puros obtenidos, sintetizando a partir de ellos los previamente descritos en la bibliografía que permitieron su comparación.

Los principales resultados de este capítulo han sido publicados en:

A. Villar-Barro, R. Brieva, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2013**, 24, 694-698

A. Villar-Barro, R. Brieva, V. Gotor, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2014**, 22, 5563-5568.

Capítulo 3: Se lleva a cabo una síntesis regioselectiva de derivados 3-amino-4-hidroxipiperidínicos ortogonalmente protegidos, obteniéndose productos de interés por su posible aplicación en la síntesis de compuestos farmacológicamente activos con elevados rendimientos. Además se consigue la resolución de los mismos de manera satisfactoria y la posterior derivatización de los compuestos enantiopuros para la asignación de la configuración mediante la comparación con los previamente descritos en la bibliografía.

Los resultados obtenidos han sido enviados para su publicación.

Capítulo 4: Se estudia la resolución enzimática de hidroxialquilpirrolidinas precursoras de inhibidores de la óxido nítrico sintasa. Además se lleva a cabo la resolución de otros regioisómeros del sustrato de interés lo que permite un estudio más amplio de la capacidad de las lipasas para la resolución de este tipo de estructuras.

Los resultados obtenidos se enviarán próximamente para su publicación

Summary

The growing importance of biocatalysis in organic synthesis is due to the high quimio, -regio and enantioselectivity shown by enzymes that allows to get highly complex molecules in a very simple way. Moreover, this kind of transformations take place in mild reaction conditions and are non-aggressive to the environment. In general they are considered within the sustainable chemistry.

In this Doctoral Thesis we carry out the synthesis and enzymatic resolution of several building blocks of complex molecules that exhibit interesting biological activities by use of lipases as catalyst.

Introduction: this section is an overview about biocatalysis, the enzymes' history and their use in the industry. Moreover, every chapter has a short individual summary.

Chapter 1: This chapter shows the difficulty of the production of optically pure quaternary carbon centres. Here we describe the synthesis and the resolution of aminoalcohols obtained from ketone-derived cyanohydrins using enzymatic aminolysis or hydrolysis of their acylated derivatives.

Chapter 2: This chapter described the synthesis and enzymatic resolution of (\pm)-*trans*-3-bromo-4-hydroxytetrahydrofuran, *cis*- and *trans*-3-amino-4-hydroxytetrahydrofuran and their pyrrolidine analogues. We also established the absolute configuration of the optically pure heterocycles obtained by comparison their specific rotation signs with those reported in the literature.

The main results attained in this work have been published in:

A. Villar-Barro, R. Brieva, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2013**, 24, 694-698

A. Villar-Barro, R. Brieva, V. Gotor, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2014**, 22, 5563-5568.

Chapter 3: This chapter summarizes the synthesis of enantiopure *trans*-3-amino-4-hydroxypiperidines orthogonally protected. The key steps are a regioselective epoxide ring-opening with diallylamine and the enzymatic resolution of the resulting aminoalcohol. The absolute configuration of optically pure compounds is established.

This results attained in this work have been sent for their publication.

Chapter 4: In this chapter, we described the enzymatic processes for the preparation of the hydroxyalkylpyrrolidines that are precursors of inhibitors of the neuronal nitric oxide synthase. In addition, we also carry out the enzymatic resolution of other regioisomers in order to investigate the scope of the enzymatic resolution.

This results attained in this work will be sent for their publication.

Introducción

El objetivo general de esta tesis doctoral es la resolución de diferentes derivados quirales de alto valor añadido. Como catalizadores de estos procesos se utilizarán una serie de enzimas, siendo más concretamente, las lipasas las enzimas elegidas para las biotransformaciones.

0.1. Biocatálisis

La Biocatálisis se define como la mediación de reacciones químicas por sistemas biológicos, incluyendo enzimas aislados, células enteras o extractos de células libres.¹

0.1.1. Biocatálisis a lo largo de la historia

Las células vivas son sistemas extraordinariamente complejos donde ocurren un gran número de reacciones químicas. El catalizador que permite llevar a cabo este tipo de transformaciones se llama enzima, la cual, cataliza las reacciones químicas aumentando su velocidad, sin consumirse en el proceso ni modificarse su estructura.

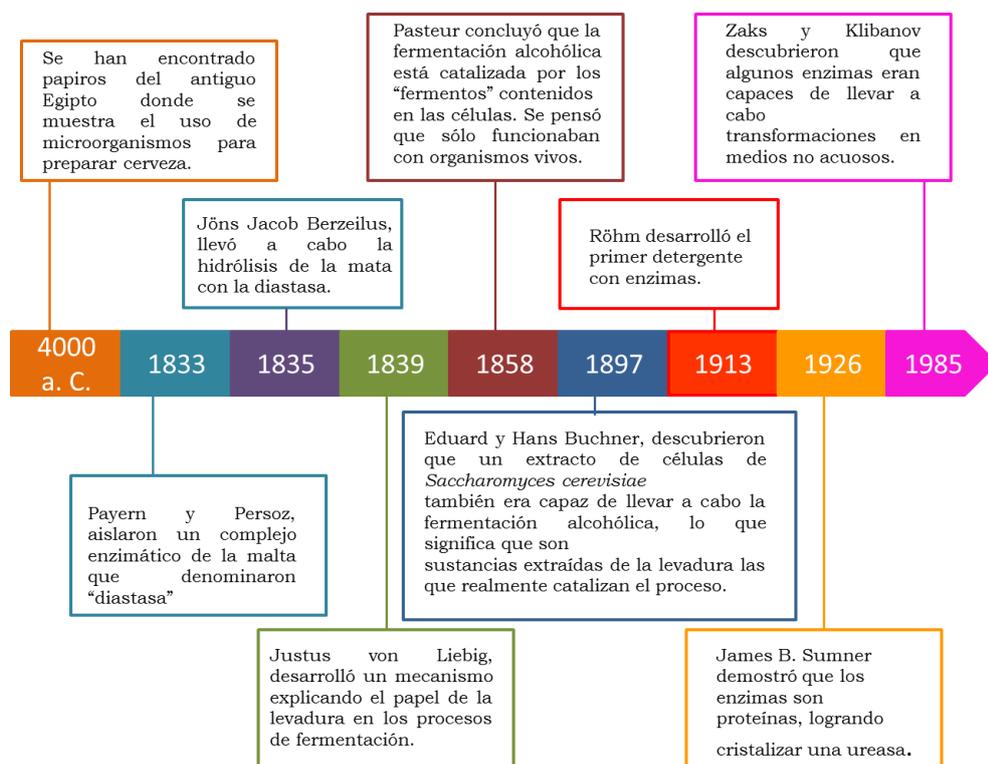
La historia de la biocatálisis se remonta a miles de años atrás, puesto que existe constancia de su uso ya en el antiguo Egipto.^{2,3} A continuación, se detallan los descubrimientos más relevantes a lo largo de la historia hasta nuestros días (Esquema 1).

¹ T. Hudlicky, J. W. Reed, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 3117-3132.

² S. E. Milner, A. R. Maguire, *Arkivoc* **2012**, (i), 321-382.

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

Introducción



Esquema 1. Descubrimiento de la biocatálisis a lo largo de la historia.

0.1.2. Biocatálisis en la Industria

La necesidad actual de las industrias de llevar a cabo los procesos de una manera poco contaminante así como económica minimizando la temperatura a la que se realizan y el número de pasos de reacción ha encontrado en la biocatálisis una herramienta indispensable, puesto que, las condiciones suaves de reacción, la baja toxicidad y la selectividad de los procesos son características propias de los procesos biocatalíticos.⁴

⁴ a) V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, "Combination of biocatalysis and Chemical Catalysis for the Preparation of Pharmaceuticals through Multi-Step Syntheses" en *Multi-Step Enzyme Catalysis: Biotransformations and Chemoenzymatic Synthesis*. Wiley-VHC **2008**, Weinheim (Germany). Capítulo 10. Pags 213-233; b) S. Panke, M. Wubbolts, *Current opinion in Chemical Biology* **2005**, 9, 188-194; c) T. Zelinsky, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 788-824.

En los últimos años se ha apreciado un aumento del uso de procesos biocatalíticos en la industria, en sectores muy diversos, tales como la industria farmacéutica, química, alimentaria, cosmética, textil, piensos y papelera.⁵

Sin embargo, el mayor número de estos procesos se encuentra en la industria farmacéutica. Esto es debido a la creciente demanda de compuestos enantiopuros, puesto que, los enantiómeros de un compuesto bioactivo pueden generar distinta respuesta en un organismo. El isómero que presenta una mayor actividad se conoce como eutómero mientras que aquel que presenta baja actividad o bien nula, se conoce como distómero. En la actualidad más del 50% de los medicamentos disponibles tienen en cuenta esta quiralidad.^{6,7} Algunos ejemplos clásicos que representan estos hechos son:

- La ketamina (Figura 1), siendo el enantiomero (S) un potente analgésico y anestésico, su isómero (R) causa alucinaciones.

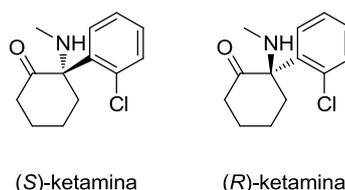


Figura 1. Enantiómeros de la ketamina.

- Ambos enantiómeros del ibuprofeno son activos (Figura 2), siendo, el isómero (S) 100 veces más potente que el (R), sin embargo, el enantiómero inactivo se transforma en el isómero (S) mediante una inversión unidireccional en el interior del organismo.

⁵ a) R. Wohlgemuth, I. Plazl, P. Znidarsic-Plazl, K. V. Gernaey, J. M. Woodley, *Trends in Biotechnol.* **2015**, 33, 302-314; b) J-M. Choi, S-S. Han, H-S. Kim, *Biotechnol. Adv.* **2015**, doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.014

⁶ K. K.-C. Liu, S. M. Sakya, C. J. O'Donnell, A. C. flick, J. Li, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 1136-1154.

⁷ B. Kasprzyk-Hordern, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 4466-4503.

Introducción

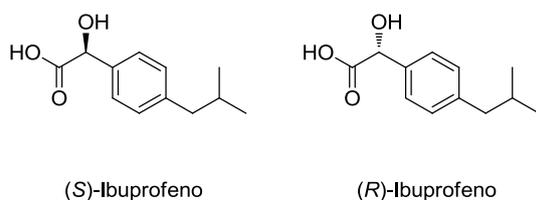


Figura 2. Enantiómeros del Ibuprofeno.

• La carvona, proporcionando la (*R*)-carvona olor a menta, mientras que la (*S*)-carvona presenta un olor a alcaravea (Figura 3).

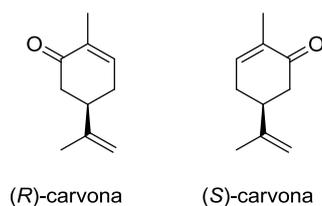


Figura 3. Enantiómeros de la carvona.

0.2. Química Sostenible

Uno de los aspectos de la biocatálisis que se ha mencionado anteriormente es su baja agresividad con el medio ambiente. El interés en el desarrollo de procesos de este tipo en industrias químicas o biotecnológicas ha ido creciendo considerablemente a lo largo de los últimos años,⁸ conociéndose como tecnologías sostenibles y siendo definidas como Green Chemistry y White biotechnology (química verde y biotecnología blanca).

El concepto de química verde fue formulado por primera vez en los 90.⁹ Por otro lado, la Asociación Europea de Bioindustrias (Europabio) definió la biotecnología blanca como un campo emergente dentro de la biotecnología moderna con utilidad industrial, de hecho, el concepto de biotecnología blanca es comúnmente aceptado en el mundo de la industria como la

⁸ R. Breitling, E. Takano, *Curr. Opin. Biotech.* **2015**, 35, 46-51.

⁹ a) P. T. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 301-312; b) T. J. Collins, in *Green Chemistry*, Macmillan Encyclopedia of Chemistry, Simon and Schuster Macmillan, New York, **1997**, vol. 2, págs. 691-697.

aplicación de herramientas biotecnológicas para producir compuestos de interés, teniendo en cuenta los principios de la química verde.

Como bien han publicado Anastas y Horvath,¹⁰ los pasos a seguir para esta nueva tecnología son los conocidos como los 12 principios de la química verde, los cuales han sido recogidos bajo el término PRODUCTIVELY (productivamente) que se pueden resumir en los siguientes:

- 1) Prevent wastes (minimizar la generación de residuos)
- 2) Renewable materials (utilizar materias primas renovables)
- 3) Omit derivatization steps (evitar pasos de protección y desprotección innecesarios)
- 4) Degradable chemical products (emplear productos químicos que sean inocuos para el medio ambiente)
- 5) Use safe chemicals (diseñar métodos sintéticos con baja o inexistente toxicidad)
- 6) Catalytic reagents (utilizar catalizadores lo más selectivos posible)
- 7) Temperature, pressure ambient (utilizar condiciones suaves de reacción)
- 8) In-process monitoring (desarrollar métodos analíticos para realizar un seguimiento en tiempo real de las reacciones)
- 9) Very few auxiliary substances (minimizar el uso de compuestos auxiliares)
- 10) E-factor, maximise feed in product (economía atómica: diseñar rutas sintéticas que minimicen los residuos. E= residuos/productos)

¹⁰ a) I. T. Horváth, P. T. Anastas, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2167-2168; b) I. T. Horváth, P. T. Anastas, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2169-2173.

Introducción

11) Low toxicity of chemical products (sintetizar productos químicos de baja toxicidad)

12) Yes, it is safe (emplear sustancias que minimicen el riesgo de accidentes)

Como se puede deducir de los principios 2, 7 y 9, la biocatálisis, desde que se ha considerado una alternativa a la química orgánica clásica, juega un papel importante en los procesos poco contaminantes.¹¹ Tanto las células enteras como las enzimas aisladas permiten llevar a cabo las reacciones en condiciones suaves sin la necesidad de utilizar metales pesados. Además, el uso de las enzimas adecuadas permite obtener los productos de manera quimioselectiva (preferencia por uno de los grupos funcionales de distinta naturaleza orgánica presentes en una molécula), regioselectiva (capacidad que tienen de reaccionar con un grupo funcional cuando existen varios de éstos en distintas zonas del compuesto) y enantioselectiva (capacidad para discriminar entre los dos enantiómeros de una mezcla racémica).¹²

En los últimos años se ha determinado la estructura de un gran número de enzimas, se ha investigado la promiscuidad enzimática y la aplicación de técnicas de ADN recombinante,¹³ lo cual ha contribuido a abaratar los costes de estos procesos biocatalíticos y mejorar los rendimientos obtenidos con ellos. Además, se ha llevado a cabo técnicas de inmovilización de enzimas¹⁴ con resultados satisfactorios, lo cual es esencial para su estabilidad en distintos medios de reacción y su reutilización.

¹¹ R. A. Sheldon, F. van Rantwijk, *Aust. J. Chem.* **2004**, *57*, 281-289.

¹² V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales. *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*. Wiley-VCH. Weinheim **2008**

¹³ a) U. T. Bornscheuer *Synlett* **2013**, *24*, 150-156; b) M. B. Quin, C. Schmidt-Dannert. *ACS Catal.* **2011**, *1*, 1017-1021.

¹⁴ L. Cao, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 217-226.

0.2.1. Enzimas en disolvente orgánico

A pesar de que los procesos enzimáticos transcurren a temperaturas suaves y que el medio acuoso es el más utilizado, los procesos biocatalíticos no se limitan a estas condiciones y algunas enzimas poseen una alta termoestabilidad que permite trabajar a temperaturas más altas, llegando incluso a los 125 °C sin perder su efectividad. Además, algunas de ellas tienen la capacidad de trabajar de manera satisfactoria en disolventes orgánicos, siendo ésta una opción que resuelve en ocasiones el problema de la baja solubilidad de muchos compuestos orgánicos en agua.²

Hasta mediados de los años 80,¹⁵ las reacciones catalizadas por enzimas en disolventes orgánicos no se consideraban factibles, puesto que, se creía que las enzimas fuera de su medio natural perdían su actividad. El hecho de poder trabajar en disolventes orgánicos presenta grandes ventajas, dado que, permite entre otras, una mejor solubilidad de los compuestos orgánicos, una sencilla recuperación de los productos finales de reacción, así como favorecer los procesos de deshidratación o esterificación evitando procesos indeseados de hidrólisis. Se ha demostrado que la desnaturalización de las proteínas en medios orgánicos anhidros apenas ocurre. De hecho, la estabilidad de la proteína es menor en disolventes miscibles con el agua ($-2.5 < \log P < 0$), como la acetona, que en disolventes hidrofóbicos ($2 < \log P < 4$), como los alcanos. Las proteínas necesitan una microcapa de agua para mantener su actividad catalítica. En disolventes miscibles con el agua esa capa esencial se disuelve, mientras que en disolventes hidrofóbicos permanece inalterada.¹⁶

¹⁵ a) G. Kirchner, M. P. Scollar, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7072-7076; b) A. Zaks, A. M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 3192-3196.

¹⁶ a) G. Carrea, S. Riva. *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Medium*. Wiley-VCH. Weinheim **2008**; b) S. Hazarika, P. Goswami, N. N. Dutta, A. K. Hazarika. *Chem. Eng. J.* **2002**, *85*, 61-68; c) A. M. Azevedo, D. M. F. Prazeres, J. M. S. Cabral, L. P. Fonseca, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *15*, 147-153; d) H. Sztajer,

Introducción

0.2.2. Inmovilización de enzimas

A pesar de la gran versatilidad que proporciona el uso de enzimas en diferentes tipos de procesos, el uso de éstas aisladas o bien como células enteras conlleva una serie de desventajas, puesto que, pueden ser inestables en el medio de reacción tanto por la temperatura, el pH, la concentración de los sustratos, además de la imposibilidad de su recuperación para ser reutilizada, lo cual, incrementa el coste del proceso.

Un buen método para solventar estos problemas es la inmovilización de las enzimas.¹⁴ Desde la segunda mitad del siglo 20 se han llevado a cabo numerosos intentos para su inmovilización de manera que puedan ser usadas en diferentes procesos.

Existen diferentes métodos de inmovilización,¹⁷ como son, adsorción, interacción electrostática, modificación de la superficie, enlace covalente, entrecruzamiento (cross-linking),² etc. Todos ellos, conllevan a una serie de beneficios, puesto que permiten la reutilización del biocatalizador, disminuyendo el coste del proceso, al estar inmovilizadas, aumenta su estabilidad, por lo que admiten una mayor variación del pH y la temperatura y por tanto pueden ser utilizadas en un mayor número de procesos sobre todo, de tipo industrial.

Sin embargo, la inmovilización de las enzimas también puede generar desventajas, puesto que, en algunos casos, éstas pierden parte de su actividad debido a modificaciones químicas en la superficie de la proteína o a problemas de difusión y acceso al sustrato del centro activo de la misma. Esto conlleva a la necesidad de generar un buen método de inmovilización¹⁸ que permita la utilización de la enzima con todas sus cualidades además de tener unos costes razonables que permitan su uso de manera industrial.

H. Lunsdorf, H. Erdmann, U. Menge, R. Schmid. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1124*, 253-261; e) A. Zaks, A. M. Klibanov. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 3194-3201.

¹⁷ D. N. Tran, K. J. Balkus Jr. *ACS Catal.* **2011**, *1*, 956-968.

¹⁸ R. A. Sheldon, *Org. Process. Res. Dev.* **2011**, *15*, 213-223.

0.3. Lipasas

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas aumentando la velocidad de las reacciones y sin consumirse en el proceso ni modificar el sentido de los equilibrios químicos. Su utilización tiene la ventaja de catalizar solamente la reacción deseada, evitando la aparición de productos secundarios.

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

Este trabajo se basará casi exclusivamente en el uso de un tipo de hidrolasas, y más concretamente en las denominadas lipasas.

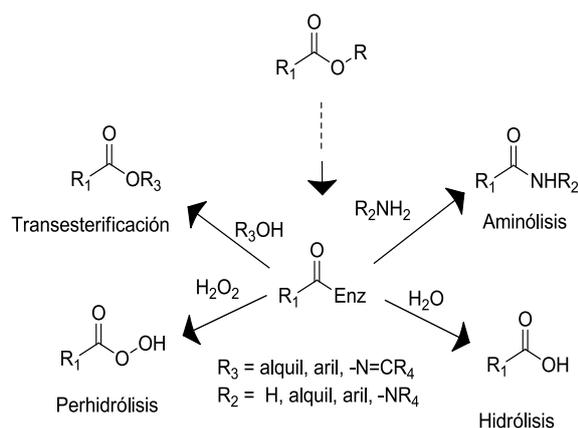
Las lipasas (EC 3.1.1.3), son triglicérol hidrolasas cuya principal función biológica es catalizar la hidrólisis de triglicéridos para dar ácidos grasos libres, mono, diglicéridos y glicerol. Actualmente se han caracterizado un gran número de ellas y se ha visto que presentan amplia variedad tanto en eficacia como en especificidad,¹⁹ puesto que, a diferencia de otras enzimas, las lipasas aceptan una gran variedad de sustratos actuando incluso en medio orgánico, lo cual le da mejor versatilidad pudiendo ser aplicados tanto en reacciones de hidrólisis como en la síntesis de ésteres.

Esta gran versatilidad se debe principalmente a que cuando son utilizados en medios orgánicos cualquier nucleófilo (alcoholes, peróxidos, aminas, amoníaco, etc.) pueden remplazar al agua en el intermedio acil-enzima (Esquema 2).²⁰

¹⁹ R. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1608-1633.

²⁰ a) V. Gotor, *Org. Process Res. Dev.* **2002**, 6, 420-426; b) V. Gotor, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 2189-2197.

Introducción



Esquema 2. Reacciones catalizadas por hidrolasas.

En la última década se ha publicado que aproximadamente dos tercios de las biotransformaciones se llevan a cabo utilizando enzimas hidrolíticas.²¹ De este modo, este tipo de catalizadores han mostrado una excelente utilidad en la preparación de detergentes, alimentos y estructuras quirales precursores de compuestos con actividad biológica o fármacos.²²

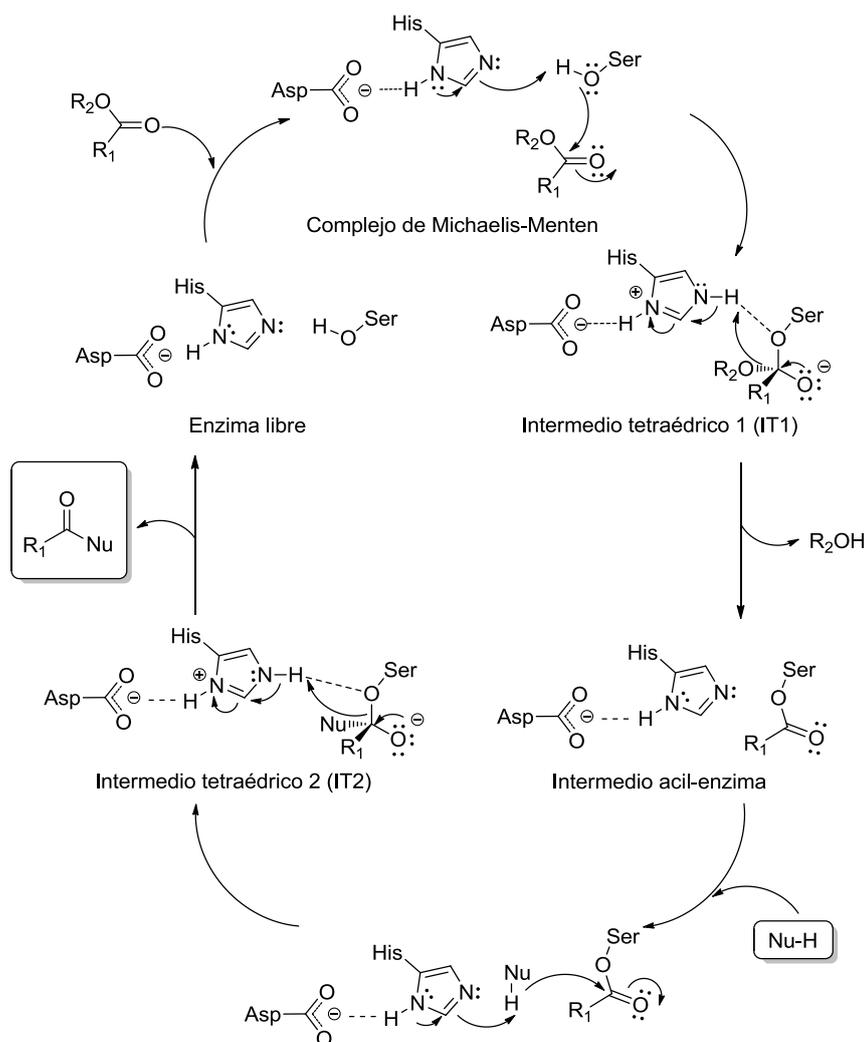
0.3.1. Mecanismo de actuación

Las lipasas siguen el mecanismo de las serín hidrolasas,²³ el cual cumple la cinética de Michaelis-Menten y transcurre fundamentalmente en tres etapas:

²¹ U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis*, 2° Ed. Wiley-VCH. **2006**.

²² a) V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *40*, 111-120; b) R. D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608-1633; c) A. Ghanem, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1721-1754.

²³ a) J. B. Jones, J. F. Beck, in *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry*, Eds. J. B. Jones, C. J. Sih, D. Perlman, parte I, Wiley **1976**, 107; b) R. J. Kazlauskas, H. K. Weber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 121-126.



Esquema 3. Mecanismo de actuación de las serín hidrolasas.

En el primer paso, el sustrato $R_1\text{-COOR}_2$ se une al centro activo de la enzima formando un enlace no-covalente en el Complejo de Michaelis, permitiendo el ataque nucleófilo del grupo hidroxilo de la serina, el cual ha sido desprotonado previamente por el resto de histidina, formando el intermedio tetrahédrico 1 (IT1). Seguidamente tiene lugar el intermedio acil-enzima eliminándose el grupo $R_2\text{OH}$. El grupo carbonilo del intermedio acil-enzima es atacado por un nucleófilo (NuH), dando lugar al intermedio

Introducción

tetraédrico 2 (IT2), el cual, finalmente, evoluciona para recuperar el catalizador y liberar el producto final de la reacción R_1CONu .

0.3.2. Estructura de las lipasas

En esta memoria se han utilizado una gran variedad de lipasas que actúan según este mecanismo, obteniéndose los mejores resultados con las lipasas de *Candida antarctica* de tipo A y B (CAL-A y CAL-B).

La lipasa de *Candida antarctica* tipo A (CAL-A) (Figura 4), proviene de la levadura *Candida antarctica* originariamente aislada en la Antártida. A lo largo de los años ha mostrado muy buena eficacia en disolventes orgánicos, a elevadas temperaturas y en un amplio intervalo de pH. Entre las resoluciones que se han descrito en la bibliografía con esta enzima destacan las de alcoholes terciarios²⁴ y N-acilación de β -aminoésteres.²⁵

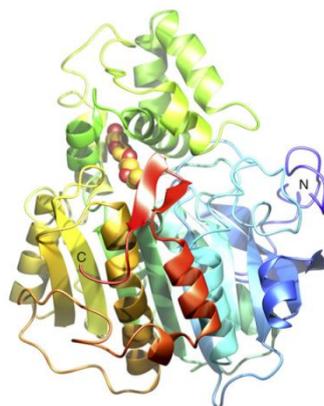


Figura 4. Estructura tridimensional de la lipasa CAL-A.

La lipasa de *Candida antarctica* tipo B (CAL-B) es una proteína globular cuya cadena polipeptídica está compuesta por 317 aminoácidos (Figura 5).²⁶ Su estructura presenta en su centro

²⁴ M. Wiggers, J. Holt, R. Kourist, S. Bartsch, I. W. C. E. Arends, A. J. Minnaard, W. T. Bornscheuer, U. Hanefeld. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *60*, 82-86.

²⁵ a) S. Gedey, A. Liljeblad, L. Lázár, F. Fülöp, L. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 105-110; b) T. Liljeblad, L. Kanerva, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5831-5854.

²⁶ S. Lutz, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2743-2748.

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

El tamaño restringido de dicho centro activo sumado a las fuertes interacciones existentes entre los aminoácidos de la cadena proteica y los sustratos explican la excelente enantioselectividad que muestra frente a alcoholes secundarios²⁷ y otros nucleófilos como las aminas primarias.²⁸ Entre sus aplicaciones más importantes se encuentra la preparación de aminas y amidas, tanto quirales como aquirales a través de procesos de aminólisis y amonólisis enzimática.²⁹

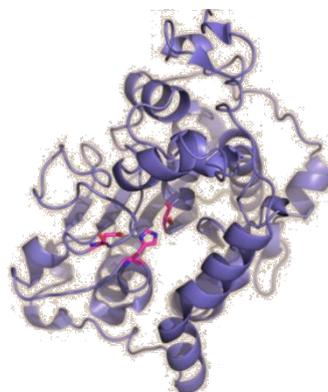


Figura 5. Estructura tridimensional de la lipasa CAL-B.

0.3.3. Enantioselectividad y reconocimiento quiral

Para describir la enantioselectividad obtenida en las transesterificaciones de alcoholes secundarios (que por extensión se puede aplicar a reacciones con otros nucleófilos) sin predecir el

²⁷ V. Gotor, *Biocatal. Biotransform.* **2000**, *18*, 87-103.

²⁸ I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 201-209.

²⁹ V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 1125-1143.

Introducción

grado de las mismas, Kazlauskas y colaboradores³⁰ diseñaron una regla empírica.

Esta regla se basa en la diferencia de tamaño de los sustituyentes unidos al centro estereogénico. Cuando el enantiómero favorecido del alcohol (enantiómero que reacciona más rápido) se une a la lipasa, el sustituyente más grande (L) se acomoda en el hueco de mayor tamaño, mientras que el grupo pequeño (M) se aloja en el hueco más pequeño. Para el enantiómero desfavorecido la situación es justo la contraria, en este caso, el grupo voluminoso debería ser alojado en el hueco más pequeño (Figura 6).

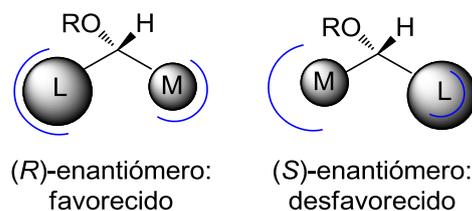


Figura 6. Enantiómero favorecido según la regla de Kazlauskas.

Por lo tanto, según este modelo el valor de la enantioselectividad que puede mostrar una lipasa en la resolución de un alcohol está determinado por la diferencia de tamaño entre los grupos grande (L) y mediano (M). Siempre teniendo en cuenta que los tamaños de los grupos sustituyentes están limitados por el espacio disponible en los respectivos huecos del centro activo de cada lipasa. Cuando los sustituyentes del centro estereogénico son mayores que estos huecos, la enantioselectividad decae de forma drástica.

Cuando el orden de preferencia de los sustituyentes concuerda con su tamaño (cuando el sustituyente mayor tiene mayor prioridad que el pequeño según las reglas de Cahn-Ingold-Prelog),³¹ la regla

³⁰ R. J. Kazlauskas, A. N. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2656-2665.

³¹ R. S. Cahn, S. C. Ingold, V. Prelog, *Angew. Chem.* **1966**, 5, 385-415.

de Kazlauskas predice una enantiopreferencia por el alcohol de configuración (*R*).

0.4. Medida de la razón enantiomérica

En una resolución cinética el valor del exceso enantiomérico del sustrato (ee_s) y del producto (ee_p) varía con el avance de la reacción. Por esta razón comparar estos valores en diferentes procesos no tiene demasiado sentido a menos que se comparen a conversiones iguales. La propiedad que regula la variación en los excesos enantioméricos es la constante de especificidad (k_{rel}) que representa la velocidad aparente de segundo orden de la reacción enzimática global a concentraciones bajas de sustrato. Esta k_{rel} se denomina enantioselectividad o razón enantiomérica E en una resolución enzimática (Ecuación 1),³² y permite medir la capacidad de una enzima para distinguir entre dos enantiómeros de una mezcla racémica. La enantioselectividad de una enzima puede variar dependiendo de las condiciones de reacción pero es independiente del momento en el que se analice la misma.

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

Ecuación 1. Ecuación de enantioselectividad.

Aunque no existe una norma general para determinar el valor de E a partir de cual se puede considerar que la resolución se ha realizado con éxito, se considera que valores de E por debajo de 15 no tienen utilidad para fines prácticos, y sólo si la E es superior a 100 se puede conseguir producto y el sustrato enantiopuros a conversiones cercanas al 50%.

³² C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294-7299.

Introducción

Generalmente el valor de E se calcula a partir de las variables experimentales c , ee_s y ee_p , aunque existen varios métodos para la determinación de esta magnitud.³³

Estas tres magnitudes están relacionadas (Ecuación 2), lo que permite conocer una de las variables a partir de las otras dos.

$$c = \frac{ee_s}{(ee_s + ee_p)}$$

Ecuación 2. Ecuación para el cálculo de la conversión.

Para reacciones irreversibles que siguen una cinética de Michaelis-Menten y en las que no existe inhibición por producto, la E puede ser determinada con las siguientes ecuaciones (Ecuación 3).

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

Ecuación 3. Ecuaciones para la determinación de la Enantioselectividad.

En general, en esta memoria, la conversión se ha determinado a partir de los valores de ee_s y ee_p que fueron medidos con gran exactitud mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), utilizando para ello columnas de relleno quiral.

0.5. Objetivos generales

Hasta este punto se ha realizado una breve introducción destacando la importancia de las biotransformaciones para la preparación de compuestos orgánicos de forma selectiva, sencilla, eficaz, no contaminante y especialmente orientada a la preparación de productos ópticamente puros.

³³ A. J. J. Straathof, J. A. Jongejan, *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *21*, 559-571.

Introducción

Esta memoria consta de cuatro capítulos en los que se utilizarán las lipasas como catalizadores en procesos de resolución cinética.

Capítulo 1:
Estudio de la resolución enzimática de 6-
bromo-2,2-dimetil-4-aminometil-4-
hidroxicromanona y aminoalcoholes de
estructura análoga

Introducción

1.1. Preparación de compuestos con centros estereogénicos cuaternarios

La preparación de compuestos ópticamente puros en los que el centro estereogénico está en un carbono cuaternario es uno de los retos de la síntesis orgánica actual. El interés que despiertan este tipo de compuestos, se debe tanto a la dificultad que a menudo presenta la construcción de un centro estereogénico con elevada congestión estérica, como a las propiedades terapéuticas que poseen algunos compuestos con esta estructura, dado que, una gran variedad de ellos forman parte de productos naturales y farmacológicos. Entre los compuestos de mayor interés destacan los aminoácidos α,α -disustituidos,³⁴ que no se pueden obtener a partir de fuentes naturales y los alcaloides con grupos amino α -cuaternarios derivados de los mismos.³⁵

Otro ejemplo de estos compuestos son los derivados del 4-benzopirano³⁶ (Figura 7) puesto que son compuestos con propiedades β -bloqueantes.

³⁴ a) C. Cativiela, M. Ordoñez, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1-63; b) M. I. Calaza, C. Cativiela, *Eur. J. Chem.* **2008**, *20*, 3427-3448; c) C. Cativiela, M. D. Díaz de Villegas, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 569- 623; d) H. Vogt, S. Bräse, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 406-430; e) Y. Ohfuné, T. Shinada, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 5127-5143.

³⁵ a) P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products-A Biosynthetic Approach*; Wiley: Chinchester **1997**; b) G. A. Cordell, *Introduction to Alkaloids-A Biogenetic approach*; Wiley: New York **1981**.

³⁶ a) X. Florence, S. Sebille, P. Tullio, P. Lebrun, B. Pirotte, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7723-7731; b) V. Calderone, L. Testai, A. Martelli, S. Rapposelli, M. Digiacomio, A. Balsamo, M. C. Breschi, *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *79*, 39-47; c) R. C. Gadwood, L. M. Thomasco, V. E. Gropii, B.-A. Burnett, S. J. Humphrey, M. P. Smith, W. Watt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2101-2104.

Capítulo 1

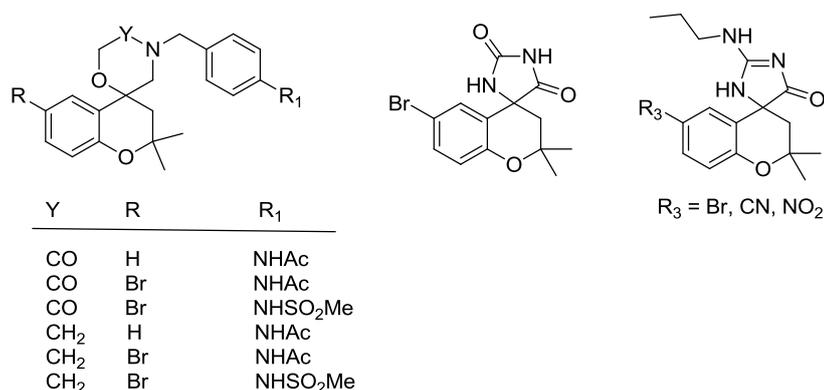


Figura 7. Dihidrobenzopiranos de interés.

Los canales de potasio son membranas proteicas que permiten el paso de iones potasio a través de la membrana celular. Un tipo de éstos, es el sensible al ATP (K_{ATP}), el cual regula los cambios de ATP intracelular. Una buena regulación de estos canales disminuye la tendencia a enfermedades tales como la hipertensión, angina de pecho, asma e incontinencia urinaria.

Los compuestos que llevan a cabo la apertura de los canales de K_{ATP} (KCOs), forman parte de un grupo heterogéneo de compuestos de diferentes clases químicas como son cianoguanidinas, tioformamidas y derivados del benzopirano. Los primeros compuestos que mostraron actividad cardioprotectora fueron el cromacalim y el pinacidil (Figura 8),³⁷ sin embargo, su uso fue limitado debido a los efectos secundarios que mostraban.

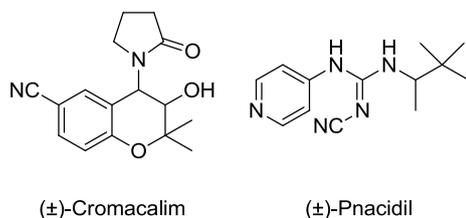


Figura 8. Estructuras del cromacalim y pinacidil.

³⁷ X. Florence, S. Sebille, P. de Tullio, P. Lebrun, B. Pirotte, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7723-7731.

Debido a esto, en los últimos años se ha desarrollado una serie de derivados del benzopirano con el objetivo de mostrar alta selectividad a los canales de β -bloqueantes del páncreas o bien cardiacos. Hasta el momento, las modificaciones realizadas en los benzopiranos han sido en la posición C-4, mostrando mejores resultados aquellos que tienen una estructura espiro.³⁸

³⁸ a) S. Rapposelli, V. Calderone, R. Cirilli, M. Digiaco, C. Faggi, F. La Torre, M. Manganaro, A. Martelli, L. Testai, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1477-1480; b) M. C. breschi, V. Calderone, A. Martelli, F. Minutolo, S. Rapposelli, L. Testai, F. Tonelli, A. Balsamo, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7600-7602.

Antecedentes

1.2. Procesos biocatalíticos

Las lipasas se usan de forma habitual para la resolución de alcoholes secundarios e incluso aminas o alcoholes primarios, sin embargo, las resoluciones desarrolladas hasta el momento no han permitido sintetizar un gran número de alcoholes terciarios enantiopuros con altos rendimientos y pureza.

Las enzimas que han mostrado una mayor efectividad en la resolución cinética de alcoholes terciarios han sido las hidrolasas,³⁹ tanto las lipasas como las esterasas, dado a su disponibilidad comercial y a no necesitar un cofactor para llevar a cabo satisfactoriamente su catálisis (factor de gran importancia a la hora de realizar estudios sobre las mismas). Debido a esto, se han realizado una serie de mutaciones sobre algunas de ellas para aumentar la capacidad de aceptación de sustratos con centros estereogénicos impedidos.

Por tanto, en este capítulo se hará un breve resumen de aquellas que mejores resultados han mostrado en la resolución de estos centros cuaternarios.

1.2.1. Epóxido hidrolasas, deshalogenasas e hidroxinitriliasas

1.2.1.1. Epóxido hidrolasas

La resolución cinética de oxiranos racémicos tiene lugar bajo la catálisis de epóxido hidrolasas procedentes de la *Rhodococcus ruber*⁴⁰ y *Bacillus subtilis* (Esquema 4).⁴¹ En ambos casos la

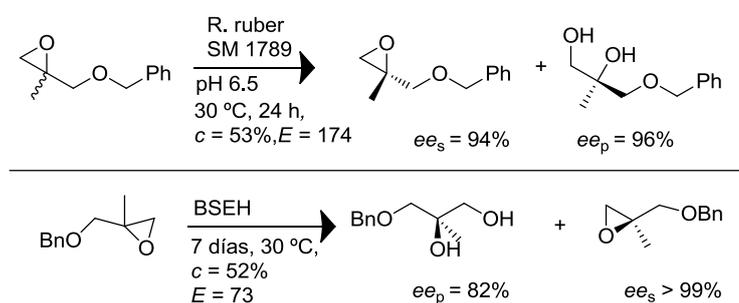
³⁹ R. Kourist, P. Domínguez de María, U. T. Bornscheuer, *ChemBioChem*. **2008**, 9, 491-498.

⁴⁰ H. Hellstrom, A. Steinreiber, S. F. Mayer, K. Faber, *Biotechnol. Lett.* **2001**, 23, 169-173.

⁴¹ A. Fujino, M. Asano, H. Yamaguchi, N. Shirasaka, A. Sakoda, M. Ikunaka, R. Obata, S. Nishiyama, T. Sugai, *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 979-983.

Capítulo 1

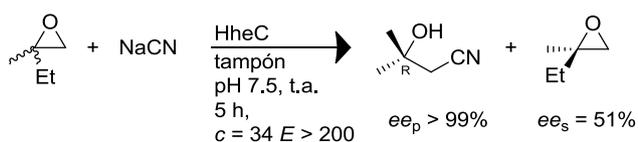
apertura de epóxidos racémicos en medio acuoso en la resolución cinética da el correspondiente alcohol con alta enantioselectividad y buenos rendimientos.



Esquema 4. Resolución enzimática con epóxido hidrolasas.

1.2.1.2. Deshalogenasas

Por otro lado, Janssen y colaboradores⁴² han descrito el uso de halohidrasas deshalogenasas como la *Agrobacterium radiobacter* AD1 (HheC) dando lugar a la apertura del epóxido con alta enantioselectividad utilizando NaCN (Esquema 5).



Esquema 5. Apertura selectiva de epóxidos.

1.2.2. Lipasas y esterasas

Varias lipasas y esterasas aceptan alcoholes terciarios como sustratos. Un ejemplo de ello es la lipasa de *Candida antarctica* de tipo A (CAL-A).

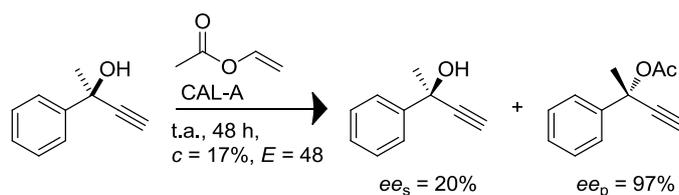
La resolución llevada a cabo por Bornscheuer y colaboradores,⁴³ en la cual catalizan la acilación enzimática del 2-hidroxi-2-fenilbut-3-ino, con la lipasa CAL-A, muestra una buena

⁴² M. Majeric-Elenkov, W. Hoeffken, L. Tang, B. Hauer, D. B. Janssen, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, 2279-2285.

⁴³ S. H. Krishna, M. Persson, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, 13, 2693-2696.

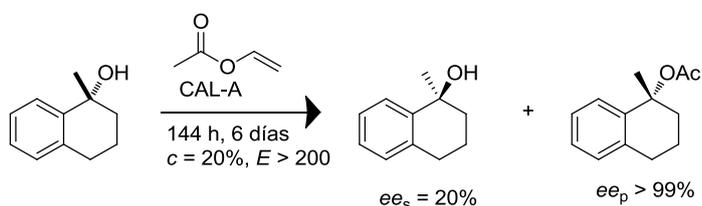
Antecedentes

enantioselectividad (Esquema 6), aunque con una conversión moderada.



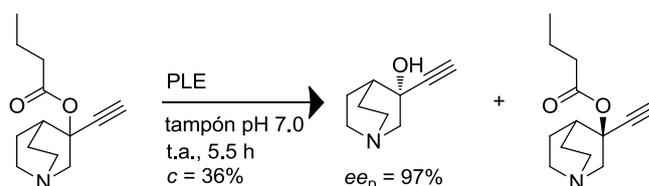
Esquema 6. Reacción catalizada por la lipasa CAL-A.

Otra resolución llevada a cabo con la misma lipasa es la acilación enzimática del 1-hidroxi-1-metil-1,2,3,4-tetrahidro-naftaleno, para la cual utilizando acetato de vinilo como medio de reacción se obtuvo una excelente enantioselectividad, sin embargo, la conversión fue moderada y tras 6 días solo se alcanzó un 20% de conversión.



Esquema 7. Acilación enzimática catalizada por la lipasa CAL-A.

Otra lipasa de interés para la resolución de este tipo de sustratos es la esterasa de hígado de cerdo (pig liver esterase) (PLE) (Esquema 8),⁴⁴ la cual cataliza la reacción de hidrólisis enzimática en medio acuoso con moderados rendimientos.

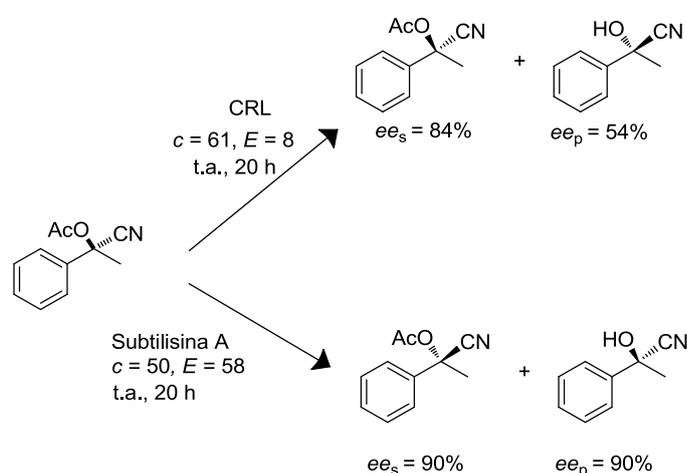


Esquema 8. Resolución con la esterasa PLE.

⁴⁴ J. F. Coope, B. G. Main, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6, 1393-1398.

Capítulo 1

Las cianhidrinas derivadas de cetonas son aceptadas por la proteasa *Subtilisina A* o la lipasa *Candida rugosa* CRL. Los acetatos de estas cianhidrinas son hidrolizados con elevada enantioselectividad, mostrando estas enzimas una opuesta preferencia estereoquímica dando lugar a los productos deseados con buenos rendimientos y moderada o alta enantioselectividad.⁴⁵

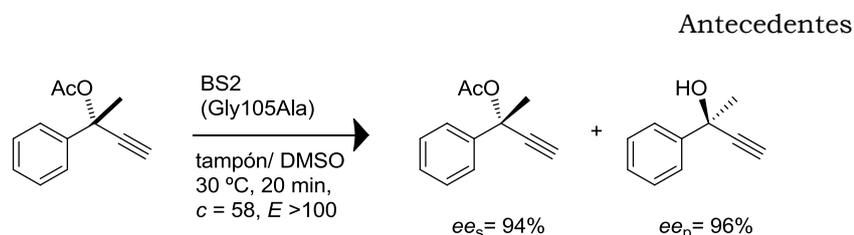


Esquema 9. Resolución de cianhidrinas racémicas con lipasas.

Finalmente, la lipasa más estudiada para este tipo de procesos en sustratos con centros estereogénicamente impedidos es la *Bacillus subtilis* (BS2).⁴⁶ Esta esterasa ha sido sometida a una gran cantidad de estudios debido a su efectividad catalítica, se ha llevado a cabo su clonación y posterior sobreexpresión en *E. Coli*, siendo varias de sus mutantes mejores catalizadores para la resolución de alcoholes terciarios que la propia BS2. Un ejemplo de ello es la resolución del acetato 1,1,1-trifluoro-2-fenilbut-3-in-2-ilo, puesto que una de las mutantes de la BS2 catalizó su hidrólisis con una excelente enantioselectividad, siendo este resultado mejor que el obtenido al utilizar la enzima sin modificar.

⁴⁵ J. Holt, I. W. C. E. Arends, A. J. Minnaard, U. Hanefeld, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1341-1344.

⁴⁶ a) B. Heinze, R. Kourist, L. Fransson, K. Hult, U. T. Bornscheuer, *Protein Eng. Des. Sel.* **2007**, *20*, 125-131; b) R. Kourist, S. Bartsch, U. T. Bornscheuer, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1393-1398.

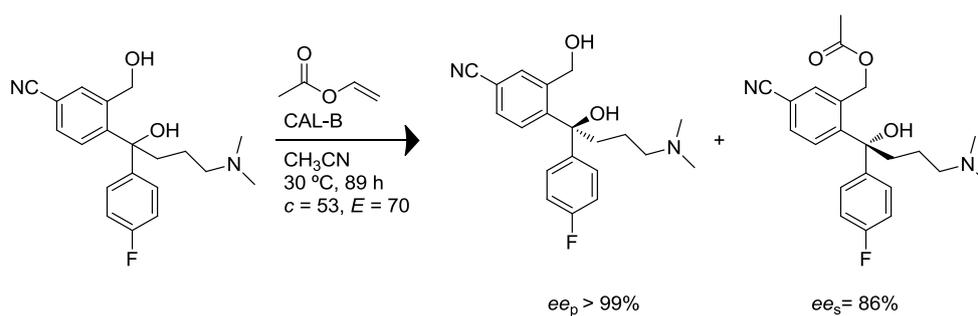


Esquema 10. Hidrólisis enzimática llevada a cabo por la BS2 mutante.

1.2.3. Resoluciones enzimáticas a través de grupos funcionales alejados del centro estereogénico

Debido a la dificultad que posee la resolución de centros cuaternarios, una posible solución a este problema es alejar el centro estereogénico impedido del punto de reacción sobre el que actúa la enzima. Son varios los ejemplos encontrados en la bibliografía que utilizan esta estrategia.

En este grupo de investigación se llevó a cabo la resolución de un intermedio para la preparación del (*S*)-citalopram⁴⁷ de manera enantiopura, mediante la acilación enzimática catalizada con la lipasa CAL-B. Se obtuvo el producto deseado con una alta enantioselectividad (Esquema 11).

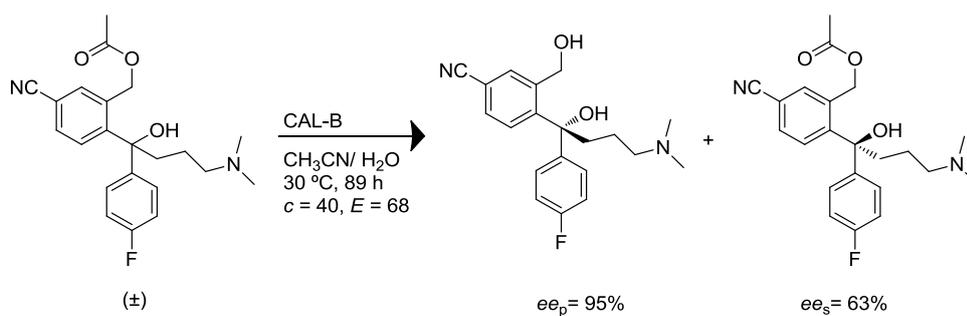


Esquema 11. Resolución enzimática del precursor del (*S*)-citaloprán.

Utilizando como catalizador la lipasa CAL-B, se puede obtener casi la misma enantioselectividad mediante el proceso de hidrólisis (Esquema 12).

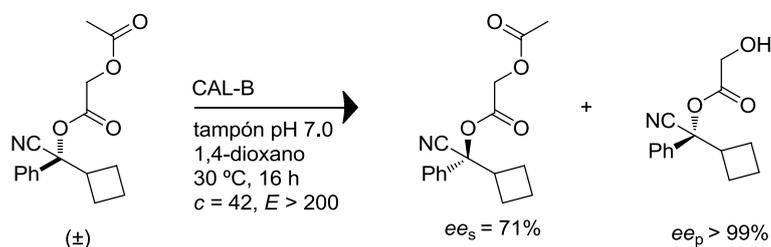
⁴⁷ L. F. Solares, R. Brieva, M. Quirós, I. Llorente, M. Bayod, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 341-345.

Capítulo 1



Esquema 12. Resolución de hidrólisis del precursor del (S)-citaloprán.

Posteriormente, se realizó la resolución enzimática del derivado del 2-ciclobutil-2-hidroxi-2-fenilacetónitrilo (Esquema 13),⁴⁸ intermedio en la síntesis de (S)-oxibutimina, obteniéndose con la lipasa CAL-B una elevada enantioselectividad.

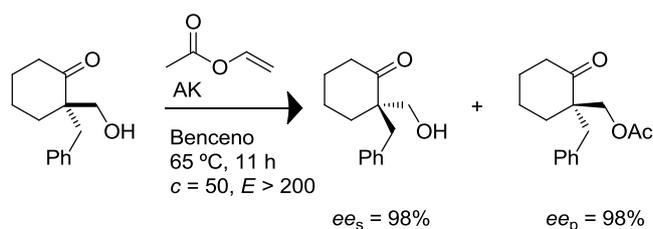


Esquema 13. Hidrólisis enzimática del derivado acetoxiacetilado.

Más recientemente, Guerrab *et al.*⁴⁹ desarrollaron la resolución de α -hidroximetilcicloalcanonas, utilizando para ello la lipasa AK como catalizador lo que permitió obtener una excelente enantioselectividad (Esquema 14).

⁴⁸ V. Recuero, M. Ferrero, V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 994-1002.

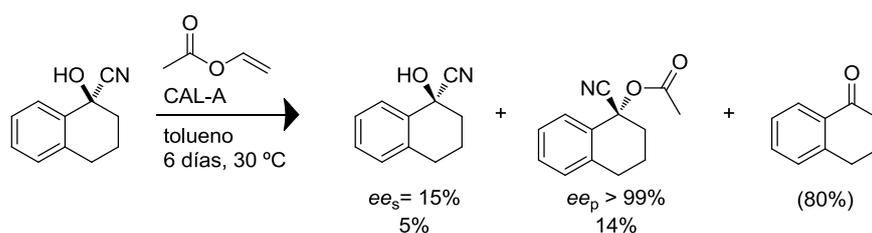
⁴⁹ Z. Guerrab, S. Schweiger, B. Daou, M. Ahmar, B. Cazes, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 1752-1757.



Esquema 14. Resolución de centros estereogénicos cuaternarios.

Como se ha comentado previamente en la introducción de este capítulo tanto la síntesis como la posterior resolución de los centros cuaternarios ha demostrado ser una ardua tarea. Puesto que en este capítulo se desarrollará la síntesis y resolución de precursores de compuestos β -bloqueantes, a continuación se exponen unos ejemplos desarrollados en este grupo de investigación referentes a la resolución de las cianhidrinas con estructuras semejantes o bien precursoras de los compuestos cuya resolución se va a estudiar posteriormente.

La resolución de la cianhidrina derivada de la tetralona se consiguió mediante una acilación catalizada por la lipasa CAL-A (Esquema 15).⁵⁰



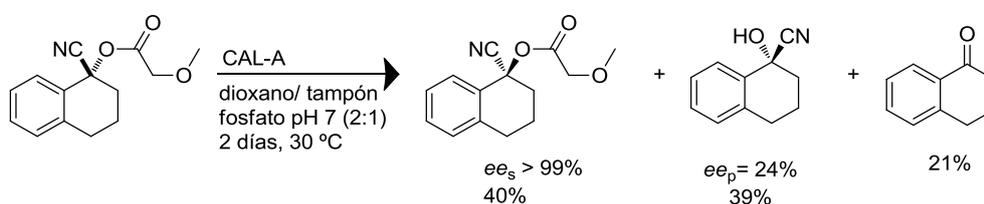
Esquema 15. Reacción de acilación enzimática catalizada por la lipasa CAL-A.

El producto acilado se obtiene con una elevada pureza óptica aunque con bajo rendimiento debido a la reacción espontánea de la cianhidrina en el medio de reacción que lleva a la recuperación de un 80% de la tetralona inicial.

⁵⁰ J. A. Rodríguez-Rodríguez, V. Gotor, R. Brieva, *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 1218-1224.

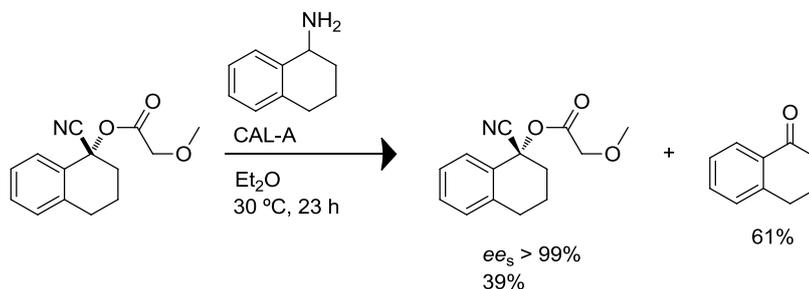
Capítulo 1

Mediante la reacción de hidrólisis enzimática de su derivado esterificado, y, tras analizar diferentes condiciones de reacción, se consiguió obtener el sustrato enantiopuro con un 40% de rendimiento al utilizar la lipasa CAL-A como catalizador (Esquema 16).



Esquema 16. Reacción de hidrólisis catalizada por lipasas.

El mejor resultado se consiguió mediante una reacción de aminólisis del derivado metoximetil acetilado de la tetralona con una amina de estructura semejante a la del éster. En estas condiciones se consiguió una elevada enantioselectividad en el proceso consiguiéndose el sustrato enantiopuro con buen rendimiento. La cianhidrina que se forma como producto se descompone completamente en estas condiciones de reacción, simplificando el número de productos de reacción.



Esquema 17. Reacción de aminólisis catalizada por lipasas.

Cuando se trata de extender el método a la resolución de estructuras análogas como la 4-cromanona o la 1-indanona solo se obtuvieron conversiones y enantioselectividades moderadas.

Objetivos

Objetivos

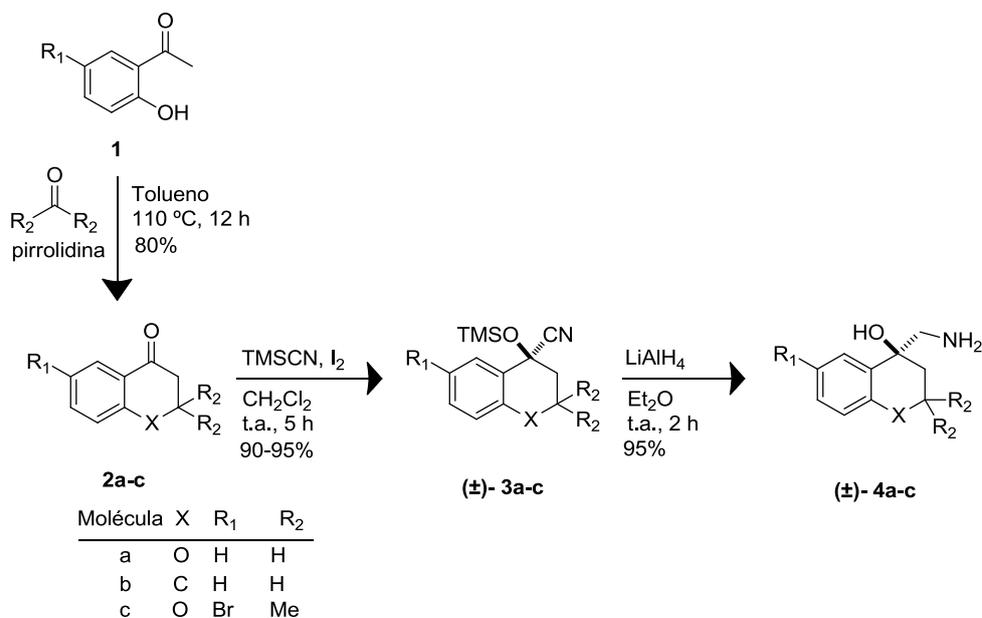
Teniendo en cuenta el valor sintético de los procesos de preparación de compuestos enantiopuros con centros estereogénicos impedidos y en concreto la importancia de los derivados dihidrobenzopiránicos mostrados en la introducción, como objetivos a este capítulo se ha planteado:

- Síntesis de aminoalcoholes derivados de 4-cromanona y tetralona mediante la formación de la cianhidrina y su posterior reducción.
- Estudio de su resolución mediante procesos de aminólisis enzimática con lipasas comerciales.
- Preparación de los derivados esterificados y protegidos en el grupo amino.
- Estudio de la resolución enzimática de estos sustratos mediante procesos de hidrólisis catalizados por lipasas y esterasas.

Resultados y discusión

1.3. Síntesis de los precursores

En primer lugar se llevó a cabo la síntesis de los sustratos de partida a partir de las cetonas correspondientes. En el caso del derivado (\pm)-**4c**, al no ser la cetona de partida un sustrato comercial, fue necesario sintetizarla a partir del 5-bromo-2-hidroxiacetofenona **1** (Esquema 18).



Esquema 18. Síntesis de los compuestos (\pm)-**4a-c**.

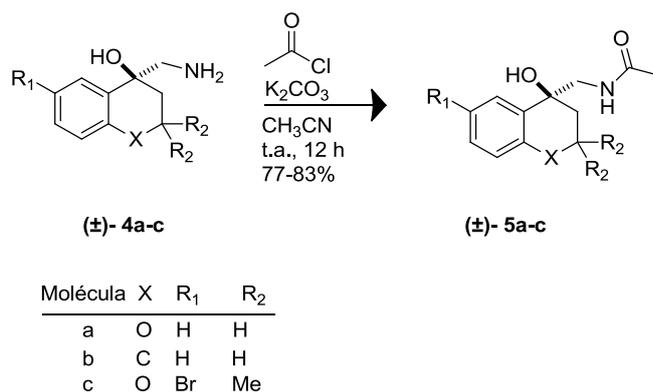
Basándose en los procedimientos sintéticos encontrados en la bibliografía,^{38b} el compuesto **1**, se hizo reaccionar con acetona y pirrolidina en tolueno, dando lugar a la cetona **2c** con elevado rendimiento. Una vez obtenidos los sustratos **2a-c**, éstos se hicieron reaccionar con TMSCN y I₂ en CH₂Cl₂, para dar las cianhidrinas protegidas (\pm)-**3a-c**.⁵¹ La reducción de las mismas utilizando para ello LiAlH₄ en Et₂O, generó los aminoalcoholes deseados (\pm)-**4a-c**.

⁵¹ S. Yadav, B. V. S. Reddy, M. S. Reddy, A. R. Prasad, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 9703-9706.

Capítulo 1

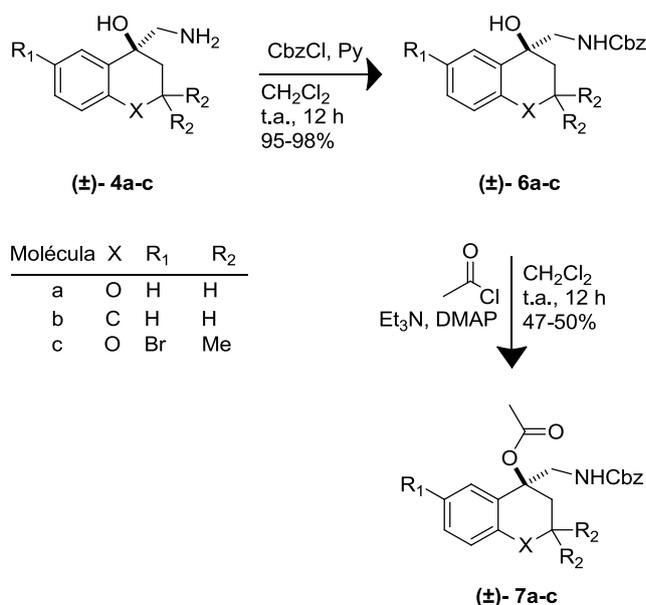
Los procesos catalíticos que se van a estudiar son reacciones de aminólisis, hidrólisis o esterificación. Para ello, se sintetizaron también los ésteres y las amidas racémicas que participan en estos procesos, bien como sustratos o bien como productos de las reacciones enzimáticas y por tanto, la síntesis de estos compuestos en su forma racémica se requiere para el seguimiento y análisis de las reacciones mediante HPLC quiral.

A partir de los aminoalcoholes **(±)-4a-c** se prepararon las amidas correspondientes **(±)-5a-c** con cloruro de acetilo y K_2CO_3 en CH_3CN (Esquema 19).



Esquema 19. Síntesis de los compuestos **(±)-5a-c**.

Tanto para las reacciones de hidrólisis como para llevar a cabo el seguimiento de las reacciones de aminólisis, fue necesaria la síntesis de los carbamatos **(±)-6a-c**, haciendo reaccionar los aminoalcoholes **(±)-4a-c** con $CbzCl$ en presencia de piridina y CH_2Cl_2 .



Esquema 20. Síntesis de los compuestos **(±)-7a-c**.

Una vez sintetizados los compuestos **(±)-6a-c**, se llevó a cabo la acetilación de los mismos en presencia del cloruro de ácido correspondiente, Et_3N en CH_2Cl_2 , dando lugar a los compuestos racémicos **(±)-7a-c**, cuya hidrólisis enzimática se llevará a cabo posteriormente.

1.3.1. Resolución mediante reacciones de aminólisis

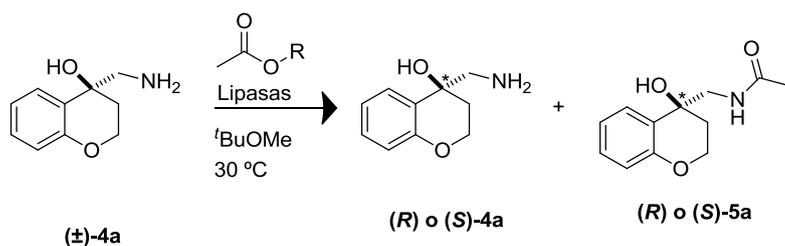
Para poder llevar a cabo el seguimiento de las reacciones enzimáticas y calcular así los excesos enantioméricos y la enantioselectividad, se optimizó la separación de los enantiómeros, tanto del producto **(±)-5a**, como del sustrato derivatizado **(±)-6a** en HPLC quiral. La derivatización se llevó a cabo utilizando CbzCl , K_2CO_3 y CH_2Cl_2 sobre la alícuota a analizar.

1.3.1.1. Resolución del sustrato **(±)-4a**

En primer lugar se estudió la reacción de aminólisis del compuesto **(±)-4a**. Para ello se utilizaron 5 equivalentes del agente

Capítulo 1

de acilación, t BuOMe como disolvente, manteniendo la agitación orbital a 30 °C. (Esquema 21).



Esquema 21. Reacción de aminólisis del sustrato $(\pm)\text{-4a}$.

Al llevar a cabo las reacciones con la lipasa CAL-B y AcOEt como agente de acilación (Tabla 1), se alcanzó una conversión del 20% tras 24 horas con baja enantioselectividad (entrada 1). La misma reacción catalizada por la lipasa AK (entrada 2) mostró una conversión del 16% y una enantioselectividad más baja que en el caso anterior. Para las reacciones catalizadas por la lipasa CAL-A y PSL-IM (entradas 3 y 4) tras 24 horas no se observó producto de reacción.

Tabla 1. Aminólisis enzimática del compuesto $(\pm)\text{-4a}$, en t BuOMe a 30 °C.

Entrada	Lipasa	R	t (horas)	ees^a (%)	eeP^a (%)	c^b (%)	E^c
1	CAL-B	Et	24	3	10	20	2
2	AK	Et	24	3	17	16	1
3	CAL-A	Et	24	---	---	---	---
4	PSL-IM	Et	24	---	---	---	---
5	CAL-B	Pr	24	1	6	15	1
6	CAL-B	Bn	24	9	5	65	2

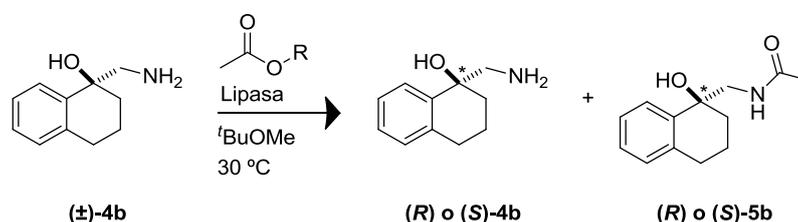
^a Excesos enantioméricos de sustrato (ees) y de producto (eeP) determinados por HPLC. ^b $c = ees/(ees+eeP)$. ^c $E = \ln[(1-c)(1-ees)]/\ln[(1-c)(1+ees)]$.³²

Con el objetivo de mejorar la catálisis, se decidió probar otros agentes de acilación. Para ello se utilizó la lipasa CAL-B como biocatalizador puesto que había sido la enzima que mejores resultados había mostrado, acetato de propilo (AcOPr) y acetato de bencilo (AcOBn) como agentes de acilación. La reacción catalizada

por CAL-B y acetato de bencilo como agente de acilación (entrada 6), tras 24 horas mostró una conversión del 65%, sin embargo, los excesos enantioméricos alcanzados fueron bajos. Por último la reacción cuyo agente de acilación fue el acetato de propilo (entrada 5), tras el mismo periodo de tiempo, alcanzó un 15% de conversión con una baja enantioselectividad.

1.3.1.2. Resolución del sustrato (\pm)-4b

A continuación se llevó a cabo la reacción de aminólisis enzimática del sustrato (\pm)-4b con 5 equivalentes de diferentes agentes de acilación, en t BuOMe como disolvente a 30 °C (Esquema 22).



Esquema 22. Aminólisis enzimática del compuesto (\pm)-4b.

Las reacciones se llevaron a cabo con CAL-B como biocatalizador puesto que, en el caso del sustrato (\pm)-4a mostró mejores resultados que el resto de enzimas probadas (Tabla 2).

Tabla 2. Aminólisis enzimática del compuesto (\pm)-4b, en t BuOMe a 30 °C.

Entrada	Lipasa	R	t (horas)	ees^a (%)	ee_P^a (%)	c^b (%)	E^c
1	CAL-B	Et	24	12	30	28	2
2	CAL-B	Pr	24	10	28	26	2
3	CAL-B	Bn	24	34	15	69	2

^a Excesos enantioméricos de sustrato (ees) y de producto (ee_P) determinados por HPLC. ^b $c = ees / (ees + ee_P)$. ^c $E = \ln[(1-c)(1 - ees)] / \ln[(1-c)(1 + ees)]$.³²

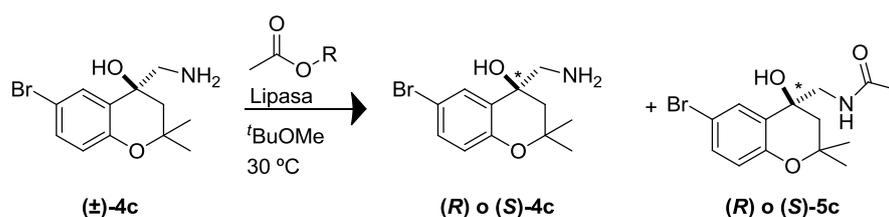
En primer lugar se llevó a cabo la resolución con AcOEt como agente de acilación (entrada 1), tras 24 horas se alcanzó el 28% de conversión con baja enantioselectividad. Al igual que para el

Capítulo 1

sustrato anterior, se decidió probar otros agentes de acilación, observándose que, cuando se trata del AcOPr (entrada 2), en el mismo periodo de tiempo, tanto la conversión como la enantioselectividad son bajas. Por último, tras 24 horas de reacción el AcOBn mostró una conversión del 69% pero con excesos enantioméricos bajos.

1.3.1.3. Resolución del sustrato (\pm)-4c

Finalmente, se llevó a cabo la reacción de aminólisis enzimática con el sustrato (\pm)-4c.



Esquema 23. Aminólisis enzimática del compuesto (\pm)-4c.

De manera análoga al sustrato anterior, se llevó a cabo la reacción con CAL-B como catalizador, *t*BuOMe como disolvente y 5 equivalentes de diferentes agentes de acilación a 30 °C (Tabla 3).

Tabla 3. Aminólisis enzimática del compuesto (\pm)-4c, en *t*BuOMe a 30 °C.

Entrada	Lipasa	R	t (horas)	ees ^a (%)	ee _p ^a (%)	c ^b (%)	E ^c
1	CAL-B	Et	48	---	---	Trazas	---
2	CAL-B	Pr	48	33	>99	25	>200
3	CAL-B	Bn	48	36	>99	27	>200

^a Excesos enantioméricos de sustrato (ees) y de producto (ee_p) determinados por HPLC. ^b $c = ees / (ees + ee_p)$. ^c $E = \ln[(1-c)(1 - ees)] / \ln[(1-c)(1 + ees)]$.³²

En este caso, los mejores resultados se obtuvieron al utilizar acetato de bencilo como agente de acilación (entrada 3), alcanzando tras 2 días de reacción un 27% de conversión con una excelente enantioselectividad. Al utilizar el acetato de propilo (entrada 2) los resultados fueron muy similares al anterior, puesto que, tras el

mismo periodo de tiempo se alcanzó un 25% de conversión con excelente enantioselectividad. Cabe mencionar, que en ambos casos, tiempos de incubación más prolongados no conducen a un incremento de la conversión.

La elevada enantioselectividad obtenida en estos procesos y la influencia de la estructura del éster observada en estas reacciones sugieren varias posibles vías de optimización del proceso: empleo de ésteres de cadena más larga, incremento de la temperatura y estudio de la influencia de la concentración de sustrato y de catalizador en el proceso.

1.3.2. Resolución mediante procesos de hidrólisis

Para realizar el estudio de la resolución a través de procesos que involucran al grupo hidroxilo terciario se introdujo el grupo Cbz en la amina.

Como se ha mostrado en la introducción, son pocos los ejemplos descritos en la bibliografía en los que se lleva a cabo la reacción de acilación enzimática de alcoholes terciarios,^{43,44} siendo la conversión muy baja en este tipo de procesos. La reacción de hidrólisis, es en principio más favorable, y, aunque tampoco existen demasiados ejemplos, en ocasiones se consiguen mejores resultados tanto respecto a la enantioselectividad como a la conversión.

Por otra parte, en este apartado, además de las enzimas comerciales, se dispuso de algunas lipasas y esterases preparadas en el grupo del profesor Uwe Bornscheuer, donde, durante una estancia de 3 meses, se realizó parte de este estudio. Estas enzimas no están inmovilizadas y solo son adecuadas para catalizar procesos de hidrólisis.

1.3.3. Estudios de solubilidad

Basándose en estudios previos, se decidió llevar a cabo las reacciones de hidrólisis en tampón fosfato 50 mM a pH 7.5 y 10%

Capítulo 1

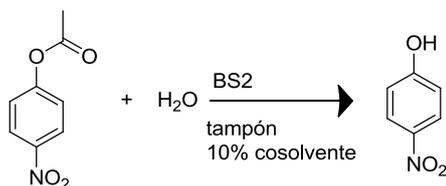
de DMSO como cosolvente, puesto que éstas fueron las condiciones cuyos mejores resultados mostraron en la bibliografía. Sin embargo, bajo estas condiciones, los sustratos **(±)-7a-c** no son solubles, por lo que fue necesario realizar pruebas de solubilidad de estos sustratos utilizando como cosolventes una gran variedad de disolventes orgánicos. Los disolventes en los que se consiguió una mayor solubilización del sustrato fueron ^tBuOMe, AcOEt, CH₂Cl₂ y CH₃CN.

1.3.4. Estudios del cosolvente

Es importante resaltar, que el objetivo principal de este estudio no fue otro más que comprobar que aquellos disolventes en los que eran solubles los sustratos **(±)-7a-c** no disminuían la actividad enzimática.

Este estudio fue necesario puesto que hasta el momento estas enzimas solo se habían probado utilizando DMSO como cosolvente, y por tanto, se desconocía su comportamiento en otros disolventes orgánicos, siendo posible su inhibición en alguno de ellos.

Las pruebas se realizaron con una reacción modelo, siendo el sustrato elegido el acetato de *p*-nitrofenilo y la enzima BS2 en tampón fosfato 50 mM a pH 7.5 con un 10% de diferentes disolventes orgánicos como cosolventes (Esquema 24).



Esquema 24. Estudio modelo de actividad en los diferentes disolventes.

Bajo estas condiciones se llevaron a cabo las reacciones con una gran variedad de disolventes orgánicos (hexano, CH₂Cl₂, DMSO, DMF, ^tBuOMe, butanol, tolueno, AcOEt, CH₃CN y acetona). En primer lugar, se observó mayor conversión al llevar a cabo las pruebas en disolución tampón sin cosolvente, seguida de la

obtenida al utilizar hexano, DMSO, *t*BuOMe y CH₂Cl₂. De los cuatro disolventes, los sustratos **(±)-7a-c** solamente se disuelven totalmente en CH₂Cl₂ y *t*BuOMe, pero debido a la toxicidad del CH₂Cl₂, se decidió usar como cosolvente en las reacciones de hidrólisis posteriores el *t*BuOMe, puesto que, la actividad de la BS2 en este disolvente era elevada y además permite comparar estos resultados con las enzimas comerciales.

1.3.5. Estudio de la actividad de las hidrolasas

Además de los estudios anteriores se comprobó la actividad de las enzimas a utilizar. Este estudio es necesario puesto que, al tratarse de células enteras o enzimas liofilizadas no soportadas pueden llegar a desnaturalizarse con el tiempo. De este modo, se llevó a cabo el ensayo de pH de Bauman *et al.*⁵² utilizando el acetato de 1-feniletilo como sustrato modelo.

Este ensayo consta de un estudio de pH mediante el uso de un indicador de color, el cual, si se lleva a cabo la hidrólisis enzimática se observa el cambio de azul a amarillo al hidrolizarse el éster del sustrato modelo. Para ello se utilizaron 20 µL de una disolución del sustrato en 200 mM DMSO, 5 µL de azul de bromotilo (BTB, 16 mM en 16% de etanol y 84% H₂O), 30 µL de las diferentes esterases en glicerol y 145 µL de una disolución tampón de fosfato de sodio 5 mM a pH 7.7, hasta alcanzar un volumen final de 200 µL, siendo éste el volumen máximo que alcanzan las placas de microtítulo utilizadas para llevar a cabo el estudio.

⁵² M. Baumann, B. H. Hauer, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 4781-4790.

Capítulo 1



Figura 9. Ensayo de actividad enzimática de diferentes células enteras.

En este ensayo fueron probadas 13 esterasas diferentes, de las cuales solamente 2 mostraron actividad, puesto que, como se muestra en la Figura 9 tornan su color a amarillo, lo cual indica hidrólisis del grupo éster y la consiguiente formación del alcohol, siendo éstas las PLE01 y la PLE05.

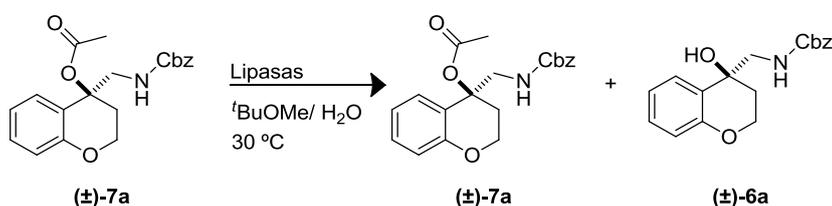
Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos en estos estudios previos, se procedió al estudio enzimático con los sustratos previamente sintetizados (**±**)-7a-c.

1.3.6. Hidrólisis enzimática del sustrato (**±**)-7a

En primer lugar, lleva a cabo la hidrólisis enzimática del mismo con una disolución tampón fosfato 50 mM a pH 7.5 y t BuOMe como cosolvente manteniendo a 30 °C la agitación orbital. Los biocatalizadores utilizados en este caso fueron la lipasa CAL-A, y una serie esterasas comerciales de la casa Enzymicals (ES01, ES06, ES08, ES09, ES10) expresadas en *E. Coli* o procedentes de la esterasa de hígado de cerdo (PLE01, PLE05) también expresadas en *E. Coli*. Además se probaron esterasas aisladas en el laboratorio del profesor Bornscheuer (PestII, ESA3, ES56). Sin embargo, se observó la hidrólisis del sustrato en ausencia de catalizador, por lo que no se obtuvo el compuesto enantioenriquecido.

Teniendo en cuenta este resultado, se decidió llevar a cabo las reacciones con los mismos catalizadores pero utilizando t BuOMe como disolvente y 10 equivalentes de H₂O (Esquema 25). En este

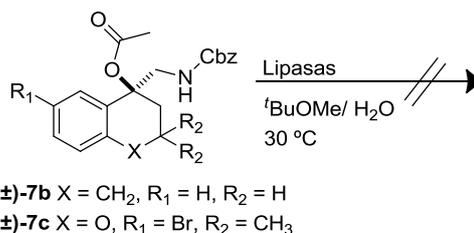
caso, no se produjo la reacción química pero en el proceso biocatalítico, tras 4 días de reacción se obtuvieron, en la mayor parte de las biotransformaciones, trazas poco enriquecidas del producto deseado.



Esquema 25. Hidrólisis enzimática del compuesto (±)-7a.

1.3.7. Hidrólisis enzimática del sustrato (±)-7b-c

Basándose en los resultados obtenidos con el sustrato anterior (±)-7a, la hidrólisis de éstos se llevó a cabo en ^tBuOMe como disolvente y 10 equivalentes de H₂O, y la misma serie de lipasas y esterasas que anteriormente, sin embargo, tras 4 días no se observó el producto de hidrólisis (Esquema 26).



Esquema 26. Hidrólisis enzimática de los compuestos (±)-7b-c.

Los resultados obtenidos en la resolución de esta serie de compuestos, no permiten la resolución mediante la hidrólisis del alcohol terciario esterificado. La estrategia que podría tener mejores resultados sería la funcionalización de estos compuestos de manera que la resolución se lleve a cabo mediante una reacción con un grupo más alejado del centro estereogénico impedido.

No obstante, tanto la funcionalización química del alcohol terciario como la posterior resolución requerirán un estudio más extenso que no forma parte de esta tesis doctoral.

Conclusiones

Conclusiones

Se ha sintetizado el compuesto 6-bromo-2,2-dimetil-4-aminometil-4-hidroxicromanona que posee actividad como β -bloqueante y dos análogos de estructura más simples derivados de la 4-cromanona y tetralona respectivamente.

Se ha estudiado su resolución enzimática mediante procesos de aminólisis de estos sustratos o bien de hidrólisis de sus ésteres derivados.

Se ha conseguido una excelente enantioselectividad en los procesos de aminólisis enzimática catalizada por la lipasa CAL-B del compuesto 6-bromo-2,2-dimetil-4-aminometil-4-hidroxicromanona aunque con una conversión baja (27%) que requiere un posterior estudio para su optimización.

Los procesos de hidrólisis enzimáticos han requerido un estudio de las condiciones de reacción puesto que algunas de las esterasas empleadas no son comerciales. Los resultados de estos procesos no han permitido la resolución de los sustratos, por lo que se requiere la preparación de nuevos derivados en los que la catálisis enzimática se produzca sobre un grupo más alejado del centro estereogénico impedido.

Parte experimental

1.4. General

Todos los reactivos utilizados a lo largo de esta memoria fueron adquiridos a Acros Organics, Aldrich, Fluka o Merck, sin ser necesarios tratamientos previos para su purificación.

1.4.1. Biocatalizadores

La lipasa de *Candida antarctica* tipo B (CAL-B, Novozyme SP-435L, 7300 PLU/g) fue donada por Novozymes. La lipasa de *Candida antarctica* tipo A (CAL-A, lipasa NZL-101, 6.2 U/g) es comercializada por Codexis. La lipasa *Burkholderia cepacia* (PSL-IM, 500 U/g) y la lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre partículas de cerámica PSL-C (1019 U/ g) son comercializada por Amano Pharmaceuticals. La lipasa de *Pseudomonas fluorescens* AK (22100 U/g) fue suministrada por Aldrich.

Las esterasas utilizadas en este capítulo provienen de hígado de cerdo (PLE01 27 mU/mg, PLE05 269 mU/mg) están sobreexpresadas en *E. Coli*, así como las esterasas de origen bacteriano (ES01 29.17 U/mg, ES6 3.56 U/mg, ES08 0.304 U/mg, ES09 0.634 U/mg y ES10 1.329 U/mg), y todas ellas son comercializadas por Enzymicals.

1.4.2. Disolventes

Los disolventes empleados en reacciones sintéticas se sometieron previamente a un tratamiento de secado, almacenándose bajo atmósfera de nitrógeno. El t BuOMe, el THF y el Et₂O se secaron sobre sodio empleando como indicador benzofenona, mientras que el CH₂Cl₂, el MeOH y el DMSO se secaron sobre hidruro cálcico.

1.5. Técnicas de análisis

1.5.1. Cromatografía en gel de sílice

Para la cromatografía en capa fina se han utilizado cromatofolios de gel de sílice POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄ (0.25 mm de espesor), los cuales llevan incorporado un revelador ultravioleta, comercializados por Merck. Como reveladores se utilizaron una disolución acuosa al 1% de KMnO₄, 5% de K₂CO₃ y un 5% de NaOH en 200 mL de agua; una disolución formada por etanol (93%), ácido acético glacial (1%), ácido sulfúrico fumante (3.5%) y *p*-anisaldehído (2.5%); o bien una disolución formada al 3% de ninhidrina en etanol, dependiendo de la naturaleza de los sustratos a analizar.

Para la cromatografía de columna de los compuestos de la primera parte se empleó gel de sílice 60 (230-240 Mesh) adquirida a Merck.

1.5.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El seguimiento de las reacciones de acilación enzimática y la medida de los excesos enantioméricos de sustratos y productos, se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100, empleando la columna quiral Chiralpak IC (25 × 0.46 cm). La detección empleada fue visible-ultravioleta a 210 y 215 nm, utilizando como fase móvil mezclas de hexano/isopropanol.

1.5.3. Espectroscopía de infrarrojo (IR)

Se registraron los espectros en un espectrómetro Perkin-Elmer 1720-X FT empleando pastillas de KBr (muestras sólidas) o en ventanas de NaCl (aceites). Las bandas de tensión se indican en valores de ν máxima y se expresan en cm⁻¹.

1.5.4. Espectrometría de masas

Las medidas de masa exacta se llevaron a cabo con un espectrómetro Bruker ESI-TOF empleando las técnicas de ESI⁺ o EI⁺. Los valores en ambos casos se refieren a unidades de masa atómica (uma).

1.5.5. Puntos de fusión

Se han llevado a cabo con un aparato Gallenkamp en tubos capilares abiertos y por tanto sus valores no están corregidos.

1.5.6. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, secuencia de pulsos DEPT y las correlaciones heteronucleares escalares (¹H-¹³C) a través de un enlace con una secuencia HSQC han sido realizados con espectrómetros Bruker AC-300, DPX-300 y AV-300 (300.13 MHz para ¹H y 75.5 MHz para ¹³C), AV-400 (400.13 MHz para ¹H y 100.6 MHz para ¹³C).

Los desplazamientos químicos se dan en valores de (δ) en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento en Hertzios (Hz).

Los calibrados se hicieron sobre la señal del CDCl₃ (¹³C, 76.95), o del CHCl₃ (¹H, 7.26) residual.

1.5.7. Rotación específica

Se han medido con un polarímetro Perkin-Elmer 241 (unidades 10⁻¹ cm² × grado × g⁻¹), empleando la lámpara de sodio (D).

1.6. Procedimientos sintéticos

1.6.1. Procedimiento general para aminólisis enzimática

El correspondiente aminoalcohol **(±)-4a-c** (0.1 mmol) se disuelve en ^tBuOMe (900.0 μL) y se añade la lipasa (10.0 mg) y 10 equivalentes del agente de acilación. La mezcla se agita a 30 °C y 250 rpm en un agitador orbital. El progreso de la reacción se monitoriza tanto por HPLC como por TLC hasta que se consigue la conversión adecuada. La enzima se elimina por filtración y se lava con ^tBuOMe. El crudo se purifica por cromatografía de columna (8 al 25% MeOH/ CH₂Cl₂).

1.6.2. Procedimiento general para la hidrólisis enzimática

El correspondiente éster **(±)-7a-c** (0.04 mmol) se disuelve en ^tBuOMe (400.0 μL) y se añade la lipasa o esterasa (10.0 mg) y 10 equivalentes de H₂O. La mezcla se agita a 30 °C y 250 rpm en un agitador orbital. El progreso de la reacción se monitoriza tanto por HPLC como por TLC hasta que se consigue la conversión adecuada. La enzima se elimina por filtración y lavado con ^tBuOMe. El crudo se purifica por cromatografía de columna (20 % AcOEt/ hexano).

1.6.3. Síntesis de 6-bromo-2,2-dimetil-4-cromanona. 2c

A la disolución del compuesto **1** (1.5 g, 7.0 mmol) en tolueno (4 mL), se le añade acetona (0.8 μL, 0.01 mmol) y pirrolidina (181.0 μL, 2.2 mmol). La disolución resultante se mantiene a 110°C durante 24 horas en un tubo sellado. Transcurrido ese tiempo, el disolvente se elimina bajo presión reducida y el crudo resultante se disuelve en AcOEt (15 mL). La disolución se lava sucesivamente con HCl 6N (50 mL), NaOH 4N (25 mL) y H₂O (50 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo se utiliza en el siguiente paso de reacción sin previa purificación por cromatografía de columna.

1.6.4. Síntesis de las trimetilsililoxicianhidrinas (\pm)-3a-c

Se disuelven las cetonas (\pm)-2a-c (6.0 mmol) en 50 mL de CH_2Cl_2 seco bajo atmósfera inerte, junto con I_2 al 15% (228.0 mg, 0.9 mmol). La disolución resultante se enfría con baño de hielo y se le añaden gota a gota TMSCN (1.5 mL, 12.0 mmol). La mezcla se deja reaccionar durante 5 horas y se lava con H_2O (5 x 15 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo resultante se purifica por cromatografía de columna (20% AcOEt/ hexano) obteniéndose los productos puros como aceites amarillos con un rendimiento del 75 al 85%.

1.6.5. Síntesis de los aminoalcoholes (\pm)-4a-c

Bajo atmósfera inerte, se disuelven las cianhidrinas (\pm)-3a-c (5.1 mmol) en Et_2O seco. La disolución se enfría con baño de hielo. Sobre ella se añade LiAlH_4 (12.8 mmol, 488.3 mg) en 3 porciones separadas en intervalos de 15 minutos. Una vez terminada la adición se retira el baño de hielo y se deja agitando 2 horas. A continuación la disolución vuelve a ser enfriada para destruir el exceso de LiAlH_4 adicionando H_2O lentamente seguido de NaOH 1N. La disolución resultante se filtra sobre celita y se procede a la extracción con AcOEt (5 x 15 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se evapora el disolvente a presión reducida. Los compuestos obtenidos como aceites amarillos solamente se purificaron por cromatografía de columna (8% MeOH/ CH_2Cl_2), cuando se utilizaron como sustratos en las reacciones de aminólisis, en el resto de los casos se continuó la síntesis con el crudo de reacción. Los productos puros se obtienen en todos los casos con un rendimiento del 95%.

1.6.6. Síntesis de las amidas (\pm)-5a-c

A una disolución de los aminoalcoholes (\pm)-4a-c (0.5 mmol) y K_2CO_3 (103.7 mg, 0.75 mmol), en 3 mL de CH_3CN , se le añade

Capítulo 1

lentamente cloruro de acilo (35.5 μL , 0.5 mmol), a temperatura ambiente y bajo atmosfera inerte. La mezcla se mantiene agitando durante 24 horas, se evapora el disolvente y se disuelve el crudo en CH_2Cl_2 (15 mL). La disolución resultante se extrae con H_2O (3 x 15 mL) y la fase orgánica se seca con Na_2SO_4 y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna (20% MeOH/ CH_2Cl_2) obteniéndose los productos puros con un rendimiento entre 77-83%

1.6.7. Síntesis de los carbamatos (\pm)-6a-c

Se disuelven los aminoalcoholes (**\pm**)-4a-c (3.5 mmol) en 35 mL de CH_2Cl_2 bajo atmósfera inerte. La disolución se enfría con un baño de hielo y se añade piridina (714.0 μL , 8.8 mmol) y CbzCl (1.25 mL, 8.8 mmol). La reacción se deja agitando a temperatura ambiente durante 12 horas. El disolvente de la reacción se evapora a presión reducida y se purifica por cromatografía de columna (30% AcOEt/ hexano), obteniéndose los productos puros con un rendimiento entre 90-95%.

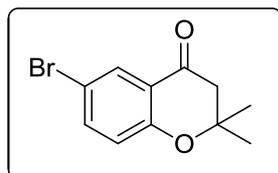
1.6.8. Síntesis de los ésteres (\pm)-7a-c

Los carbamatos (**\pm**)-6a-c (2.47 mmol) se disuelven en CH_2Cl_2 en atmósfera inerte. La disolución se enfría con un baño de hielo y se añade DMAP (75.0 mg, 0.6 mmol), Et_3N (1.7 mL, 12.4 mmol) y el cloruro de ácido. (778.0 μL , 12.4 mmol). La disolución se deja agitando 12 horas, tras las cuales se evapora el disolvente a presión reducida y se purifican los productos por cromatografía de columna (20% AcOEt/hexano). Dando lugar a los ésteres con un rendimiento entre el 46- 50%.

1.7. Datos experimentales

En esta sección se han recogido los datos experimentales de los compuestos que forman parte de este capítulo.

6-Bromo-2,2-dimetil-4-cromanona. 2c



Fórmula molecular: C₁₁H₁₁BrO₂

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 255.11 g/mol

Rf: (20% AcOEt/ hexano): 0.58

HRMS (ESI⁺, m/z) calculada (C₁₁H₁₂BrO₂)⁺ 255.0015 m/z, encontrada 255.0026.

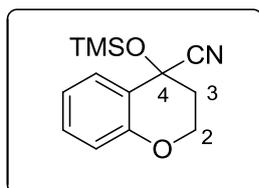
¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.93 (m, 1H), 7.51 (m, 1H), 6.81 (m, 1H), 2.69 (s, 2H, CH₂), 1.43 (s, 6H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 191.3 (C), 158.8 (C), 138.7 (C), 128.9 (C), 121.4 (CH), 120.5 (CH), 113.2 (CH), 79.6 (C), 48.5 (CH₂), 26.5 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3054.19; 2985.87; 1762.21 cm⁻¹

Rendimiento: 80%

**3,4-Dihidro-4-(trimetilsililoxi)-2H-1-benzopirano-4-carbonitrilo.
(±)-3a**



Fórmula molecular: C₁₃H₁₇NO₂Si

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 247.37 g/ mol

Rf: (20% AcOEt/ hexano): 0.72

HRMS (ESI⁺, m/z) calculada (C₁₃H₁₇NNaO₂Si)⁺ 270.0935 m/z, encontrada 270.0921.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.61 (dt, *J* = 7.8, 1.4 Hz, 1H), 7.33 – 7.27 (m, 1H), 7.01 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.88 (dd, *J* = 8.3, 1.2 Hz, 1H), 4.37 (m, 2H, H-2), 2.47 – 2.36 (m, 2H, H-3), 0.22 (s, 9H, TMS).

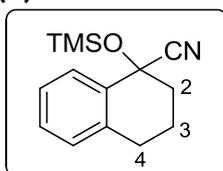
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 153.9 (C), 131.8 (CH), 129.1 (CH), 121.4 (C), 121.2 (CH), 117.9 (CH), 65.9 (C-2), 61.7 (C-4), 36.7 (C-3), 1.6 (TMS).

IR (NaCl): ν 2254 cm⁻¹

Rendimiento: 95%

1,2,3,4-Tetrahidro-1-trimetilsiloxinaftaleno-1-carbonitrilo.

(±)-3b



Fórmula molecular: C₁₄H₁₉NOSi

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 245.11 g/ mol

Rf: (20% AcOEt/ hexano): 0.66

HRMS ESI⁺ calculada para (C₁₄H₁₉NNaOSi)⁺ 268.1128 *m/z*, encontrada 268.1115.

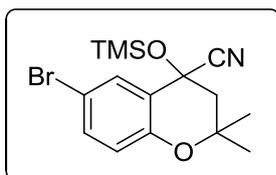
¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.76 – 7.58 (m, 1H), 7.29 (dd, *J* = 5.8, 3.3 Hz, 2H), 7.13 (dd, *J* = 5.1, 3.8 Hz, 1H), 2.85 (m, 2H, H-4), 2.36 (m, 1H, H-2), 2.22 (m, 1H, H-2), 2.04 (m, 2H, H-3) 0.24 (s, 9H, TMS).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 136.5 (C), 136.0 (C), 129.7 (C), 129.5 (CH), 128.4 (CH), 127.0 (CH), 122.5 (CN), 70.0 (C-1), 38.2 (C-2), 28.7 (C-4), 19.1 (C-3), 1.8 (TMS).

IR (NaCl): ν 3055.18; 2986.84; 2255 cm⁻¹

Rendimiento: 90%

6-Bromo-3,4-dihidro-2,2-dimetil-4-trimetilsililoxi-2H-1-benzopirano-4-carbonitrilo. (±)-3c



Fórmula molecular: C₁₅H₂₀BrO₂Si

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 354.31 g/mol

Rf: (20% AcOEt/ hexano): 0.69

HRMS ESI⁺: calculada para (C₁₅H₂₀BrNNaO₂Si)⁺ 376.0292 *m/z*, encontrada 376.0339.

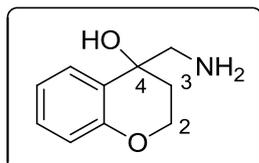
¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.64 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.37 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 2.39 (m, 2H, CH₂), 1.46 (s, 6H, CH₃), 0.30 (s, 9H, TMS).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 158.6 (C), 134.0 (CH), 131.4 (CH), 122.0 (CH), 121.0 (C), 120.2 (C), 74.9 (C), 46.6 (CH₂), 27.6 y 27.5 (CH₃), 1.3 (TMS).

IR (NaCl): ν 3053.91; 2984.98; 2305.81 cm⁻¹

Rendimiento: 90%

4-Aminometilcroman-4-ol. (±)-4a



Fórmula molecular: C₁₀H₁₃NO₂

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 179.22 g/ mol

Rf: (6% MeOH/ CH₂Cl₂): 0.30

HRMS (ESI⁺, m/z) calculada (C₁₀H₁₃NNaO₂)⁺ 202.0833 m/z, encontrada 202.0838.

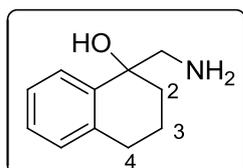
¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.31 (dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz, 1H), 7.15 – 7.09 (m, 1H), 6.89 – 6.83 (ddd, *J* = 15.1, 7.7, 1.2 Hz, 1H), 6.78 (dd, *J* = 8.2, 1.1 Hz, 1H), 4.13 (td, *J* = 6.9, 4.2 Hz, 2H, H-2), 3.09 (s, 3H, NH₂ y OH), 2.90 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H, CH₂), 2.75 (d, *J* = 13.3 Hz, 1H, CH₂), 1.94 (m, 2H, H-3).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 154.7 (C), 129.2 (CH), 126.6 (CH), 126.2 (CH), 120.7 (CH), 117.0 (C), 67.7 (C-4), 63.3 (C-2), 50.6 (CH₂), 33.3 (C-3).

IR (NaCl): ν 3581.45; 3053.67; 2987.74 cm⁻¹

Rendimiento: 95%

1-Aminometil-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-ol. (±)-4b



Fórmula molecular: C₁₁H₁₅NO

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 177.24 g/ mol

Rf: (10% MeOH /CH₂Cl₂): 0.31

HRMS (ESI⁺, m/z) calculada (C₁₁H₁₆NO)⁺ 178.1226 m/z, encontrada 178.1209.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.52 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.19 (dd, *J* = 6.6, 2.5 Hz, 3H), 7.09 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 2.95 – 2.73 (m, 4H, H-4 y CH₂), 2.48 (s, 3H, NH₂ y OH), 2.08 – 1.75 (m, 4H, H-2 y H-3).

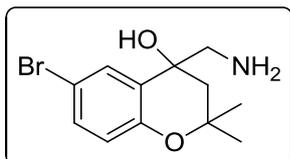
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 140.6 (C), 137.2 (C), 128.8 (CH), 127.2 (CH), 126.3 (CH), 126.2 (CH), 72.2 (C-1), 51.6 (CH₂), 34.4 (C-4), 29.6 (C-2), 19.94 (C-3).

IR (NaCl): ν 3583.24; 3053.90; 2986.09 cm⁻¹

Rendimiento:95%

Capítulo 1

6-Bromo-2,2-dimetil-4-aminometilcroman-4-ol. (±)-4c



Fórmula molecular: C₁₂H₁₆BrNO₂

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 286.16 g/mol

Rf: (20% hexano/ AcOEt): 0.35

HRMS (ESI⁺, m/z) calculada para (C₁₂H₁₇BrNO₂)⁺ 286.0437 m/z, encontrada 286.0445.

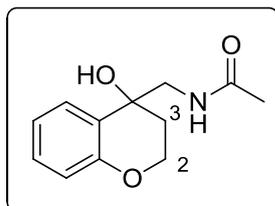
¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.56 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.28 (dd, *J* = 6.5, 2.2 Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 2.98 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 2.81 (d, *J* = 12.8 Hz, 1H), 2.01 (m y s, 5H, NH₂, OH y CH₂), 1.45 (s, 3H, CH₃), 1.38 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 153.2 (C), 132.4 (CH), 130.0 (CH), 128.8 (CH), 120.3 (C), 113.2 (C), 75.3 (C), 68.3 (C), 53.0 (CH₂), 45.8 (C-3), 30.3 (CH₃), 25.8 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3582.25; 3053.57; 2985.71 cm⁻¹

Rendimiento: 95%

***N*-[(4-Hidroxicroman-4-il)metil]acetamida (±)-5a**



Fórmula molecular: C₁₂H₁₅NO₃

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 221.25 g/ mol

Rf: (6% MeOH /CH₂Cl₂): 0.66

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para (C₁₂H₁₅NNaO₃)⁺ 244.0944 *m/z*, encontrada 244.0951.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.46 (s, 1H), 7.21 (dd, *J* = 7.6, 6.2 Hz, 1H), 6.96 (dd, *J* = 8.7, 4.0 Hz, 1H), 6.84 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 6.01 (s, 1H), 4.37 – 4.18 (m, 2H, H-2), 3.83 – 3.70 (m, 1H, H-3), 3.56 (m, 1H, H-3), 2.05 (m, 5H, CH₂, CH₃).

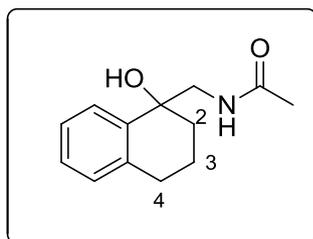
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 171.5 (CO), 154.4 (C), 129.6 (CH), 126.4 (CH), 125.9 (CH), 120.8 (CH), 117.1 (C), 69.0 (C-4), 63.5 (C-2), 48.6 (CH₂), 33.2 (C-3), 23.2 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3054.29, 2986.23, 2305.76, 1711.34 cm⁻¹

Rendimiento: 83%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 80:20); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* = 16.276 y 16.764 min.

***N*-[(1-Hidroxi-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)metil]acetamida
(±)-5b**



Fórmula molecular: C₁₃H₁₇NO₂

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 219.28 g/ mol

Rf: (20% MeOH / CH₂Cl₂): 0.77

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para (C₁₃H₁₇NNaO₂)⁺ 242.1155 *m/z* encontrada 242.1151.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.63 – 7.46 (m, 1H), 7.28 – 7.15 (m, 3H), 7.09 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 6.2 (s, OH o NH₂), 3.74 – 3.59 (m, 1H, CH₂), 3.42 – 3.30 (m, 2H, H-4 y CH₂), 2.88 – 2.73 (m, 2H, H-4, H-2 o H-3), 2.01 (s, 3H, CH₃), 1.82 (m, 3H, H-2 y H-3).

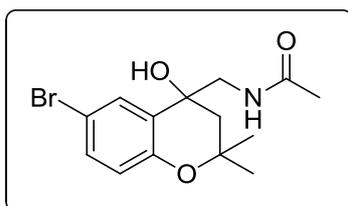
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 171.8 (CO), 140.6 (C), 137.4 (C), 129.2 (CH), 127.9 (CH), 126.7 (CH), 126.6 (CH), 73.3 (C-1), 49.4 (CH₂), 34.5 (C-4), 29.8 (C-2), 23.6 (C-3), 20.6 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3442.94, 3054.04, 2986.24, 2305.65, 1711.54 cm⁻¹

Rendimiento: 77%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 80:20); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* = 20.838 y 24.517 min.

***N*-[(6-Bromo-4-hidroxi-2,2-dimetilcroman-4-il)metil]acetamida.
(±)-5c**



Fórmula molecular: C₁₄H₁₈BrNO₃

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 328.20 g/mol

Rf: (10% MeOH /CH₂Cl₂): 0.75

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.57 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 6.71 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 3.65 (dd, *J* = 13.8, 5.0 Hz, 1H, H-3), 3.34 (dd, *J* = 14.0, 7.0 Hz, 1H, H-3), 2.02 – 1.93 (m, 5H, CH₂ y CH₃), 1.37 (m, 6H, CH₃).

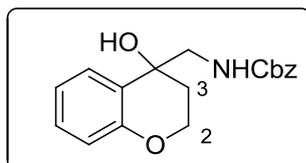
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 172.5 (CO), 152.7 (C), 132.7 (C), 129.9 (CH), 128.2 (CH), 120.5 (CH), 113.2 (C), 75.4 (C-4), 69.3 (C-2), 51.3 (CH₂), 45.1 (C-3), 29.8 (CH₃), 26.2 (CH₃), 23.5 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3319.69; 2979.71; 2932.30; 1651.56 cm⁻¹

Rendimiento: 80%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 90:10); 30 °C, 0.8 mL/min, t_R = 14.628 y 21.657 min.

***N*-[(4-Hidroxicroman-4-il)metil]carbamato de bencilo. (±)-6a**



Fórmula molecular: C₁₈H₁₉NO₄

Estado físico: sólido blanco

Peso molecular: 313.35 g/ mol

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.33

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para (C₁₂H₁₅NNaO₃)⁺ 336.1223 *m/z*, encontrada 336.1223.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.43 – 7.32 (m, 5H), 7.23 – 7.16 (m, 1H), 6.96 – 6.89 (m, 1H), 6.87 – 6.81 (m, 1H), 5.10 (s, 2H, CH₂), 4.24 (dd, *J* = 6.6, 3.9 Hz, 2H, H-2), 3.67 – 3.47 (m, 2H, H-3), 2.19 – 2.07 (m, 1H, CH₂), 2.02 – 1.92 (m, 1H, CH₂).

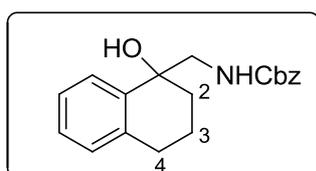
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 157.3 (CO), 154.5 (C), 136.2 (C), 129.6 (CH), 128.6 (CH), 128.2 (CH), 128.1 (CH), 126.4 (CH), 125.7 (CH), 120.8 (CH), 117.1 (C), 68.8 (C-4), 67.0 (CH₂), 63.4 (C-2), 49.7 (CH₂), 33.0 (C-3).

IR (NaCl): ν 3440.27; 3051.87; 2985.92; 1719.28 cm⁻¹

Rendimiento: 97%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 85:15); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* = 9.747 y 11.190 min.

***N*-[(1-Hidroxi-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)metil]carbamato de bencilo. (±)-6b**



Fórmula molecular: C₁₉H₂₁NO₃

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 311.37 g/ mol

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.47

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para (C₁₉H₂₁NNaO₃)⁺ 334.1414 *m/z*, encontrada 334.1446.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.53 (dd, *J* = 5.9, 3.2 Hz, 1H), 7.47 – 7.26 (m, 5H), 7.30 – 7.14 (m, 2H), 7.16 – 7.04 (m, 1H), 5.11 (s, 2H, CH₂), 3.56 (dd, *J* = 13.7, 7.7 Hz, 1H, H-4), 3.38 (dd, *J* = 13.7, 4.3 Hz, 1H, H-4), 2.79 (m, 2H, H-2), 2.18 – 2.04 (m, 1H, H-3), 1.80 (m, 3H, H-3, CH₂).

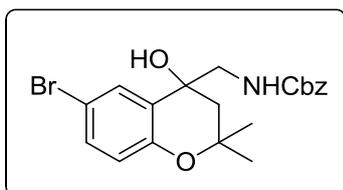
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 157.3 (CO), 140.1 (C), 137.2 (C), 136.5 (C), 128.9 (CH), 128.5 (CH), 128.1 (CH), 127.6 (CH), 126.5 (CH), 126.3 (CH), 72.9 (C-1), 66.9 (CH₂), 50.2 (CH₂), 34.0 (C-4), 29.6 (C-2), 20.2 (C-3).

IR (NaCl): ν 3436.49; 3053.78; 2942.11; 1713.91 cm⁻¹

Rendimiento: 95%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 80:20); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* = 10.738 y 18.021 min.

***N*-[(6-Bromo-4-hidroxi-2,2-dimetilcroman-4-il)metil]carbamato de bencilo. (±)-6c**



Fórmula molecular: C₂₀H₂₂BrNO₄

Estado físico: aceite transparente

Peso molecular: 420.30 g/ mol

Rf: (30% AcOEt/ hexano): 0.38

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para (C₂₀H₂₂BrNKO₄)⁺ 458.0364 *m/z* encontrada 458.0394.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.57 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.38 – 7.29 (m, 6H), 6.74 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 5.14 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, CH₂), 3.75 – 3.63 (m, 1H, H-3), 3.34 (m, 1H, H-3), 2.05 (dd, *J* = 31.6, 14.6 Hz, 2H, CH₂), 1.43 (s, 3H, CH₃), 1.36 (s, 3H, CH₃).

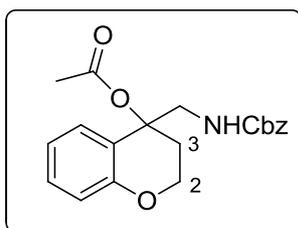
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 157.5 (CO), 152.5 (C), 136.1 (C), 132.6 (CH), 129.3 (CH), 128.6 (CH), 128.3 (CH), 128.2 (CH), 127.3 (CH), 120.2 (C), 112.9 (C), 74.9 (C), 67.3 (CH₂), 51.7 (CH₂), 44.5 (CH₂), 29.4 (CH₃), 25.8 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3439.40; 3053.39; 2985.35; 1718.50 cm⁻¹

Rendimiento: 98%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 90:10); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* = 12.071 y 15.582 min.

***N*-[(4-Acetoxicroman-4-il)metil]carbamato de bencilo (±)-7a**



Fórmula molecular: C₂₀H₂₁NO₅

Estado físico: sólido blanco

Peso molecular: 355.38 g/ mol

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.37

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para (C₂₀H₂₁NNaO₅)⁺ 378.1312 *m/z*, encontrada 378.1286.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.37 – 7.17 (m, 7H), 7.03 – 6.85 (m, 2H), 5.13 (s, 2H, CH₂), 4.43 – 4.13 (m, 2H, H-2), 3.98 (dd, *J* = 17.3, 6.5 Hz, 2H, CH₂), 2.73 (td, *J* = 9.2, 4.3 Hz, 1H, H-3), 2.49 – 2.33 (m, 1H, H-3), 2.29 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 165.8 (CO), 156.6 (CO), 154.8 (C), 136.2 (C), 130.0 (CH), 128.6 (CH), 128.4 (CH), 128.2 (CH), 126.3 (CH), 122.3 (CH), 120.8 (CH), 117.7 (CH), 109.4 (C), 79.4 (C-4), 67.2 (CH₂), 63.4 (C-2), 48.6 (CH₂), 29.3 (C-3), 25.93 (CH₃).

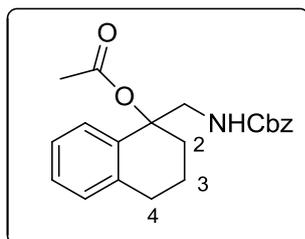
IR (NaCl): ν 3442.62; 3054.18; 2986.28; 1761.72; 1723.67 cm⁻¹

Rendimiento: 48%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 85:15); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* = 17.914 y 19.088 min.

Capítulo 1

***N*-[(1-Acetoxi-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-il)metil]carbamato de bencilo (±)-7b**



Fórmula molecular: C₂₁H₂₃NO₄

Estado físico: aceite transparente

Peso molecular: 353.41 g/ mol

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.37

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.57 – 7.13 (m, 9H), 5.15 (s, 2H, CH₂), 3.84 (dd, *J* = 14.5, 9.1 Hz, 1H, H-4), 3.44 (m, 1H, H-4), 3.11 – 2.70 (m, 3H, H-2 y H-3), 2.51 (m, 1H, H-3), 2.25 (s, 3H, CH₃), 2.00 (m, 2H, CH₂).

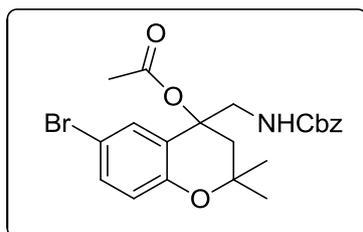
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 168.6 (CO), 164.6 (CO), 156.9 (C), 137.7 (C), 129.5 (CH), 129.0 (CH), 128.6 (CH), 128.0 (CH), 126.7 (CH), 125.5 (CH), 110.9 (C), 83.3 (C-1), 67.4 (CH₂), 50.4 (CH₂), 29.8 (C-4 o C-2), 28.8 (C-2 o C-4), 21.2 (C-3), 18.5 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3442.66; 3054.27; 2986.35; 1720.04 cm⁻¹

Rendimiento: 46%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 80:20); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* = 10.738 y 18.021 min.

***N*-[(4-Acetoxy-6-bromo-2,2-dimetilcroman-4-il)metil]carbamato de bencilo. (±)-7c**



Fórmula molecular: C₂₂H₂₄BrNO₅

Estado físico: aceite transparente

Peso molecular: 462.33 g/ mol

Rf: (30% AcOEt/ hexano): 0.49

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para (C₂₂H₂₄BrNaNO₅)⁺ 484.0730 *m/z* encontrada 484.0730.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.48 (m, 1H), 7.43 – 7.29 (m, 6H), 6.76 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 5.13 (s, 2H, CH₂), 4.13 (dd, *J* = 14.5, 5.2 Hz, 1H, H-3), 3.80 (dd, *J* = 14.4, 7.6 Hz, 1H, H-3), 2.73 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, CH₂), 2.32 (m, 1H, CH₂), 2.18 (s, 3H, CH₃), 1.41 (s, 3H, CH₃), 1.35 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 165.3 (CO), 156.8 (CO), 152.9 (C), 136.5 (C), 133.5 (CH), 129.9 (CH), 128.9 (CH), 128.6 (CH), 120.7 (CH), 113.2 (C), 110.5 (C), 75.2 (C), 67.5 (CH₂), 49.4 (C-3), 39.1 (CH₂), 29.1 (CH₃), 26.7 (CH₃), 21.5 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3439.40; 3053.39; 2985.35; 1762.21; 1723.76 cm⁻¹

Rendimiento: 50%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 90:10); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* = 14.276 y 20.520 min.

Capítulo 2:
Síntesis y resolución de bromohidrinas y
aminoalcoholes tetrahidrofuránicos y
pirrolidínicos sustituidos en las posiciones
3 y 4 del anillo

Introducción

Las pirrolidinas o tetrahidrofuranos ópticamente puros, con diferente grado de funcionalización, son unidades estructurales que aparecen frecuentemente en productos naturales y otros compuestos con importante actividad biológica. Algunos ejemplos representativos pueden ser los inhibidores de glucoasas,⁵³ intermedios en la síntesis de cefalosporinas,⁵⁴ carbohidrato-miméticos⁵⁵ o antitumorales.⁵⁶

Es importante también, destacar el interés de estas estructuras heterocíclicas por su creciente utilización en organocatálisis, especialmente los 1,2-dioles, aminoalcoholes y diaminas cíclicas. En concreto este capítulo se centrará en la preparación quimioenzimática de los ciclos de 3-amino-4-hidroxipirrolidina y tetrahidrofurano que se muestran en la Figura 10 y derivados de los mismos de forma enantiopura.

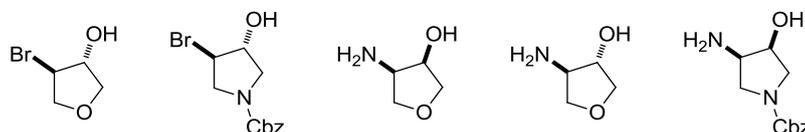


Figura 10. Estructura de los compuestos racémicos de interés.

2.1. Importancia de las pirrolidinas quirales

Las pirrolidinas quirales y, especialmente, los aminoalcoholes heterocíclicos vecinales, forman parte de la estructura de numerosos compuestos biológicamente activos, tanto naturales como sintéticos,⁵⁷ siendo unidades estructurales esenciales para esta actividad.

⁵³ R. Lysek, P. Vogel, *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 3167-3181.

⁵⁴ Y. S. Lee, J. Y. Lee, S. H. Jung, E. Woo, D. H. Suk, S. H. Seo, H. J. Park, *Antibiot.* **1994**, *47*, 609-612.

⁵⁵ B. G. Davis, M. A. T. Maughan, T. M. Chapman, R. Villard, S. Courtney, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 103-106.

⁵⁶ Y. Tsuzuki, K. Tomita, K. Shibamori, Y. Sato, S. Kashimoto, K. Chi, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2097-2109.

⁵⁷ M. Pichon, B. Figarede, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 927-964.

Capítulo 2

Ejemplos de ellos son algunas quinolinas sustituidas con unidades 3-amino-4-metoxipirrolidina que han mostrado propiedades antibacterianas⁵⁸ y antitumorales⁵⁶ (Figura 11).

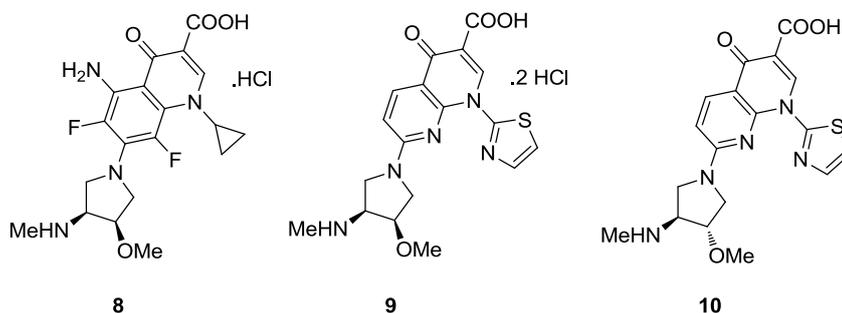


Figura 11. Quinolinas con propiedades antibacterianas.

La importancia de la configuración queda reflejada al comprobar que aquellas que contienen el derivado (3*R*,4*S*)-3-metoxi-4-metilaminopirrolidina unido al anillo de naftiridina en C-7 (**8 y 9**) tienen una potente actividad antibacteriana, mientras que, la quinolina cuyo sustituyente es el (3*S*,4*S*)-3-metoxi-4-metilaminopirrolidina (**10**) es el agente antitumoral Voreloxin (AG-7352) para el tratamiento del cáncer de colon, mama y ovario.

Otros compuestos de interés que contienen en su esqueleto la estructura de la *trans*-3-amino-4-hidroxipiperidina son los compuestos (11) y sus derivados (Figura 12). Se ha estudiado la actividad de esta familia de compuestos con distintos sustituyentes en el nitrógeno piperidínico por su potente actividad inhibidora frente a los receptores CCR2⁵⁹ de la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1/ CCL2) implicada en la inflamación de tejidos que se produce como respuesta inmune a una infección. Su regulación es esencial para el tratamiento de enfermedades crónicas

⁵⁸ T. Okada, K. Ezumi, M. Yamakawa, H. Sato, T. Tsuji, T. Tsushima, K. Motokawa, Y. Komatsu, *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 126-131.

⁵⁹ a) C. Xue, A. Wang, D. Meloni, S. Friedman, B. Metcalf, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *29*, 7473-7478; b) S. L. Deshmane, S. Kremlev, S. Amini, B. E. Sawaya, *J. Interf. Cytok. Res.* **2009**, *29*, 313-326.

relacionadas con la falta de control de esta respuesta en enfermedades como la artritis reumatoide o la esclerosis múltiple.

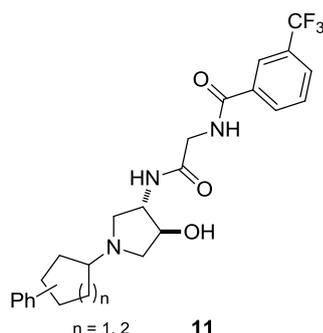


Figura 12. Inhibidor frente a los receptores CCR2.

Con configuración *cis* un ejemplo destacable es el derivado de la guanina (12) que se ha evaluado como inhibidor potencial de la purina nucleosido fosforilasa (PNP) con posibles aplicaciones terapéuticas en varias enfermedades como el cáncer, artritis reumatoide, rechazo en transplantes y otras enfermedades autoinmunes.⁶⁰ Además, también con configuración *cis* se encuentra como sustituyente en la pirazina (13), receptor antagonista del CRF (factor liberador de corticotropina), el cual está asociado con desordenes de ansiedad, estrés postraumático, desorden obsesivo-compulsivo (Figura 13).⁶¹

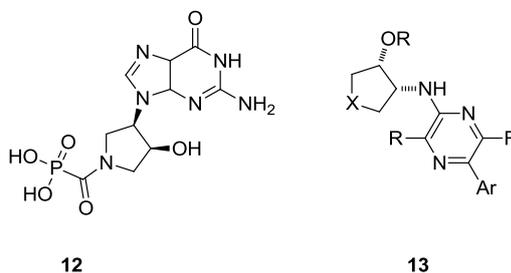


Figura 13. Compuestos *cis*-pirrolidínicos de interés.

⁶⁰ D. Rejman, N. Panova, P. Klener, B. Maswabi, R. Pohl, I. Rosenberg, *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 1612–1621.

⁶¹ M. D. Ennis, K. E. Frank, J-M Fu, R. L. Hoffman, P. R. Verhoest, WO2004099201 A1 **2004**, CAN141: 410966, WO2003045924 A1 **2003**, CAN139: 6891.

2.2. Importancia de los tetrahidrofuranos quirales

Al igual que en el caso de las pirrolidinas, derivados enantiopuros del tetrahidrofurano son moléculas de gran importancia por sus aplicaciones farmacéuticas y agrícolas.

Aunque los tetrahidrofuranos polifuncionalizados quirales son ampliamente conocidos debido a que son la base de los monosacáridos, son escasos los procesos sintéticos descritos para la preparación de los sustituidos exclusivamente en las posiciones C-3 y C-4.

Derivados a destacar son los análogos de nucleótidos (Figura 14) por sus posibles aplicaciones como agentes antivirales como la estructura **(14)**.⁶²

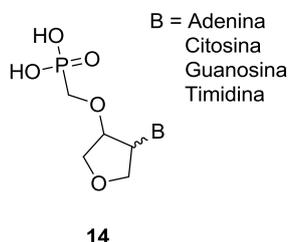


Figura 14. Derivados del tetrahidrofurano.

A pesar de que las unidades que se muestran en los apartados anteriores, son en apariencia sencillas, la existencia de varios grupos funcionales y dos centros estereogénicos, hace que su síntesis requiera la utilización de métodos altamente regio-, quimio- y enantioselectivos para su preparación.

Para la síntesis de los aminoalcoholes heterocíclicos ópticamente puros que se aborda en este capítulo se han seguido dos estrategias distintas. En una primera parte se plantea la síntesis y resolución enzimática de las *trans*-bromohidrinias precursoras de los aminoalcoholes de configuración *cis*. En una

⁶² W. Wang, H. Jin, N. Fuselli, T. S. Mansour, *Biorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2567-2572.

segunda parte, se estudiará la síntesis y resolución de los aminoalcoholes heterocíclicos tanto *cis* como *trans* que se muestran en la Figura 10.

Antecedentes

2.3. Preparación de aminoalcoholes tetrahidrofuránicos y pirrolidínicos ópticamente puros

Como se ha visto en la introducción, tanto las bromohidrinas como los aminoalcoholes derivados del tetrahidrofurano y pirrolidina sustituidos en las posiciones 3 y 4 del anillo, son compuestos con gran interés especialmente por las posibles aplicaciones farmacéuticas de sus derivados

En la actualidad son pocos los métodos descritos para la síntesis asimétrica de los mismos. Sin embargo, en los últimos años se han aplicado los procesos biocatalíticos a la resolución de compuestos con estructuras análogas a las que se estudiarán en este capítulo.

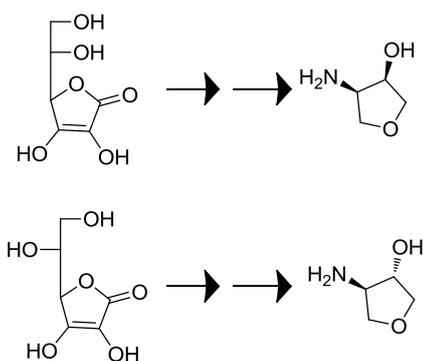
2.3.1. Síntesis a partir de productos naturales

Estas síntesis se caracterizan generalmente por un elevado número de pasos que repercuten en sus rendimientos.

A principios de los 90, Börner y colaboradores,⁶³ sintetizaron de manera enantiopura los derivados (3*R*,4*S*)-3-amino-4-hidroxitetrahidrofurano y (3*R*,4*R*)-3-amino-4-hidroxitetrahidrofurano a partir de los ácidos naturales D-isoascórbico y L-ascórbico.

⁶³ A. Börner, J. Holz, H. Kagan, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 5273-5276.

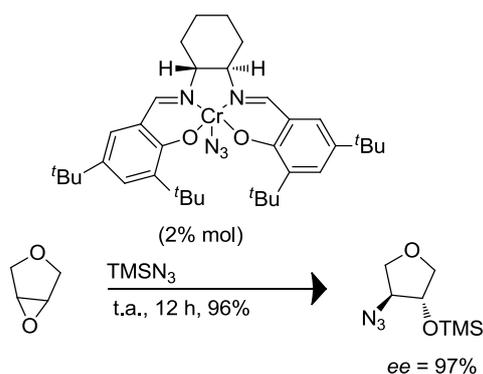
Capítulo 2



Esquema 27. Síntesis de los aminoalcoholes de interés a partir de productos naturales.

2.3.2. Catálisis asimétrica

A finales de los 90, Schaus *et al.*⁶⁴ describieron una síntesis para la apertura asimétrica de epóxidos *meso* con TMSN_3 y complejos quirales de Cr(III) (Esquema 28). La apertura del epóxido se logra con elevados rendimientos.

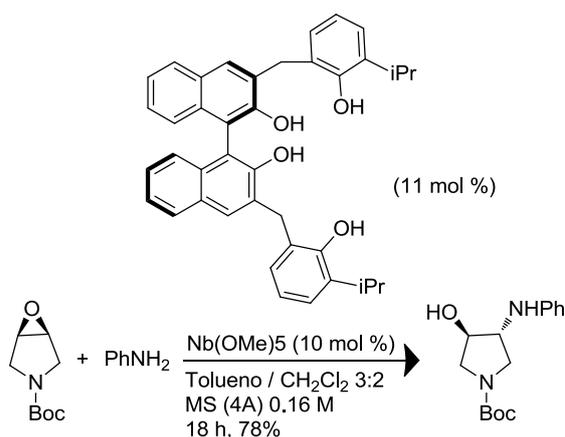


Esquema 28. Apertura asimétrica con complejos de Cr(III).

En la última década, Arai *et al.*⁶⁵ desarrollaron un nuevo método de apertura de epóxidos (Esquema 29) utilizando como catalizador un complejo formado por Niobio (V) y un ligando tetradentado, el cual lleva a cabo la desimetrización de epóxidos con rendimientos cuantitativos y excelentes enantioselectividades.

⁶⁴ S. E. Schaus, J. F. Larrow, E. N. Jacobsen, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4197-4199.

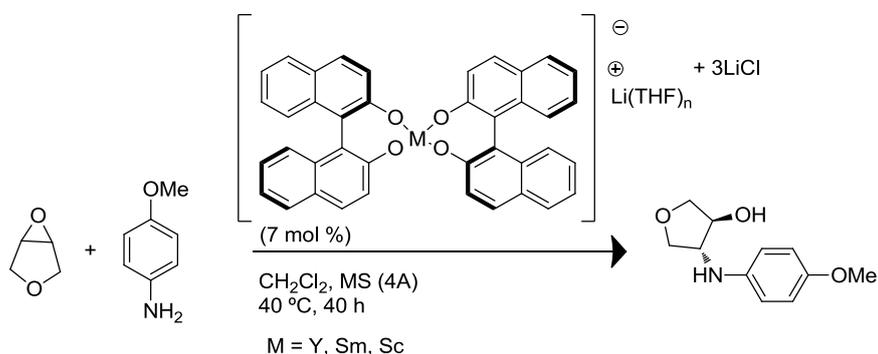
⁶⁵ K. Arai, M. M. Salter, Y. Yamashita, S. Kobayashi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 955-957.



Esquema 29. Apertura asimétrica de epóxidos.

En el caso del epóxido de pirrolidina, se consigue el aminoalcohol *trans* con un *ee* = 89% y un rendimiento del 78%.

Martin *et al.*⁶⁶ (Esquema 30) sintetizaron una serie de complejos quirales de lantánidos derivados del (*R*)-binaftol que mostraron una alta eficacia en la apertura asimétrica de epoxidos *meso*, dando lugar a los correspondientes aminoalcoholes *trans* que pueden alcanzar, en las condiciones más favorables, dependiendo del sustrato y el complejo utilizado, excesos enantioméricos del orden del 80% y rendimientos moderados.

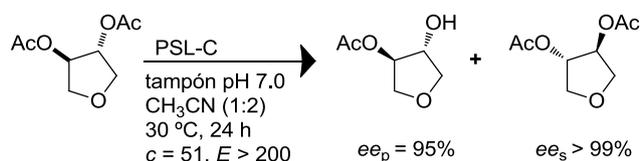


Esquema 30. Catálisis asimétrica.

⁶⁶ M. Martin, A. E. Hellani, J. Yang, J. Collin, S. Bezzenine-Lafollée, *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 9801-9808.

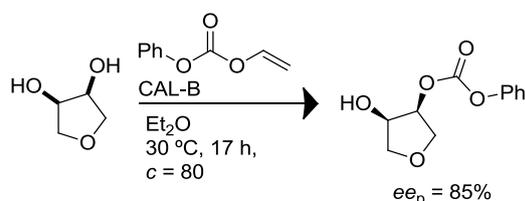
2.3.3. Resolución enzimática de 3,4-dihidroxitetrahydrofurano

En este grupo de investigación se describió la síntesis y resolución o bien asimetrización de 3,4-dihidroxitetrahydrofuranos.⁶⁷ A partir de los derivados *trans* diacetilados se lograron altas enantioselectividades en los procesos de hidrólisis catalizados por la lipasa PSL-C (Esquema 31).



Esquema 31. Hidrólisis enzimática del compuesto (\pm)-*trans*-3,4-diacetoxitetrahydrofurano.

Por otro lado, al tratarse de la asimetrización de los derivados *cis*, los mejores resultados fueron obtenidos mediante procesos de acilación enzimática (Esquema 32).



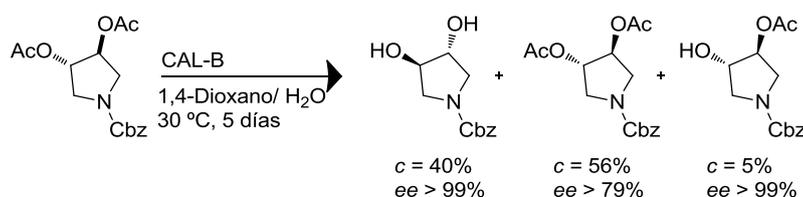
Esquema 32. Alcoxycarbonilación enzimática del compuesto (\pm)-*cis*-dihidroxitetrahydrofurano.

2.3.4. Resolución enzimática de 3,4-dihidroxipirrolidina

De forma análoga a los derivados del furano, se resolvieron las *trans*-3,4-dihidroxipirrolidinas.⁶⁸ En este caso los mejores resultados tanto en conversión como en enantioselectividad, se obtuvieron en los procesos de hidrólisis enzimática de los derivados acetilados al ser la reacción catalizada por la lipasa CAL-B (Esquema 33).

⁶⁷ V. Recuero, R. Brieva, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1684-1688.

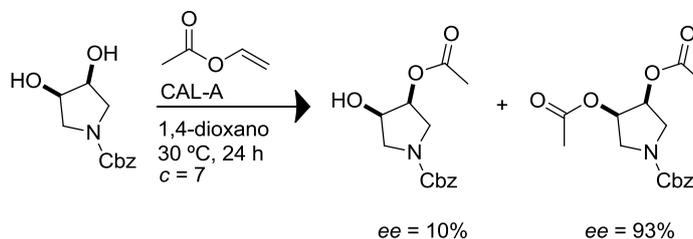
⁶⁸ J. A. Rodríguez-Rodríguez, R. Brieva, V. Gotor, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 6789-6796.



Esquema 33. Hidrólisis enzimática del compuesto (\pm)-*trans*-3,4-diacetoxy-1-benciloxycarbonilpirrolidina.

Se puede obtener de forma enantiopura tanto el sustrato como el producto de reacción dependiendo de la conversión alcanzada. En el esquema se muestra el resultado obtenido cuando la conversión alcanza el 40%.

En la desimetrización de los derivados *cis* (Esquema 34), tanto las pruebas de hidrólisis como las de acilación con varios derivados acilados diferentes, dieron lugar a conversiones bajas.



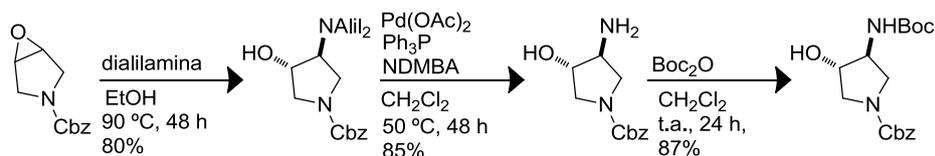
Esquema 34. Acilación enzimática del compuesto (\pm)-*cis*-1-benciloxycarbonil-3,4-dihidroxi-1-pirrolidina.

2.3.5. Resolución enzimática de *trans*-3-amino-4-hidroxi-1-pirrolidina

Por último, en este grupo de investigación se llevó a cabo la síntesis y resolución de (\pm)-*trans*-3-amino-4-hidroxi-1-pirrolidinas.⁶⁹ Se sintetizaron varios derivados con distintos sustituyentes en el grupo amino con el objetivo de probar su efecto en los procesos biocatalíticos. La ruta sintética se muestra en el Esquema 35.

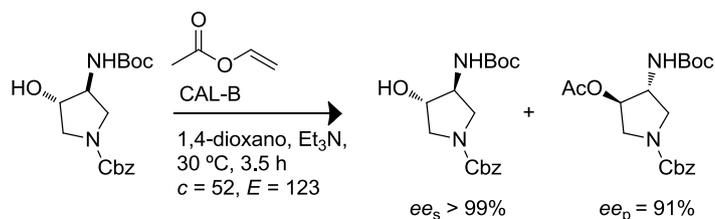
⁶⁹ J. A. Rodríguez-Rodríguez, F. J. Quijada, R. Brieva, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 5407-5412.

Capítulo 2



Esquema 35. Síntesis de (\pm) -*trans*-3-amino-4-hidroxipirrolidinas

En los procesos de acilación enzimática se observaron excelentes resultados cuando el derivado protegido con Boc es catalizado por la lipasa CAL-B (Esquema 36).



Esquema 36. Acilación enzimática de los aminoalcoholes objeto de estudio.

En vista de los buenos resultados obtenidos en la resolución de las *trans*-3-amino-4-hidroxipirrolidinas mediante procesos de acilación enzimática, y, teniendo en cuenta su importancia debido a su amplia presencia en compuestos biológicamente activos, tal como se ha puesto de manifiesto en la introducción de este capítulo, se planteó como objetivo la síntesis y resolución tanto del *cis*-3-amino-4-hidroxipirrolidina como de los *cis* y *trans* 3-amino-4-hidroxitetrahidrofuranos

Además, se llevó a cabo la síntesis y posterior resolución de las *trans*-bromohidrinias vecinales tetrahidrofuránicas y pirrolidínicas, puesto que, son precursoras de los aminoalcoholes *cis*, así como de otros compuestos, mediante procesos S_N2.

Objetivos

Objetivos

En la introducción de este capítulo ha quedado patente la importancia de las bromohidrinas y los aminoalcoholes tetrahidrofuránicos y pirrolidínicos como precursores de moléculas de interés biológico, ésto, unido a la capacidad de las lipasas para llevar a cabo transformaciones estereoselectivas ha dado lugar al planteamiento de los siguientes objetivos:

- Preparación de forma racémica de los derivados *trans*-3-bromo-4-hidroxitetrahidrofurano y *trans*-3-bromo-4-hidroxi-pirrolidina.
- Resolución enzimática de los mismos y posterior asignación de su configuración absoluta.
- Preparación de forma racémica de los derivados *cis* y *trans* del 3-amino-4-hidroxitetrahidrofurano y del *cis*-3-amino-4-hidroxi-pirrolidina.
- Resolución enzimática de los mismos y posterior asignación de su configuración absoluta.

Resultados y discusión

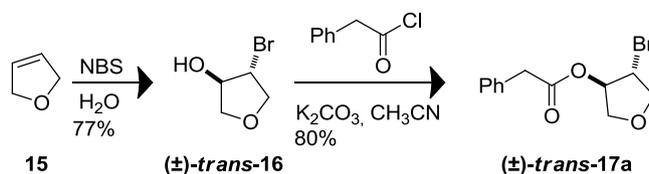
2.4. Síntesis y resolución de bromohidrinas heterocíclicas

Teniendo en cuenta la utilidad de los procesos biocatalíticos en la resolución de compuestos heterocíclicos hidroxilados mostrados en los antecedentes, se propone llevar a cabo la síntesis y resolución de bromohidrinas heterocíclicas de cinco miembros mediante los procesos quimioenzimáticos que se describen a continuación.

En general, se han estudiado procesos enzimáticos de acilación del grupo hidroxilo y procesos de hidrólisis de derivados acilados del mismo.

2.4.1. Síntesis y resolución de *trans*-3-bromo-4-hidroxi-tetrahidrofurano

Inicialmente se estudió la hidrólisis enzimática del (\pm)-*trans*-3-bromo-4-fenilacetoxitetrahidrofurano (**(\pm)-*trans*-17a**), el cual fue preparado con alto rendimiento mediante el proceso que se describe a continuación (Esquema 37). Cabe mencionar que el motivo por el cual se elige este éster es su facilidad a la hora de ser detectado por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) debido a la presencia de un grupo cromóforo.



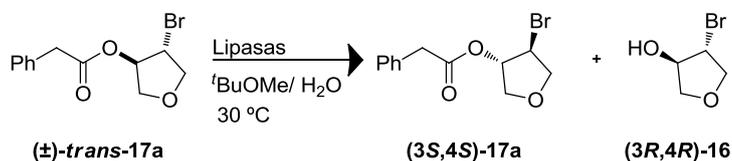
Esquema 37. Síntesis de los compuestos (**(\pm)-*trans*-16**) y (**(\pm)-*trans*-17a**).

En primer lugar se trató el 2,5-dihidrofurano **15** con *N*-bromosuccinimida en H₂O, obteniéndose la bromohidrina (**(\pm)-*trans*-16**). Sin necesidad de una purificación posterior, ésta se esterifica con cloruro de 2-fenilacetilo en CH₃CN, lo cual permitió

Capítulo 2

aislar, tras cromatografía de columna, el compuesto deseado (**±**)-**trans-17a** con un alto rendimiento.

A continuación se llevó a cabo la resolución cinética enzimática del éster racémico mediante procesos de hidrólisis (Esquema 38), estudiando los diferentes parámetros de reacción.



Esquema 38. Hidrólisis enzimática del compuesto (**±**)-**trans-17a** (configuración obtenida con la lipasa CAL-B).

La progresión de las reacciones fue seguido mediante la técnica de cromatografía de capa fina (TLC), no obstante, con el fin de poder calcular las conversiones de las biotransformaciones, así como los excesos enantioméricos tanto de sustrato como de producto, fue necesario optimizar las condiciones de separación de sus enantiómeros. Para ello, se seleccionó la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) empleando una columna de relleno quiral.

Una vez obtenida la separación, se comenzó con el estudio de los procesos enzimáticos. Inicialmente, se probaron cinco lipasas bajo dos condiciones de reacción diferentes: usando 10 equivalentes de H₂O en disolvente orgánico, o bien en proporción 2:1 de disolvente orgánico y H₂O (Tabla 4).

Tras una primera prueba con distintas lipasas, 10 equivalentes de H₂O y *t*BuOMe a 30 °C como disolvente (entradas 1-3) se observaron grandes diferencias. La lipasa CAL-B hidroliza enantioselectivamente el éster de configuración (3*R*,4*R*) permitiendo aislar el alcohol enantiopuro y el éster remanente de configuración (3*S*,4*S*) con elevada pureza óptica tras 16 horas de reacción (entrada 2). Sin embargo, bajo estas condiciones, tanto la lipasa

CAL-A como la AK (entradas 1 y 3) son poco activas y muestran una baja enantioselectividad.

Tabla 4. Hidrólisis enzimática del compuesto (\pm)-**trans-17a** en t BuOMe a 30 °C.

Entrada	Lipasa	H ₂ O	t (h)	ees ^a (%)	ee _p ^a (%)	c ^b (%)	E ^c
1	CAL-A	10 eq	22	59	27	69	3
2	CAL-B	10 eq	16	>99	>99	50	>200
3	AK	10 eq	22	33	61	35	6
4	CAL-A	t BuOMe/H ₂ O 2:1	17	86	31	73	5
5	CAL-B	t BuOMe/H ₂ O 2:1	17	97	83	54	45
6	TL-IM	t BuOMe/H ₂ O 2:1	22	16	37	30	3
7	PS-SD	t BuOMe/H ₂ O 2:1	8 días	4	21	16	2

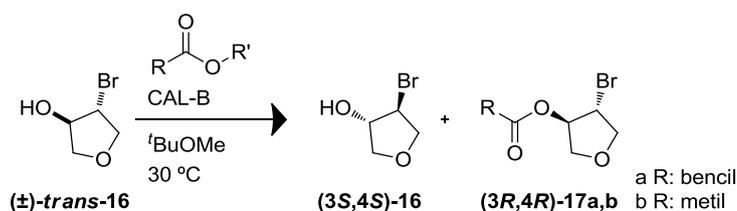
^a Excesos enantioméricos de sustrato (*ees*) y de producto (*ee_p*) determinados por HPLC. ^b $c = ees / (ees + ee_p)$. ^c $E = \ln[(1-c)(1 - ees)] / \ln[(1-c)(1 + ees)]$.³²

En las biotransformaciones cuyo disolvente fue el sistema t BuOMe/ H₂O 2:1 (entradas 4-7), la velocidad aumentó ligeramente, sin embargo, la enantioselectividad fue siempre baja. El mejor de los resultados fue obtenido al catalizar la reacción con la lipasa CAL-B (entrada 5), pero aún así, tanto los excesos enantioméricos como las enantioselectividades fueron inferiores a las obtenidas con 10 equivalentes de H₂O.

Cabe mencionar que fue observada diferente preferencia estereoquímica dependiendo de la lipasa utilizada, catalizando la hidrólisis del éster (3*R*,4*R*) la CAL-B, AK y TL-IM mientras que, tanto la lipasa CAL-A como la PS-SD catalizan la hidrólisis del éster (3*S*,4*S*).

Se estudió también el proceso enzimático de acilación, para ello, se utilizó la lipasa CAL-B dado que había mostrado una alta enantioselectividad en los procesos de hidrólisis llevados a cabo anteriormente (Esquema 39).

Capítulo 2



Esquema 39. Acilación enzimática del compuesto **(±)-trans-16**.

Inicialmente se prueban las condiciones de reacción habituales en este tipo de procesos: acetato de vinilo como donador de acilo en *t*BuOMe a 30 °C (Tabla 5).

Tabla 5. Acilación enzimática del compuesto **(±)-trans-16** en *t*BuOMe a 30°C.

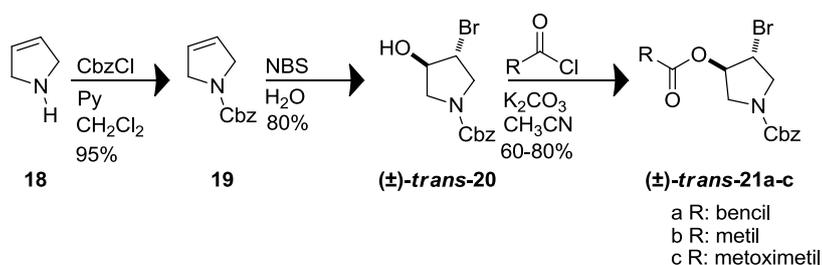
Entrada	R	R'	<i>t</i> (h)	<i>ees</i> ^a (%)	<i>ee_p</i> ^a (%)	<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i> ^c
1	Metil	vinil	48	14	42	25	3
2	Bencil	etil	48	38	56	40	5

^a Excesos enantioméricos de sustrato (*ees*) y de producto (*ee_p*) determinados por HPLC. ^b $c = ees / (ees + ee_p)$. ^c $E = \ln[(1-c)(1-ees)] / \ln[(1-c)(1+ees)]$.³²

En este caso (entrada 1), tras 48 horas de reacción la enantioselectividad alcanzada fue baja, por lo que, para intentar mejorar los resultados se cambió el agente de acilación. Se utilizó el acetato de bencilo (entrada 2) puesto que se obtendrían los mismos productos que en el caso de hidrólisis. Sin embargo, a pesar de que tras 2 días de reacción se alcanzó una conversión del 40%, la enantioselectividad fue mucho más baja que el proceso de hidrólisis.

2.4.2. Síntesis y resolución de *trans*-3-bromo-4-hidroxi-pirrolidinas

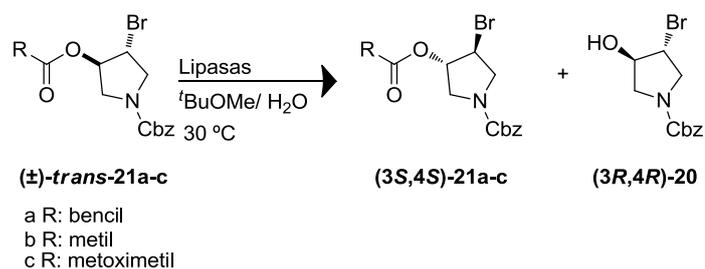
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la resolución de las bromohidrinas derivadas del tetrahydrofurano **(±)-trans-17a**, se procedió al estudio de sus análogos de pirrolidina comenzando por la hidrólisis del sustrato **(±)-trans-21a** el cual se sintetizó utilizando la misma metodología que en el caso de los derivados tetrahydrofuránicos (Esquema 40).



Esquema 40. Síntesis de los compuestos **(±)-trans-20** y **(±)-trans-21a-c**.

Al tratarse de una pirrolidina, en un primer paso fue necesaria la protección del nitrógeno. Para ello, se decidió usar como grupo protector el CbzCl: por un lado, por comparación con el trabajo realizado en este grupo de investigación, en el que previamente se utilizó tanto en asimetrización como en resolución enzimática de los *cis* y *trans* 3,4-dihidroxi-pirrolidinas⁶⁸ respectivamente, o bien en la resolución de las *trans*-3-amino-4-hidroxi-pirrolidinas.⁶⁹ Por otro lado, al tratarse de un grupo cromóforo, permite ser detectado con facilidad en el HPLC quiral, para el seguimiento de las reacciones enzimáticas.

En primer lugar, se estudiaron las reacciones de hidrólisis de los ésteres **(±)-trans-21a-c** (Esquema 41).



Esquema 41. Hidrólisis enzimática de los compuestos **(±)-trans-21a-c**.

Como primer sustrato se escogió el **(±)-trans-21a** debido a su similitud con el **(±)-trans-17a** resuelto anteriormente. Inicialmente se reprodujeron las condiciones de reacción ya descritas (Tabla 6).

Capítulo 2

Tabla 6. Hidrólisis enzimática de los compuestos (**±**)-*trans*-**21a-c** en ^tBuOMe a 30 °C.

Entrada	Sustrato	Lipasa	H ₂ O	t (días)	ees ^a (%)	ee _p ^a (%)	c ^b (%)	E ^c
1	(±)- <i>trans</i> - 21a	CAL-B	10 eq	12	25	89	22	23
2	(±)- <i>trans</i> - 21a	CAL-A	10 eq	1	5	12	31	1
3	(±)- <i>trans</i> - 21a	CAL-B	^t BuOMe /H ₂ O 2:1	7	17	88	16	18
4	(±)- <i>trans</i> - 21a	AK	^t BuOMe /H ₂ O 2:1	7	1	15	8	1
5	(±)- <i>trans</i> - 21a	TL-IM	^t BuOMe /H ₂ O 2:1	7	6	66	8	5
6	(±)- <i>trans</i> - 21b	CAL-B	10 eq	2	76	91	46	50
7	(±)- <i>trans</i> - 21c	CAL-B	10 eq	9 h	>99	>99	50	>200

^a Excesos enantioméricos de sustrato (*ees*) y de producto (*ee_p*) determinados por HPLC. ^b $c = ees / (ees + ee_p)$. ^c $E = \ln[(1-c)(1 - ees)] / \ln[(1-c)(1 + ees)]$.³²

Sin embargo, tanto en la hidrólisis catalizada por CAL-B como por CAL-A se obtuvieron enantioselectividades moderadas. En el caso de la reacción catalizada por la lipasa CAL-B (entrada 1), tras 12 días de reacción sólo se alcanzó un 22% de conversión y aunque para la lipasa CAL-A (entrada 2) se apreció un ligero aumento en la velocidad y en la conversión, la enantioselectividad alcanzada fue muy baja.

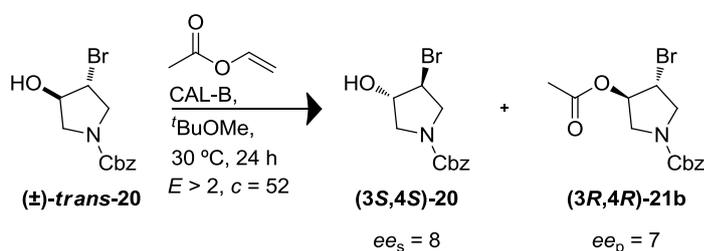
A continuación, se llevó a cabo la reacción usando un disolvente orgánico 2:1 en H₂O (entradas 3-5), siendo utilizado inicialmente el ^tBuOMe como disolvente y las enzimas CAL-B, AK, TL-IM como catalizadores, observándose tras 7 días de reacción bajas enantioselectividades. Para demostrar la influencia de los disolventes en la catálisis, se amplió el estudio utilizando dioxano, tolueno, CH₃CN y THF bajo las mismas condiciones, pero los resultados alcanzados no fueron mejores que el obtenido en ^tBuOMe.

Teniendo en cuenta estos resultados se decidió modificar el sustrato de partida, siendo sintetizados los derivados **(±)-trans-21b** y **(±)-trans-21c**.

En ambos casos se llevó a cabo la hidrólisis con CAL-B y 10 equivalentes de H₂O en *t*BuOMe a 30 °C, puesto que, con el sustrato **(±)-trans-21a**, en estas condiciones se obtuvo una enantioselectividad más alta.

Los resultados obtenidos con el éster **(±)-trans-21b**, se muestran en la entrada 6 de la tabla. Tras 2 días de reacción tanto la conversión como la enantioselectividad fueron mayores que en el caso del derivado **(±)-trans-21a**. Con el fin de mejorar estos resultados, se decidió usar un éster más activado, eligiéndose en este caso el compuesto **(±)-trans-21c**. Efectivamente, tras 9 horas de reacción se consiguió alcanzar una conversión del 50%. Además en este caso el proceso muestra una enantioselectividad muy alta, obteniéndose tanto el enantiómero (3*R*,4*R*) del alcohol y como el enantiómero (3*S*,4*S*) del sustrato remanente ópticamente puros (entrada 7).

Finalmente, se probó también la acilación enzimática del derivado **(±)-trans-20** (Esquema 42)



Esquema 42. Hidrólisis enzimática del compuesto **(±)-trans-20**.

La reacción fue llevada a cabo en *t*BuOMe a 30 °C como disolvente y acetato de vinilo como agente de acilación, siendo la lipasa CAL-B la enzima elegida para el proceso. Tras 24 horas de

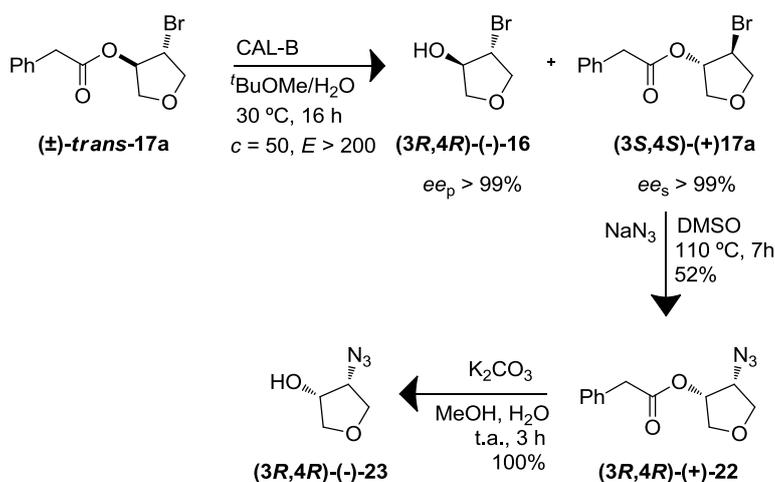
Capítulo 2

reacción se alcanzó el 50% de conversión obteniéndose una enantioselectividad más baja que en el proceso de hidrólisis.

2.4.3. Asignación de la configuración absoluta

Finalmente, las configuraciones absolutas del sustrato y del producto se establecieron por comparación con los valores de las rotaciones ópticas de los compuestos enantioméricamente puros descritos en la bibliografía.^{63,70} Las configuraciones encontradas para los productos son las predichas por la regla de Kazlauskas.⁷¹

2.4.3.1. Configuración absoluta del compuesto *trans*-3-bromo-4-fenilacetoxitetrahidrofurano



Esquema 43. Síntesis del compuesto enantiopuro **(3R,4R)-(-)-23**.

El sustrato ***trans*-(+)-17a** enantiopuro (Esquema 43), se disuelve en DMSO seco y se trata con NaN_3 para dar la azida ***cis*-(+)-22**. El éster se hidroliza en una mezcla de K_2CO_3 , MeOH y H_2O durante 3 horas. El producto obtenido es el ***cis*-(-)-23**, cuya rotación óptica se corresponde con la configuración $(3R,4R)$ descrita en la

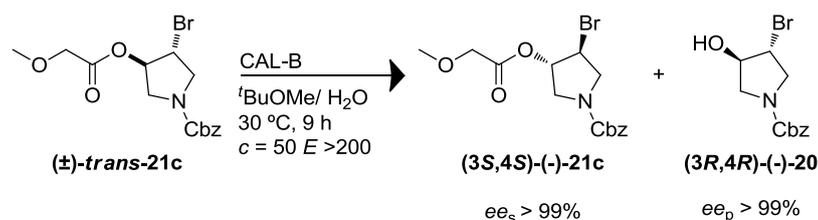
⁷⁰ A. Kamal, A. A. Sahik, M. Sandbhor, M. S. Malik, S. Azeeza, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2876-2883.

⁷¹ a) R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665; b) K. Lemke, M. Lemke, F. Theil, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6268-6273.

bibliografía para este compuesto,⁶³ lo que permitió asignar al éster de partida la configuración **(3S,4S)-(+)-17a**.

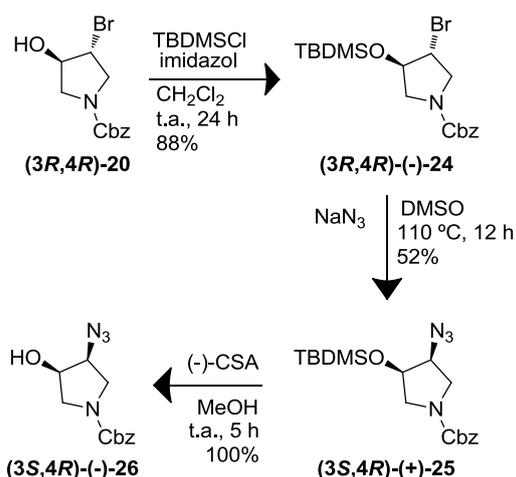
2.4.3.2. Configuración absoluta del compuesto *trans*-1-benciloxicarbonil-3-bromo-4-hidroxipirrolidina

En este caso se utilizó la bromohidrina *trans*-(-)-**20** obtenida de la reacción de hidrólisis enzimática del compuesto **(±)-*trans*-21c** (Esquema 44).



Esquema 44. Reacción de hidrólisis del compuesto **(±)-*trans*-21c**.

La bromohidrina *trans*-(-)-**20** (Esquema 45), se protegió con TBDMSCl en CH₂Cl₂ e imidazol y una vez purificado el producto se realizó una reacción S_N2 con NaN₃ en DMSO para dar el compuesto ***cis*-(+)-25**. Por último se desprotegió el alcohol utilizando (-)-CSA en metanol anhidro, obteniéndose la hidroxiazida ***cis*-(-)-26**. Al realizar la comparación de la rotación óptica con el mismo compuesto descrito en la bibliografía,⁷⁰ se asignó a este compuesto la configuración **(3S,4R)-(-)-26**, permitiendo también identificar la configuración de los precursores en la síntesis.



Esquema 45. Síntesis del compuesto enantiopuro (3S,4R)-(-)-26.

2.5. Síntesis y resolución de 3-amino-4-hidroxi-tetrahidrofuranos y pirrolidinas

Tal como se ha mencionado en la introducción de este capítulo, los aminoalcoholes vecinales son usados en organocatálisis como auxiliares quirales y como unidades estructurales en compuestos de interés biológico.

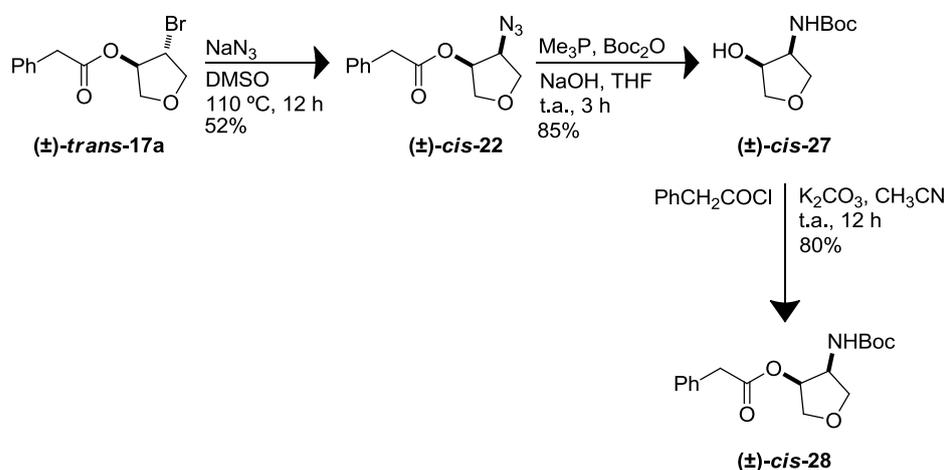
Teniendo en cuenta la resolución enzimática de la *trans*-3-amino-4-hidroxipirrolidina descrita en los antecedentes, el objetivo de esta investigación es ampliar este método de resolución a nuevas estructuras heterocíclicas. En todos los casos, se estudiarán los procesos de acilación e hidrólisis de los derivados acilados mediante reacciones catalizadas por lipasas.

2.5.1. Síntesis y resolución de (±)-*cis*-3-amino-4-hidroxi-tetrahidrofurano

La obtención de los aminoalcoholes *cis* se consigue a partir de las bromohidrininas mediante la sustitución del bromo por la azida en un proceso S_N2 en las mismas condiciones que el realizado para la asignación de la configuración de la bromohidrina ópticamente

pura (Esquema 45). Tal como se ha descrito,⁷⁰ el grupo hidroxilo ha de estar protegido para evitar su posible participación durante el proceso S_N2 , dando lugar a un epóxido intermedio que originaría mezclas de los isómeros *cis* y *trans*. En este caso, puesto que se disponía del éster **(±)-*trans*-17a**, cuya síntesis se ha descrito previamente, se utilizó como producto de partida para la preparación de los nuevos sustratos.

El compuesto **(±)-*trans*-17a** se trató con NaN_3 y se mantuvo a reflujo durante 12 horas y tras la purificación mediante cromatografía de columna se obtuvo el compuesto **(±)-*cis*-22**. La hidrólisis de la azida y la protección de la amina correspondiente se realizaron en un solo paso en las condiciones descritas en el esquema. Tras la purificación se obtiene el compuesto **(±)-*cis*-27** con alto rendimiento (Esquema 46).



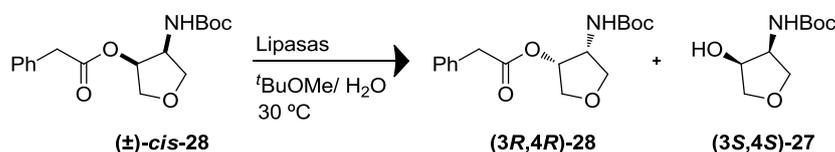
Esquema 46. Síntesis de los compuestos **(±)-*cis*-27** y **(±)-*cis*-28**.

El compuesto **(±)-*cis*-27** fue utilizado posteriormente como sustrato en los procesos de acilación enzimática, además, el grupo hidroxilo se esterificó de nuevo para obtener el éster **(±)-*cis*-28**, que se estudiará como sustrato en las reacciones enzimáticas de hidrólisis.

Capítulo 2

Como es habitual, el seguimiento de las reacciones se realizó mediante TLC y HPLC quiral, una vez optimizadas las condiciones para estos análisis.

La resolución enzimática del derivado **(±)-cis-28** se realizó mediante procesos de hidrólisis de acuerdo con siguiente esquema:



Esquema 47. Hidrólisis enzimática del compuesto **(±)-cis-28**

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la resolución de las bromohidrinas se utilizaron inicialmente las mejores condiciones de éstas, *t*-BuOMe como disolvente y 10 equivalentes de H₂O a 30 °C (Tabla 7).

Tabla 7. Hidrólisis enzimática del compuesto **(±)-cis-28** en *t*-BuOMe a 30 °C.

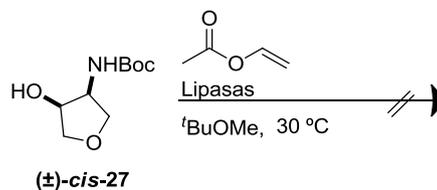
Entrada	Lipasa	<i>t</i> (días)	<i>ees</i> ^a (%)	<i>ee_p</i> ^a (%)	<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i> ^c
1	CAL-A	5	>99	>99	50	>200
2	CAL-A ^d	3	>99	>99	50	>200
3	CAL-B	10 h	>99	>99	50	>200

^a Excesos enantioméricos de sustrato (*ees*) y de producto (*ee_p*) determinados por HPLC. ^b $c = ees / (ees + ee_p)$. ^c $E = \ln[(1-c)(1-ees)] / \ln[(1-c)(1+ee_p)]$.³² ^d Doble proporción de enzima: sustrato

En estas condiciones se probaron una gran variedad de lipasas. Al usar como catalizador la lipasa de *Candida antarctica* tanto de tipo A como B, la reacción mostraba una excelente enantioselectividad y conversión, obteniéndose de manera enantiopura en ambos casos tanto el alcohol **(3S,4S)-27** como el éster **(3R,4R)-28** remanente. Aun mostrando ambas enzimas la misma enantioselectividad, la velocidad de reacción fue bastante diferente, ya que, en el caso de la CAL-B (entrada 3) se alcanzó un 50% de conversión en 10 horas, mientras que, para la lipasa CAL-A fueron necesarios 3 días de reacción y la adición de un equivalente más de catalizador (entrada 2). Sin embargo, para este sustrato tras

2 días de reacción no se observó conversión cuando se utilizaron las lipasas AK, TL-IM, PSL-IM y PSL-C como catalizadores.

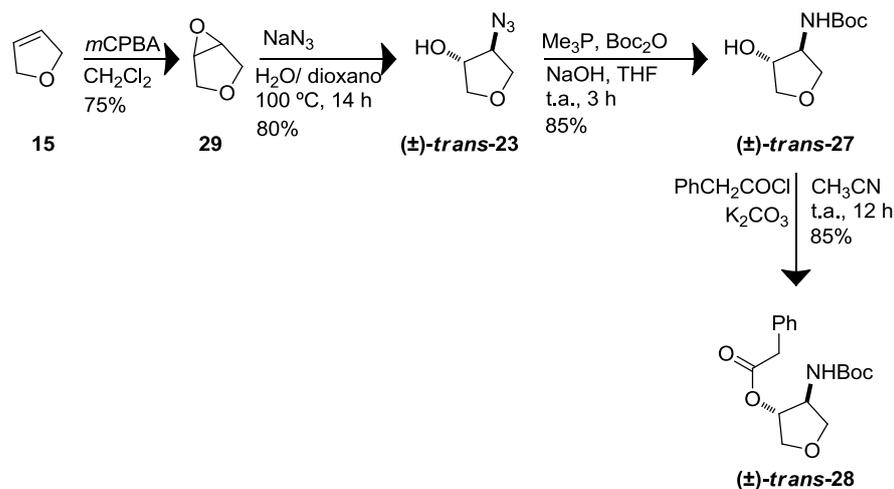
Se probó también a la acilación enzimática del sustrato **(±)-cis-27** (Esquema 48). Para ello, se utilizaron las enzimas CAL-A y CAL-B, puesto que, con ellas se obtuvieron los mejores resultados en los procesos de hidrólisis, sin embargo, en ninguno de los casos tras 3 días de reacción se detectó producto.



Esquema 48. Acilación enzimática del compuesto **(±)-cis-27**.

2.5.2. Síntesis y resolución de **(±)-trans-3-amino-4-hidroxi-tetrahidrofurano**

En vista de los buenos resultados obtenidos para el sustrato **(±)-cis-28** se planteó como siguiente objetivo la síntesis y posterior resolución de sus análogos tetrahidrofuránicos. Se comenzó con la resolución del compuesto **(±)-trans-28** (Esquema 49).

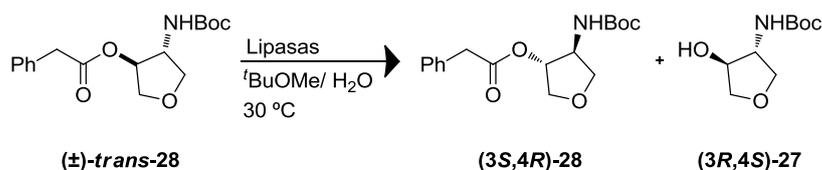


Esquema 49. Síntesis de los compuestos **(±)-trans-27** y **(±)-trans-28**.

Capítulo 2

El 2,5-tetrahidrofurano **15** se hizo reaccionar con *m*CPBA en CH₂Cl₂ conduciendo al correspondiente epóxido **29**. Éste se trató con NaN₃ en una mezcla H₂O: dioxano 4:1 a 100 °C dando lugar, con elevado rendimiento, a la correspondiente hidroxiazida (**±**)-**trans-23**. Llegados a este punto la síntesis se completa de manera análoga a la descrita para el compuesto (**±**)-**cis-28**.

El seguimiento de los procesos enzimáticos se realizó mediante TLC y HPLC. A continuación se llevó a cabo la hidrólisis enzimática del derivado (**±**)-**trans-28** (Esquema 50).



Esquema 50. Hidrólisis enzimática del compuesto (**±**)-**trans-28**.

Para comenzar, se utilizaron las mismas condiciones que para el compuesto (**±**)-**cis-28**, por lo que, se hizo un primer estudio con 10 equivalentes de H₂O en *t*BuOMe a 30 °C con las lipasas CAL-A y CAL-B (Tabla 8).

Tabla 8. Acilación enzimática del compuesto (**±**)-**trans-28** en *t*BuOMe a 30 °C

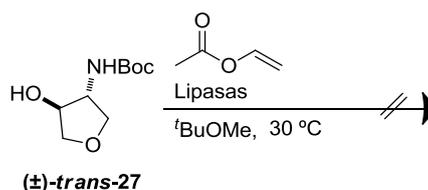
Entrada	Lipasa	<i>t</i> (días)	<i>ees</i> ^a (%)	<i>eep</i> ^a (%)	<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i> ^c
1	CAL-B	3 h	>99	>99	50	>200
2	CAL-A	7	>99	>99	50	>200

^a Excesos enantioméricos de sustrato (*ees*) y de producto (*eep*) determinados por HPLC. ^b $c = ees / (ees + eep)$. ^c $E = \ln[(1-c)(1 - ees)] / \ln[(1-c)(1 + eep)]$.³²

Al igual que en la resolución del derivado (**±**)-**cis-28**, se observó conversión en las reacciones catalizadas por ambas lipasas, sin embargo, la velocidad de las reacciones varió sustancialmente. En el caso del sustrato (**±**)-**trans-28** la reacción catalizada por CAL-B (entrada 1) alcanzó un 50% de conversión en tan solo 3 horas. La enantioselectividad del proceso fue muy elevada obteniéndose de manera enantiopura tanto el alcohol de configuración (3*R*,4*S*) como el éster remanente (3*S*,4*R*), estando la configuración del producto

obtenido de acuerdo con la predicha por la regla de Kazlauskas.⁷¹ Por otro lado, en el proceso catalizado por la lipasa CAL-A (entrada 2) a pesar de mostrar igualmente una elevada enantioselectividad, fueron necesarios 7 días de reacción para alcanzar una conversión del 50%.

Como en los casos anteriores, se estudió el proceso enzimático de acilación del compuesto **(±)-*trans*-27** (Esquema 51), utilizándose las mismas condiciones de reacción que en el caso del sustrato **(±)-*cis*-27**. De nuevo, los resultados obtenidos fueron poco satisfactorios, puesto que, tras 2 días no se observó reacción.



Esquema 51. Acilación enzimática del compuesto **(±)-*trans*-27**.

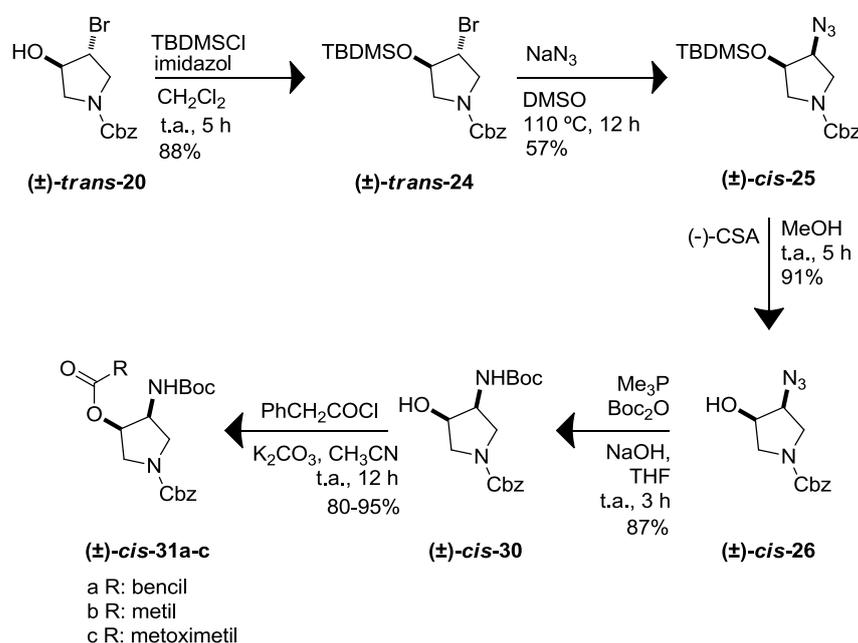
2.5.3. Síntesis y resolución de **(±)-*cis*-3-amino-4-hidroxi-pirrolidina**

Como se ha mostrado en los antecedentes, recientemente en este grupo de investigación se ha realizado con éxito la síntesis y posterior resolución del compuesto **(±)-*trans*-3-amino-4-hidroxi-pirrolidina**.⁶⁹ Teniendo en cuenta los resultados descritos en este trabajo, así como las excelentes resoluciones enzimáticas de los análogos tetrahidrofuránicos tanto de configuración *cis* como *trans* obtenidas en este capítulo, se procedió al estudio de la resolución del derivado **(±)-*cis*-3-amino-4-hidroxi-pirrolidina** **(±)-*cis*-30**.

Para la síntesis del mismo se partió de la bromohidrina **(±)-*trans*-20** (Esquema 52). Cabe mencionar que parte de esta síntesis fue descrita previamente para obtener la configuración absoluta de dicha bromohidrina en su forma enantiopura (Esquema 45).

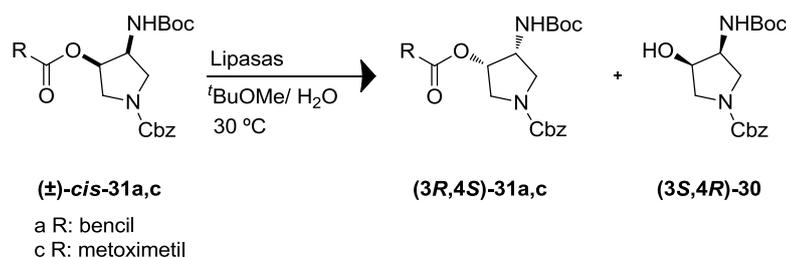
Capítulo 2

La ruta sintética difiere ligeramente de la descrita para el compuesto **(±)-cis-28**, debido a que, el rendimiento en el paso de protección del grupo hidroxilo previo al proceso S_N2 es mayor en este caso para la formación del derivado **(±)-trans-24** que la esterificación para dar el intermedio **(±)-trans-21a**. La hidrólisis de la azida **(±)-cis-26** y su protección como derivado *tert*-butoxicarbonilado se realizó en un solo paso de reacción por tratamiento con NaOH 1 N, Me₃P y Boc₂O en THF. El aminoalcohol **(±)-cis-30** obtenido se esterifica con el correspondiente agente de acilación en presencia de K₂CO₃ conduciendo a los derivados **(±)-cis-31a-c** que se estudiarán como sustratos en los procesos enzimáticos de hidrólisis.



Esquema 52. Síntesis de los compuestos **(±)-cis-30** y **(±)-cis-31a-c**.

Una vez sintetizados los compuestos de interés, se procedió a la hidrólisis enzimática (Esquema 53):



Esquema 53. Hidrólisis enzimática de los compuestos $(\pm)\text{-cis-31a-c}$.

Teniendo en cuenta que, los mejores resultados se habían obtenido con las lipasas *Candida antarctica* (tanto la CAL-A como la CAL-B), se decidió estudiar en primer lugar los procesos de hidrólisis catalizados por ambas enzimas en las mismas condiciones: $t\text{BuOMe}$, 10 equivalentes de H_2O y manteniendo la agitación orbital a $30\text{ }^\circ\text{C}$ (Tabla 9).

Tabla 9. Hidrólisis enzimática de los compuestos $(\pm)\text{-cis-31a-c}$ en $t\text{BuOMe}$ a $30\text{ }^\circ\text{C}$.

Entrada	Sustrato	Lipasa	t (días)	ees ^a (%)	eep ^a (%)	c ^b (%)	E ^c
1	$(\pm)\text{-cis-31a}$	CAL-A	2	>99	>99	50	>200
2	$(\pm)\text{-cis-31a}$	CAL-B	2	---	---	---	---
3	$(\pm)\text{-cis-31c}$	CAL-A	1	>99	>99	50	>200
4	$(\pm)\text{-cis-31c}$	CAL-B	10 h	>99	>99	50	>200

^a Excesos enantioméricos de sustrato (ees) y de producto (eep) determinados por HPLC. ^b $c = ees / (ees + eep)$. ^c $E = \ln[(1-c)(1 - ees)] / \ln[(1-c)(1 + ees)]$.³²

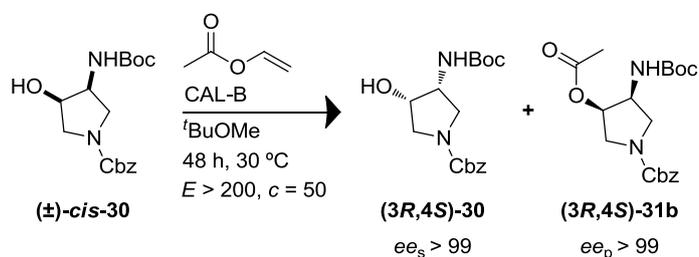
Tras la primera prueba con el sustrato $(\pm)\text{-cis-31a}$, se observaron claras diferencias entre las biotransformaciones catalizadas por las dos lipasas (entradas 1 y 2), ya que, en el caso de la CAL-A el proceso fue altamente enantioselectivo y tras 2 días de reacción se alcanzó una conversión del 50% permitiendo obtener tanto el producto de la reacción $(3S,4R)\text{-30}$ como el éster remanente $(3R,4S)\text{-31a}$ enantioméricamente puros, sin embargo, en el caso de la lipasa CAL-B, bajo estas mismas condiciones, no se observó reacción.

Teniendo en cuenta estos resultados y basándose en la experiencia adquirida en la resolución de los compuestos previos en

Capítulo 2

este capítulo, se decidió probar un éster más activado **(±)-cis-31c**, llevando a cabo su hidrólisis en las mismas condiciones de reacción que con el sustrato **(±)-cis-31a**. En el caso de la lipasa CAL-A (entrada 3) la enantioselectividad fue igualmente muy alta lográndose tiempos de reacción más cortos puesto que el 50% de conversión se alcanzó en tan solo un día. En los procesos catalizados por CAL-B (entrada 4) queda patente la influencia del sustrato dado que no solo se obtuvieron compuestos altamente enantioenriquecidos ($ee > 99$), sino que, el 50% de la conversión se alcanzó tras 10 horas de reacción, observándose la misma preferencia estereoquímica en ambas lipasas, como se detalla más adelante.

Por último se llevó a cabo la acilación enzimática del sustrato **(±)-cis-30** (Esquema 54).



Esquema 54. Acilación enzimática del compuesto **(±)-cis-30**.

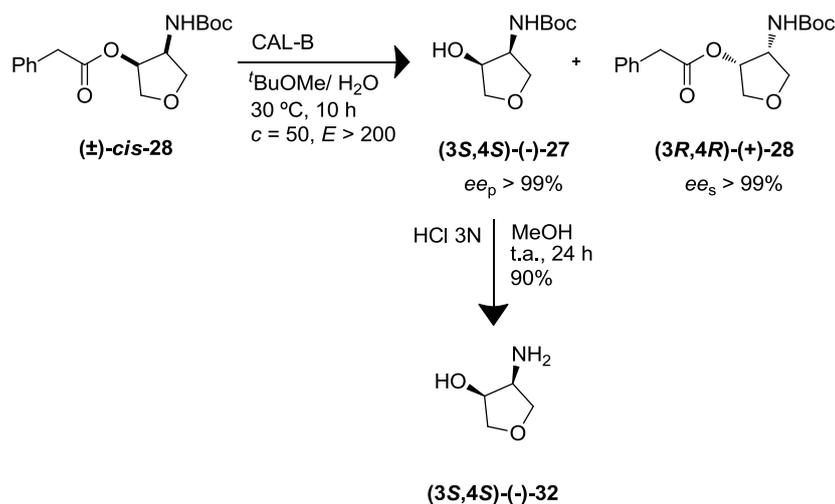
El proceso se llevó a cabo en *t*BuOMe a 30 °C, con 5 equivalentes de acetato de vinilo y CAL-B como catalizador. Éste, a diferencia de los derivados del furano **(±)-cis-** y **(±)-trans-27**, resultó ser un excelente sustrato para la reacción de acilación catalizada por la lipasa CAL-B puesto que, tras 2 días de reacción se alcanzó una conversión del 50% y tanto el producto como el sustrato remanente se obtuvieron de forma enantiopura.

2.5.4. Asignación de la configuración absoluta

La determinación de la configuración de los compuestos enantiopuros obtenidos en las reacciones enzimáticas, se realizó por comparación con productos previamente descritos en la bibliografía.

2.5.4.1. Configuración absoluta del compuesto *cis*-3-*tert*-butoxicarbonilamino-4-hidroxitetrahidrofurano

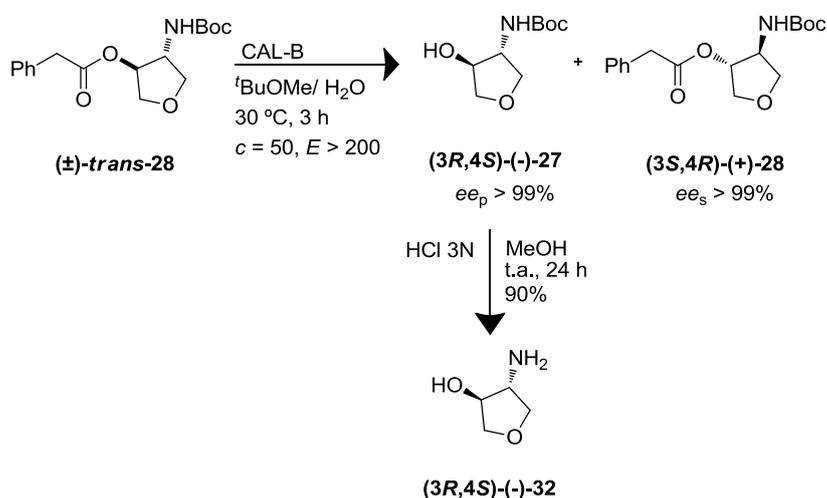
En este caso, solamente fue necesaria la desprotección del grupo amino en el compuesto *cis*-(-)-**27** obtenido como producto de la hidrólisis enzimática (Esquema 55). Para ello, se disolvió el producto enantiopuro, *cis*-(-)-**27** en una mezcla de metanol/ HCl 3N durante 24 horas. La comparación del signo de la rotación óptica de este compuesto con el previamente descrito en la bibliografía,⁶³ permitió tanto asignar la configuración **(3S,4S)-(-)-32** al aminoalcohol como averiguar la configuración del resto de compuestos obtenidos en la reacción de hidrólisis enzimática.



Esquema 55. Confirmación de la configuración del compuesto **(3S,4S)-(-)-32**.

2.5.4.2. Configuración absoluta del compuesto *trans*-3-*tert*-butoxicarbonilamino-4-hidroxitetrahidrofurano

La desprotección se realizó de la misma manera que en el caso anterior, corroborándose también la configuración esperada al obtener mediante la hidrólisis del compuesto *trans*-(-)-27 el aminoalcohol (3*R*,4*S*)-(-)-32.⁶³

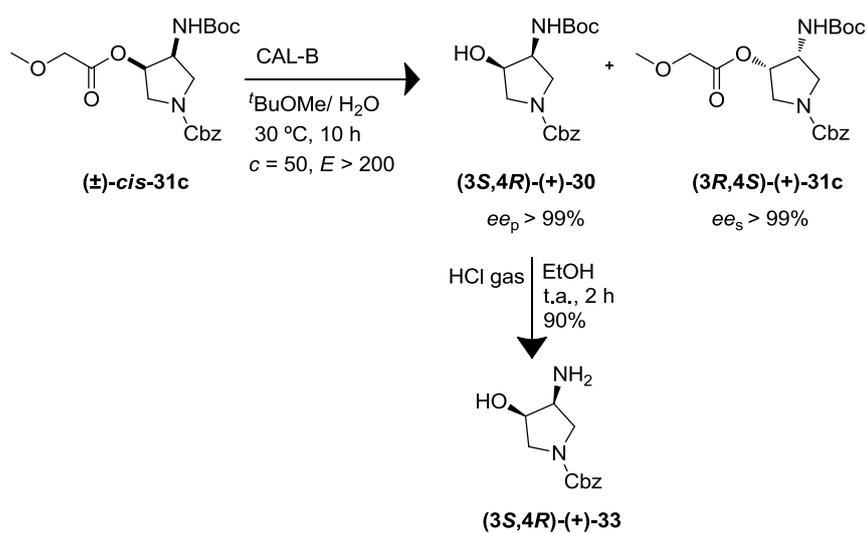


Esquema 56. Confirmación de la configuración del compuesto (3*R*,4*S*)-(-)-32.

2.5.4.3. Configuración absoluta del compuesto *cis*-1-benciloxicarbonil-3-*tert*-butoxicarbonilamino-4-hidroxi-pirrolidina

En este caso la desprotección transcurre con un mayor rendimiento mediante la disolución del compuesto enantiopuro *cis*-(+)-30 en etanol saturado con HCl, obteniéndose tras 2 horas de reacción a temperatura ambiente el compuesto cuya rotación óptica tiene el signo opuesto al compuesto de configuración (3*S*,4*R*) descrito en la bibliografía.⁶¹

Resultados y discusión



Esquema 57. Confirmación de la configuración absoluta del compuesto **(3S,4R)-(+)**33.

Conclusiones

Conclusiones

En este capítulo ha descrito la síntesis química y posterior resolución de las (\pm)-*trans*-3-bromo-4-hidroxitetrahydrofurano, (\pm)-*trans*-3-bromo-4-hidroxi-pirrolidina, (\pm)-*cis* y (\pm)-*trans*-3-amino-4-hidroxitetrahydrofurano, (\pm)-*cis*-3-amino-4-hidroxi-pirrolidina y derivados de estos compuestos.

Tanto la lipasa de *Candida antarctica* de tipo A como B han catalizado con excelente enantioselectividad las reacciones de hidrólisis de los sustratos propuestos así como la reacción de acilación del derivado (\pm)-*cis*-1-benciloxicarbonil-3-*tert*-butoxicarbonilamino-4-hidroxi-pirrolidina.

Por último se han realizado las transformaciones químicas necesarias para determinar la configuración absoluta de los productos de las reacciones enzimáticas mediante la comparación del valor de la rotación óptica de estos compuestos enantiopuros con los descritos previamente en la bibliografía.

Parte experimental

2.6. General

Los reactivos, biocatalizadores, disolventes y técnicas de análisis han sido detalladas en la parte experimental del primer capítulo con las excepciones que se muestran a continuación.

2.6.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El seguimiento de las reacciones tanto de acilación como de hidrólisis enzimática así como la medida de los excesos enantioméricos de sustratos y productos, se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100. Para ello se emplearon, además de las columnas quirales que se han mencionado en el primer capítulo la Chiralpak IA (25 × 0.46 cm) y Chiralcel OJ-H (0.46 x 25 cm). La detección empleada fue visible-ultravioleta a 210 y 215 nm, utilizando como fase móvil mezclas en distintas proporciones de hexano/isopropanol.

2.7. Procedimientos sintéticos

2.7.1. Procedimiento general para hidrólisis enzimática

El correspondiente éster (**±**)-*trans*-17a, (**±**)-*trans*-21a,c, (**±**)-*cis*-28, (**±**)-*trans*-28 o (**±**)-*cis*-31a-c (0.04 mmol), se disuelve en ^tBuOMe (400 μL) y se añade la lipasa (15.0 mg) y 10 equivalentes de H₂O. La mezcla se agita a 30 °C y 250 rpm en un agitador orbital. El progreso de la reacción se monitoriza tanto por HPLC quiral como por TLC hasta que se consigue la conversión adecuada. La enzima se elimina por filtración y se lava con ^tBuOMe. El crudo se purifica por cromatografía de columna (20 al 70% AcOEt/ hexano).

2.7.2. Procedimiento general para la acilación enzimática

El correspondiente (**±**)-*trans*-16, (**±**)-*trans*-20, (**±**)-*cis*-27, (**±**)-*trans*-27 o (**±**)-*cis*-30 (0.04 mmol) se disuelve en ^tBuOMe (400 μL) y

Capítulo 2

se añade la lipasa (15.0 mg) y 5 equivalentes de agente de acilación. La mezcla se agita a 30 °C y 250 rpm en un agitador orbital. El progreso de la reacción se monitoriza tanto por HPLC quiral como por TLC hasta que se consigue la conversión adecuada. La enzima se elimina por filtración y lavado con ^tBuOMe. El crudo se purifica por cromatografía de columna (20 al 70% AcOEt/ hexano).

2.7.3. Síntesis del compuesto 1-benciloxicarbonil-2,5-dihidropirrol. 19

Se añade CbzCl (5.2 mL, 36.2 mmol) gota a gota a 0 °C sobre una mezcla que contiene **18** (1.0 g, 14.5 mmol) y Py (2.9 mL, 36.2 mmol) disueltos en 40 mL de CH₂Cl₂. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 12 horas. A continuación se evapora el disolvente y se purifica por cromatografía de columna (30% AcOEt/hexano). Se obtiene el producto deseado con un 95% de rendimiento.

2.7.4. Procedimiento general para la preparación de las bromohidrinas (±)-*trans*-16 y (±)-*trans*-20

Se prepara una disolución de *N*-bromosuccinimida (NBS) (650.0 mg, 3.7 mmol) en 3 mL de H₂O, y se enfría en un baño de hielo. A ésta, se añaden 2.5 mmol del compuesto **15** o **19**. La reacción se agita durante 4 horas a temperatura ambiente, tras lo cual, se añade Et₂O (3 x 15 mL), se lava con salmuera y la fase orgánica se seca con Na₂SO₄. El disolvente se evapora bajo presión reducida, obteniéndose un crudo de reacción amarillo/ naranja con un 70-80% de rendimiento. En los casos en los que se requiere la bromohidrina pura, ésta se purifica por cromatografía de columna (40% AcOEt/ hexano) obteniéndose un aceite amarillo con un 77%-80% de rendimiento tras la purificación.

2.7.5. Síntesis de los ésteres (\pm)-*trans*-17a,b y (\pm)-*trans*-21a-c

A una disolución del crudo de la bromohidrina (\pm)-*trans*-16 o (\pm)-*trans*-20 (3.0 mmol) en CH₃CN (30 mL), se añade el correspondiente cloruro de acilo (4.6 mmol) y K₂CO₃ (623.0 mg, 3.0 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 12 horas. Seguidamente el disolvente se evapora bajo presión reducida y se añade AcOEt (25 mL). La mezcla se lava con H₂O (3 x 15 mL) y la fase orgánica se seca con Na₂SO₄. El disolvente se evapora bajo presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía de columna (20% AcOEt/ hexano) obteniéndose aceites amarillos con un rendimiento 60-80%.

2.7.6. Síntesis de (3*R*,4*R*)-3-azido-4-fenilacetoxitetra-hidrofurano. (3*R*,4*R*)-22

Al sustrato puro (3*S*,4*S*)-17a (30.0 mg, 0.1 mmol) obtenido por la hidrólisis con CAL-B se le añade bajo atmósfera de nitrógeno DMSO (2 mL), y azida de sodio (33.0 mg, 0.5 mmol). La mezcla se agita a 110°C durante 7 horas. Seguidamente el disolvente se evapora bajo presión reducida y el compuesto se purifica por cromatografía de columna (30% AcOEt/ hexano) obteniéndose el compuesto (3*R*,4*R*)-22 como un sólido amarillo con un 52% de rendimiento.

2.7.7. Síntesis de (3*R*,4*R*)-3-azido-4-hidroxitetra-hidrofurano. (3*R*,4*R*)-23

Una disolución de (3*R*,4*R*)-22 (8.0 mg, 0.03 mmol) y K₂CO₃ (4.5 mg, 0.03 mmol) en MeOH/ H₂O (2 mL/ 1 mL) se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. Seguidamente se añade AcOEt (10 mL) y se lava con H₂O (3 x 15 mL). Las fases orgánicas se juntan y se secan con Na₂SO₄. El crudo se purifica por cromatografía de columna (30% AcOEt/ hexano), obteniéndose el

Capítulo 2

compuesto **(3R,4R)-23** como un aceite amarillo con un 100% de rendimiento. La rotación específica característica del producto puro concuerda con la ya descrita.

2.7.8. Síntesis de **(±)-trans-3-azido-4-hidroxitetrahydrofurano. (±)-trans-23**

Se prepara una disolución de **29** (1.0 g, 11.6 mmol) en una mezcla de 1,4-dioxano-H₂O 4:1 (50 mL). Sobre ella se añade azida de sodio (2.2 g, 33.8 mmol). La mezcla se deja agitando durante 12 horas a 100°C en un tubo sellado. Transcurrido ese tiempo, la mezcla resultante se extrae con AcOEt (3 x 20 mL), las fases orgánicas combinadas se mezclan y se secan sobre Na₂SO₄. El crudo resultante se purifica por cromatografía de columna (30% AcOEt/ hexano) obteniéndose el producto **(±)-trans-27** puro, incoloro, con un 80% de rendimiento.

2.7.9. Síntesis de **(3R,4R)-1-benciloxicarbonil-3-bromo-4-(tert-butildimetilsililo)pirrolidina. (3R,4R)-24**

El compuesto enantioméricamente puro **(3R,4R)-20** (25 mg, 0.08 mmol), obtenido de la hidrólisis catalizada por la CAL-B, se disuelve en CH₂Cl₂ (8.8 mL). A esta disolución se le añaden, bajo atmósfera inerte, imidazol (7.48 mg, 0.1 mmol) y cloruro de *tert*-butildimetilsililo (TBDMSCl) (15.0 mg, 0.1 mmol). La mezcla se deja agitando durante 24 horas a temperatura ambiente tras las cuales se evapora el disolvente y el crudo se purifica en cromatografía de columna (35% AcOEt/ hexano) obteniéndose el compuesto **(3R,4R)-24** como un aceite transparente con un 88% de rendimiento.

2.7.10. Síntesis de **(3S,4R)-1-benciloxicarbonil-3-azido-4-(tert-butildimetilsililo)pirrolidina. (3S,4R)-25**

A una disolución del compuesto enantioméricamente puro **(3R,4R)-24** (30.0 mg, 0.1 mmol) en DMSO, se le añade, bajo

atmósfera inerte, azida de sodio (23.4 mg, 0.36 mmol) y se mantiene agitando durante 12 horas a 110°C. El disolvente se elimina a presión reducida y el compuesto se purifica por cromatografía de columna (20% AcOEt/ hexano) consiguiéndose el derivado **(3S,4R)-(+)-25** como un aceite transparente con un 57% de rendimiento.

2.7.11. Síntesis de (3S,4R)-1-benciloxycarbonil-3-azido-4-hidroxi-pirrolidina. (3S,4R)-26

El compuesto enantioméricamente puro **(3S,4R)-25** (10.0 mg, 0.03 mmol) se disuelve, bajo atmósfera inerte, en metanol seco (300.0 µL). A esta disolución se le añade ácido(-)-camphor sulfónico (CSA) (35.0 mg, 0.15 mmol). Se agita durante 5 horas a temperatura ambiente, y, tras eliminar el disolvente a presión reducida, el crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna (40% AcOEt/ hexano). El producto **(3S,4R)-26** incoloro se obtiene con un 100% de rendimiento.

2.7.12. Síntesis del compuesto 3,4-epoxitetrahidrofurano. 29

A una disolución del compuesto **15** (5.0 g, 71.3 mmol) en 20 mL de CH₂Cl₂ a 0 °C, se añade *m*CPBA (4.3 g, 25.0 mmol). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. Pasado ese tiempo, se lava la fase orgánica con NaOH 1N (3 x 15 mL) y se seca con Na₂SO₄. Se evapora el disolvente a presión reducida a 0 °C (debido a la volatilidad del compuesto), obteniéndose el producto deseado **29** como un aceite transparente con un 75% de rendimiento.

2.7.13. Procedimiento general para síntesis de (±)-cis-28, (±)-trans-28 y (±)-cis-31a-c

Bajo atmósfera inerte, sobre una disolución del correspondiente *N-tert*-butoxicarbonilaminoalcohol **(±)-cis-27**, **(±)-**

trans-27 ó **(±)-cis-30** (3.0 mmol) en CH₃CN (30 mL) se añade el correspondiente cloruro de ácido (4.6 mmol) y K₂CO₃ (623.0 mg, 4.5 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 12 horas. Tras ese tiempo, se evapora el disolvente a presión reducida y se extrae con AcOEt (3 x 10 mL), las fases orgánicas se juntan y se secan sobre Na₂SO₄. El crudo se purifica por cromatografía de columna (40% AcOEt/ hexano), obteniéndose los productos con un rendimiento 80-95%.

2.7.14. Procedimiento general para la síntesis de (±)-cis- y (±)-trans-3-tert-butoxicarbonilamino-4-hidroxitetrahidrofurano y (±)-cis-1-benciloxicarbonil-3-tert-butoxicarbonil-amino-4-hidroxi-pirrolidina [(±)-cis-27 (±)-trans-27 y (±)-cis-30]

El compuesto de partida **(±)-cis-23**, **(±)-trans-23** ó **(±)-cis-26** (4.0 mmol), se disuelve bajo atmósfera inerte en THF seco (40 mL) y se añadió por este orden: NaOH 1M desoxigenado (8 mL), Me₃P (12.0 mmol) y Boc₂O (12.0 mmol). La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. Transcurrido ese tiempo, el disolvente se elimina bajo presión reducida y el crudo se disuelve en AcOEt (20 mL) lavándolo con H₂O (3 x 10 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄. El crudo se purifica por cromatografía de columna (30% hexano/ AcOEt), obteniéndose el producto con un rendimiento 85-87%.

2.7.15. Síntesis de (3S,4S)-3-amino-4-hidroxitetrahidrofurano (3S,4S)-32 y (3R,4S)-3-amino-4-hidroxi-tetrahidrofurano (3R,4S)-32

El compuesto enantioméricamente puro **(-)-cis-27** o **(-)-trans-27** (10.0 mg, 0.05 mmol), obtenidos por la hidrólisis catalizada por la lipasa CAL- B se disuelve en metanol (1 mL) y se añade HCl 3N (20.0 µL), la disolución se agita a temperatura ambiente durante

24 horas tras las cuales se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna (20% MeOH/CH₂Cl₂). El producto purificado es un aceite transparente y se obtiene con un 90% de rendimiento. La rotación específica de los productos puros **(3R,4S)-32** y **(3S,4S)-32** se compara con la descrita previamente en la bibliografía.

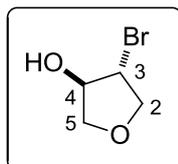
2.7.16. Síntesis de (3S,4R)-1-benciloxycarbonil-3-amino-4-hidroxipirrolidina (3S,4R)-33

El compuesto enantioméricamente puro **(3S,4R)-30** (20.0 mg, 0.06 mmol) obtenido por la hidrólisis catalizada por la CAL-B, se disuelve en etanol (1.2 mL) y se añade etanol saturado de HCl (5 mL). La mezcla de reacción se agita durante 2 horas. Seguidamente se evapora el disolvente a presión reducida, siendo el crudo de reacción purificado por cromatografía de columna (20% MeOH/CH₂Cl₂). El producto **(3S,4R)-33** se obtiene como un aceite transparente con un 90% de rendimiento. La rotación específica del producto puro concuerda con la descrita previamente en la bibliografía.

2.8 Datos experimentales

En esta sección se han recogido los datos experimentales de los compuestos que han formado parte de este capítulo.

***trans*-3-Bromo-4-hidroxitetrahidrofurano. (\pm)-*trans*-16**



Fórmula molecular: C₄H₇BrO₂

Estado físico: Aceite amarillo

Peso molecular: 167.00 g/mol

Rf: (50% AcOEt/ hexano): 0.63

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 4.59 (m, 1H, H-4), 4.43 (dd, J = 10.6, 4.6 Hz, 1H, H-5), 4.27 (dd, J = 10.0, 4.2 Hz, 1H, H-2), 4.23 – 4.18 (m, 1H, H-3), 4.10 (dd, J = 10.6, 2.2 Hz, 1H, H-5), 3.83 (dd, J = 10.0, 1.5 Hz, 1H, H-2).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 78.8 (C-4), 74.2 (C-5), 73.3 (C-2), 51.5 (C-3).

IR (NaCl): ν 3100 - 3400 cm⁻¹

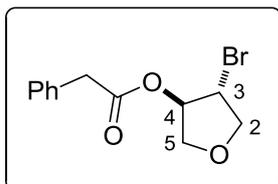
Rendimiento: 77%

(3*S*,4*S*)-3-Bromo-4-hidroxitetrahidrofurano:

$[\alpha]_D^{20}$: -27.6 (c = 1, CH₂Cl₂) ee >99%. **(3*S*,4*S*)-(-)-16**

Rendimiento: 48%

***trans*-3-Bromo-4-fenilacetoxitetrahidrofurano. (±)-*trans*-17a**



Fórmula molecular: C₁₂H₁₃BrO₃

Estado físico: Aceite amarillo

Peso molecular: 284.13 g/mol

Rf: (20% AcOEt/ hexano): 0.45

HRMS (ESI+, m/z) calculada para [C₁₂H₁₃BrNaO₃]⁺ 306.9940 m/z, encontrada 306.9913.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.49 – 7.18 (m, 5H), 5.40 (d, 1H, *J* = 6.6, H-4), 4.30 (m, 3H, H-2, H-3 y H-5), 4.09 (m, 1H, H-2 o H-5), 3.87 (m, 1H, H-2 o H-5), 3.66 (s, 2H, CH₂).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.9 (CO), 133.6 (C), 129.6 (CH), 129.1 (CH), 127.8 (CH), 81.0 (C-4), 75.0 (C-5), 71.7 (C-2), 48.4 (C-3), 41.5 (CH₂).

IR (NaCl): ν 1739 cm⁻¹

Rendimiento: 80%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** OJ-H (Hexano: isopropanol 95:5); 30 °C, 0.8 mL/min. t_R (3*R*,4*R*) = 25.142 min y t_R (3*S*,4*S*) = 27.412 min.

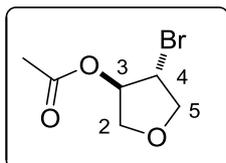
(3*S*,4*S*)-3-Bromo-4-fenilacetoxitetrahidrofurano:

[α]_D²⁰: + 73.1 (*c* = 1, CH₂Cl₂) *ee* >99%. **(3*S*,4*S*)-(+)-17a**

Rendimiento: 49%

Capítulo 2

***trans*-3-Acetoxy-4-bromotetrahidrofurano. (\pm)-*trans*-17b**



Fórmula molecular: C₆H₉BrO₃

Estado físico: Aceite amarillo

Peso molecular: 209.04 g/mol

R_f (40% AcOEt / hexano): 0.38

HRMS (ESI+, m/z): calculada para [C₆H₉BrNaO₃]⁺ 230.9627 m/z, encontrada: 232.9618.

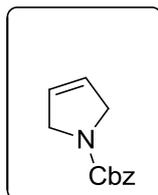
¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 5.29 – 5.19 (m, 1H, H-3), 4.28 – 4.15 (m, 3H, H-2, H-4 y H-5), 3.97 (m, 1H, H-2 o H-5), 3.74 (m, 1H, H-2 o H-5), 1.98 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 169.7 (CO), 81.2 (C-3), 74.4 (C-2), 71.3 (C-5), 48.2 (C-4), 20.7 (CH₃).

IR (NaCl): ν 1742 cm⁻¹

Rendimiento: 82%

1-Benciloxycarbonil2,5-dihidropirrol. 19



Fórmula molecular: C₁₂H₁₃NO₂

Estado físico: Aceite incoloro

Peso molecular: 203.24 g/mol

Rf (30% AcOEt/ hexano): 0.43

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.38 (m, 5H), 5.78 (d, J = 9.0 Hz, 2H, CH₂), 5.17 (m, 2H, CH), 4.18 (m, 4H, CH₂).

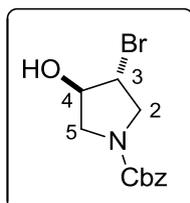
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 154.7 (CO), 137.0 (C), 128.5 (CH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 125.8 (CH), 125.7 (CH), 66.8 (CH₂), 53.5 (CH₂).

IR (NaCl): ν 3058; 1695 cm⁻¹

Rendimiento: 90%

trans-1-Benciloxycarbonil-3-bromo-4-hidroxi-pirrolidina.

(±)-trans-20



Fórmula molecular: C₁₂H₁₄BrNO₃

Estado físico: Aceite amarillo

Peso molecular: 300.15 g/mol

Rf (20% AcOEt/ hexano): 0.15

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.38 (m, 5H), 5.16 (s, 2H, CH₂), 4.50 (m, 1H, H-4), 4.24 – 4.06 (m, 2H, H-2 y H-5), 3.99 – 3.78 (m, 2H, H-2 y H-5), 3.51 (m, 1H, H-3).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 155.0 (CO), 136.4 (C), 128.5 (CH), 128.1 (CH), 127.9 (CH), 76.1 (C-4), 67.2 (CH₂), 52.9 y 52.8 (C-2 o C-5), 51.7 y 51.3 (C-2 o C-5), 50.2 y 49.7 (C-3).

IR (NaCl): ν 3200-3300; 1706.50 cm⁻¹

Rendimiento: 80%

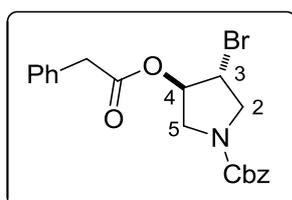
HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 90:10); 30 °C, 0.8 mL/min, t_R (3S,4S) = 13.5 y t_R (3R,4R) = 15.77 min.

(3R,4R)-1-Benciloxycarbonil-3-bromo-4-hidroxi-pirrolidina:

[α]_D²⁰: -5.0 (c = 1, CHCl₃) ee > 99% **(3R,4R)-(-)-20**

Rendimiento: 47%

***trans*-1-Benciloxycarbonil-3-bromo-4-fenilacetoxipirrolidina.
(±)-*trans*-21a**



Fórmula molecular: C₂₀H₂₀BrNO₄

Estado físico: Aceite amarillo

Peso molecular: 418.28 g/mol

Rf (20% AcOEt/ hexano): 0.36

HRMS (ESI+, m/z): calculada para [C₂₀H₂₀BrNNaO₄]⁺ 440.0468 *m/z*, encontrada 440.0457.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.52 – 7.19 (m, 10H), 5.35 (d, 1H, *J* = 4.3 Hz, H-4), 5.19 (s, 2H, CH₂), 4.2 (brs, 1H, H-3), 4.11 – 4.00 (m, 1H, H-2 o H-5), 3.94 (m, 2H, H-2 y H-5), 3.75 – 3.53 (m, 3H, H-2 o H-5, CH₂).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.7 (CO), 155.1 (CO), 137.8 (C), 133.5 (C), 129.5 (CH), 129.2 (CH), 129.0 (CH), 128.6 (CH), 128.4 (CH), 127.88 (CH), 78.9 (C-4), 67.7 (CH₂), 53.8 y 53.5 (C-2 o C-5), 49.8 y 49.6 (C-2 o C-5), 47.2 y 46.5 (C-3), 41.5 (CH₂).

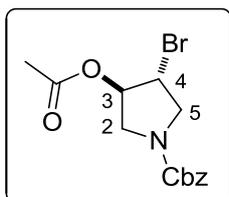
IR (NaCl): ν 1740, 1704 cm⁻¹

Rendimiento: 80%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 90:10); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* (3*S*,4*S*) = 21.685 y *t_R* (3*R*,4*R*) = 23.726 min.

***trans*-1-Benciloxicarbonil-3-acetoxi-4-bromopirrolidina.**

(±)-*trans*-21b



Fórmula molecular: C₁₄H₁₆BrNO₄

Estado físico: Aceite amarillo

Peso molecular: 342.19 g/mol

R_f (20% AcOEt/ hexano):0.36

HRMS ESI⁺ calculada para [C₁₄H₁₆BrNNaO₄]⁺ 364.0155 *m/z*, encontrada: 364.0169.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.39 (br s, 5H), 5.33 (m, 1H, H-3), 5.18 (br s, 2H, CH₂), 4.41 – 4.24 (m, 1H, H-4), 4.12 – 3.86 (m, 3H, H-2 y H-5), 3.71–3.5 (m, 1H, H-2 o H-5), 2.09 (s, 3H, CH₃).

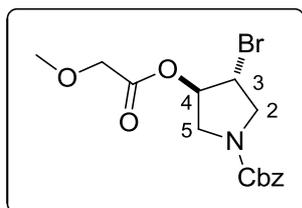
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 169.6 (CO), 154.7 (CO), 136.4 (C), 128.5 (CH), 128.2 (CH), 128.0 (CH), 128.6 (CH), 78.3 (C-3), 67.3 (CH₂), 53.4 y 53.2 (C-2 o C-5), 49.6 y 49.3 (C-2 o C-5), 46.9 y 46.2 (C-4), 20.9 (CH₃).

IR (NaCl): ν 1744, 1704 cm⁻¹

Rendimiento: 60%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 90:10); 30 °C, 0.8 mL/min, t_R (3*S*,4*S*) = 20.914 y t_R (3*R*,4*R*) = 23.955 min.

***trans*-1-Benciloxycarbonil-3-bromo-4-(2-metoxiacetil)-
pirrolidina. (±)-*trans*-21c**



Fórmula molecular: C₁₅H₁₈BrNO₅

Estado físico: Aceite amarillo

Peso molecular: 372.21 g/mol

R_f (40% AcOEt/hexano): 0.30

HRMS ESI⁺ calculada para [C₁₅H₁₈BrNNaO₅]⁺ 394.0261 *m/z*, encontrada: 394.0258.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.52 – 7.27 (m, 5H), 5.42 (m, 1H, H-4), 5.17 (br s, 2H, CH₂), 4.38 – 4.24 (m, 1H, H-3), 4.21 – 3.84 (m, 5H, CH₂, H-2 y H-5), 3.62 (m, 1H, H-2 o H-5), 3.44 (s, 3H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 168.1 (CO), 154.6 (CO), 136.3 (C), 128.5 (C), 128.2 (CH), 128.0 (CH), 78.5 (C-4), 69.5 (CH₂), 67.3 (CH₂), 59.5 (CH₃), 53.3 (C-2 o C-5), 49.4 (C-2 o C-5), 46.3 (C-3).

IR (NaCl): ν 1758, 1704 cm⁻¹

Rendimiento: 65%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 90:10); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* (3*S*,4*S*) = 42.144 min y *t_R* (3*R*,4*R*) = 54.054 min.

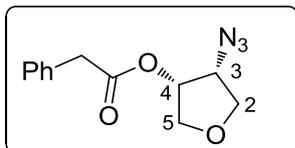
**(3*S*,4*S*)-1-Benciloxycarbonil-3-bromo-4-(2-metoxiacetil)-
pirrolidina:**

[α]_D²⁰: -10.0 (*c* = 0.05, CHCl₃) *ee* > 99% **(3*S*,4*S*)-(-)-21c**

Rendimiento: 49%

Capítulo 2

(3R,4R)-3-Azido-4-fenilacetoxitetrahidrofurano. (3R,4R)-(+)-22



Fórmula molecular: C₁₂H₁₃N₃O₃

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 247.25 g/mol

R_f (30% AcOEt/hexano): 0.35

HRMS ESI⁺ calculada para [C₁₂H₁₃N₃NaO₃]⁺ 270.0855 *m/z*, encontrada 270.0849.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.40 – 7.28 (m, 5H), 5.20 (m, 1H, H-4), 4.11 (m, 1H, H-3), 4.08 – 3.96 (m, 2H, H-2 y H-5), 3.90 – 3.72 (m, 2H, H-2 y H-5), 3.67 (s, 2H, CH₂).

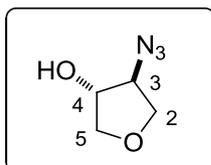
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 171.1 (CO), 133.2 (C), 129.3 (C), 128.7 (CH), 127.3 (CH), 73.7 (C-4), 70.8 (C-5), 70.1 (C-2), 60.7 (C-3), 40.9 (CH₂).

IR (NaCl): ν 2355.5, 1738.05 cm⁻¹

Rendimiento: 52%

[α]_D²⁰: +1.4 (c = 0.08, CH₂Cl₂) *ee* > 99%

***trans*-3-Azido-4-hidroxitetrahidrofurano. (\pm)-*trans*-23**



Fórmula molecular: C₄H₇N₃O₂

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 129.11 g/mol

R_f (30% AcOEt/hexano): 0.40

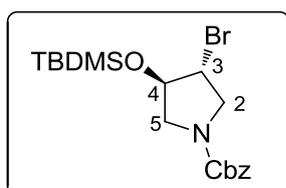
¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 4.54 – 4.26 (m, 1H, OH), 4.16 – 3.96 (m, 3H, H-2, H-3 y H-5), 3.94 – 3.78 (m, 1H, H-5), 3.74 (dd, *J* = 9.7, 4.2 Hz, 1H, H-2), 2.35 (m, 1H, H-3).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 73.1 (C-5), 71.9 (C-4), 69.5 (C-2), 63.1 (C-3).

IR (NaCl): ν 2355.5, 1738.05 cm⁻¹

Rendimiento: 52%

(3R,4R)-1-Benciloxicarbonil-3-bromo-4-(tert-butildimetilsililoxi)-pirrolidina (3R,4R)-(-)-24



Fórmula molecular: C₁₈H₂₈BrNO₃Si

Estado físico: Aceite transparente

Peso molecular: 414.41 g/mol

Rf (40% AcOEt/ hexano): 0.68

HRMS-ESI⁺ calculada para [C₁₈H₂₈BrNNaO₃Si]⁺ 436.0914 m/z, encontrada: 436.0899.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.38 (m, 5H), 5.18 (s, 2H, CH₂), 4.41 (m, 1H, H-4), 4.18 – 4.01 (m, 2H, H-3, H-2 o H-5), 3.97 – 3.72 (m, 2H, H-2 y H-5), 3.40 (m, 1H, H-2 o H-5), 0.89 (s, 9H, TBDMS), 0.15 (s, 6H, TBDMS).

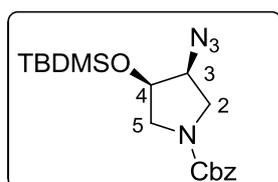
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 155.4 (CO), 137.1 (C), 128.9 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 77.9 y 77.1 (C-4), 67.4 (CH₂), 53.3 y 53.0 (C- 2 o C-5), 52.6 y 52.4 (C- 2 o C-5), 51.2 y 50.6 (C-3), 26.0 (CH₃, TBDMS), 18.3 (C, TBDMS), -4.3 (CH₃, TBDMS).

IR (NaCl): ν 1708.8 cm⁻¹

Rendimiento: 88%

[α]_D²⁰: -3.0 (c = 0.08, CHCl₃) ee > 99%

(3S,4R)-1-Benciloxycarbonil-3-azido-4-(tert-butildimetilsililoxi)pirrolidina. (3S,4R)-(+)-25



Fórmula molecular: C₁₈H₂₈N₄O₃Si

Estado físico: Aceite transparente

Peso molecular: 376.53 g/mol

R_f (40% AcOEt/ hexano): 0.59

HRMS-ESI⁺ calculada para [C₁₈H₂₉N₄O₃Si]⁺ 377.2003 *m/z*, encontrada: 377.1996.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.38 (br s, 5H), 5.16 (s, 2H, CH₂), 4.43 (m, 1H, H-4), 4.05 – 3.70 (m, 1H, H-3), 3.50 (m, 4H, H-2 y H-5), 0.94 (s, 9H, TBDMS), 0.29 (s, 6H, TBDMS)

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 154.8 (CO), 136.6 (C), 128.5 (CH), 128.1 (CH), 128.0 (CH), 73.5 y 72.9 (C-4), 67.1 (CH₂), 62.2 y 61.7 (C-3), 51.2 y 50.8 (C-5), 48.3 y 48.0 (C-2), 25.3 (CH₃, TBDMS), 18.1 (C, TBDMS), -5.0 (m, CH₃, TBDMS)

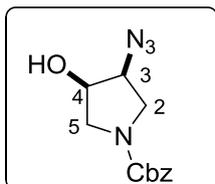
IR (NaCl): ν 2104.3, 1704.5 cm⁻¹.

Rendimiento: 57%

[α]_D²⁰: +35.0 (c = 0.1, CHCl₃) *ee* > 99%

Capítulo 2

cis-1-Benciloxycarbonil-3-azido-4-hidroxi-pirrolidina. (±)-cis-26



Fórmula molecular: C₁₂H₁₄N₄O₃

Estado físico: Aceite transparente

Peso molecular: 262.26 g/mol

Rf (40% AcOEt/ hexano): 0.14

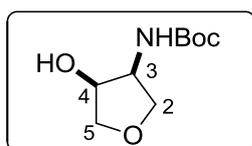
¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.38 (s, 5H), 5.15 (d, *J* = 2.3 Hz, 2H, CH₂), 4.38 (s, 1H, OH), 4.06 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, H-3), 3.87 – 3.33 (m, 5H, H-2, H-4 y H-5).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 155.1 (CO), 136.8 (C), 128.9 (CH), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 71.7 (C-4), 67.1 (CH₂), 63.0 (C-2), 51.5 (C-5), 48.2 (C-3)

IR (NaCl): ν 3200-3300; 2100.87; 1704.55 cm⁻¹.

Rendimiento: 80%

***cis*-3-*tert*-Butoxicarbonilamino-4-hidroxitetrahidrofurano.
(±)-*cis*-27.**



Fórmula molecular: C₉H₁₇NO₄

Estado físico: sólido blanco.

Peso molecular: 203.24 g/mol

R_f (20% MeOH/ CH₂Cl₂): 0.59

Punto de fusión: 148-154°C

HRMS ESI⁺ calculada para [C₉H₁₇NNaO₄]⁺ 226.1050 *m/z*, encontrada 226.1030.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 5.22 (bs, 1H, OH o NH), 4.32 (bs, 1H, H-4), 4.16 (bs, 1H, H-3), 4.07-3.96 (m, 2H, H-2 y H-5), 3.78 (dd, *J* = 10.1, 2.3 Hz, 1H, H-5), 3.53 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-2), 1.45 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 155.9 (CO), 80.0 (C), 74.4 (C-5), 70.6 (C-4), 70.4 (C-2), 53.5 (C-3), 28.3 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3400-3200, 1690, cm⁻¹

Rendimiento: 85%

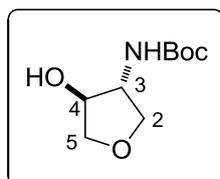
HPLC (210, 215 nm): **columna:** OJ-H (Hexano: Isopropanol 90:10); 30 °C, 0.8 mL/min. (El producto enantiopuro se derivatiza como éster ***cis*-28**, *t_R* (3*S*,4*S*) = 19.395 min).

(3*S*,4*S*)-3-*tert*-Butoxicarbonilamino-4-hidroxitetrahidrofurano:

[α]_D²⁰: -3.6 (*c* = 0.10, MeOH), *ee* > 99 % **(3*S*,4*S*)-(-)-27**

Rendimiento: 48%

***trans*-3-*tert*-Butoxicarbonilamino-4-hidroxitetrahidrofurano.
trans-27.**



Fórmula molecular: C₉H₁₇NO₄

Estado físico: sólido blanco

Peso molecular: 203.24 g/mol

R_f (20% MeOH/ CH₂Cl₂): 0.59

Punto de fusión: 144-146°C

HRMS ESI⁺ calculada para [C₉H₁₇NNaO₄]⁺ 226.1050 *m/z*, encontrada 226.1061.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 4.79 (bs, 1H), 4.30 (m, 1H, H-4), 4.09 (m, 2H, H-2 y H-5), 3.97 (m, 1H, H-3), 3.71 (dd, *J* = 2.9, 9.9 Hz, 1H, H-5), 3.64 (dd, *J* = 2.9, 9.4 Hz, 1H, H-2), 1.47 (s, 9H, CH₃)

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 155.9 (CO), 80.3 (C), 77.3 (C-4), 73.6 (C-5), 71.0 (C-2), 59.8 (C-3), 28.3 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3400-3200, 1689, cm⁻¹

Rendimiento: 85%

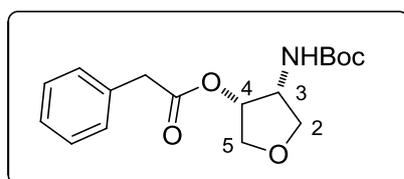
HPLC (210, 215 nm): **columna:** OJ-H (Hexano: Isopropanol 90:10); 30 °C, 0.8 mL/min. (El producto enantiopuro se derivatiza como éster *trans*-28, *t_R* (3*R*,4*S*) = 26.627 min).

(3*R*,4*S*)-3-*tert*-Butoxicarbonilamino-4-hidroxitetrahidrofurano

[α]_D²⁰: - 4.2 (*c* = 0.15, MeOH), *ee* >99 % **(3*R*,4*S*)-(-)-27**

Rendimiento: 48%

cis-3-tert-Butoxicarbonilamino-4-fenilacetoxitetrahydrofurano. (\pm)-cis-28.



Fórmula molecular: C₁₇H₂₃NO₅

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 321.37 g/mol

Rf (50% AcOEt/ hexano): 0.37

HRMS ESI⁺ calculada para [C₁₇H₂₃NNaO₅]⁺ 344.1468 *m/z*, encontrada 344.1466.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.42 - 7.27 (m, 5H), 5.25 (m, 1H, H-4), 4.45 - 4.43 (m, 2H, NH y H-2 o H-5), 4.14 - 4.01 (m, 1H, H-2 o H-5), 3.82 (m, 1H, H-2 o H-5), 3.72 (s, 2H, CH₂), 3.43 (m, 1H, H-3), 1.45 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.5 (CO), 155.7 (CO), 133.4 (C), 129.1 (CH), 128.8 (CH), 127.4 (CH), 80.0 (C), 73.3 (C-4), 72.6 (C-5), 70.0 (C-2), 52.1 (C-3), 41.5 (CH₂), 28.3 (CH₃).

IR (NaCl): ν 1730, 1711, 3341 cm⁻¹

Rendimiento: 80%

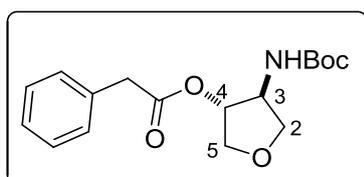
HPLC (210, 215 nm): **columna:** OJ-H (Hexano: Isopropanol 90:10); 30 °C, 0.8 mL/min. *t_R* (3*R*,4*R*) = 17.187 y *t_R* (3*S*,4*S*) = 20.072 min.

(3*R*,4*R*)-3-tert-Butoxicarbonilamino-4-fenilacetoxitetrahydrofurano:

[α]_D²⁰: + 16.3 (*c* = 0.10, EtOH), *ee* >99 %.(3*R*,4*R*)-(+)-28.

Rendimiento: 49%

***trans*-3-*tert*-Butoxicarbonilamino-4-fenilacetoxi-tetrahidrofurano. (±)-*trans*-28.**



Fórmula molecular: C₁₇H₂₃NO₅

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 321.37 g/mol

R_f (50% AcOEt/ hexano): 0.37

HRMS ESI⁺ calculada para [C₁₇H₂₃NNaO₅]⁺ 344.1468 *m/z*, encontrada 344.1478.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.40-7.25 (m, 5H), 5.11 (m, 1H, H-4), 4.85 (bs, 1H, NH), 4.12 - 4.02 (m, 3H, H-2, H-3 y H-5), 3.74 - 3.68 (m, 2H, H-2 y H-5), 3.66 (s, 2H, CH₂), 1.45 (s, 9H, CH₃)

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.9 (CO), 155.9 (CO), 133.4 (C), 129.2 (CH), 128.8 (CH), 127.2 (CH), 79.0 (C-4), 77.6 (C), 72.1 (C-2 o C-5), 71.9 (C-2 o C-5), 56.6 (C-3), 41.10 (CH₂), 28.3 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3341, 1730, 1711 cm⁻¹

Rendimiento: 85%

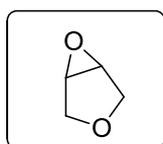
HPLC (210, 215 nm): **columna:** OJ-H (Hexano: Isopropanol 90:10); 30 °C, 0.8 mL/min. t_R (3*S*,4*R*) = 21.474 y t_R (3*R*,4*S*) = 29.432 min.

(3*S*,4*R*)-3-*tert*-Butoxicarbonilamino-4-fenilacetoxitetrahidrofurano:

[α]_D²⁰: + 9.0 (*c* = 0.10, MeOH), *ee* >99 %.(3*S*,4*R*)-(+)-28.

Rendimiento: 49%

3,4-Epoxitetrahidrofurano. 29



Fórmula molecular: C₄H₆O₂

Estado físico: aceite incoloro.

Peso molecular: 86.04 g/mol

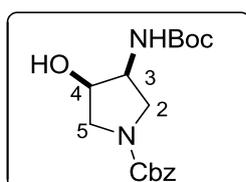
R_f (30% AcOEt/ hexano): 0.36

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 3.86 (d, *J* = 10.4 Hz, 2H, CH₂), 3.66 (s, 2H, CH₂), 3.51 (d, *J* = 10.5 Hz, 2H, CH).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 67.2 (CH₂), 55.7 (CH).

Rendimiento: 87%

cis-1-Benciloxycarbonil-3-tert-butoxicarbonilamino-4-hidroxi-pirrolidina. (±)-cis-30.



Fórmula molecular: C₁₇H₂₄N₂O₅

Estado físico: aceite incoloro.

Peso molecular: 336.38 g/mol

R_f (40% AcOEt/ hexano): 0.15

HRMS ESI⁺ calculada para [C₁₇H₂₄N₂NaO₅]⁺ 359.1583 *m/z*, encontrada 359.1577.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.35 (m, 5H), 5.12 (s, 2H, CH₂), 4.41 - 4.05 (m, 2H, H-3 y H-4), 3.71 (m, 1H, H-2 o H-5), 3.54 (m, 2H, H-2 y H-5), 3.35-3.17 (m, 1H, H-2 o H-5); 1.45 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 155.6 (CO), 155.1 (CO), 136.5 (C), 128.5 (CH), 128.1 (CH), 127.9 (CH), 80.0 (C), 70.4 y 69.6 (C-4), 67.1 (CH₂), 53.1 (C-5), 52.6 (C-3), 48.0 (C-2), 28.3 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3400-3200, 1689, cm⁻¹

Rendimiento: 87%

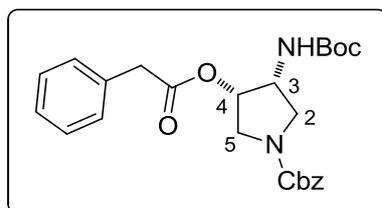
HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 75:25); 30 °C, 0.8 mL/min, t_R (3*S*,4*R*) = 11.123 y t_R (3*R*,4*S*) = 14.794 min.

(3*S*,4*R*)-1-Benciloxycarbonil-3-tert-butoxicarbonilamino-4-hidroxi-pirrolidina:

[α]_D²⁰: + 7.2 (*c* = 0.07, MeOH), *ee* >99 %.(3*S*,4*R*)-(+)-30

Rendimiento: 47%

***cis*-1-Benciloxycarbonil-3-*tert*-butoxicarbonilamino-4-fenil-acetoxipirrolidina. (\pm)-*cis*-31a.**



Fórmula molecular: C₂₅H₃₀N₂O₆

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 454.52 g/mol

R_f (60% AcOEt/ hexano): 0.71

HRMS ESI⁺ calculada para [C₂₅H₃₀N₂NaO₆]⁺ 477.1996 *m/z*, encontrada 477.1949.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.45 - 7.25 (m, 10H), 5.15 (s, 2H CH₂), 4.32 (m, 1H, H-4), 3.87-3.43 (m, 5H, H-2, H-3 y H-5), 3.36 (s, 2H, CH₂), 1.46 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 175.8 (CO), 170.4 (CO), 154.7 (CO), 136.5 (C), 133.6 (C), 129.4 (CH), 129.1 (CH), 128.8 (CH), 128.6 (CH), 128.1 (CH), 127.5 (CH), 127.2 (CH), 80.0 (C), 73.1 y 72.9 (C-4), 67.1 y 65.9 (CH₂), 50.9 y 50.6 (C-2 o C-5), 49.4 (C-2 o C-5), 48.1 (C-3), 41.6 y 41.0 (CH₂), 28.3 y 27.0 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3053, 1715, 1705 cm⁻¹

Rendimiento: 95%

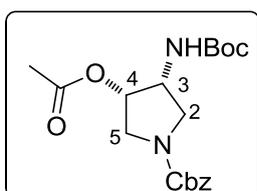
HPLC (210, 215 nm): **columna:** IA (hexano: Isopropanol 75:25), 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* (3*R*,4*S*) = 8.383 y *t_R* (3*S*,4*R*) = 10.528 min.

(3*R*,4*S*)-1-Benciloxycarbonil-3-*tert*-butoxicarbonilamino-4-fenil-acetoxipirrolidina:

[α]_D²⁰: = + 35.0 (*c* = 0.10, CHCl₃), *ee* >99 %.(3*R*,4*S*)-(+)-31^a

Rendimiento: 49%

cis-1-Benciloxicarbonil-3-acetoxi-4-tert-butoxicarbonil-aminopirrolidina. (±)-cis-31b.



Fórmula molecular: C₁₉H₂₆N₂O₆

Estado físico: aceite incoloro

Peso molecular: 378.42 g/mol

Rf (40% AcOEt/ hexano): 0.39

HRMS ESI⁺ calculada para [C₁₉H₂₆N₂NaO₆]⁺ 401.1683 *m/z* encontrada 401.1660.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.52-7.31 (m, 5H), 5.23 (m, 1H, H-4), 5.13 (s, 2H, CH₂), 4.75 (m, 1H, H-3), 4.41 (m, 1H, NH), 3.89 (m, 1H, H-2 o H-5), 3.62 (m, 2H, H-2 y H-5), 3.19 (m, 1H, H-2 o H-5), 2.13 (s, 3H, CH₃), 1.59 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.7 (CO), 154.9 (CO), 130.7 (C), 128.5 (CH), 128.1 (CH), 128.0 (CH), 80.3 (C), 77.3 (C-4), 67.1 (CH₂), 51.7 (C-2 o C-5), 50.9 (C-3), 48.26 (C-2 o C-5), 28.3 (CH₃), 22.65 (CH₃).

IR (NaCl): ν 1744, 1719, 1706 cm⁻¹.

Rendimiento: 80 %

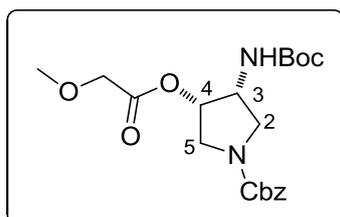
HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 75:25) 30 °C 0.8 mL/min *t_R* (3*S*,4*R*) = 13.510 y *t_R* (3*R*,4*S*) = 28.881 min.

(3*R*,4*S*)-1-Benciloxicarbonil-3-acetoxi-4-tert-butoxicarbonil-aminopirrolidina:

[α]_D²⁰: = -2.0 (*c* = 0.10, MeOH), *ee* > 99 %. **(3*R*,4*S*)-(-)-31b**

Rendimiento: 18%

cis-1-Benciloxycarbonil-3-*tert*-butoxicarbonilamino-4-(2-metoxiacetoxi)pirrolidina. (±)-cis-31c.



Fórmula molecular: C₂₀H₂₈N₂O₇

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 408.45 g/mol

R_f (40% AcOEt/ hexano): 0.28

HRMS ESI⁺ calculada para [C₂₅H₃₀N₂NaO₆]⁺ 431.1794 m/z, encontrada 431.1789.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.35 (s, 5H), 5.34 (bs, 1H, H-4), 5.13 (s, 2H, CH₂), 4.82 (m, 1H, H-3), 4.44 (bs, 1H, NH) 4.08 (s, 2H, CH₂), 3.89 (m, 1H, H-5), 3.65 (m, 2H, H-2 y H-5), 3.44 (s, 3H, CH₃), 3.19 (m, 1H, H-2), 1.45 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 169.9 (CO), 155.3 (CO), 155.1 (CO), 136.8 (C), 128.9 (CH), 128.5 (CH), 128.4 (CH), 80.7 (C), 73.1 (C-4), 70.0 (CH₂), 67.5 (CH₂), 59.8 (CH₃), 52.0 (C-3) 51.7 (C-5), 48.4 (C-2), 28.7 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3345, 1730, 1710 cm⁻¹.

Rendimiento: 85%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IA (Hexano: Isopropanol 75:25); 30 °C, 0.8 mL/min, t_R (3*R*,4*S*) = 8.585 min y t_R (3*S*,4*R*) = 9.214 min.

(3*R*,4*S*)-1-Benciloxycarbonil-3-*tert*-butoxicarbonilamino-4-(2-metoxiacetoxi)pirrolidina:

[α]_D²⁰: = + 10.9 (c = 0.10, MeOH), ee > 99 %. **(3*R*,4*S*)-(+)-31c.**

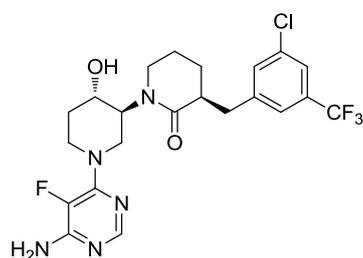
Rendimiento: 49%

Capítulo 3:
Síntesis quimioenzimática selectiva de
***trans*-3-amino-4-hidroxipiperidinas**
enantio puras, ortogonalmente protegidas

Introducción

Capítulo 3

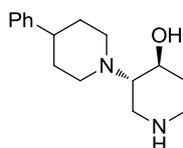
Por otra parte, la estructura de 3-amino-4-hidroxipiperidina está presente en el compuesto **(37)** (Figura 16), un inhibidor de las tiroxina quinasas, con un gran interés por su posible aplicación en el tratamiento de varias enfermedades autoinmunes.⁷³



37

Figura 16. Inhibidor de las tiroxina kinasas.

Otro ejemplo relevante de *trans*-3-amino-4-hidroxipiperidinas (Figura 17) son los derivados radio-marcados del trozamizol **(38)** puesto que son inhibidores de los transportadores vesiculares acetilcolina y pueden ser utilizados como radiotrazadores en tomografía por emisión de positrones (PET).⁷⁴



38

Figura 17. Trozamicol.

⁷³ T. B. Hopkins, X. Cai, T. R. Chan, P. Conlon, M. Humora, T. J. Jenkins, J. M. MacPhee, X. Shi, R. A. Miller, A. Thompson, WO2013185082 A2 **2013**, *CAN160*:69958.

⁷⁴ a) S. M. N. Efange, A. Khare, S. M. Parsons, R. Bau, T. Metzenthin, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 985-989; b) A. B. Khare, R. B. Langason, S. M. Parsons, R. H. Mach, S. M. N. Efange, *Nucl. Med. Biol.* **1999**, *26*, 609-617; c) S. M. N. Efange, R. H. Mach, A. Khare, R. H. Michelson, P. A. Nowak, P. H. Evora, *App. Radiat. Isot.* **1994**, *45*, 465-472.

Por otra parte, los isómeros de configuración *trans* suelen ser los precursores sintéticos de las *cis*-3-amino-4-hidroxipiperidinas, las cuales se obtienen mediante la inversión del grupo hidroxilo. Estos compuestos también tienen importantes propiedades farmacológicas como es el caso de los inhibidores del PAD4 (**39**) (Figura 18) y pueden ser utilizados en tratamientos de varios tipos de enfermedades como la artritis reumatoide, asma o psoriasis entre otras.⁷⁵

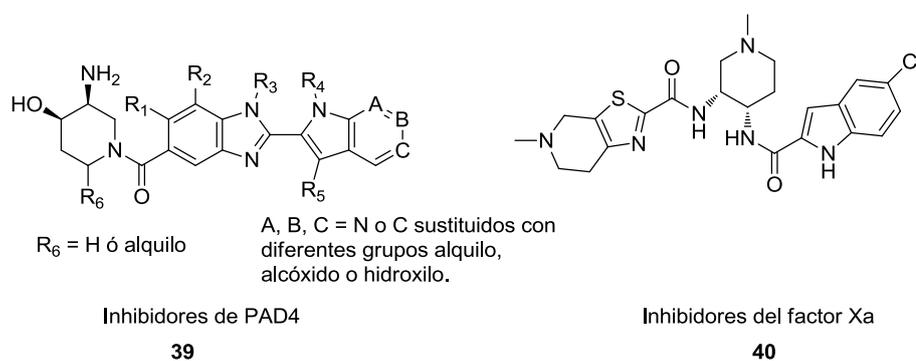


Figura 18. Piperidinas de interés.

Por último cabe mencionar la importancia de las *cis*-3,4-diaminopiperidinas⁷⁶ (Figura 18) de las cuales también son precursores los *trans*-3,4-aminoalcoholes, puesto que están presentes en los inhibidores del factor Xa (**40**), una serín proteasa que juega un papel importante en la prevención de trombos y anginas.

Estos ejemplos muestran como la presencia de unidades de piperidina sustituidas por grupos amino en las posiciones 3 y 4 del anillo, de su configuración tanto absoluta como relativa, es esencial

⁷⁵ S. J. Atkinson, M. D. Barker, M. Campbell, H. Diallo, C. Dovault, N. S. Garten, J. Liddle, R. J. Sheppard, A. L. Walker, C. Wellaway, D. M. Wilson, WO 2014015905 A1 **2014**, CAN160:278922.

⁷⁶ A. Mochizuki, Y. Nakamoto, H. Naito, K. Uoto, T. Ohta, *Bioorg. Med. Chem Lett.* **2008**, *18*, 782-787.

Capítulo 3

para la actividad de varias moléculas con importantes propiedades farmacológicas.

Por ello, es de gran interés el desarrollo de métodos regio y enantioselectivos para su síntesis.

Antecedentes

3.2. Síntesis regioselectiva de 3-amino-4-hidroxi-piperidinas y 4-amino-3-hidroxipiperidinas

A lo largo de los últimos años se han descrito varios métodos para la síntesis regioselectiva de las piperidinas disustituidas en las posiciones 3 y 4 del anillo.

Young y colaboradores⁷⁷ realizaron un estudio comparativo sobre los diferentes métodos de síntesis regioselectiva de las *trans*-4-amino-3-hidroxipiperidinas, con el objetivo de preparar la (-)-(3*R*,4*R*)-1-bencil-4-bencilamino-3-hidroxipiperidina (**34**) precursora del BMS-690514 (Figura 15) mencionado en los antecedentes. De los métodos analizados, se concluyó, que el más adecuado para ser llevado a gran escala era la apertura regioselectiva del epóxido de la piperidina y la posterior resolución del aminoalcohol racémico obtenido. Además, estos autores realizaron posteriormente un estudio de este método comprobando su aplicabilidad a mayor escala.⁷⁸

La apertura regioselectiva del epóxido de la piperidina con aminas cíclicas secundarias en presencia de ácidos de Lewis había sido descrita previamente por Ganina *et al.*⁷⁹ La presencia del ácido de Lewis favorece el ataque de la amina a la posición C-4 del anillo.

Posteriormente, Tokuda *et al.*⁸⁰ y Sheunemann *et al.*⁸¹ llevaron a cabo el estudio de esta apertura mediante el ataque regioselectivo

⁷⁷ I. S. Young, A. Ortiz, J. R. Sawyer, D. A. Conlon, F. G. Buono, S. W. Leung, J. L. Burt, E. W. Sortore, *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16*, 1558-1565.

⁷⁸ A. Ortiz, I. S. Young, J. R. Sawyer, Y. Hsiao, A. Singh, M. Sugiyama, R. M. Corbett, M. Chau, Z. Shi, D. A. Conlon, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5253-5257.

⁷⁹ O. G. Ganina, I. S. Veselov, G. V. Grishina, A. Yu. Fedorov, I. P. Beletskaya, *Russ. Chem. Bull.* **2006**, *55*, 1642-1647.

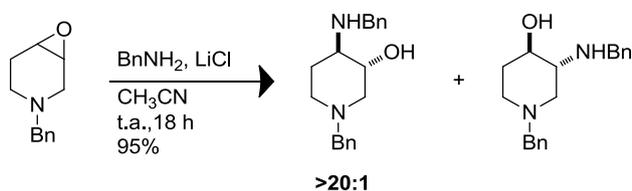
⁸⁰ O. Tokuda, T. Aikawa, T. Ikemoto, I. Kurimoto, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2832-2834.

⁸¹ M. Sheunemann, L. Henning, U. Funke, J. Steinbach, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3448-3456.

Capítulo 3

con diferentes aminas hacia la posición C-3 o C-4 del anillo en distintas condiciones.

De este modo, partiendo del epóxido y tratándolo con BnNH₂ y LiCl en CH₃CN se obtiene preferentemente la *trans*-4-aminobencil-3-hidroxipiperidina (Esquema 58) con elevado rendimiento y alta regioselectividad.⁸⁰



Esquema 58. Apertura regioselectiva de epóxidos.

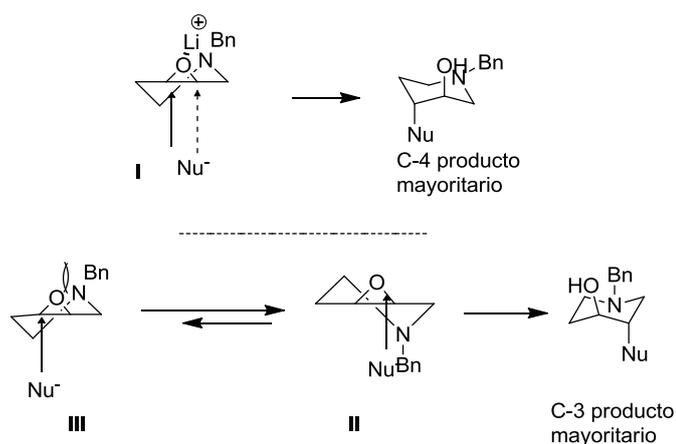
De manera opuesta, en ausencia del ácido de Lewis se obtiene preferentemente el regioisómero contrario con una proporción que varía dependiendo del nucleófilo y del disolvente utilizado, favoreciendo en este caso un disolvente prótico el ataque de la amina en C-3.

3.3. Importancia del grupo protector

En este punto es necesario aclarar el papel que juega el grupo protector de la piperidina, puesto que, la regioselectividad en la síntesis de los derivados que se van a estudiar a lo largo de este capítulo depende de él.

Tokuda *et al.*⁸⁰ explican la regioselectividad observada en presencia del ácido de Lewis por la coordinación del catión litio con el oxígeno del epóxido y el nitrógeno del anillo de piperidina dando lugar a un conformero rígido **I**, (Esquema 59). El ataque axial del nucleófilo en C-4 ocurre selectivamente según de la regla de Fürst

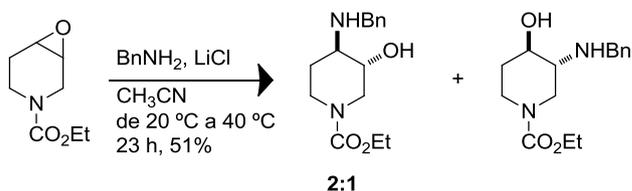
Plattner⁸² dando lugar a la *trans*-4-aminobencil-3-hidroxipiperidina (Esquema 58).



Esquema 59. Explicación de la regioselectividad para la apertura nucleófila del epóxido.

Por el contrario, en ausencia del ácido de Lewis, existiría un equilibrio entre los conformeros **II** y **III**, desplazado hacia el conformero **II** en el que la repulsión electrostática entre el átomo de nitrógeno del anillo de la piperidina y el oxígeno del epóxido es menor, lo que favorecería el ataque axial del nucleófilo en C-3.

Para la coordinación del ácido de Lewis es fundamental, por tanto, la basicidad del nitrógeno piperidínico. Esto se demuestra al sustituir el grupo bencilo por el etoxicarbonilo (Esquema 60).



Esquema 60. Efecto del grupo protector en la apertura del epóxido.

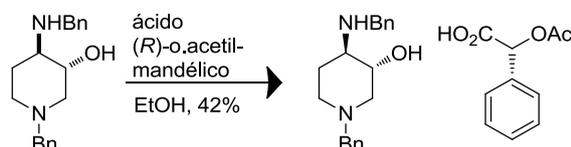
⁸² A. Fürst, Pl. A. Plattner, *Helv. Chim. Acta* **1949**, *32*, 275-283.

Capítulo 3

En este caso, el nitrógeno del carbamato es mucho menos básico y no se produce la coordinación con el catión litio. Como consecuencia de ello, se obtiene una mezcla de los dos regioisómeros, prácticamente en la misma proporción en presencia o ausencia de ácido de Lewis, observándose también en ambos casos una menor reactividad.

3.4. Obtención de las 3,4-aminohidroxipiperidinas ópticamente puras

Se ha descrito la resolución del regioisómero 4-amino-3-hidroxipiperidina, mediante la formación de sales diastereoméricas con ácido (*R*)-*o*-acetilmandélico (Esquema 61).^{77,78} Obteniéndose el aminoalcohol de configuración (3*R*,4*R*) adecuado para la síntesis del BMS-690514.

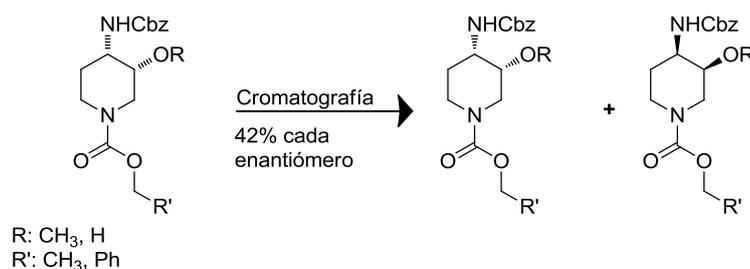


Esquema 61. Resolución mediante recristalización.

Otra alternativa a la separación de los enantiómeros, descrita para ambos regioisómeros, es la resolución mediante HPLC quiral semipreparativo (Esquema 62).^{83,84}

⁸³ G. S. Basarab, P. J. Hill, C. E. Garner, K. Hull, O. Green, B. A. Sherer, P. B. Dangel, J. I. Manchester, S. Bist, S. Hauck, F. Zhou, M. Uria-Nickelsen, R. Illingworth, R. Alm, M. Rooney, A. E. Eakin, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 6060-6082.

⁸⁴ M. T. Burger, W. Han, J. Lan, G. Nishiguchi, C. Bellamacina, M. Lindval, G. Atallah, Y. Ding, M. Mathur, C. McBride, E. L. Beans, K. Muller, V. Tamez, Y. Zhang, K. Huh, P. Feucht, T. Zavorotinskaya, Y. Dai, J. Holash, J. Castillo, J. Langowski, Y. Wang, M. Yu Chen, P. D. García, *J. Med. Lett.* **2013**, *4*, 1193-1197.



Esquema 62. Separación cromatográfica.

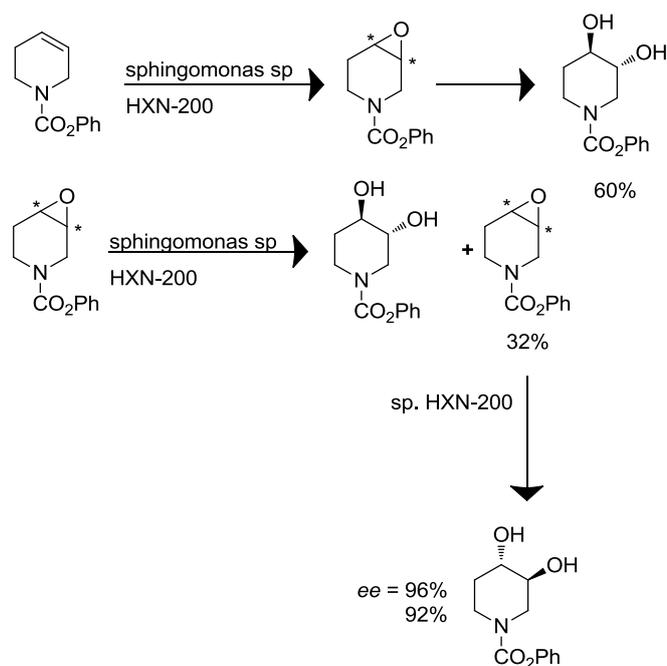
3.5. Resoluciones enzimáticas

En la actualidad no se ha descrito ningún método de resolución enzimática de los aminohidroxipiperidinas, sin embargo, si se han encontrado ejemplos de la preparación enantioselectiva de las *trans*-3,4-dihidroxipiperidinas.

Chang *et al.*⁸⁵ han descrito una síntesis de los isómeros de configuración *trans*- enantioméricamente puros mediante una *trans*-dihidroxilación de 1,2,5,6-tetrahidropiridina *N*-sustituida catalizada por la bacteria *Sphingomonas* sp. HXN-200. En la biotransformación participan dos enzimas, una monooxigenasa y una epóxido hidrolasa.

⁸⁵ D. Chang, M. F. Heringa, B. Witholt, Z. Li, *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 8599-8606.

Capítulo 3



Esquema 63. Resolución enzimática utilizando la bacteria sp. HXN-200.

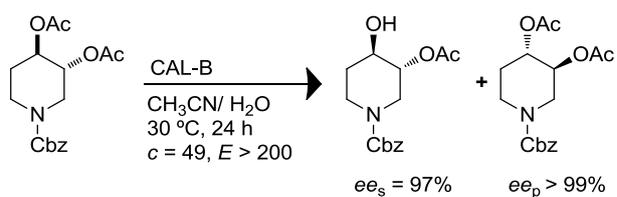
La enantioselectividad alcanzada en el proceso global es la suma de la que se logra en el proceso de epoxidación de la olefina que se enriquece en la posterior hidrólisis biocatalítica del epóxido obtenido (Esquema 63). El isómero (+)-*trans*-(3*R*,4*R*) se obtiene con un rendimiento del 60% y un *ee* = 96%. El enantiómero opuesto (-)-*trans*-(3*S*,4*S*) se obtiene a través de una hidrólisis enantioselectiva del epóxido racémico con la epóxido hidrolasa de HXN-200 para dar lugar al epóxido enantiopuro con un rendimiento del 34%, el cual se continua hidrolizando en presencia de la bacteria hasta obtener el diol *trans*-(3*S*,4*S*) con un rendimiento de 92% y *ee* = 96%.

Por último, en este grupo de investigación se ha llevado a cabo la resolución enzimática de la *trans*-3,4-diacetoxipiperidina⁸⁶ (Esquema 64), obteniéndose excelentes resultados al catalizar la reacción de hidrólisis con la lipasa CAL-B, puesto que, la enzima

⁸⁶ L. F. Solares, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *Tetrahedron* **2006**, 62, 3284-3291.

Antecedentes

muestra una alta regio- y enantioselectividad obteniéndose solo uno de los posibles isómeros como producto de reacción.



Esquema 64. Hidrólisis enzimática del derivado (±)-*trans*-3,4-diacetoxipiperidina.

Objetivos

Objetivos

Teniendo en cuenta el interés de las *trans*-amino-hidroxipiperidinas sustituidas en las posiciones 3 y 4 del anillo como unidades estructurales de diversos productos de interés biológico y, por otra parte, la utilidad que presentan los métodos biocatalíticos para la preparación enantioselectiva de diversos heterociclos funcionalizados, este capítulo se ha centrado en la puesta a punto de un método químioenzimático para la preparación de estos compuestos. Se han planteado los siguientes objetivos:

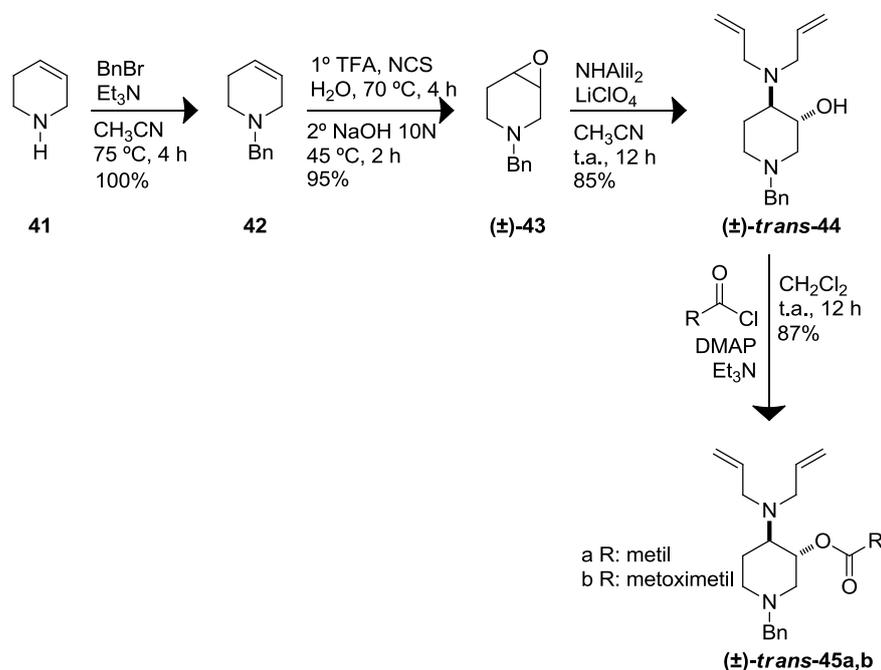
- Síntesis regioselectiva y estudio de la resolución enzimática de (\pm)-*trans*-1-bencil-4-dialilamino-3-hidroxipiperidina y sus derivados.
- Síntesis regioselectiva y estudio de la resolución enzimática de (\pm)-*trans*-1-bencil-3-dialilamino-4-hidroxipiperidina y sus derivados.
- Preparación de derivados *N*-benciloxycarbonilados de la (\pm)-*trans*-3-amino-4-hidroxipiperidina y estudio de su resolución enzimática.
- Asignación de la configuración absoluta a los productos ópticamente puros obtenidos en los procesos enzimáticos.
- Síntesis del derivado (3*R*,4*S*)-1-benciloxycarbonil-4-hidroxi-3-*tert*-butoxicarbonilaminopiperidina.

Resultados y discusión

3.6. Síntesis y resolución de (\pm)-*trans*-4-amino-3-hidroxipiperidinas

Se comenzó con el estudio de la acilación enzimática del derivado (\pm)-*trans*-**44** y la hidrólisis de los ésteres (\pm)-*trans*-**45a,b**.

La síntesis regioselectiva de los sustratos está basada en los trabajos de Tokuda *et al.*⁸⁰ mencionados en los antecedentes. Se comenzó con la protección de 1,2,3,6-tetrahidropiridina comercial **41** con bromuro de bencilo, obteniéndose la piperidina bencilada **42**. Aunque este proceso transcurre con rendimientos cuantitativos (Esquema 65), es importante mencionar, que para su síntesis a mayor escala se ha optimizado un método a partir de la piridina.⁷⁷



Esquema 65. Síntesis de los compuestos (\pm)-*trans*-**44** y (\pm)-*trans*-**45a,b**.

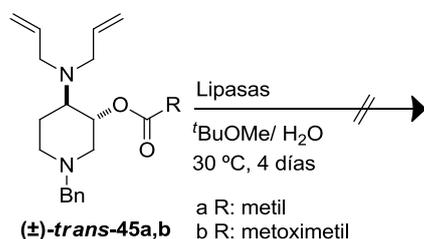
El siguiente paso fue la formación del epóxido correspondiente, con TFA y *N*-clorosuccinimida (NCS), en estas condiciones se evita

Capítulo 3

la sobreoxidación de la piperidina, dando lugar con elevado rendimiento al epóxido **(±)-43**. Seguidamente, con dialilamina y en presencia de LiClO₄ se consiguió la apertura del epóxido y la consiguiente formación del compuesto **(±)-trans-44** en proporción 9:1 respecto al regioisómero opuesto. La separación del regioisómero deseado se realiza fácilmente mediante cromatografía de columna. Por último, se esterifica con el cloruro de ácido correspondiente y Et₃N en CH₂Cl₂, obteniéndose, el compuesto **(±)-trans-45a,b** con elevado rendimiento.

En este punto cabe mencionar que se seleccionó la dialilamina como nucleófilo para la apertura del epóxido, puesto que, además de ser una amina voluminosa que podría favorecer la regioselectividad en el proceso, permite una desprotección ortogonal, con respecto al grupo bencilo, en el producto formado.

Una vez obtenidos los sustratos se estudiaron las resoluciones cinéticas de los ésteres racémicos **(±)-trans-45a,b** (Esquema 66) mediante la hidrólisis enzimática. La progresión de las reacciones y la determinación de los excesos enantioméricos tanto de sustrato como de producto, se llevaron a cabo mediante la técnica de HPLC empleando una columna de relleno quiral (ver parte experimental).



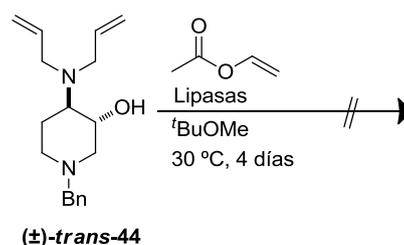
Esquema 66. Hidrólisis enzimática del compuesto **(±)-trans-45a,b**.

Inicialmente se estudió la hidrólisis enzimática del derivado **(±)-trans-45a** catalizada con las lipasas CAL-A, CAL-B, AK y PSL-IM, en ^tBuOMe con 5 equivalentes de H₂O a 30 °C.

Tras 4 días de reacción no se observó producto en ninguno de los casos, por lo que, se llevó a cabo la catálisis en medio acuoso utilizando tampón fosfato 50 mM de pH 7.0 como disolvente y como catalizadores las mismas lipasas que en el caso anterior. Sin embargo, en estas condiciones se observa la formación de producto en ausencia de catalizador tras 1 hora de reacción.

Teniendo en cuenta que la actividad de las enzimas puede variar notoriamente en función del tipo de éster utilizado, se decidió probar con las mismas enzimas y en las condiciones de reacción iniciales, un éster más activado, siendo el elegido en este caso el **(±)-*trans*-45b**. Sin embargo, tampoco en este caso se observó la formación del producto.

Seguidamente, se estudió la reacción de acilación enzimática del derivado **(±)-*trans*-44** utilizando las mismas lipasas que en el caso anterior, 5 equivalentes de acetato de vinilo como agente de acilación y ^tBuOMe a 30 °C (Esquema 67).

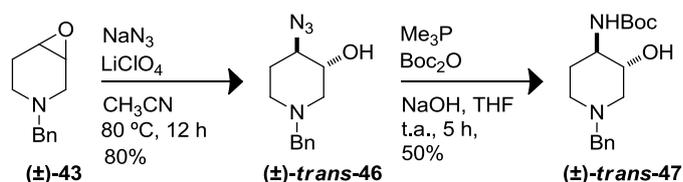


Esquema 67. Acilación enzimática del compuesto **(±)-*trans*-44**.

En este caso, los resultados obtenidos tampoco fueron satisfactorios, puesto que, tras 4 días de reacción no se observó conversión.

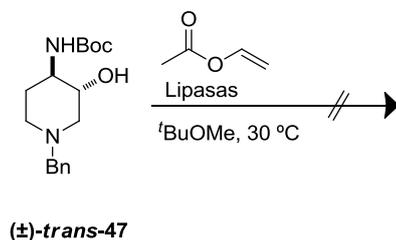
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se decidió cambiar de grupo protector del sustituyente amino y comprobar su influencia en los procesos de acilación. Para ello se realizó la apertura del epóxido **(±)-43** (Esquema 68), con NaN₃ en presencia de LiClO₄, conduciendo al compuesto **(±)-*trans*-46**.

Capítulo 3



Esquema 68. Síntesis del compuesto **(±)-*trans*-47**.

La azida **(±)-*trans*-46** formada, en presencia de Me_3P y *tert*-butildicarbonato en THF, da lugar a la correspondiente amina protegida **(±)-*trans*-47**. En primer lugar, y tras la habitual puesta a punto de las condiciones necesarias para el seguimiento de la reacción mediante el HPLC quiral, se llevó a cabo la reacción de acilación enzimática del mismo (Esquema 69).



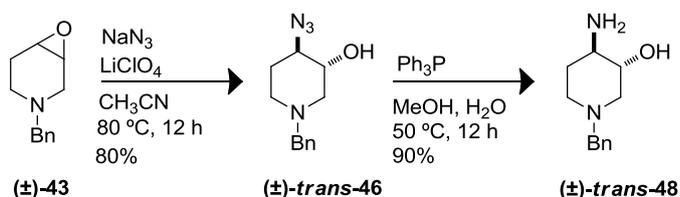
Esquema 69. Acilación enzimática del compuesto **(±)-*trans*-47**.

En este caso, se probaron las lipasas de *Candida antarctica* de tipo A y B, como agente de acilación se utilizaron 5 equivalentes de acetato de vinilo y *t*BuOMe como disolvente a 30 °C, sin observarse producto tras 4 días de reacción.

De los resultados expuestos hasta este momento parece evidente la inaccesibilidad del hidroxilo en la posición 3 de la piperidina al centro activo de las lipasas probadas. Estos resultados, por otra parte, no fueron sorprendentes puesto que concuerdan con los previamente obtenidos en este grupo de investigación cuando se lleva a cabo la resolución de 3,4-dihidroxi-piperidinas que se mencionan en los antecedentes de este capítulo.⁸⁶ En este caso, la lipasa CAL-B catalizaba exclusivamente

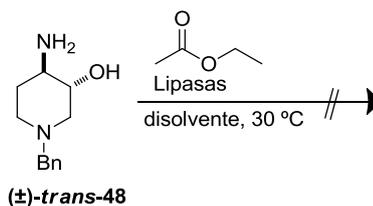
la hidrólisis del derivado acetilado en posición 4 obteniéndose un único regioisómero.

Llegados a este punto, se decidió probar la reacción de aminólisis (Esquema 70), puesto que, la amina libre se obtiene fácilmente a partir de la azida. El compuesto **(±)-trans-46** en presencia de Ph_3P y MeOH da lugar a la correspondiente amina **(±)-trans-48**.



Esquema 70. Síntesis del compuesto **(±)-trans-48**.

El seguimiento de la reacción de aminólisis se hizo mediante la técnica de cromatografía de capa fina (TLC). En primer lugar, se hizo reaccionar el sustrato **(±)-trans-48**, en $t\text{BuOMe}$ como disolvente a 30°C y las lipasas CAL-A, CAL-B y AK, utilizando como agente de acilación 5 equivalentes de acetato de etilo.



Esquema 71. Reacción de aminólisis del compuesto **(±)-trans-48**.

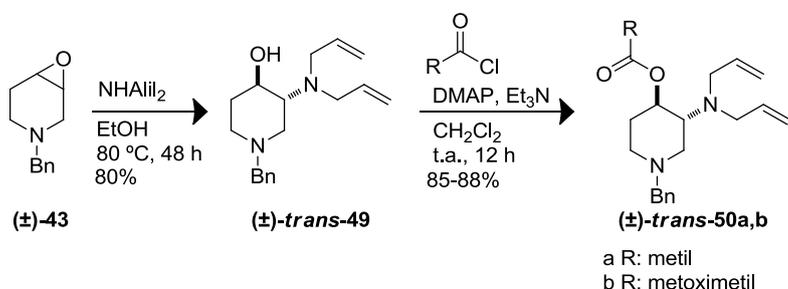
Bajo estas condiciones y tras 3 días de reacción, no se observó producto, por lo que se decidió utilizar el acetato de etilo tanto como agente de acilación como disolvente, manteniendo inalteradas el resto de condiciones.

Es importante mencionar que para todas las reacciones enzimáticas es necesario realizar de manera paralela una prueba de

control, es decir, mismas condiciones de reacción pero sin la adición de la enzima, de esta manera se comprueba cómo de efectiva es la catálisis enzimática. Esta prueba cobra aún más importancia al tratarse de reacciones de aminólisis debido a la alta reactividad de las aminas. Tras solamente 1 hora de reacción se observó, que, tanto en ausencia de catalizador como en todas las pruebas enzimáticas, se había alcanzado el 100% de conversión.

3.7. Síntesis y resolución del derivado (\pm)-*trans*-3-amino-4-hidroxipiperidina

Para el estudio de la resolución enzimática de estos nuevos sustratos se preparó el regioisómero (\pm)-*trans*-49 y los derivados acilados del mismo (Esquema 72).



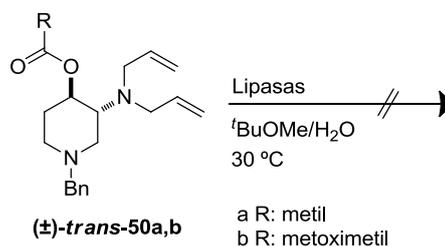
Esquema 72. Síntesis de los compuestos (\pm)-*trans*-49 y (\pm)-*trans*-50a,b.

La síntesis de estos sustratos está basada en los trabajos descritos en los antecedentes,^{77,78,80} el compuesto (\pm)-*trans*-49 se preparó a partir del epóxido (\pm)-43 por tratamiento con dialilamina en ausencia del ácido de Lewis. En este caso la presencia de un disolvente prótico como el etanol favorece la regioselectividad y el rendimiento de la reacción.

A pesar de ser éste el único regioisómero que se detecta en el medio de reacción, la reactividad varía dependiendo de las condiciones de la misma. Para alcanzar un elevado rendimiento (80%) es necesario llevar a cabo la reacción en un tubo sellado

durante 48 horas a 80 °C, recuperándose el 20% restante del producto de partida inalterado. Por último, por tratamiento del aminoalcohol obtenido con el correspondiente cloruro de ácido en CH₂Cl₂, se consiguieron los derivados **(±)-trans-50a,b** con alto rendimiento.

Con el objetivo de hacer un seguimiento de las reacciones así como calcular los excesos enantioméricos tanto de sustrato como de producto, se optimizó la separación de los enantiómeros mediante HPLC quiral. Una vez establecidas las condiciones, se llevaron a cabo en primer lugar las reacciones de hidrólisis enzimática (Esquema 73).

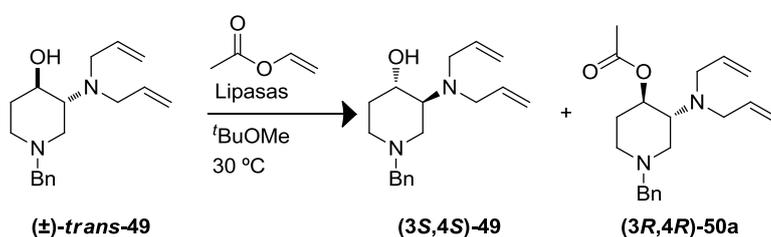


Esquema 73. Hidrólisis enzimática de los compuestos **(±)-trans-50a,b**.

Las condiciones iniciales para la hidrólisis del sustrato **(±)-trans-50a** fueron 5 equivalentes de H₂O, ^tBuOMe como disolvente a 30 °C y se probaron varias lipasas (CAL-A, CAL-B, AK, PSL-IM). En ninguno de los casos se observó reacción tras 3 días de incubación. Debido a esto, se llevan a cabo estas mismas reacciones con un éster más activado **(±)-trans-50b**, en las condiciones descritas anteriormente. En este caso, tras 3 días de reacción se observaron trazas del producto deseado en las reacciones catalizadas por las lipasas CAL-A, CAL-B y AK. En un intento de aumentar la velocidad de la reacción, se utilizó como medio de reacción también fosfato 50 mM a pH 7.0, sin embargo, en estas condiciones, se observó la formación en una elevada proporción del producto racémico en ausencia de catalizador.

Capítulo 3

Finalmente, se estudió el proceso de acilación enzimática del sustrato **(±)-trans-49** (Esquema 74) con las mismas lipasas que para el sustrato anterior, 5 equivalentes de acetato de vinilo y t BuOMe como disolvente a 30 °C (Tabla 10).



Esquema 74. Acilación enzimática del compuesto **(±)-trans-49**.

En estas condiciones (Tabla 10) se observó una elevada enantioselectividad con las lipasas CAL-B, CAL-A, AK y PSL-IM (entradas 1-4). Sin embargo, las conversiones alcanzadas no fueron elevadas, siendo el mejor de los resultados el obtenido con la lipasa CAL-B (entrada 1), puesto que, tras 4 días de reacción, se obtuvo un 31% de conversión.

Con el fin de optimizar la conversión de los procesos se estudió el efecto de la temperatura y del disolvente con los biocatalizadores que mostraron conversiones más altas en los procesos iniciales (CAL-A y CAL-B).

Los disolventes probados fueron el tolueno, CH_3CN y el propio acetato de vinilo. En las reacciones realizadas en acetato de vinilo (entradas 5 y 6), se observó un aumento de la velocidad de la reacción con ambas enzimas, aunque con la lipasa CAL-B (entrada 5) disminuyó la enantioselectividad. Por el contrario, en la reacción llevada a cabo con la lipasa CAL-A como catalizador (entrada 6) se mejoró la velocidad consiguiéndose un 40% de conversión tras 4 días de reacción y sin pérdida de enantioselectividad.

Tabla 10. Acilación enzimática del compuesto (\pm)-*trans*-49 a 30 °C.

Entrada	Lipasa	disolvente	<i>t</i> (días)	<i>ees</i> ^a (%)	<i>eeP</i> ^a (%)	<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i> ^c
1	CAL-B	^t BuOMe	4	46	>99	31	>200
2	CAL-A	^t BuOMe	5	40	>99	27	>200
3	AK	^t BuOMe	6	28	>99	22	>200
4	PSL-IM	^t BuOMe	6	13	>99	11	>200
5	CAL-B	AcOVin	4	59	47	55	5
6	CAL-A	AcOVin	4	64	>99	40	>200
7	CAL-B	Tolueno	5	35	>99	26	5
8	CAL-A	Tolueno	4	---	---	trazas	---
9	CAL-B	CH ₃ CN	5	26	>99	20	>200
10	CAL-A	CH ₃ CN	4	---	---	trazas	---
11 ^d	CAL-B	^t BuOMe	4	62	>99	38	>200
12 ^d	CAL-B	^t BuOMe	7	87	>99	47	>200
13 ^d	CAL-A	AcOVin	4	16	>99	14	>200
14 ^d	CAL-B	^t BuOMe/ Et ₃ N	4	81	>99	45	>200

^a Excesos enantioméricos de sustrato (*ees*) y de producto (*eeP*) determinados por HPLC. ^b $c = ees / (ees + eeP)$. ^c $E = \ln[(1-c)(1 - ees)] / \ln[(1-c)(1 + ees)]$.³² ^d reacciones llevadas a cabo a 45 °C.

Los resultados de las reacciones llevadas a cabo en tolueno y CH₃CN como disolventes se muestran en las entradas 7-10. Al catalizar la reacción con CAL-B en CH₃CN (entrada 9) como disolvente se obtuvo un 20% de conversión tras 5 días de reacción, mientras que para el resto de las biotransformaciones, en el mismo periodo de tiempo, solamente se obtuvieron trazas del producto deseado.

Tras finalizar el estudio de los diferentes disolventes, se concluyó, que los mejores resultados con CAL-B se obtenían con ^tBuOMe como disolvente, mientras que con la lipasa CAL-A se podía mejorar la velocidad utilizando acetato de vinilo como disolvente. Por tanto, y teniendo en cuenta estos resultados, se estudió la influencia de la temperatura elevándola a 45 °C y manteniendo el resto de condiciones más favorables en cada caso. Con CAL-B, tras

Capítulo 3

4 días (entrada 11) la conversión era ligeramente superior que la obtenida a 30 °C (entrada 1), y tras 7 días de reacción (entrada 12) se alcanzó una conversión cercana al 50% lo que permitió obtener también el sustrato remanente con una elevada pureza óptica. Por el contrario, al llevar a cabo la reacción con CAL-A en acetato de vinilo a 45°C (entrada 13) la actividad descendió apreciablemente.

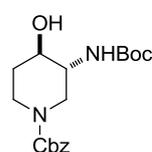
Teniendo en cuenta los excelentes resultados obtenidos con CAL-B, se intentó optimizar el proceso mediante la adición de una pequeña cantidad de Et₃N al medio de reacción. Se ha descrito,⁸⁷ que la adición de aminas en pequeña proporción puede favorecer la catálisis al evitar la presencia de ácido en el medio de reacción. En este caso, la presencia del ácido acético podría provenir de la hidrólisis química o enzimática del agente de acilación. De este modo, se llevó a cabo la acetilación enzimática bajo las condiciones anteriormente descritas en presencia de Et₃N, observándose un incremento considerable de la velocidad de la reacción puesto que tras sólo 4 días se consiguió prácticamente la misma conversión que en 7 días en ausencia de amina sin pérdida de la elevada enantioselectividad en estas condiciones (entrada 14).

3.8. Estudio de la resolución de los derivados benciloxicarbonilados de la piperidina

Como se ha explicado anteriormente, la presencia de bencilamina como grupo protector del nitrógeno piperidínico es esencial para el control de la regioselectividad. No obstante, desde el punto de vista de la catálisis enzimática, se planteó el estudio de la influencia de este grupo protector en la misma, y para ello, se sintetizaron los derivados *N*-benciloxicarbonilados. Por otra parte, se encuentra descrita en la bibliografía la separación de ambos enantiómeros del compuesto (±)-bencil-3-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-hidroxipiperidina-1-carboxilato **(±)-*trans*-51** (

⁸⁷ F. Theil, *Tetrahedron* **2000**, 56, 2905- 2919.

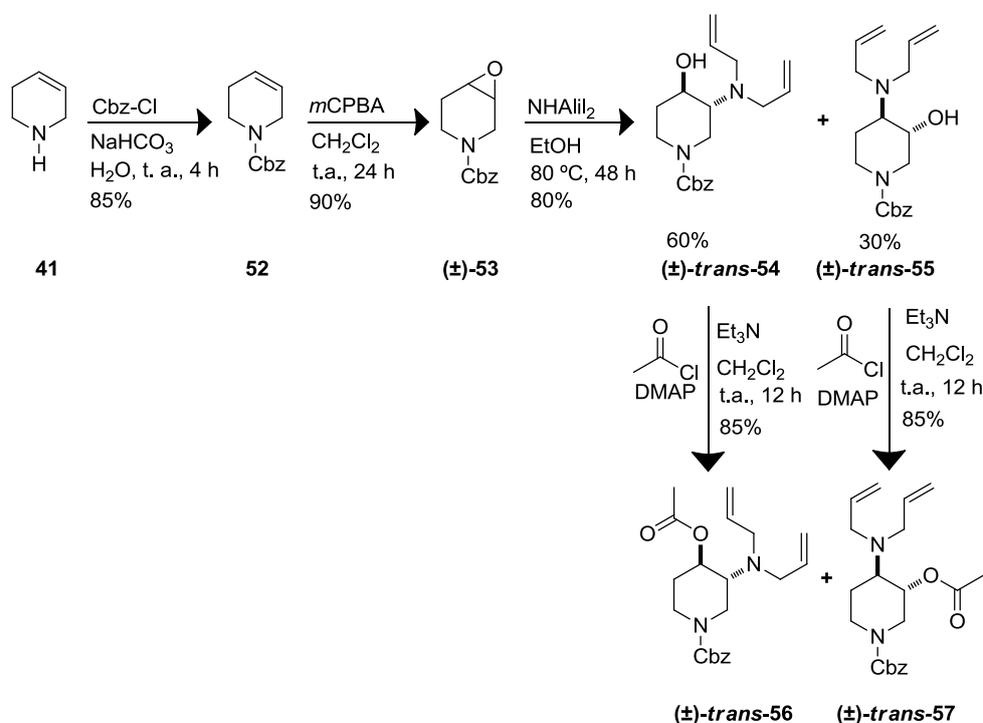
Figura 19) mediante el uso del HPLC quiral (material suplementario de la cita 84). Por lo que, obtener estos derivados ópticamente puros facilitaría la asignación de la configuración absoluta de los previamente resueltos.



(±)-*trans*-51

Figura 19. Compuesto con configuración descrita a comparar.

Por ambas razones, y a pesar de que era previsible una baja regioselectividad en la apertura del epóxido (±)-53, se decidió sintetizar estos regioisómeros y estudiarlos como sustratos de las reacciones enzimáticas (Esquema 75).



Esquema 75. Síntesis de los compuestos (±)-*trans*-54, (±)-*trans*-55, (±)-*trans*-56 y (±)-*trans*-57.

Capítulo 3

Para la síntesis de las piperidinas benciloxicarboniladas, se partió de la piperidina **41** (Esquema 75), la cual fue protegida previamente con Cbz. Para ello, fue tratada con NaHCO₃ en H₂O y cloroformiato de bencilo, obteniéndose la 1-benciloxicarbonil-1,2,3,6-tetrahidropiridina **52** con elevado rendimiento. En este caso, para la formación del epóxido fue posible la utilización de *m*CPBA como agente oxidante, puesto que, la protección como carbamato impide la oxidación del nitrógeno. Una vez obtenido el compuesto **(±)-53**, se hizo reaccionar con dialilamina en etanol, dando lugar, como era previsible, a mezclas de ambos regioisómeros **(±)-trans-54** y **(±)-trans-55** en proporción 2:1, los cuales fueron separados de manera satisfactoria mediante cromatografía de columna.

En primer lugar se estudió tanto la acilación del sustrato **(±)-trans-54** como la hidrólisis de su derivado **(±)-trans-56**. Para ello, se probaron diferentes lipasas (CAL-A, CAL-B, AK) en *t*BuOMe como disolvente a 30 °C y 5 equivalentes de acetato de vinilo o H₂O respectivamente, sin embargo, en ninguno de los procesos se observó producto tras 4 días de reacción.

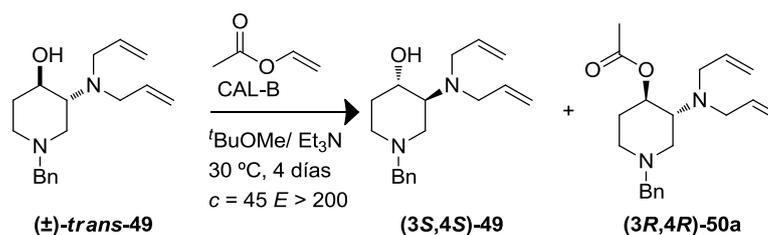
De manera análoga, se llevaron a cabo dichos procesos para los derivados **(±)-trans-55** y **(±)-trans-57**. Las condiciones de reacción probadas fueron las mismas que en el caso anterior y en ningún caso se observó producto de reacción.

Aunque la resolución de estos sustratos no ha sido posible, este estudio pone de manifiesto como la estructura del sustrato es uno de los factores que más influye en la enantioselectividad de los procesos enzimáticos, al tener que acomodarse éste en el centro activo de la enzima.

3.9. Asignación de la configuración absoluta

La determinación de la configuración de los compuestos enantiopuros se obtuvo tras una serie de transformaciones a partir

del compuesto **(3R,4R)-50a** obtenido en la reacción de acilación enzimática del sustrato **(±)-trans-49** (Esquema 76).



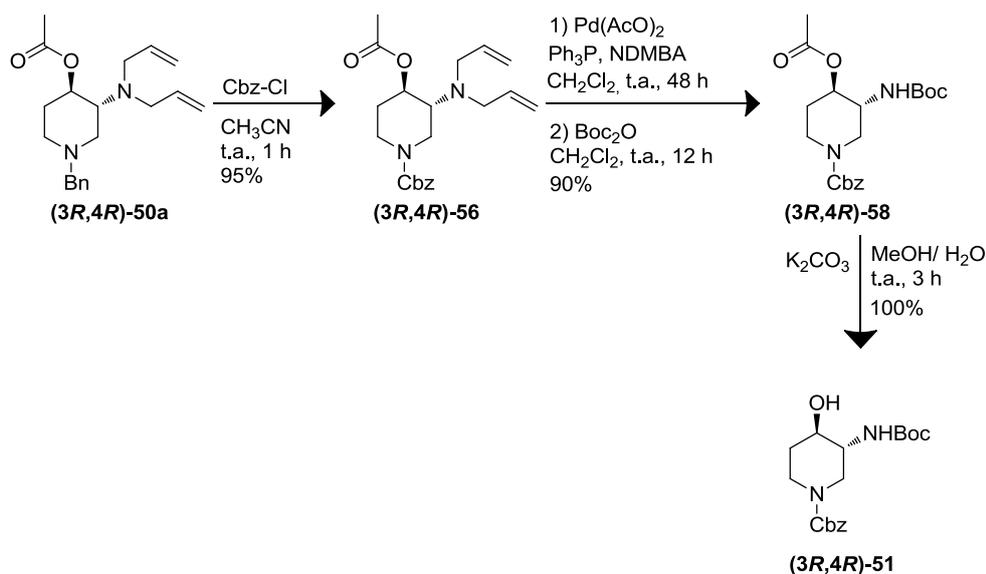
Esquema 76. Acilación enzimática del compuesto **(±)-trans-49**

En primer lugar, se intercambió el grupo bencilo por el benciloxycarbonilo en el compuesto **(3R,4R)-50a**,⁸⁸ por tratamiento de éste con cloroformiato de bencilo, obteniéndose el compuesto enantiopuro **(3R,4R)-56** con alto rendimiento (Esquema 77). Seguidamente se realizó la desalilación del sustituyente amino en las condiciones de Tsuji-Trost.⁸⁹ Tras una filtración sobre sílica gel del crudo de reacción se hizo reaccionar con *di*tert-butildicarbonato, obteniéndose la amina protegida **(3R,4R)-58**. Por último, y con el objetivo de obtener el compuesto **(3R,4R)-51** descrito previamente en la bibliografía, se hidrolizó el acetilo por tratamiento con K_2CO_3 en una mezcla de MeOH/ H_2O , obteniéndose, el compuesto deseado **(3R,4R)-51** con un rendimiento cuantitativo.

⁸⁸ V. H. Rawal, R. J. Jones, M. P. Cava, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 19-28.

⁸⁹ F. Garro-Helion, A. Merzouk, F. Guibé, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 6109-6113.

Capítulo 3



Esquema 77. Síntesis del compuesto enantiopuro (3R,4R)-51.

Para asignar la configuración absoluta al producto obtenido, se llevó a cabo su análisis mediante cromatografía HPLC quiral en las condiciones previamente descritas (material suplementario de la cita 84). De acuerdo con ella, se asignó la configuración de su precursor (3R,4R)-50a procedente de la reacción biocatalizada por la lipasa CAL-B para el sustrato (\pm)-*trans*-49. El cromatograma obtenido mediante este análisis con una columna de relleno quiral (Chiralpak AD-H) a 30 °C, utilizando como eluyentes una mezcla de heptano: isopropanol (70:30) se muestra en la figura 20. Una vez establecidas las configuraciones absolutas se comprobó una vez más que la lipasa CAL-B cataliza la acilación del enantiómero esperado de acuerdo con la regla de Kazlauskas.³⁰

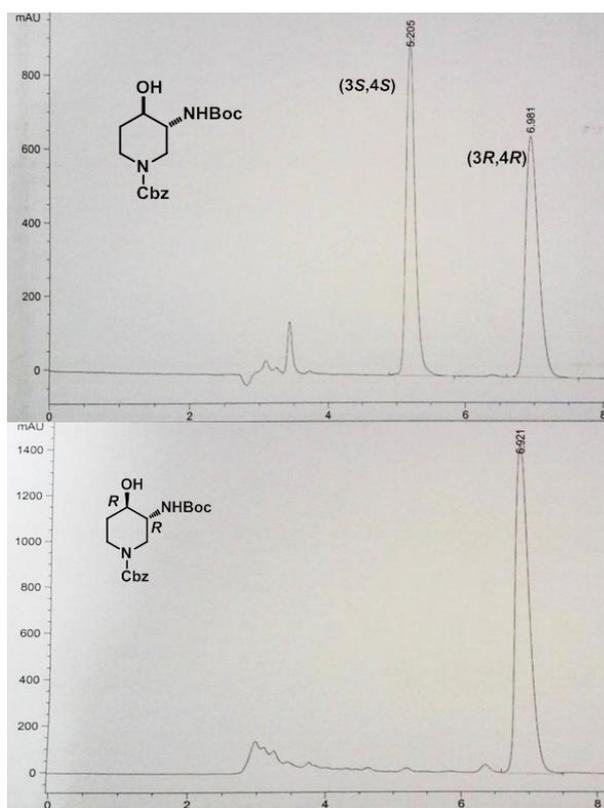


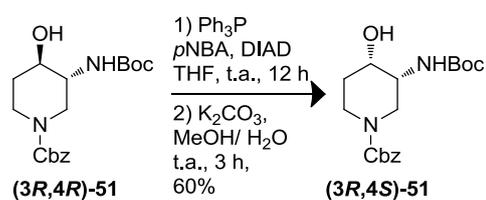
Figura 20. Cromatogramas de HPLC del compuesto (±)-*trans*-51 racémico y el (3*R*,4*R*)-51 enantiopuro.

3.10. Síntesis del derivado (3*R*,4*S*)-1-benciloxycarbonil-4-hidroxi-3-*tert*-butoxicarbonil-aminopiperidina

Como bien se ha comentado en la introducción a este capítulo, tanto los derivados *trans* como los *cis* son estructuras claves para la actividad farmacológica de varios compuestos. Por tanto, como muestra de la versatilidad del derivado (3*R*,4*R*)-51 previamente obtenido, se decidió sintetizar su análogo *cis* (3*R*,4*S*)-51 (Esquema 78), mediante una reacción en condiciones de Mitsunobu. Por comparación con los datos previamente descritos respecto al análisis mediante HPLC quiral de este compuesto,⁷⁵ se corrobora

Capítulo 3

que se ha obtenido el compuesto deseado sin perder su pureza óptica, permitiendo confirmar de forma adicional la configuración absoluta de los compuestos obtenidos.⁷⁵



Esquema 78. Síntesis del compuesto **(3R,4S)-51** en condiciones de Mitsunobu.

Conclusiones

En este capítulo se ha estudiado la síntesis regioselectiva de *trans*-3-dialilamino-4-hidroxi-piperidinas y *trans*-4-dialilamino-3-hidroxi-piperidinas y su resolución mediante procesos de acilación catalizados por lipasas o de hidrólisis de sus derivados esterificados.

Se ha comprobado la influencia de los grupos sustituyentes del nitrógeno del anillo piperidínico tanto en la síntesis de los sustratos racémicos como en su resolución, siendo el grupo bencilo con el que mejores resultados se han obtenido en ambos casos.

El método sintético que se ha puesto a punto combina la apertura regioselectiva del epóxido de la piperidina con dialilamina y la resolución del *trans*-aminoalcohol obtenido mediante la acetilación con la lipasa CAL-B. Este método, permite la preparación con elevada pureza óptica y buen rendimiento la (3*S*,4*S*)-*N*-bencil-3-dialilamino-4-hidroxi-piperidina así como (3*R*,4*R*)-*N*-bencil-4-acetoxi-3-dialilaminopiperidina.

La influencia de los grupos protectores se ha puesto de manifiesto en la serie de transformaciones llevadas a cabo para la asignación de la configuración absoluta de los productos obtenidos.

Parte experimental

3.11. General

Los reactivos, biocatalizadores, disolventes y técnicas de análisis han sido detalladas en la parte experimental del primer capítulo con las excepciones que se muestran a continuación.

3.11.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El seguimiento de las reacciones tanto de acilación como de hidrólisis enzimática así como la medida de los excesos enantioméricos de sustratos y productos, se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100. Para ello se emplearon las columnas quirales mencionadas en los capítulos anteriores así como la Chiralpak AD-H (0.46 x 25 cm). La detección empleada fue visible-ultravioleta a 210 y 215 nm, utilizando como fase móvil mezclas en distintas proporciones de hexano/isopropanol o bien heptano/ isopropanol.

3.12. Procedimientos sintéticos

3.12.1. Procedimiento general para las acilaciones enzimáticas

La mezcla de reacción contiene la correspondiente aminohidroxipiperidina *N*-protegida (0.18 mmol), la lipasa (100.0 mg), Et₃N (150 μ L) y el agente de acilación (5 equivalentes) en ^tBuOMe (1.5 mL). Se agita a 45°C y 250 rpm en un agitador orbital. El progreso de la reacción se sigue mediante HPLC quiral hasta la conversión requerida. La enzima se elimina mediante filtración y se lava con ^tBuOMe. El disolvente se elimina a presión reducida y el crudo se purifica mediante cromatografía de columna (20% hexano / AcOEt).

3.12.2. Procedimiento general para las hidrólisis enzimáticas

La mezcla de reacción contiene la correspondiente aminoaciloxipiperidina *N*-protegida (50.0 mg), la lipasa (100.0 mg) y 5 equivalentes de H₂O en ^tBuOMe (1.5 mL). Se agita a 30°C y 250 rpm en un agitador orbital. El progreso de la reacción se sigue mediante HPLC quiral hasta la conversión requerida. La enzima se elimina mediante filtración y se lava con ^tBuOMe. El disolvente se elimina a presión reducida y el crudo se purifica mediante cromatografía de columna (20% hexano / AcOEt).

3.12.3. Síntesis de 1-bencil-1,2,3,6-tetrahidropiridina. 42

A una disolución de 1,2,3,6-tetrahidropiridina (12.0 mmol, 1.0 g) en 10 mL de CH₃CN, se le añade de Et₃N (1.7 mL, 12.0 mmol) y bromuro de bencilo (1.6 mL, 12.0 mmol). Se calienta a 75 °C en un tubo sellado. Tras 4 horas de reacción se evapora el disolvente y se purifica mediante cromatografía de columna (100% AcOEt), obteniéndose un aceite amarillo con rendimiento cuantitativo.

3.12.4. Síntesis de 1-bencil-3,4-epoxipiperidina (±)-43

A una disolución de 1-bencil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (620.0 mg, 3.6 mmol) en 25 mL H₂O, se añade TFA gota a gota (342.3 mg, 4.6 mmol). Cuando la disolución se aclara se añade NCS (277.2 mg, 2.0 mmol) y se agita a 70°C durante 5 horas. Pasado este tiempo se añaden 10 mL NaOH 10N y se mantiene la agitación durante 2 horas más a 45 °C. Seguidamente se extrae con AcOEt (3 x 10 mL). Se juntan las fases orgánicas y se secan sobre Na₂SO₄. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía de columna (40% AcOEt/hexano) obteniéndose un aceite amarillo con un rendimiento del 95%.

3.12.5. Síntesis 1-bencil-4-amino-3-hidroxipiperidinas (\pm)-*trans*-44, (\pm)-*trans*-46.

A una disolución en atmósfera inerte del epóxido (**\pm -43**) (320.0 mg, 1.7 mmol) en CH₃CN (15 mL) se añade LiClO₄ (539.0 mg, 5.1 mmol) y la amina correspondiente (dialilamina o bien azida de sodio) (2.5 mmol) y se deja agitando durante 12 horas. Pasado este tiempo, se evapora el disolvente y el crudo resultante se purifica mediante cromatografía de columna (1% MeOH/CH₂Cl₂). Se obtiene el isómero deseado con un rendimiento entre el 80-85%.

3.12.6. Síntesis del derivado (\pm)-*trans*-1-bencil-3-hidroxi-4-*tert*-butoxicarbonilaminopiperidina. (\pm)-*trans*-47.

El compuesto de partida (**\pm -*trans*-46**) (200.0 mg, 0.86 mmol), se disuelve bajo atmósfera inerte en THF seco (10 mL) y se añadió por este orden: NaOH 1M desoxigenado (2 mL), Me₃P (229.8 μ L, 2.6 mmol) y Boc₂O (560.0 mg, 2.6 mmol). La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. Transcurrido ese tiempo, el disolvente se elimina bajo presión reducida y el crudo se disuelve en AcOEt 20 mL lavándolo con H₂O (3 x 10 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄. El crudo se purifica por cromatografía de columna (2% MeOH/ CH₂Cl₂).

3.12.7. Síntesis del derivado (\pm)-*trans*-1-bencil-4-amino-3-hidroxipiperidina. (\pm)-*trans*-48

Sobre una disolución en atmósfera inerte del compuesto (**\pm -*trans*-46**, (200.0 mg, 0.9 mmol) en MeOH (8.5 mL) se añade Ph₃P (338.0 mg, 1.3 mmol) y se agita hasta su completa disolución. A continuación se añade H₂O (155.0 μ L, 1.3 mmol) y se agita durante 12 horas a 50 °C hasta la completa desaparición del sustrato de partida. Seguidamente, el disolvente se evapora a presión reducida y el crudo se purifica mediante cromatografía de columna (10%

Capítulo 3

MeOH/ CH₂Cl₂), obteniéndose el compuesto **(±)-trans-48**, como un aceite con un 90% de rendimiento.

3.12.8 Procedimiento general para los derivados acilados (±)-trans-45a,b, (±)-trans-50a,b, (±)-trans-56, (±)-trans-57.

Bajo atmósfera inerte se disuelve el correspondiente alcohol **(±)-trans-44**, **(±)-trans-49**, **(±)-trans-54** o **(±)-trans-55** (1.0 mmol) en 10 mL de CH₂Cl₂, se le añade DMAP (6.4 mg, 0.05 mmol), Et₃N (217.6 μL, 1.6 mmol) y el cloruro de acilo correspondiente (2.1 mmol). Pasadas 12 horas se extrae 3 veces (3 x 15 mL) con H₂O. Se la fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro y se purifica mediante cromatografía de columna (10% MeOH/ CH₂Cl₂), obteniéndose los productos como aceites amarillos con un rendimiento entre el 85 y el 90%.

3.12.9. Síntesis de los derivados (±)-trans-49, (±)-trans-54, (±)-trans-55

Se disuelve el epóxido correspondiente **(±)-43** o **(±)-53** (1.6 mmol) en 10 mL de etanol, se añade dialilamina (229.2 μL, 2.4 mmol) y se deja a 80°C durante dos días en un tubo sellado. A continuación se evapora el disolvente y se purifica el producto por cromatografía de columna. En el caso del derivado **(±)-trans-49**, la purificación se lleva a cabo (2% MeOH/ CH₂Cl₂), obteniéndose el producto como un aceite amarillo con un 80% de rendimiento, recuperándose el epóxido de partida.

En el caso de los compuestos **(±)-trans-54** y **(±)-trans-55**, el producto se obtiene como mezclas de ambos isómeros, siendo posible su separación por cromatografía de columna (40% AcOEt/ hexano). Se obtienen los productos deseados como aceites amarillos siendo el rendimiento de un 60% para el derivado **(±)-trans-54** y un 30% en el caso del **(±)-trans-55**.

3.12.10. Síntesis del compuesto (3R,4R)-1-benciloxi-carbonil-4-hidroxi-3-tert-butoxicarbonilaminopiperidina. (3R,4R)-51

El compuesto **(3R,4R)-58** (100.0 mg, 0.3 mmol) se disuelve en una mezcla metanol/ agua (3 mL/ 1.5 mL) y se añade K₂CO₃ (35.0 mg, 0.6 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. Seguidamente se evapora el disolvente bajo presión reducida y se disuelve el crudo en AcOEt (10 mL). La suspensión resultante se lava con agua (3 x 15 mL) y la fase orgánica se seca con Na₂SO₄. El producto **(3R,4R)-51** se obtiene como un aceite transparente de manera cuantitativa sin necesidad de purificación.

3.12.11. Síntesis del compuesto 1-benciloxycarbonil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina. 52

Se añade CbzCl (3.8 mL, 26.3 mmol) gota a gota a 0 °C sobre una mezcla que contiene **41** (2.0 g, 21.9 mmol) y NaHCO₃ (2.8 g, 26.3 mmol) disueltos en 50 mL de H₂O. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. A continuación se añaden 20 mL de una disolución acuosa de Na₂CO₃ al 5%.y se lava con CH₂Cl₂ (3 x 20 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ y tras evaporar el disolvente bajo presión reducida se purifica por cromatografía de columna (20% AcOEt/hexano). Se obtiene el producto deseado con un 85% de rendimiento.

3.12.12. Síntesis de 1-benciloxycarbonil—3,4-epoxipiperidina. (±)-53

A una disolución del compuesto **52** (3.4 g, 18.0 mmol) en 20 mL de CH₂Cl₂ a 0 °C, se añade *m*CPBA (4.3 g, 25.0 mmol,). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. Pasado ese tiempo, se lava la fase orgánica con NaOH 1N (3 x 15 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ y tras evaporar el disolvente bajo

Capítulo 3

presión reducida se purifica por cromatografía de columna (50% AcOEt/ hexano). Se obtiene el producto deseado (\pm)-**53** como un aceite transparente con un 90% de rendimiento.

3.12.13. Síntesis del derivado (3R,4R)-4-acetoxi-1-benciloxicarbonil-3-(dialilamino)piperidina. (3R,4R)-56

El sustrato (**3R,4R**)-**50a** (250.0 mg, 0.7 mmol) obtenido en la acilación enzimática del sustrato (\pm)-*trans*-**49** catalizada por la lipasa CAL-B, se disuelve en CH₃CN (7 mL) y se añade CbzCl (104.0 μ L, 0.7 mmol). La disolución se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. Seguidamente se elimina el disolvente a presión reducida y se resuspende el crudo de reacción en AcOEt (10 mL). La mezcla se lava con H₂O (3 x 10 mL) secándolo posteriormente sobre Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se elimina a presión reducida y el crudo se purifica por cromatografía de columna (10% AcOEt/ hexano). Se obtiene el producto puro como un aceite transparente con un rendimiento del 95%.

3.12.14. Síntesis del derivado (3R,4R)-4-acetoxi-1-benciloxicarbonil-3-*tert*-butoxicarbonilaminopiperidina. (3R,4R)-58.

En un bulbo se introduce el compuesto (**3R,4R**)-**56** (216.0 mg, 0.6 mmol). Una vez colocado sobre el bulbo un embudo de adición de presión compensada, el sistema se pone en atmósfera de nitrógeno y, a continuación, se introducen 2 mL de CH₂Cl₂ anhidro en el bulbo. En el embudo de adición se mezclan el Pd(OAc)₂ (5 mg, 0.03 mmol) y Ph₃P (23.0 mg, 0.08 mmol) con 2 mL de CH₂Cl₂ anhidro; se deja durante cinco minutos preformando el catalizador y, después, se gotea al bulbo. Se retira el embudo de adición y se adiciona directamente el ácido *N-N*-dimetilbarbitúrico (272.0 mg, 1.7 mmol). Se deja reaccionar a reflujo de CH₂Cl₂ durante 48 horas. Una vez completado este tiempo, se lava la fase orgánica con una

disolución de NaOH ac. 3N (4 x 10 mL), se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y se elimina el disolvente a presión reducida. El crudo resultante se filtra sobre sílica gel (5% MeOH/ CH₂Cl₂).

El crudo resultante se disuelve en CH₂Cl₂ (2.5 mL) y se añade Boc₂O (15.6 mg, 0.7 mmol) dejándolo agitar a temperatura ambiente durante 12 horas. A continuación se evapora el disolvente y se purifica por cromatografía de columna (3% MeOH/ CH₂Cl₂), obteniéndose el compuesto **(3R,4R)-58** como un aceite amarillo con un 90% rendimiento.

3.12.15. Síntesis del derivado (3R,4S)-1-benciloxicarbonil-3-tert-butoxicarbonilamino-4-hidroxipiperidina. (3R,4S)-51

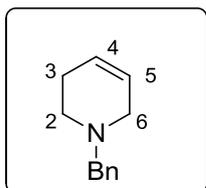
A una suspensión del alcohol **(3R,4R)-51** (0.2 mmol) en THF seco (2.4 mL) se adiciona por este orden y tras la completa disolución del anterior: Ph₃P (9.2 mg, 0.35 mmol), pNBA (80.2 mg, 0.48 mmol), seguidamente se pone la reacción a cero grados y se añade gota a gota DIAD (101.3 μL, 0.48 mmol). La mezcla se deja agitando 12 horas a temperatura ambiente, tras las cuales se evapora el disolvente y se procede al paso de desprotección, para el cual, se redisuelve el crudo en una mezcla de MeOH/H₂O (3 mL/1.5 mL) y se le añade K₂CO₃ (35.0 mg, 0.3 mmol). La mezcla se deja agitar durante 2 horas y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo se suspende en AcOEt (6 mL) y se extrae con agua (3 x 10 mL). Se combinan las fases orgánicas y se secan con Na₂SO₄. El producto se purifica por cromatografía de columna (3% MeOH/ CH₂Cl₂), obteniéndose **(3R,4S)-51** como aceite blanco con un 60% de rendimiento.

Capítulo 3

3.13. Datos experimentales

En esta sección se han recogido los datos experimentales de los compuestos que forman parte de este capítulo.

1-Bencil-1,2,3,6-tetrahidropiridina. 42



Fórmula molecular: C₁₂H₁₅N

Estado físico: aceite transparente

Peso molecular: 173.25 g/mol

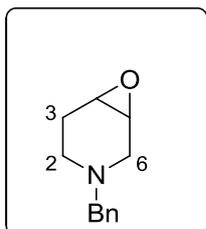
Rf: (20% Hexano/ AcOEt): 0.3

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.48 – 7.25 (m, 5H), 5.81 (dtd, *J* = 8.6, 3.4, 1.7 Hz, 1H, C-5), 5.72 (dtt, *J* = 7.9, 3.0, 1.5 Hz, 1H, C-4), 3.64 (s, 2H, CH₂), 3.03 (m, 2H, H-6), 2.62 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, H-2), 2.22 (m, 2H, H-3).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 138.8 (C), 129.6 (CH), 128.6 (CH), 127.4 (CH), 125.9 (C-4 o C-5), 125.6 (C-4 o C-5), 63.4 (CH₂), 53.3 (C-6), 50.1 (C-2), 26.7 (C-3).

Rendimiento: 100%

1-Bencil-3,4-epoxipiperidina. (±)-43



Fórmula molecular: C₁₂H₁₅NO

Estado físico: aceite transparente

Peso molecular: 189.25 g/mol

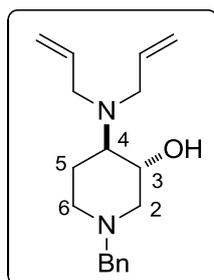
Rf: (40% AcOEt/Hexano): 0.35

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.44 – 7.16 (m, 5H), 3.48 (s, 2H, CH₂), 3.24 (m, 2H, H-4 y H-5), 3.04 (m, 1H, H-2 o H-6), 2.70 (m, 1H, H-2 o H-6), 2.42 – 2.30 (m, 1H, H-2 o H-6), 2.28 – 2.17 (m, 1H, H-2 o H-6), 2.07 – 1.95 (m, 2H, H-3).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 137.9 (C), 129.0 (CH), 128.3 (CH), 127.1 (CH), 62.4 (CH₂), 52.4 (C-6), 51.4 (C-4 o C-5), 50.7 (C-4 o C-5), 45.8 (C-2), 25.6 (C-3).

Rendimiento: 95%

***trans*-1-Bencil-4-(dialilamino)-3-hidroxipiperidina. (\pm)-*trans*-44**



Fórmula molecular: C₁₈H₂₆N₂O

Estado físico: aceite transparente

Peso molecular: 286.41 g/mol

Rf: (1% MeOH/ CH₂Cl₂): 0.05

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₁₈H₂₇N₂O]⁺ 287.2118 *m/z*, encontrada 287.2122.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.39 – 7.24 (m, 5H), 5.87 – 5.73 (m, 2H, 2 x CH=CH₂), 5.22 – 5.09 (m, 4H, 2 x CH=CH₂), 3.64 – 3.57 (m, 3H, H-3, CH₂), 3.40 – 3.37 (m, 2H, 2 x CH-CH=CH₂) 3.23 (ddd, *J* = 10.4, 4.6, 2.1 Hz, 1H, H-2), 2.97 – 2.90 (m, 3H, H-6 y 2 x CH-CH=CH₂), 2.44 (ddd, *J* = 12.1, 9.8, 3.9 Hz, 1H, H-4), 1.99 (dt, *J* = 11.7, 2.6 Hz, 1H, H-6), 1.89 (t, *J* = 10.0 Hz, 1H, H-2), 1.78 – 1.63 (m, 1H, H-5), 1.53 (ddd, *J* = 24.0, 12.2, 4.1 Hz, 1H, H-5).

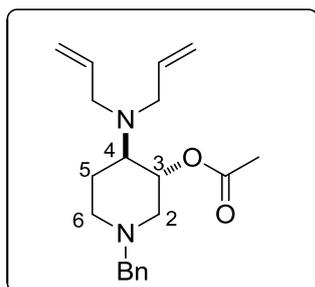
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 137.1 (C), 129.5 (CH), 128.6 (CH), 127.5 (CH), 117.6 (CH₂), 67.0 (C-3), 64.6 (C-4), 63.1 (CH₂), 59.2 (C-2), 53.3 (C-6), 53.0 (CH₂), 22.5 (C-5).

IR (NaCl): ν 3462.71, 2988.02, 2086.81, 1643.65, 1802.23 cm⁻¹

Rendimiento: 85%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IA (Hexano: Isopropanol 95:5); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* = 6.794 y 7.460 min.

***trans*-3-Acetoxy-1-bencil-4-(dialilamino)piperidina. (±)-*trans*-45a**



Fórmula molecular: C₂₀H₂₈N₂O₂

Estado físico: aceite transparente

Peso molecular: 328.45 g/mol

Rf: (20% Hexano/ AcOEt): 0.75

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₂₁H₂₉N₂O₂]⁺ 329.2224 *m/z*, encontrada 329.2206.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.38 – 7.22 (m, 5H), 5.83 – 5.63 (m, 2H, 2 x CH=CH₂), 5.22 – 5.01 (m, 5H, H-3 y 2 x CH=CH₂), 3.56 (br s, 2H, CH₂), 3.39 – 3.21 (dd, *J* = 13.8, 5.2 Hz, 2H, 2 x CH-CH=CH₂), 3.10 – 2.81 (m, 4H, H-2, H-6 y 2 x CH-CH=CH₂), 2.72 – 2.55 (td, *J* = 12.6, 4.4 Hz, 1H, H-4), 2.06 (s, 3H, CH₃), 1.96 (m, 2H, H-2 y H-6), 1.74 (m, 1H, H-5), 1.61 (ddd, *J* = 23.6, 12.4, 3.9 Hz, H-5).

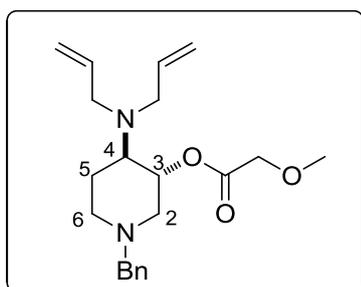
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.5 (CO), 138.3 (C), 138.0 (CH), 129.4 (CH), 128.7 (CH), 127.5 (CH), 116.5 (CH₂), 69.4 (C-3), 62.8 (CH₂), 61.1 (C-4), 57.3 (C-2), 53.2 (CH₂), 52.9 (C-6), 24.2 (C-5), 21.6 (CH₃).

IR (NaCl): ν 2088.22, 1643.81 cm⁻¹

Rendimiento: 87%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IA (Hexano: Isopropanol 95:5); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* = 5.012 y 5.712 min.

***trans*-1-Bencil-4-(dialilamino)-3-metoxiacetoxipiperidina.
(±)-*trans*-45b**



Fórmula molecular: C₂₁H₃₀N₂O₃

Estado físico: aceite blanco.

Peso molecular: 358.47 g/mol

Rf: (20% Hexano/ AcOEt): 0.83

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₂₁H₃₁N₂O₃]⁺ 359.2329 *m/z*, encontrada 359.2333.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.36 – 7.21 (m, 5H), 5.72 (m, 2H, 2 x CH=CH₂), 5.23 – 5.01 (m, 5H, H-3, 2 x CH=CH₂), 4.02 (s, 2H, CH₂), 3.53 (m, 2H, CH₂), 3.52 – 3.44 (m, 3H, CH₃), 3.36 – 3.23 (m, 2H, 2 x CH-CH=CH₂), 3.06 (ddd, *J* = 10.0, 4.8, 2.2 Hz, 1H, H-3), 2.92 (m, 3H, H-6 y 2 x CH-CH=CH₂), 2.74 – 2.57 (td, *J* = 10.7, 5.2 Hz, 1H, H-2), 1.95 (m, 2H, H-2 y H-6), 1.82 – 1.70 (m, 1H, H-5), 1.57 (ddd, *J* = 25.0, 12.2, 3.7 Hz, 1H, H-5).

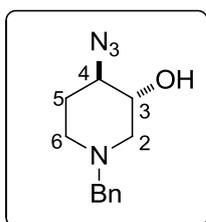
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 169.8 (CO), 138.4 (C), 137.9 (CH), 129.3 (CH), 128.7 (CH), 127.6 (CH), 116.7 (CH₂), 70.3 (CH₂), 69.7 (C-3), 62.8 (CH₂), 61.2 (CH₃), 59.7 (C-4), 57.2 (C-2), 53.1 (CH₂), 52.8 (C-6), 23.8 (C-5).

IR (NaCl): ν 2088.22, 1643.81 cm⁻¹

Rendimiento: 87%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IA (Hexano: Isopropanol 95:5); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* = 6.775 y 8.874 min.

***trans*-4-Azido-1-bencil-3-hidroxipiperidina. (±)-*trans*-46**



Fórmula molecular: C₁₂H₁₆N₄O

Estado físico: aceite transparente

Peso molecular: 232.28 g/mol

Rf: (1% MeOH/ CH₂Cl₂): 0.31

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₁₂H₁₇N₄O]⁺ 233.1397 *m/z*, encontrada 233.1385.

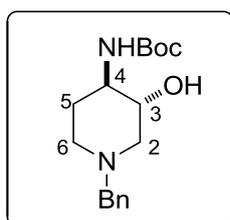
¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.36 – 7.26 (m, 5H), 3.63 (m, 1H, H-3), 3.55 (m, 2H, CH₂), 3.39 – 3.27 (m, 1H, H-4), 2.91 (m, 1H, H-2), 2.75 – 2.67 (m, 1H, H-6), 2.27 – 2.14 (m, 2H, H-2 y H-6), 2.07 – 1.98 (m, 1H, H-5), 1.73 – 1.61 (m, 1H, H-5).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 137.6 (C), 129.0 (CH), 128.4 (CH), 127.3 (CH), 69.8 (C-3), 63.4 (C-4) 62.4 (CH₂), 57.1 (C-2), 50.5 (C-6), 27.9 (C-5).

IR (NaCl): ν 3053.87, 2986.07, 2304.08 cm⁻¹

Rendimiento: 80%

***trans*-1-Bencil-4-*tert*-butoxicarbonilamino-3-hidroxi-*piperidina*.
(±)-*trans*-47**



Fórmula molecular: C₁₇H₂₆N₂O₃

Estado físico: aceite transparente

Peso molecular: 306.40 g/mol

Rf: (1% MeOH/ CH₂Cl₂): 0.17

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₁₇H₂₇N₂O₃]⁺ 307.2016 *m/z* encontrada 307.2013.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.32 (m, 5H), 4.62 (s, 1H, OH o NH), 3.60 – 3.49 (m, 3H, CH₂ y H-3), 3.40 (m, 1H, H-4), 3.04 (m, 1H, H-2), 2.79 (m, 1H, H-6), 2.22 (m, 1H, H-5), 2.01 (m, 3H, H-2, H-5 y H-6), 1.47 (s, 9H, CH₃).

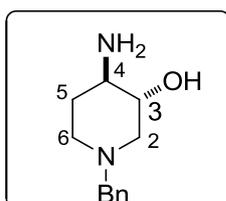
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 148.0 (CO), 137.6 (C), 129.1 (CH), 128.3 (CH), 127.2 (CH), 80.3 (C), 72.7 (C-3), 62.4 (CH₂), 58.9 (C-2), 54.7 (C-4), 51.6 (C-6), 30.0 (C-5), 28.3 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3058.97, 2986.67, 1697.84 cm⁻¹

Rendimiento: 50%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IA (Hexano: Isopropanol 95:5); 30 °C, 0.8 mL/min, t_R = 15.315 y 20.907 min.

***trans*-4-Amino-1-bencil-3-hidroxipiperidina. (±)-*trans*-48**



Fórmula molecular: C₁₂H₁₈N₂O

Estado físico: aceite transparente

Peso molecular: 206.14 g/mol

Rf:(10% MeOH/ CH₂Cl₂): 0.05

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₁₂H₁₉N₂O]⁺ 207.1492 *m/z*, encontrada 207.1499.

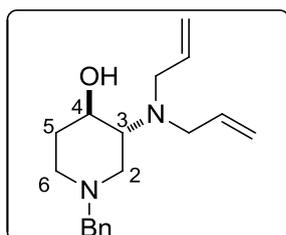
¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.35 – 7.18 (m, 5H), 3.57 – 3.45 (AB, *J* = 12.9 Hz, 2H, CH₂), 3.33 (td, *J* = 9.4, 4.4 Hz, 1H, H-3), 3.00 – 2.75 (m, 4H, NH, OH, H-2 y H-6), 2.51 – 2.40 (m, 1H, H-4), 2.00 (td, *J* = 11.5, 2.3 Hz, 1H, H-6), 1.87 (t, *J* = 10.3 Hz, 1H, H-2), 1.81 – 1.70 (m, 1H, H-5), 1.41 (ddd, *J* = 23.7, 12.6, 3.6 Hz, 1H, H-5).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 137.9 (C), 129.2 (CH), 128.2 (CH), 127.1 (CH), 72.7 (C-3), 62.6 (CH₂), 59.0 (C-2), 55.3 (C-4), 52.2 (C-6), 32.7 (C-5).

IR (NaCl): ν 3600, 3053.9, 2986.02 cm⁻¹

Rendimiento: 90%

***trans*-1-Bencil-3-(dialilamino)-4-hidroxipiperidina.
(±)-*trans*-49**



Fórmula molecular: C₁₈H₂₆N₂O

Estado físico: aceite incoloro

Peso molecular: 286.41 g/mol

Rf: (1% MeOH/ CH₂Cl₂): 0.26

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₁₈H₂₇N₂O]⁺ 287.2118 *m/z*, encontrada 287.2125.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.42 – 7.22 (m, 5H), 5.77 (m, 2H, 2 x CH=CH₂), 5.27 – 5.03 (m, 4H, 2 x CH=CH₂), 3.54 (AB, *J* = 13.5 Hz, 2H, CH₂), 3.49 – 3.40 (m, 1H, H-4), 3.37 – 3.30 (m, 2H, 2 x CH-CH=CH₂), 2.95 – 2.80 (m, 4H, H-2, H-6, 2 x CH-CH=CH₂), 2.75 (td, *J* = 10.7, 3.6 Hz, 1H, H-3), 2.16 – 1.93 (m, 2H, H-2 o H-6, H-5), 1.85 (t, *J* = 10.8 Hz, 1H, H-2 o H-6), 1.72 – 1.53 (m, 1H, H-5).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 138.4 (C), 136.6 (CH), 129.0 (CH), 128.8 (CH), 128.2 (CH), 127.0 (CH), 117.3 (CH₂), 68.04 (C-4), 63.1 (C-3), 62.8 (CH₂), 52.7 (CH₂), 51.7 (C-2 o C-6), 50.3 (C-2 o C-6), 32.3 (C-5).

IR (NaCl): ν 3053.99, 2986.21 cm⁻¹

Rendimiento: 80%

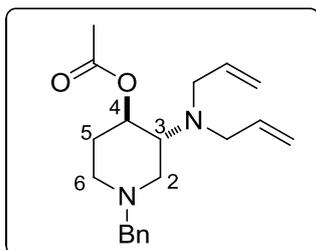
HPLC (210, 215 nm): **columna:** IA (Hexano: Isopropanol 95:5); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* (3*S*,4*S*) = 6.530 y *t_R* (3*R*,4*R*) = 6.959 min.

(3*S*,4*S*)-1-Bencil-3-(dialilamino)-4-hidroxipiperidina:

[α]_D²⁰: + 5.2 (*c* = 1, CHCl₃) *ee* >81% **(3*S*,4*S*)-(+)-49**

Rendimiento: 45 %

***trans*-4-Acetoxi-1-bencil-3-(dialilamino)piperidina.
(±)-*trans*-50a**



Fórmula molecular: C₂₀H₂₈N₂O₂

Estado físico: aceite blanco.

Peso molecular: 328.45 g/mol

Rf: (20% hexano/ AcOEt): 1.1

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₂₁H₂₉N₂O₂]⁺ 329.2224 *m/z*, encontrada 329.2205.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): 7.32 (m, 5H), 5.71 (m, 2H, 2 x CH=CH₂), 5.19 – 5.02 (m, 4H, 2 x CH=CH₂), 4.98 – 4.85 (dt, *J* = 10.2, 4.9 Hz, 1H, H-4), 3.55 (AB, *J* = 12.8 Hz, 2H, CH₂), 3.32 – 3.21 (m, 2H, 2 x CH-CH=CH₂), 3.15 – 2.89 (m, 3H, H-2 o H-6, 2 x CH-CH=CH₂), 2.81 (d, *J* = 12.7 Hz, 2H, H-3), 2.14 – 2.07 (s y m, 7H, CH₃, H-5, H-2 y H-6), 1.77 – 1.55 (ddd, *J* = 23.0, 12.5, 4.7 Hz, 1H, H-5).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.5 (CO), 138.3 (C), 137.5 (CH), 128.9 (CH), 128.2 (CH), 127.1 (CH), 116.2 (CH₂), 71.0 (C-4), 62.6 (CH₂), 59.7 (C-3), 53.2 (CH₂), 53.2 (C-2 o C-6), 51.4 (C-2 o C-6), 30.7 (C-5), 21.4 (CH₃).

IR (NaCl): ν 2088.22, 1643.81 cm⁻¹

Rendimiento: 85%

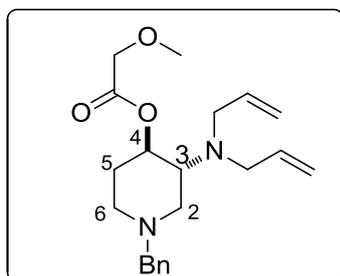
HPLC (210, 215 nm): **columna:** IA (Hexano: Isopropanol 95:5); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* (3*R*,4*R*) = 4.785 y *t_R* (3*S*,4*S*) = 5.323 min.

(3*R*,4*R*)-1-Bencil-3-(dialilamino)-4-acetilpiperidina:

[α]_D²⁰: + 1.8 (*c* = 1, CHCl₃) *ee* >99% (3*R*,4*R*)-(+)-50a

Rendimiento: 48 %

***trans*-1-Bencil-3-(dialilamino)-4-metoxiacetoxipiperidina.
(±)-*trans*-50b**



Fórmula molecular: C₂₁H₃₀N₂O₃

Estado físico: aceite incoloro

Peso molecular 358.47 g/mol

R_f (20% hexano/ AcOEt): 0.8

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₂₁H₃₁N₂O₃]⁺ 359.2329 *m/z*, encontrada 359.2345.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.31 (m, 5H), 5.84 – 5.61 (m, 2H, 2 x CH=CH₂), 5.20 – 4.91 (m, 5H, H-4, 2 x CH=CH₂), 4.06 (s, 2H, CH₂), 3.54 (m, 2H, CH₂), 3.48 (s, 3H, CH₃), 3.28 (dd, *J* = 14.2, 5.1 Hz, 2H, 2 x CH-CH=CH₂), 2.98 (m, 4H, H-3, H-2 o H-6, 2 x CH-CH=CH₂), 2.83 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H, H-2 o H-6), 2.09 – 1.93 (m, 3H, H-5, H-2 y H-6), 1.77-1.67 (m, 1H, H-5).

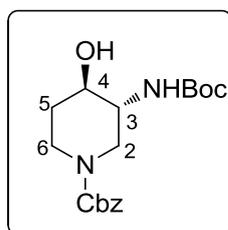
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 169.8 (CO), 137.2 (C), 128.9 (CH), 128.4 (CH), 128.3 (CH), 127.1 (CH), 116.5 (CH₂), 71.3 (C-4), 70.0 (CH₂), 62.5 (CH₂), 59.7 (C-3), 59.3 (CH₃), 53.1 (CH₂), 52.5 (C-2 o C-6), 51.3 (C-2 o C-6), 30.6 (C-5).

IR (NaCl): ν 3053.52, 2985.31, 1751.60 cm⁻¹

Rendimiento: 88%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IA (Hexano: Isopropanol 95:5); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* = 6.328 y 11.159 min.

(3*R*,4*R*)-1-Benciloxycarbonil-3-*tert*-butoxicarbonilamino-4-hidroxi-piperidina. (3*R*,4*R*)-(+)-51



Fórmula molecular: C₁₈H₂₆N₂O₅

Estado físico: aceite incoloro

Peso molecular: 350,41 g/mol

R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂):0.56

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₁₈H₂₆N₂NaO₅]⁺ 373.1734 *m/z*, encontrada 373.1744.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.45 – 7.30 (m, 5H), 5.25 – 5.07 (m, 2H, CH₂), 4.82 (s, 1H, OH o NH), 4.22 – 4.01 (m, 1H, H-2 o H-6), 3.86 (m, 1H, H-2 o H-6), 3.65 (m, 1H, H-4), 3.47 (m, 1H, H-3), 3.11 (m, 2H, H-2 y H-6), 1.97 (m, 1H, H-5), 1.73 – 1.53 (m, 1H, H-5), 1.45 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 156.2 (CO), 155.3 (CO), 136.5 (C), 128.5 (CH), 128.0 (CH), 127.9 (CH), 80.3 (C), 70.6 (C-4), 67.4 (CH₂), 52.9 (C-3), 45.5 (C-2 o C-6), 41.2 (C-2 o C-6), 31.3 (C-5), 28.3 (CH₃).

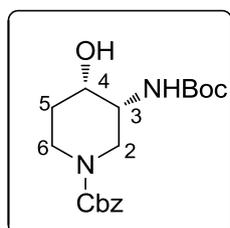
IR (NaCl): ν 3100, 3054.95, 2987.30, 2962.41, 1695.07 cm⁻¹

Rendimiento: 95%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** ADH (Heptano: EtOH 70:30); 30 °C, 1.0 mL/min, t_R (3*S*,4*S*) = 5.205 y t_R (3*R*,4*R*) = 6.951 min.

[α]_D²⁰: + 3.1 (*c* = 1, CHCl₃) *ee* >99%.

(3*R*,4*S*)-1-Benciloxicarbonil-3-*tert*-butoxicarbonilamino-4-hidroxi-piperidina. (3*R*,4*S*)-(+)-51.



Fórmula molecular: C₁₈H₂₆N₂O₅

Estado físico: Aceite blanco

Peso molecular: 350.41 g/mol

R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂):0.59

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₁₈H₂₆N₂NaO₅]⁺ 373.1734 *m/z*, encontrada 373.1738.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.38 (m, 5H), 5.15 (m, 2H, CH₂), 5.01 – 4.91 (m, 1H, OH o NH), 4.00 (m, 1H, H-4), 3.79 (m, 1H, H-3), 3.7 – 3.1 (m, 4H, H-2 y H-6), 1.83 – 1.64 (m, 2H, H-5), 1.46 (s, 9H).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 156.8 (CO), 156.4 (CO), 136.5 (C), 128.5 (CH), 128.1 (CH), 127.9 (CH), 80.2 (C), 70.1 (C-4), 67.4 (CH₂), 50.4 (C-3), 44.7 (C-2 o C-6), 39.8 (C-2 o C-6), 30.3 (C-5), 28.3 (CH₃).

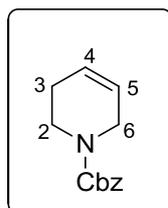
IR (NaCl): ν 3100, 3054.95, 2987.30, 2962.41, 1695.07 cm⁻¹

Rendimiento: 60%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** ADH (Hexano: Isopropanol 90:10); 30 °C, 1.0 mL/min, t_R (3*R*,4*S*) = 12.724 y t_R (3*S*,4*R*) = 16.732 min

[α]_D²⁰: + 1.9 (*c* = 1, CHCl₃) *ee* >99%.

1-Benciloxycarbonil-1,2,3,6-tetrahidropiridina. 52.



Fórmula molecular: C₁₃H₁₅NO₂

Estado físico: Aceite transparente

Peso molecular: 217.26 g/mol

Rf (20% AcOEt/Hexano):0.33

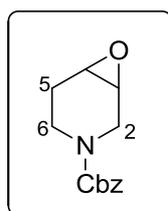
¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.38 (m, 5H), 5.81 (m, 1H, C-5), 5.64 (m, 1H, H-4), 5.16 (m, 2H, CH₂), 3.96 (m, 2H, H-6), 3.57 (m, 2H, H-2), 2.14 (m, 2H, H-3).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 155.2 (CO), 136.5 (C), 128.2 (CH), 127.7 (CH), 127.6 (CH), 125.1 (C-5), 124.8 (C-4), 66.7 (CH₂), 43.1 (C-2 o C-6), 40.1 (C-2 o C-6), 24.7 (C-3).

IR (NaCl): ν 1713.56, 1630.95 cm⁻¹

Rendimiento: 85%

1-Benciloxycarbonil-3,4-epoxipiperidina. (±)-53.



Fórmula molecular: C₁₃H₁₅NO₃

Estado físico: Aceite transparente

Peso molecular: 233.26 g/mol

Rf (50% AcOEt/Hexano):0.53

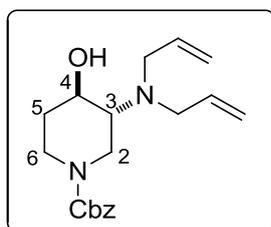
¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.38 (m, 5H), 5.10 (m, 2H, CH₂), 3.85 - 3.72 (m, 2H, H-3 y H-4), 3.44 (m, 2H, H-2), 3.23 (m, 2H, H-6), 2.01 (m, 2H, H-5).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 155.2 (CO), 136.3 (C), 128.4 (CH), 128.0 (CH), 127.8 (CH), 66.7 (CH₂), 55.3 (C-3 y C-4), 47.5 (C-2 o C-6), 41.3 (C-2 o C-6), 21.1 (C-5).

IR (NaCl): ν 1715.03 cm⁻¹

Rendimiento: 90%

***trans*-1-Benciloxicarbonil-3-(dialilamino)-4-hidroxi piperidina.
(±)-*trans*-54**



Fórmula molecular: C₁₉H₂₆N₂O₃

Estado físico: aceite incoloro

Peso molecular: 330.42 g/mol

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.43

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₁₉H₂₇N₂O₃]⁺ 331.2016 *m/z*, encontrada 331.2030.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.46 – 7.29 (m, 5H), 5.78 (m, 2H, 2 x CH=CH₂), 5.36 – 5.03 (m, 6H, 2 x CH=CH₂, CH₂), 4.44 – 4.11 (m, 2H, H-2 y H-6), 3.82 – 3.55 (td, *J* = 10.4, 5.2 Hz, 1H, H-4), 3.36 (dd, *J* = 14.4, 4.7 Hz, 2H, 2 x CH-CH=CH₂), 3.17 – 2.87 (m, 2H, 2 x CH-CH=CH₂), 2.86 – 2.44 (m, 3H, H-2, H-6 y H-3), 2.08 (m, 1H, H-5), 1.48 (m, 1H, H-5).

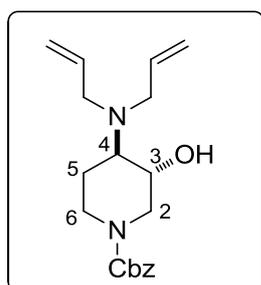
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 155.6 (CO), 137.0 (C), 136.8 (CH), 128.9 (CH), 128.5 (CH), 128.3 (CH), 118.3 (CH₂), 68.3 (C-4), 67.9 (CH₂), 63.2 (C-3), 53.0 (CH₂), 44.2 (C-2 o C-6), 42.9 y 41.9 (C-2 o C-6), 33.0 y 32.7 (C-5).

IR (NaCl): ν 3053.99, 2986.31, 2305.25 cm⁻¹

Rendimiento: 60%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 90:10); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* = 32.765 y 35.193 min.

***trans*-1-Benciloxycarbonil-4-(dialilamino)-3-hidroxipiperidina.
(±)-*trans*-55**



Fórmula molecular: C₁₉H₂₆N₂O₃

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 330.42 g/mol

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.45

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₁₉H₂₇N₂O₃]⁺ 331.2016 *m/z*, encontrada 331.2031.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.37 (m, 5H), 5.91 - 5.73 (m, 2H, 2 x CH=CH₂), 5.28 - 5.11 (m, 6H, 2 x CH=CH₂, CH₂), 4.42 (m, 2H, H-2 y H-6), 3.37 (m, 3H, H-3, 2 x CH-CH=CH₂), 2.97 (m, 2H, 2 x CH-CH=CH₂), 2.62 (m, 3H, H-2, H-4 y H-6), 1.70 (m, 2H, H-5).

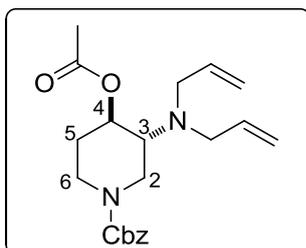
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 155.4 (CO), 136.6 (C), 136.0 (CH), 128.5 (CH₂), 128.0 (CH₂), 127.9 (CH₂), 117.8 (CH₂), 77.3 (C-3), 67.5 (CH₂), 64.3 (C-4), 52.7 (CH₂), 49.0 (C-2 o C-6), 43.7 (C-2 o C-6), 24.2 (C-5).

IR (NaCl): ν 3053.78, 2985.93 cm⁻¹

Rendimiento: 30%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 80:20); 30 °C, 0.8 mL/min, t_R = 18.824 y 20.149 min.

***trans*-4-Acetoxi-1-benciloxycarbonil-3-(dialilamino)piperidina.
(±)-*trans*-56**



Fórmula molecular: C₂₁H₂₈N₂O₄

Estado físico: aceite incoloro

Peso molecular: 372.46 g/mol

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.65

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₂₁H₂₉N₂O₄]⁺ 373.2122 *m/z*, encontrada 373.2135.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.43 – 7.34 (m, 5H), 5.81 – 5.64 (m, 2H, 2 x CH=CH₂), 5.11 (m, 7H, H-4, 2 x CH=CH₂, CH₂), 4.14 (m, 2H, H-2 y H-6), 3.29 (dd, *J* = 14.3, 5.0 Hz, 2H, 2 x CH-CH=CH₂), 3.08 (m, 2H, 2 x CH-CH=CH₂), 2.77 (m, 3H, H-2, H-6 y H-3), 2.08 (s, 3H, CH₃), 2.00 (m, 1H, H-5), 1.69 – 1.46 (dd, *J* = 13.8, 4.6 Hz, 1H, H-5).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.3 (CO), 155.1 (CO), 136.8 (CH), 136.6 (C), 128.5 (CH), 128.1 (CH), 127.9 (CH), 116.7 (CH₂), 70.31 (C-4), 67.3 (CH₂), 59.4 (C-3), 53.0 (CH₂), 43.4 (C-2 o C-6), 42.2 (C-2 o C-6), 30.7 (C-5), 21.3 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3053.80, 2986.11, 2304.72, 1723.76, 1718.50 cm⁻¹

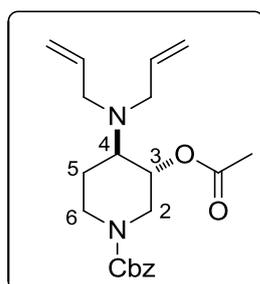
Rendimiento: 85%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 90:10); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* = 12.322 y 13.324 min.

(3*R*,4*R*)-1-Benciloxycarbonil-4-acetoxi-3-(dialilamino)piperidina:

[α]_D²⁰: + 5.92 (*c* = 1, CHCl₃) *ee* >99% **(3*R*,4*R*)-(+)-56**

***trans*-3-Acetoxi-1-benciloxycarbonil-4-(dialilamino)piperidina.
(±)-*trans*-57**



Fórmula molecular: C₂₁H₂₈N₂O₄

Estado físico: aceite incoloro

Peso molecular: 372.46 g/mol

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.67

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₂₁H₂₉N₂O₄]⁺ 373.2122 *m/z*, encontrada 373.2135.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.74 – 7.32 (m, 5H), 5.93 – 5.70 (m, 2H, 2 x CH=CH₂), 5.35 – 5.03 (m, 6H, 2 x CH=CH₂, CH₂), 4.92 (m, 1H, H-3), 4.24 (m, 2H, H-2 y H-6), 3.42 – 3.19 (m, 2H, 2 x CH-CH=CH₂), 2.95 (dd, *J* = 14.3, 7.3 Hz, 2H, 2 x CH-CH=CH₂), 2.76 (m, 3H, H-4, H-2 y H-6), 2.08 (s, 3H, CH₃), 1.95 – 1.64 (m, 1H, H-5), 1.64 – 1.36 (m, 1H, H-5).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 169.9 (CO), 155.0 (CO), 137.1 (CH₂), 136.5 (C), 128.5 (CH), 128.1 (CH), 128.0 (CH), 116.5 (CH), 67.7 (C-3), 67.4 (CH₂), 60.4 (C-4), 52.7 (CH₂), 46.8 (C-2 o C-6), 43.2 (C-2 o C-6), 23.4 (C-5), 21.1 (CH₃).

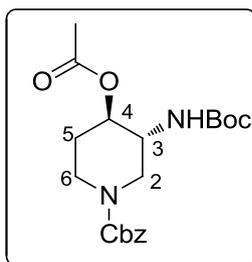
IR (NaCl): ν 3052.95, 2986.24, 1650.67 cm⁻¹

Rendimiento: 85%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 80:20); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* = 13.322 y 14.411 min.

Capítulo 3

(3*R*,4*R*)-4-Acetoxi-1-benciloxycarbonil-3-*tert*-butoxicarbonil-aminopiperidina. (3*R*,4*R*)-(+)-58



Fórmula molecular: C₂₀H₂₈N₂O₆

Estado físico: aceite transparente

Peso molecular: 392.45 g/mol

R_f (3% MeOH/CH₂Cl₂): 0.66

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.38 (m, 5H), 5.15 (m, 2H, CH₂), 4.84 (m, 1H, H-4), 4.63 (m, 1H, H-3), 4.05 (m, 1H, H-2 o H-6), 3.77 (m, 2H, H-2 y H-6), 3.16 (m, 2H, H-5, H-2 o H-6), 2.09 (s, 3H, CH₃), 1.93 (s, 1H, H-5), 1.44 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃): δ 170.7 (CO), 155.0 (CO), 154.9 (CO), 136.4 (C), 128.5 (CH), 128.1 (CH), 127.9 (CH), 79.9 (C), 71.3 (C-4), 67.5 (CH₂), 50.2 (C-3), 46.3 (C-2 o C-6), 41.1 (C-2 o C-6), 28.5 (C-5), 28.3 (CH₃), 21.1 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3054.83, 2985.98, 1701.12, 1696.92, 1672.56 cm⁻¹

Rendimiento: 90%

[α]_D²⁰: + 1.5 (c = 1, CHCl₃) ee >99%.

Capítulo 4:
Síntesis enantioselectiva de segmentos
pirrolidínicos de inhibidores de la óxido
nítrico sintasa neuronal

Introducción

4.1. Importancia de las óxido nítrico sintasas (NOS)

La óxido nítrico sintasa (NOS)⁹⁰ es una monooxigenasa hemodependiente que cataliza la conversión de L-arginina y O₂ en L-citrulina, produciendo óxido nítrico (NO). Hasta el momento se conocen tres isoformas de las NOS:

- Neuronal (nNOS), se encuentra en el cerebro y en la mitocondria, estando involucrada en la comunicación celular.
- Endotelial (eNOS), se encuentra en el endotelio, y está involucrada en la vasodilatación.
- Macrofaga o inducible (iNOS), se expresa durante la respuesta del sistema inmune.

Un exceso de NO suele estar asociado a enfermedades neurodegenerativas, conociéndose, hasta el momento, unas 600 enfermedades diferentes entre las que se incluyen parálisis cerebral, Alzheimer y Parkinson. Estas enfermedades, cuyo riesgo aumenta con la edad, implican degeneraciones irreversibles del tejido neurológico. Debido a esto, se han realizado una serie de estudios, a partir de los cuales, se ha deducido que la inhibición selectiva de la nNOS puede ser neuroprotectora.

Sin embargo, debido a la similitud existente en el centro activo de las tres isoformas, es difícil encontrar un inhibidor selectivo para las nNOS. Silverman *et al.*,⁹¹ apoyando su trabajo en las estructuras

⁹⁰ a) F. Xue, J. M. Kraus, K. J. Labby, H. Ji, J. Mataka, G. Xia, H. Li, S. L. Delker, L. J. Roman, P. Matasek, T. L. Poulos, R. Silverman, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6399-6403; b) H. Li, F. Xue, J. M. Kraus, H. Ji, K. J. Labby, J. Mataka, S. L. Delker, P. Matasek, L. J. Roman, T. L. Poulos, R. Silverman, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1333-1343; c) P. C. Trippier, K. J. Labby, D. D. Hawker, J. Mataka, R. Silverman, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 3121-3147.

⁹¹ a) H. Ji, B. Z. Stanton, J. Igarashi, H. Li, P. Matasek, L. Roman, T. L. Poulos, R. Silverman, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3900-3914; b) H. Ji, S. Delker, H. Li, P. Matasek, L. Roman, T. L. Poulos, R. Silverman, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7804-

Capítulo 4

crystalinas⁹² de las nNOS, diseñaron de mediante métodos computacionales la estructura **59**. A partir de ella, mediante sucesivos estudios, se obtuvieron varios derivados en los que se optimizaba su capacidad inhibidora y selectividad, como es el caso del compuesto **60**. En todos ellos la (3*R*,4*R*)-hidroxipirrolidina **61**, cuya síntesis será descrita posteriormente en este capítulo, es una parte esencial del esqueleto.

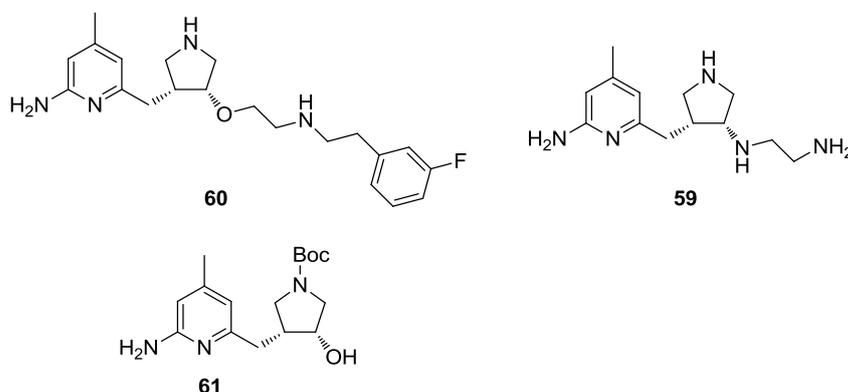


Figura 21. Estructuras diseñadas como inhibidores del nNOs.

Teniendo en cuenta la importancia de estas estructuras, y el bajo rendimiento de la síntesis descrita para el compuesto enantiopuro **61**, se planteó la resolución enzimática de dicho compuesto, cuyos resultados serán expuestos en este capítulo.

7824; c) J. M. Kraus, R. Silverman, US8618143 B1 **2013**, CAN, 160:125937; d) F. Xue, H. Li, S. L. Delker, J. Fang, P. Matasek, L. Roman, T. L. Poulos, R. Silverman, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 14229-14238; e) G. R. Lawton, H. R. Ranaivo, L. K. Wing, H. Ji, F. Xue, P. Martasek, L. J. Roman, D. M. Watterson, R. Silverman, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17, 2371-2380.

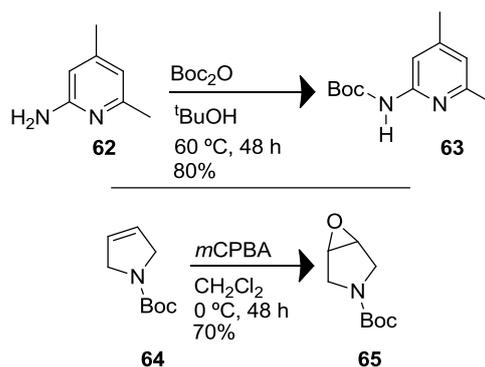
⁹² a) B. R. Crane, A. S. Arvai, R. Gauchhui, C. Wu, D. K. Ghosh, D. E. Getzoff, D. J. Stuehr, J. A. Tainer, *Science* **1997**, 278, 425- 431; b) C. S. Raman, H. Li, P. Matasek, V. Kral, B. S. Masters, T. L. Poulos, *Cell*. **1998**, 95, 939-950.

Antecedentes

4.2. Síntesis de 3-(aminopirimidil)metil-4-hidroxipirrolidinas

Como se ha mostrado en la introducción, estas estructuras han cobrado importancia puesto que son una parte fundamental de moléculas con una alta capacidad como inhibidores selectivos de nNOS. A continuación se describen los ejemplos encontrados en la bibliografía en los que se lleva a cabo la síntesis y resolución de estas estructuras.

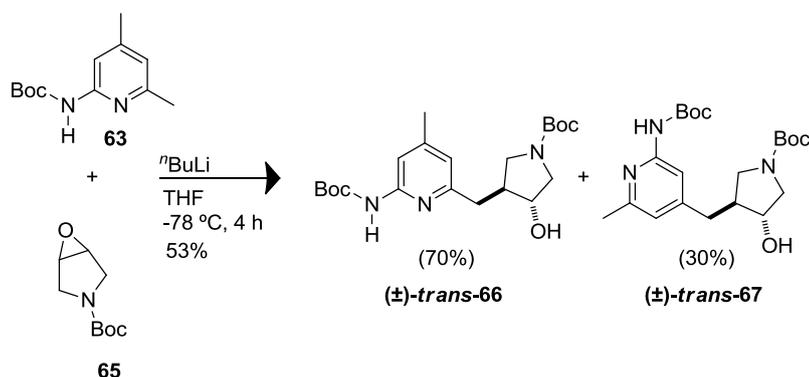
La síntesis del compuesto **61** (Figura 21) mencionado en los antecedentes ha sido desarrollada por el grupo de Silverman y colaboradores.^{90a} La ruta sintética que describieron estos autores parte del derivado de la 6-amino-2,4-dimetilpiridina **62** (Esquema 79), el cual se protege con *tert*-butildicarbonato para formar el precursor **63** con elevado rendimiento. Paralelamente, el epóxido **65** se forma a partir del compuesto **64**, utilizando para ello *m*CPBA en CH₂Cl₂.



Esquema 79. Síntesis de los precursores **63** y **65**.

Seguidamente se lleva a cabo la reacción de acoplamiento (Esquema 80). Mediante el tratamiento de la piridina **63** con ⁿBuLi y la posterior adición del epóxido **65**, se obtienen los compuestos (\pm)-*trans*-**66** y (\pm)-*trans*-**67**.

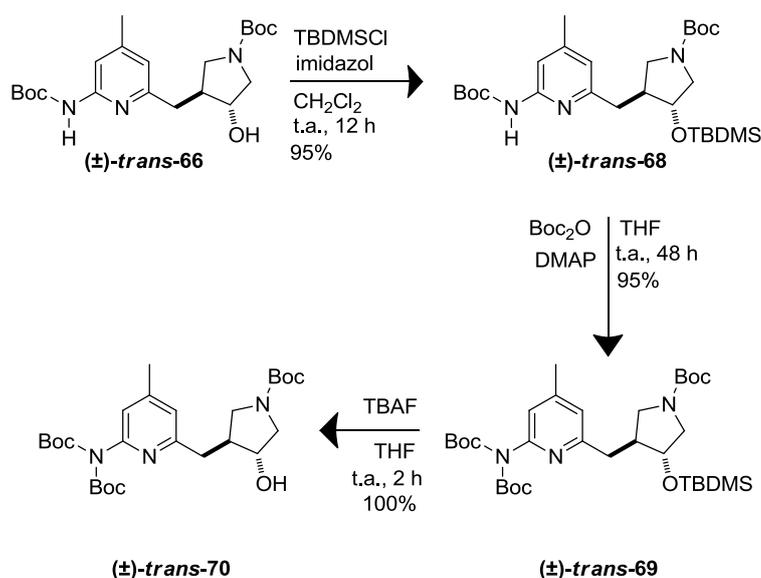
Capítulo 4



Esquema 80. Síntesis de los compuestos **(±)-trans-66** y **(±)-trans-67**.

La inversión del grupo hidroxilo en el compuesto **(±)-trans-66** no es posible en las condiciones de reacción de Mitsunobu porque se produce la migración del grupo Boc al grupo hidroxilo de la pirrolidina. Por ello, es necesario introducir en el grupo amino un segundo grupo *tert*-butoxicarbonilo.

Se partió del compuesto **(±)-trans-66** (Esquema 81) el cual se trató con TBDMSCl e imidazol en CH_2Cl_2 , protegiéndose así el grupo hidroxilo de la pirrolidina con elevado rendimiento.

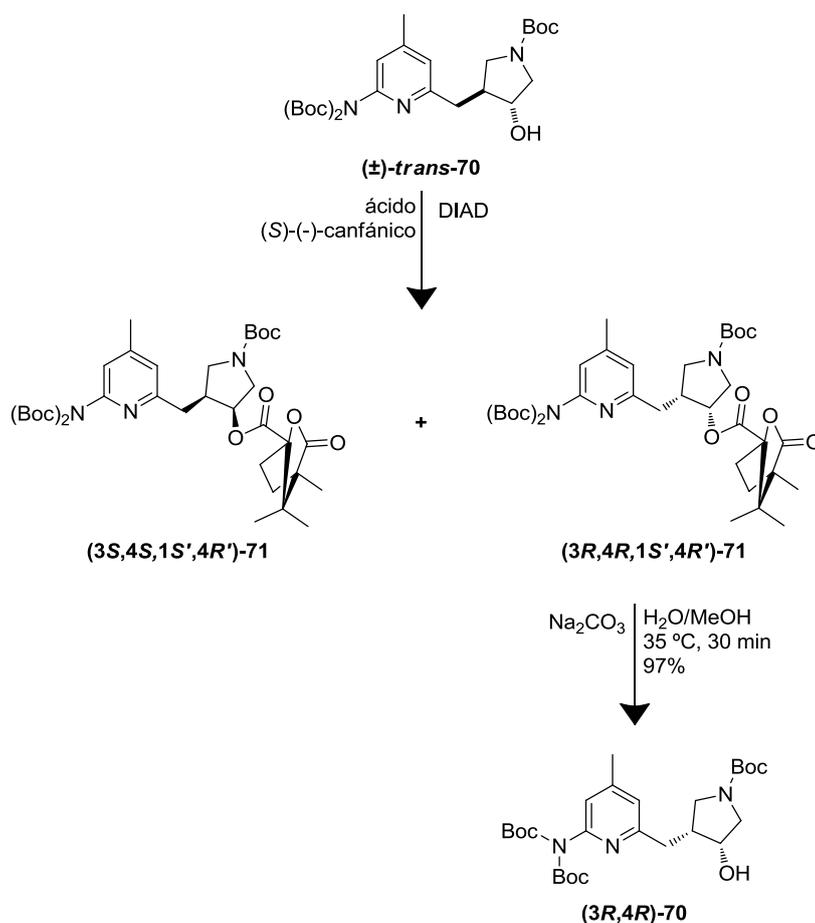


Esquema 81. Síntesis del compuesto **(±)-trans-70**.

Antecedentes

A continuación, se protege por segunda vez el carbamato sustituyente del anillo piridínico utilizando un segundo *tert*-butildicarbonato pero esta vez con la ayuda de DMAP en THF, formándose el derivado **(±)-*trans*-69**. Por último, se desprotege el grupo hidroxilo con TBAF en THF, el cual, da lugar al compuesto **(±)-*trans*-70** con un rendimiento cuantitativo.

La separación de los dos enantiómeros (Esquema 82) se hace tras la inversión del grupo hidroxilo de la pirrolidina mediante una reacción de Mitsunobu en presencia del ácido (*S*)-(-)-canfánico como nucleófilo, lo que da lugar a los ésteres diastereoméricos cuya separación requiere una serie de columnas cromatográficas.



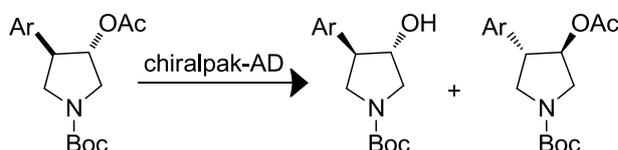
Esquema 82. Separación de enantiómeros.

Capítulo 4

Finalmente, se obtiene el isómero **(3R,4R)-70** mediante la hidrólisis del sustrato **(3R,4R)-71** con Na₂CO₃ en una mezcla de MeOH/H₂O.

4.2.1. Resoluciones de hidroxiarilpirrolidinas y derivados de las mismas

Aunque la síntesis y resolución mencionada en el apartado anterior es la única que se ha encontrado descrita hasta el momento en la bibliografía, cabe mencionar por la analogía de los compuestos, la separación cromatográfica descrita por Lin *et al.*⁹³ Estos autores han conseguido la separación de ambos enantiómeros de la *N-tert*-butoxicarbonil-3-hidroxi-4-arilpirrolidina (Esquema 83) mediante cromatografía de HPLC quiral utilizando columnas semipreparativas.



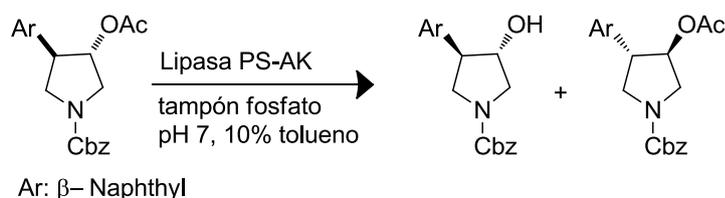
Esquema 83. Separación de enantiómeros mediante HPLC quiral semipreparativo.

4.3. Resoluciones enzimáticas

Hasta el momento, solamente Correia y colaboradores⁹⁴ han desarrollado un método enzimático de resolución de derivados 3-hidroxi-4-arilpirrolidínicos (Esquema 84). En este caso, la resolución enzimática se lleva a cabo mediante el proceso de hidrólisis utilizando la lipasa PS-AK como catalizador, siendo necesarios 30 días de reacción para obtener tanto sustrato como producto con excelentes excesos enantioméricos.

⁹³ P. Lin, L. Chang, R. J. DeVita, J. R. Young, R. Eid, X. Tong, S. Xheng, R. G. Ball, N. N. Tsou, G. G. Chicchi, M. M. Kurtz, K.C. Tsao, A. Wheeldon, E. J. Carlson, W. Eng, H. D. burns, R. J. Hargreaves, S. G. Mills, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5191-5198.

⁹⁴ R. L. Barreto, M. J. S. Carpes, C. C. Santana, C. R. D. Correia, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 435-442.



Esquema 84. Resolución enzimática de derivados de la pirrolidina.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y la experiencia adquirida en este grupo de investigación en la resolución de compuestos heterocíclicos funcionalizados con grupos hidroxilo,⁹⁵ se decidió llevar a cabo la síntesis y resolución de los derivados pirrolidínicos precursores de los inhibidores de nNOS.

Por otra parte, considerando también la escasez de ejemplos de resoluciones enzimáticas de alquil o aril-hidroxipirrolidinas, se amplió el estudio al regioisómero **(±)-trans-67** y los distintos derivados de éste, que se obtienen simultáneamente con los métodos sintéticos que se acaban de describir.

El método biocatalítico mejoraría considerablemente la eficacia de la síntesis, evitando la separación de los diastereoisómeros **71** mediante columnas cromatográficas y podría ser de gran utilidad para la preparación de estas moléculas a mayor escala.

⁹⁵ a) A. Villar-Barro, R. Brieva, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24*, 694-698; b) A. Villar-Barro, R. Brieva, V. Gotor, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5563-5568.

Objetivos

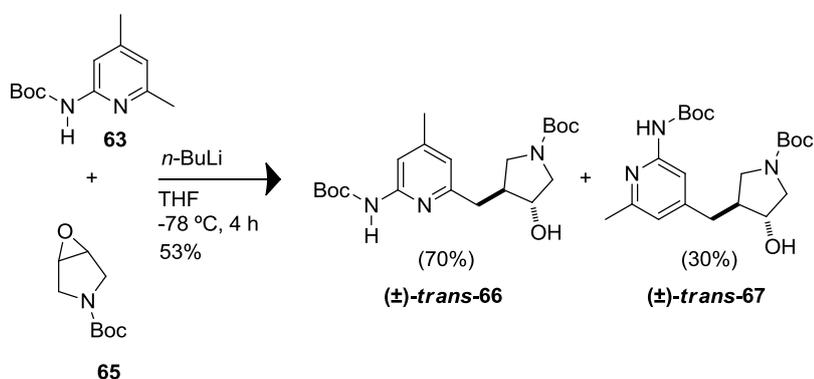
Teniendo en cuenta el interés de las hidroxialquilpirrolidinas precursoras de inhibidores de nNOS, y las ventajas que puede presentar la catálisis enzimática para la resolución de las mismas, como objetivos en este capítulo se han planteado:

- Síntesis y resolución de los derivados (\pm)-*trans*-1-*tert*-butoxicarbonil-3-{{6-[bis(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-metilpiridin-2-il}metil}-4-hidroxi-pirrolidina y (\pm)-*trans*-1-*tert*-butoxicarbonil-3-{{6-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-metilpiridin-2-il}metil}-4-hidroxi-pirrolidina.
- Síntesis y resolución de los derivados (\pm)-*cis*-1-*tert*-butoxicarbonil-3-{{6-[bis(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-metilpiridin-2-il}metil}-4-hidroxi-pirrolidina.
- Se ha ampliado el estudio de esta resolución a los compuestos (\pm)-*trans*-1-*tert*-butoxicarbonil-3-{{3-[bis(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-metilpiridin-4-il}metil}-4-hidroxi-pirrolidina, que se obtienen como producto secundario de la síntesis de sus regioisómeros. Se plantea el estudio tanto de éste como de su isómero *cis* y derivados de los mismos lo que permite tener una mayor información sobre la capacidad de las lipasas utilizadas para la resolución de estas estructuras.

Resultados y discusión

4.4. Síntesis de los sustratos

En primer lugar, siguiendo la metodología descrita por Silverman y colaboradores,⁹⁰ se llevó a cabo la síntesis de los sustratos cuya resolución enzimática se va a estudiar en este capítulo (Esquema 80).

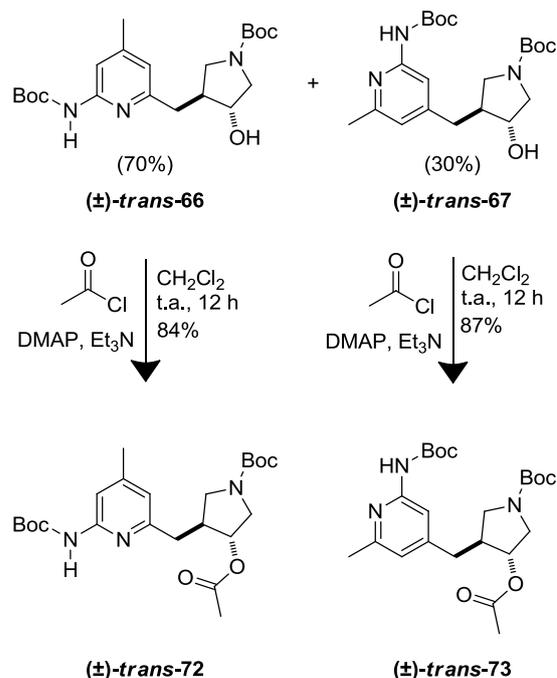


Esquema 80. Síntesis de los compuestos **(±)-trans-66** y **(±)-trans-67**.

Aunque el objetivo principal de este trabajo es la resolución de los compuestos **(±)-trans-66** y **(±)-cis-66** así como de sus derivados, al ser obtenido en la síntesis su regioisómero **(±)-trans-67** se estudió también su resolución. Tal como se ha comentado en los antecedentes, en la bibliografía se describen escasos ejemplos de resoluciones biocatalíticas de estructuras de este tipo.

4.4.1. Síntesis de los ésteres derivados de los sustratos **(±)-trans-66** y **(±)-trans-67**

Una vez sintetizados los sustratos de partida se llevó a cabo su acilación (Esquema 85) mediante un procedimiento habitual con cloruro de acetilo en CH_2Cl_2 , lo que dio lugar a los ésteres **(±)-trans-72** y **(±)-trans-73** cuyas reacciones de hidrólisis enzimática serán estudiadas posteriormente.



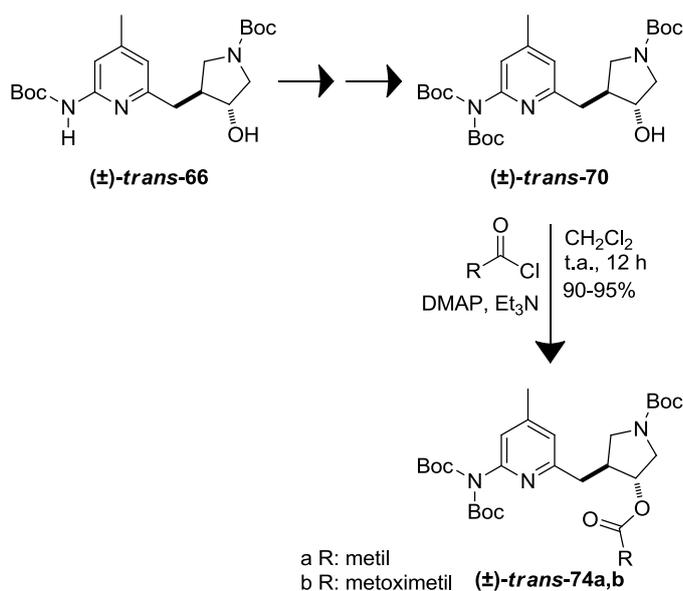
Esquema 85. Síntesis de los compuestos **(±)-trans-72** y **(±)-trans-73**.

4.4.2. Síntesis de los compuestos **(±)-trans-70**, **(±)-cis-70** y sus ésteres derivados

Teniendo en cuenta que las estructuras de interés tienen configuración *cis*, y, que como se ha comentado en los antecedentes, no es posible realizar la inversión de Mitsunobu de este compuesto debido a la migración del grupo *tert*-butoxicarbonilo en las condiciones de reacción, se preparó el derivado **(±)-trans-70** utilizando el proceso descrito por Silverman y colaboradores^{90a} como se muestra en el Esquema 81 de los antecedentes.

La resolución del compuesto **(±)-trans-70**, es de gran interés como posible precursor de los inhibidores. Para el estudio de esta resolución biocatalítica se sintetizaron también sus ésteres derivados (Esquema 86) disolviendo el sustrato en CH_2Cl_2 y esterificándolo con el correspondiente cloruro de ácido en presencia de DMAP y Et_3N , dando lugar a los compuestos **(±)-trans-74a,b**.

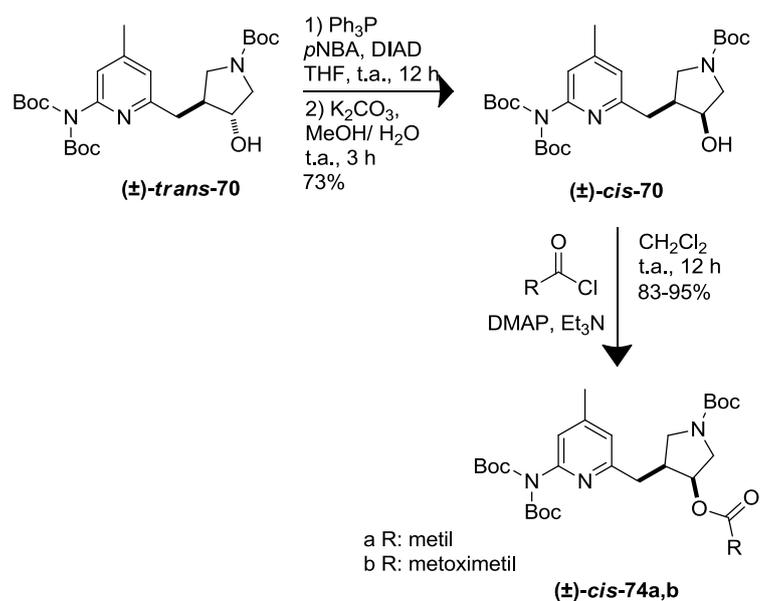
Resultados y discusión



Esquema 86. Síntesis de los compuestos **(±)-trans-70** y **(±)-trans-74a,b**.

Finalmente se realizó la síntesis del compuesto **(±)-cis-70**, mediante la inversión de Mitsunobu del grupo hidroxilo en su isómero **(±)-trans-70** (Esquema 87). Al compuesto **(±)-trans-70** disuelto en THF se le añadió Ph_3P , *p*NBA y DIAD. El posterior tratamiento del crudo obtenido con K_2CO_3 disuelto en una mezcla de MeOH y H_2O , dio lugar al compuesto **(±)-cis-70** con buen rendimiento.

Capítulo 4



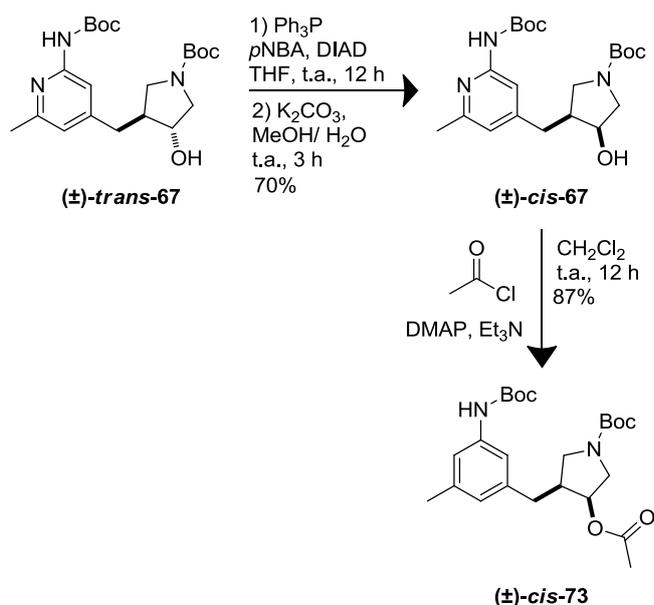
Esquema 87. Síntesis de los compuestos (±)-*cis*-70 y (±)-*cis*-74a,b.

Además, para el estudio de su resolución mediante reacciones de hidrólisis enzimática, se prepararon los ésteres (±)-*cis*-74a,b (Esquema 87), utilizando condiciones análogas a las de los sustratos (±)-*trans*-74a,b.

4.4.3. Síntesis de los compuestos (±)-*cis*-67, (±)-*trans*-77, (±)-*cis*-77 y sus ésteres derivados

Como se ha mencionado previamente, se decidió llevar a cabo el estudio de los isómeros (±)-*cis*-67 y (±)-*trans*-67 y sus consiguientes derivados (Esquema 88).

Resultados y discusión

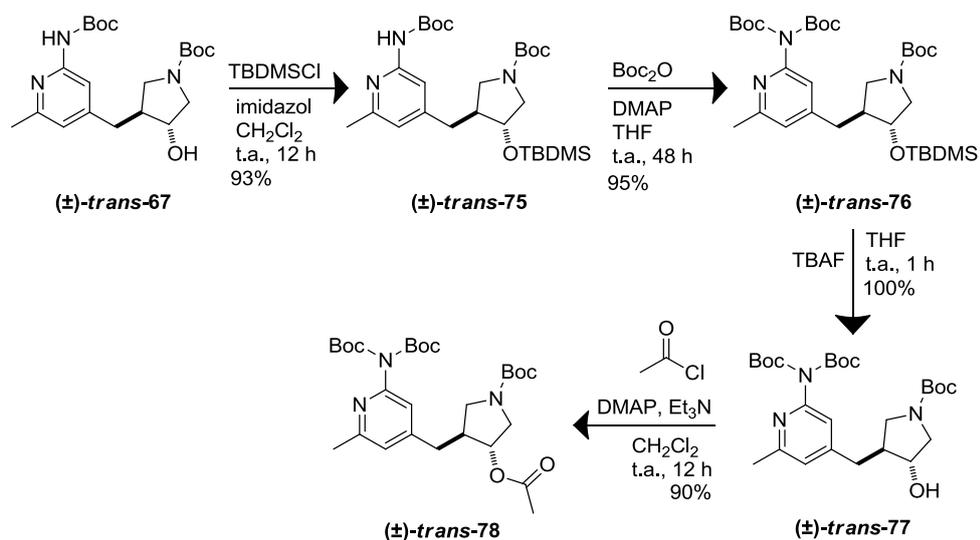


Esquema 88. Síntesis de los compuestos **(±)-cis-67** y **(±)-cis-73**.

En este caso, y a diferencia del compuesto **(±)-trans-66**, sí se puede realizar la inversión del alcohol, en las condiciones de la reacción de Mitsunobu, sin que se observe la migración del grupo *tert*-butoxicarbonilo. De este modo, y bajo las condiciones descritas en el Esquema 88, se obtuvo el compuesto deseado **(±)-cis-67**. Finalmente, se trata con cloruro de acetilo, para formar el correspondiente éster **(±)-cis-73**.

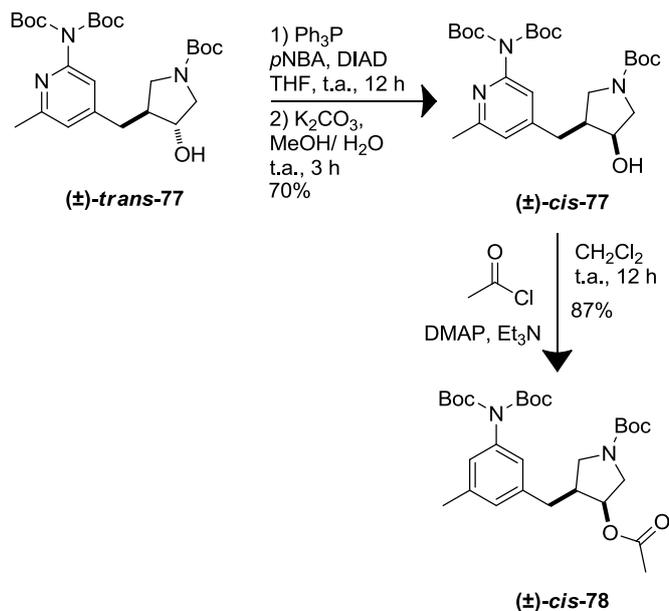
Seguidamente, tras una serie de transformaciones análogas realizadas en el compuesto **(±)-trans-66**, se obtuvo con elevado rendimiento el derivado **(±)-trans-77** (Esquema 89). El cual, por tratamiento con el cloruro de acetilo correspondiente, dio lugar al compuesto **(±)-trans-78**.

Capítulo 4



Esquema 89. Síntesis de los compuestos **(±)-trans-77** y **(±)-trans-78**.

Por último, se sintetizó mediante las condiciones de Mitsunobu ya descritas el compuesto **(±)-cis-77** (Esquema 90), el cual se esterificó para obtener el derivado **(±)-cis-78**.



Esquema 90. Síntesis de los compuestos **(±)-cis-77** y **(±)-cis-78**.

4.5. Resoluciones enzimáticas de las hidroxipirrolidinas sintetizadas

Una vez finalizada la síntesis de todos los sustratos propuestos se procedió al estudio de su resolución enzimática mediante procesos de hidrólisis o de acilación. Las lipasas que se han probado han sido la CAL-A, CAL-B, AK y PSL-IM, aunque en las tablas que se exponen a lo largo del capítulo solo se han incluido los resultados más representativos para cada sustrato.

En este punto cabe mencionar que la existencia de 2 tipos de lipasa CAL-A se debe a la reciente aparición en el mercado de una nueva preparación de la misma, siendo proporcionada en este caso por la casa *Chiralvision*, la cual difiere en actividad con la ya existente, como se podrá apreciar a lo largo de este capítulo.

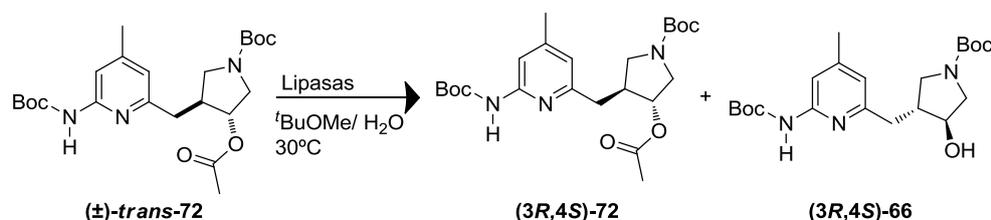
El uso de la última lipasa adquirida será representado a lo largo del capítulo como CAL-A* con el objetivo de diferenciarla de la ya utilizada a lo largo de toda la memoria (CAL-A de *Codexis*).

Con el objetivo de llevar un seguimiento de las reacciones así como de calcular los excesos enantioméricos de sustrato y producto, se optimizaron las condiciones para el análisis de los enantiómeros mediante la técnica de HPLC quiral, siendo este mismo procedimiento el utilizado para todos los sustratos que se estudiarán a lo largo de este capítulo.

4.5.1. Resolución enzimática del sustrato (\pm)-*trans*-72 y sus derivados

Se comenzó con el estudio del compuesto (\pm)-*trans*-72 (Esquema 91).

Capítulo 4



Esquema 91. Hidrólisis enzimática del compuesto $(\pm)\text{-trans-72}$.

En este caso la hidrólisis enzimática se llevó a cabo utilizando 10 equivalentes de H_2O en $t\text{BuOMe}$ a 30°C (Tabla 11).

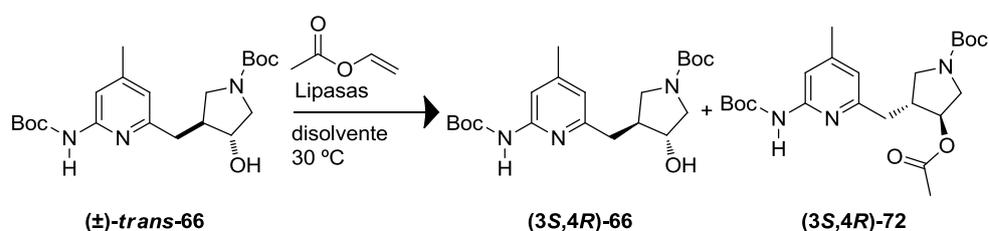
Tabla 11. Hidrólisis enzimática del compuesto $(\pm)\text{-trans-72}$ en $t\text{BuOMe}$ a 30°C .

Entrada	Lipasa	<i>t</i> (días)	<i>ees</i> ^a (%)	<i>ee_p</i> ^a (%)	<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i> ^c
1	CAL-A	2	60	72	45	11
2	CAL-A*	3	16	81	16	11
3	CAL-B	3	---	---	trazas	---
4	AK	3	---	---	trazas	---

^a Excesos enantioméricos de sustrato (*ees*) y de producto (*ee_p*) determinados por HPLC. ^b $c = ees/(ees+ee_p)$. ^c $E = \ln[(1-c)(1-ees)]/\ln[(1-c)(1+ees)]$.³²

Utilizando la lipasa CAL-A como catalizador (entrada 1), tras 2 días de reacción se alcanzó un 45% de conversión, sin embargo, la enantioselectividad no fue elevada. Al tratarse de la lipasa CAL-A* (entrada 2), la enantioselectividad observada fue semejante aunque la enzima muestra menos actividad frente a este sustrato y tras 3 días de reacción, la conversión solamente alcanzó el 16%. Por último, en las reacciones biocatalizadas por las lipasas CAL-B y AK (entradas 3 y 4), tras 3 días de reacción solamente se observaron trazas del producto.

A continuación, se llevaron a cabo las reacciones de acilación enzimática del sustrato $(\pm)\text{-trans-66}$ (Esquema 92).



Esquema 92. Acilación enzimática del compuesto $(\pm)\text{-trans-66}$.

Inicialmente se probaron las condiciones habituales en este tipo de reacciones, 5 equivalentes de acetato de vinilo como agente de acilación y $t\text{BuOMe}$ como disolvente manteniendo la agitación a 30 °C.

Tabla 12. Acilación enzimática del compuesto $(\pm)\text{-trans-66}$ en $t\text{BuOMe}$ a 30 °C.

Entrada	Lipasa	disolvente	<i>t</i> (días)	<i>ees</i> ^a (%)	<i>ee_P</i> ^a (%)	<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i> ^c
1	CAL-A	$t\text{BuOMe}$	8 h	64	74	46	12
2	CAL-A*	$t\text{BuOMe}$	1 h	89	78	53	24
3	AK	$t\text{BuOMe}$	4	8	>99	7	>200
4	CAL-B	$t\text{BuOMe}$	4	27	87	24	19
5	CAL-B	AcOVin	3	13	>99	12	>200
6	CAL-A	AcOVin	8 h	11	12	50	1
7	AK	AcOVin	3	5	31	1	2
8	CAL-B	Tolueno	4	6	>99	7	>200
9	CAL-A	Tolueno	8 h	36	76	32	10
10	AK	Tolueno	3	2	>99	2	>200

^a Excesos enantioméricos de sustrato (*ees*) y de producto (*ee_P*) determinados por HPLC. ^b $c = ees / (ees + ee_P)$. ^c $E = \ln[(1-c)(1 - ees)] / \ln[(1-c)(1 + ees)]$.³²

Bajo estas condiciones, con la lipasa CAL-A tras 8 horas de reacción (entrada 1) se alcanzó una conversión cercana al 50% con una baja enantioselectividad. La reacción biocatalizada por la lipasa CAL-A* (entrada 2), en solo 1 hora superó ligeramente el 50% de conversión mostrando una enantioselectividad moderada. La lipasa AK (entrada 3) muestra muy baja actividad a pesar de tener una enantioselectividad aparentemente alta. Por último, la lipasa CAL-B

Tabla 13. Hidrólisis enzimática de los compuestos (\pm)-**trans-74a,b**, en ^tBuOMe a 30 °C.

Entrada	Sustrato	Lipasa	<i>t</i> (días)	<i>ees</i> ^a (%)	<i>ee_p</i> ^a (%)	<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i> ^c
1	(\pm)- trans-74a	CAL-A	4	22	95	19	48
2	(\pm)- trans-74a	CAL-A*	4	49	65	43	8
3	(\pm)- trans-74a	CAL-B	4	---	---	trazas	---
4	(\pm)- trans-74a	AK	4	---	---	trazas	---
5 ^d	(\pm)- trans-74a	CAL-A	23 h	88	86	50	39
6 ^d	(\pm)- trans-74a	CAL-A*	7	19	93	18	34
7 ^e	(\pm)- trans-74a	CAL-A*	10 h	29	44	40	3
8	(\pm)- trans-74b	CAL-A	1	>99	76	56	48
9	(\pm)- trans-74b	CAL-A*	9 h	40	57	41	5
10	(\pm)- trans-74b	CAL-B	4	---	---	trazas	---
11	(\pm)- trans-74b	AK	4	---	---	trazas	---

^a Excesos enantioméricos de sustrato (*ees*) y de producto (*ee_p*) determinados por HPLC. ^b $c = ees/(ees+ee_p)$. ^c $E = \ln[(1-c)(1-ees)]/\ln[(1-c)(1+ees)]$.³² ^d reacción a 45 °C. ^e reacción a 60 °C.

Teniendo en cuenta estos resultados, se intentó mejorar la conversión obtenida elevando la temperatura de reacción a 45 °C.

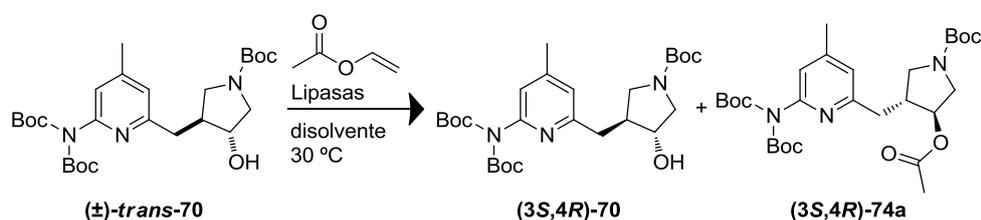
En estas condiciones, la reacción catalizada por la CAL-A (entrada 5) tras 23 horas de reacción alcanzó una conversión del 50%, sin embargo, la enantioselectividad decreció respecto a la reacción a 30 °C. Al llevarse a cabo la reacción con la lipasa CAL-A* (entrada 6), tras 7 días de reacción se alcanzó un elevado exceso enantiomérico de producto, sin embargo, la enantioselectividad fue moderada. Al llevar a cabo la reacción catalizada por la lipasa CAL-A* a 60 °C (entrada 7), se observó un incremento de la velocidad de la reacción, puesto que, tras 10 horas se alcanzó un 40% de conversión, sin embargo, la enantioselectividad decreció respecto a la obtenida tanto a 30 °C como a 45 °C.

En vista de los resultados obtenidos se decidió utilizar como sustrato en la hidrólisis enzimática un éster más activado, siendo el derivado (\pm)-**trans-74b** el elegido.

Capítulo 4

Efectivamente, con dos de las lipasas probadas se incrementó la velocidad de reacción. La lipasa CAL-A (entrada 8) tras 1 día de reacción alcanzó el 56% de conversión, lográndose así un excelente exceso enantiomérico de sustrato. Bajo estas mismas condiciones, con la lipasa CAL-A* (entrada 9), tras 9 horas de reacción, se alcanzó una conversión del 41% con baja enantioselectividad. Tanto la lipasa CAL-B como la AK (entradas 10 y 11) mostraron también con este sustrato una actividad catalítica muy baja, obteniéndose solamente trazas del producto deseado tras 4 días de reacción.

Una vez estudiada la hidrólisis enzimática se procedió al estudio de los procesos de acilación enzimática del sustrato (\pm)-**trans-70** (Esquema 94).



Esquema 94. Acilación enzimática del compuesto (\pm)-**trans-70**.

En la reacción de acilación enzimática se utilizaron las diferentes lipasas, 5 equivalentes de acetato de vinilo y ^tBuOMe a 30 °C como disolvente (Tabla 14).

Bajo estas condiciones, se observó que tras sólo 3 horas la reacción catalizada por la lipasa CAL-A* (entrada 1) alcanzó el 35% de conversión con una enantioselectividad moderada. Estos resultados fueron mejores que los obtenidos en el caso de la lipasa CAL-A (entrada 2), puesto que fue necesario 1 día de reacción para alcanzar el 50% de conversión y la enantioselectividad fue inferior. Con las lipasas CAL-B y la AK (entradas 3 y 4) tras 3 días de reacción se obtuvieron conversiones muy bajas.

Tabla 14. Acilación enzimática del compuesto (\pm)-*trans*-70, en ^tBuOMe a 30 °C.

Entrada	Lipasa	disolvente	<i>t</i> (días)	<i>ees</i> ^a (%)	<i>ee_p</i> ^a (%)	<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i> ^c
1	CAL-A*	^t BuOMe	3 h	46	84	35	18
2	CAL-A	^t BuOMe	1	73	73	50	14
3	CAL-B	^t BuOMe	3	31	51	38	4
4	AK	^t BuOMe	3	22	87	20	18
5	CAL-A*	AcOVin	3.5 h	>99	93	52	>200
6	CAL-A	AcOVin	3	43	76	36	11
7	CAL-B	AcOVin	3	---	---	trazas	---
8	AK	AcOVin	3	---	---	trazas	---

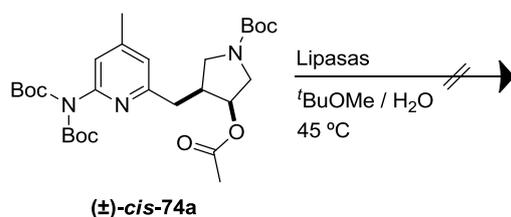
^a Excesos enantioméricos de sustrato (*ees*) y de producto (*ee_p*) determinados por HPLC. ^b $c = ees / (ees + ee_p)$. ^c $E = \ln[(1-c)(1 - ees)] / \ln[(1-c)(1 + ees)]$.³²

La influencia del disolvente se probó utilizando acetato de vinilo no solo como agente de acilación sino también como disolvente. En estas condiciones, la lipasa CAL-A* (entrada 5) muestra una elevada enantioselectividad tras 3.5 horas de reacción obteniéndose el enantiómero (**3S,4R**)-70 del sustrato remanente y el producto (**3S,4R**)-74a con un elevado exceso enantiomérico. La reacción catalizada por la lipasa CAL-A (entrada 6) bajo las mismas condiciones mostró, una enantioselectividad baja y una velocidad moderada, tras 3 días de reacción, alcanzando una conversión del 36%. Con las lipasas CAL-B y AK (entradas 7 y 8) se observaron solamente trazas del producto tras el mismo periodo de tiempo.

4.5.3. Resolución enzimática del sustrato (\pm)-*cis*-70 y sus derivados

En primer lugar, se estudió la reacción de hidrólisis enzimática del sustrato (\pm)-*cis*-74a (Esquema 95).

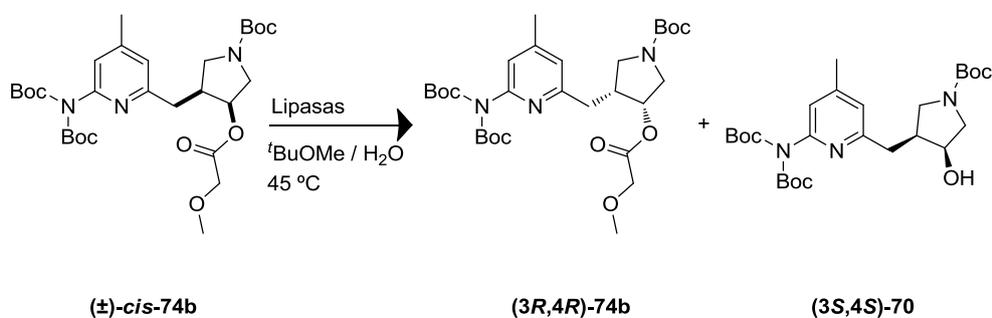
Capítulo 4



Esquema 95. Hidrólisis enzimática del compuesto **(±)-cis-74a**.

Las reacciones enzimáticas se realizaron con 10 equivalentes de H₂O y ^tBuOMe como disolvente. Sin embargo, tras 3 días de reacción, no se observó producto con ninguna de las lipasas utilizadas para el proceso, incluso llevando a cabo la biocatálisis a una temperatura de 45 °C.

Teniendo en cuenta estos resultados, se probaron inicialmente las mismas condiciones de reacción con el éster **(±)-cis-74b** (Esquema 96).



Esquema 96. Hidrólisis enzimática del compuesto **(±)-cis-74b**.

Los mejores resultados obtenidos para este proceso se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Hidrólisis enzimática del compuesto (\pm)-**cis-74b**, en t BuOMe a 45 °C.

Entrada	Lipasa	t (días)	ees ^a (%)	ee _P ^a (%)	c ^b (%)	E ^c
1	AK	10	40	>99	29	>200
2	CAL-A*	10	38	>99	28	>200
3	CAL-B	10	14	>99	12	>200
4	CAL-A	10	---	---	trazas	---
5 ^d	CAL-A*	1	77	71	52	14
6 ^d	CAL-A	2	22	27	45	2
7 ^d	AK	1	67	81	45	18

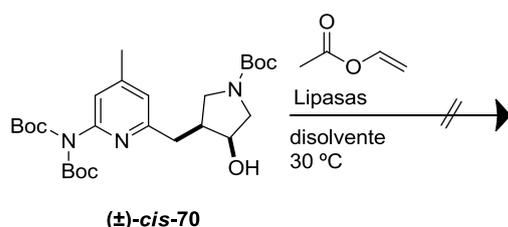
^a Excesos enantioméricos de sustrato (*ees*) y de producto (*ee_P*) determinados por HPLC. ^b $c = ees/(ees+ee_P)$. ^c $E = \ln[(1-c)(1-ees)]/\ln[(1-c)(1+ees)]$.³² ^d reacción en tampón fosfato 50 mM a pH 7.5.

Bajo las condiciones iniciales, las lipasas AK y CAL-A* (entradas 1 y 2) alcanzaron un 29% de conversión tras 10 días de reacción, observándose una enantioselectividad muy elevada. Con la lipasa CAL-B (entrada 3), al igual que en los casos anteriores, se observó una enantioselectividad elevada pero la conversión alcanzada fue menor. En el caso de la lipasa CAL-A (entrada 4) solo se observaron trazas de producto.

Para intentar mejorar la conversión, se usó tampón fosfato 50 mM a pH 7.5 como medio de reacción y t BuOMe como cosolvente. En este caso, se alcanzó una conversión del 52% (entrada 5) tras 1 día de reacción con la lipasa CAL-A*, sin embargo la enantioselectividad fue mucho menor que la obtenida en t BuOMe. Más drástico aún fue el descenso de la enantioselectividad en la reacción catalizada por la lipasa CAL-A (entrada 6) en estas condiciones, aunque, tras 2 días de reacción se alcanzó un 45% de conversión. Por último, la reacción catalizada por la lipasa AK (entrada 7), tras 1 día de reacción obtuvo una buena conversión pero la enantioselectividad no alcanzó los niveles deseados.

Finalmente se llevó a cabo la reacción de acilación enzimática del compuesto (\pm)-**cis-70** (Esquema 97).

Capítulo 4



Esquema 97. Acilación enzimática del compuesto **(±)-cis-70**.

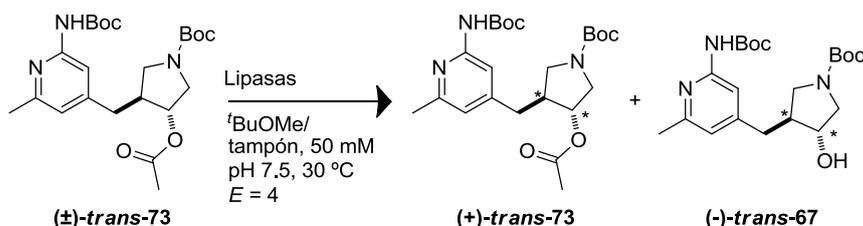
Para ello, se dispuso de diferentes tipos de lipasas, 5 equivalentes de acetato de vinilo como agente de acilación y t BuOMe como disolvente, manteniendo la agitación orbital a 30 °C.

En estas condiciones y tras 3 días de reacción, no se observó actividad catalítica en ninguno de los casos. Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió prescindir del t BuOMe y utilizar el acetato de vinilo como disolvente, sin embargo tampoco se observó producto de reacción.

4.5.4. Resolución enzimática del sustrato **(±)-trans-67** y sus derivados

Finalmente, puesto que en la síntesis inicial del derivado **(±)-trans-66** se forma también, aunque en menor proporción, su regioisómero **(±)-trans-67**, se estudió su resolución así como la de sus derivados.

En primer lugar se realizó la hidrólisis enzimática del sustrato **(±)-trans-73** (Esquema 98).



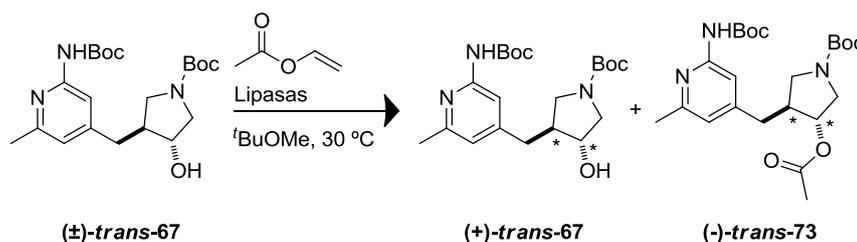
Esquema 98. Hidrólisis enzimática del compuesto **(±)-trans-73**.

Resultados y discusión

Para ello se utilizaron dos condiciones diferentes: t BuOMe con 10 equivalentes de H_2O o bien tampón fosfato 50 mM a pH 7.5 siendo el t BuOMe el cosolvente de la reacción.

En el primer caso no se observó reacción con ninguna de las enzimas probadas, mientras que cuando se utiliza tampón fosfato se observó reacción con las lipasas CAL-A y AK se produjo catálisis, pero con una enantioselectividad muy baja ($E = 4$).

Seguidamente, se llevó a cabo el proceso de acilación enzimática del sustrato **(±)-trans-67** (Esquema 99).



Esquema 99. Acilación enzimática del compuesto **(±)-trans-67**.

Para ello se utilizaron las lipasas habituales, 5 equivalentes de acetato de vinilo como agente de acilación y t BuOMe como disolvente manteniendo la agitación orbital a 30 °C (Tabla 16).

Tabla 16. Acilación enzimática del compuesto **(±)-trans-67** en t BuOMe a 30 °C.

Entrada	Lipasa	<i>t</i> (días)	<i>ees</i> ^a (%)	<i>ee_p</i> ^a (%)	<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i> ^c
1	CAL-A	2	91	76	55	24
2	CAL-B	5	25	93	22	35
3	AK	5	24	>99	20	>200
4 ^d	AK	4	91	>99	48	>200
5 ^e	CAL-B	3	81	86	48	34

^a Excesos enantioméricos de sustrato (*ees*) y de producto (*ee_p*) determinados por HPLC. ^b $c = ees / (ees + ee_p)$. ^c $E = \ln[(1-c)(1-ees)] / \ln[(1-c)(1+ees)]$.³² ^d 10 eq. AcOvin. ^e 20 eq. AcOvin.

En las condiciones probadas inicialmente, la lipasa AK (entrada 3), mostró una elevada enantioselectividad, lográndose obtener el producto enantiopuro con una baja conversión tras 5

Capítulo 4

días de reacción. Con las lipasas CAL-A y CAL-B (entrada 1 y 2), la enantioselectividad fue moderada, aunque en el caso de la biocatálisis producida por la lipasa CAL-A (entrada 1), tras 2 días de reacción, se pudo obtener el sustrato altamente enantioenriquecido.

Teniendo en cuenta la elevada selectividad del proceso catalizado por la AK, se intentó incrementar la conversión mediante un aumento de la concentración del agente de acilación. Al utilizar 10 equivalentes de acetato de vinilo (entrada 4), tras 4 días de reacción, alcanzó una conversión prácticamente del 50% manteniéndose la elevada enantioselectividad.

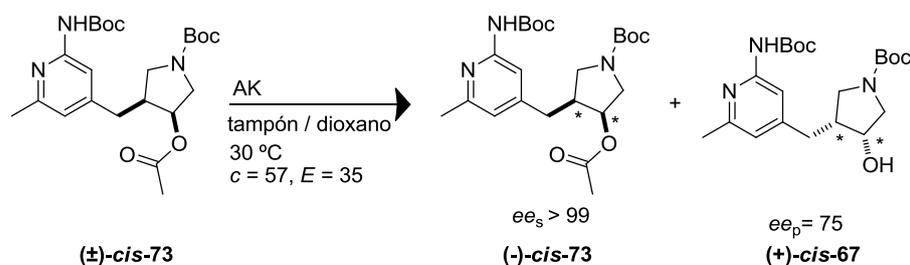
Aunque la enantioselectividad obtenida inicialmente por la reacción catalizada por la lipasa CAL-B es más baja, se probó también el efecto del aumento de la cantidad del agente de acilación alcanzando hasta 20 equivalentes. A pesar de que en estas condiciones se logró alcanzar una conversión cercana al 50% en 3 días de reacción, la enantioselectividad se mantuvo con un valor moderado de $E = 34$.

Para este sustrato también se llevaron a cabo pruebas con diferentes disolventes como fueron el dioxano y el acetato de vinilo, que no mejoraron en ningún caso los resultados obtenidos con la lipasa AK en las condiciones indicadas en la entrada 4, por lo que no se han incluido en la tabla.

4.5.5. Resolución enzimática del sustrato (\pm)-*cis*-67 y sus derivados

En primer lugar se llevó a cabo la hidrólisis enzimática del sustrato (\pm)-*cis*-73 (Esquema 100).

Resultados y discusión

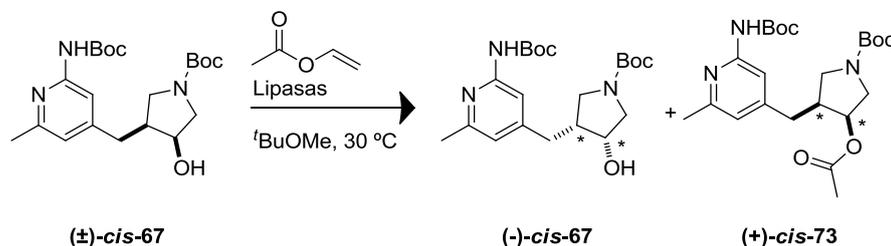


Esquema 100. Hidrólisis enzimática del compuesto **(±)-cis-73**.

La hidrólisis se llevó a cabo con 10 equivalentes de H₂O y *t*BuOMe como disolvente a 30 °C. Tras 4 días de reacción solamente se apreciaron trazas del producto deseado, por lo que, se decidió utilizar otros disolventes en la catálisis. Sin embargo, el uso de tolueno, dioxano y CH₃CN no conllevó a mejoras apreciables y tras el mismo periodo de tiempo tampoco se observó producto.

Se llevaron a cabo varias reacciones utilizando tampón fosfato 50 mM a pH 7.5 como disolvente y dioxano y/o *t*BuOMe como cosolvente con el fin de mejorar la catálisis. En este caso, al tratarse de la reacción catalizada por la lipasa AK, si se observó producto de reacción aunque la enantioselectividad fue moderada (Esquema 100).

Finalmente, se estudió la acilación enzimática del sustrato **(±)-cis-67** (Esquema 101).



Esquema 101. Acilación enzimática del compuesto **(±)-cis-67**.

Las condiciones probadas inicialmente fueron 10 equivalentes de acetato de vinilo y *t*BuOMe como disolvente a 30 °C (Tabla 17).

Tabla 17. Acilación enzimática del compuesto (\pm)-**cis-67** a 30 °C.

Entrada	Lipasa	disolvente	t (días)	ees^a (%)	eep^a (%)	c^b (%)	E^c
1	CAL-B	^t BuOMe	3	58	53	52	5
2	AK	^t BuOMe	3	---	---	trazas	---
3	CAL-B	dioxano	3	29	>99	23	>200
4	CAL-B	CH ₃ CN	3	17	>99	15	>200
5	CAL-B	AcOVin	3	38	>99	28	>200
6 ^d	CAL-B	AcOVin	5	>99	>99	50	>200

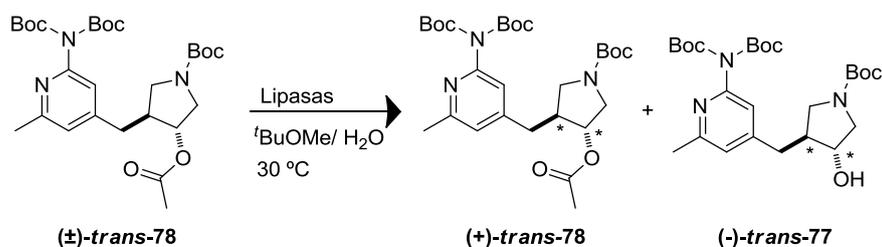
^a Excesos enantioméricos de sustrato (*ees*) y de producto (*eep*) determinados por HPLC. ^b $c = ees/(ees+eep)$. ^c $E = \ln[(1-c)(1-ees)]/\ln[(1-c)(1+ees)]$.³² ^d Reacción llevada a cabo a 45 °C.

En estas condiciones, la reacción catalizada por CAL-B (entrada 1) en ^tBuOMe, alcanzó tras 3 días de reacción una conversión del 50%, pero la enantioselectividad fue baja. Al utilizar la lipasa AK como catalizador (entrada 2), solo se detectaron trazas de producto.

Para mejorar estos resultados se probaron varios disolventes con los que se logró mejorar en algunos casos la catálisis con CAL-B. Al utilizar como disolvente dioxano (entrada 3), CH₃CN (entrada 4) o bien acetato de vinilo (entrada 5), tras 3 días de reacción, se obtiene una enantioselectividad muy alta pero la conversión solo alcanza el 28%. Teniendo en cuenta este resultado, se incrementó la temperatura de este proceso a 45 °C, y, tras 5 días de reacción (entrada 6), se observó un 50% de conversión y una alta enantioselectividad, lo que permitió obtener ópticamente puros tanto el sustrato como el producto.

4.5.6. Resolución enzimática del sustrato (\pm)-**trans-77** y sus derivados

En primer lugar, se llevó a cabo la reacción de hidrólisis enzimática del compuesto (\pm)-**trans-78** (Esquema 102), utilizando para ello 10 equivalentes de H₂O y ^tBuOMe a 30 °C como disolvente.



Esquema 102. Hidrólisis enzimática del compuesto $(\pm)\text{-trans-78}$.

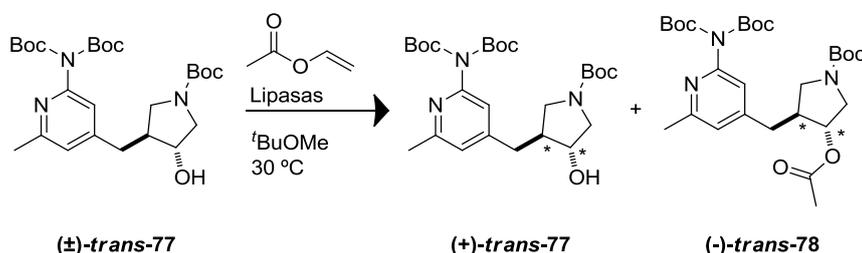
Bajo estas condiciones las lipasas CAL-A (entradas 1 y 2) catalizaron la reacción pero con baja enantioselectividad, mientras que, tanto la lipasa CAL-B como la AK (entradas 3 y 4) solamente dieron lugar a trazas del producto deseado.

Tabla 18. Hidrólisis enzimática del compuesto $(\pm)\text{-trans-78}$ en $t\text{BuOMe}$ a 30 °C.

Entrada	Lipasa	t (días)	<i>ees</i> ^a (%)	<i>eeP</i> ^a (%)	<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i> ^c
1	CAL-A	4	1	1	53	1
2	CAL-A*	4	38	57	40	5
3	CAL-B	4	---	---	trazas	---
4	AK	4	---	---	trazas	---

^a Excesos enantioméricos de sustrato (*ees*) y de producto (*eeP*) determinados por HPLC. ^b $c = ees / (ees + eeP)$. ^c $E = \ln[(1-c)(1 - ees)] / \ln[(1-c)(1 + ees)]$.³²

Al igual que para los sustratos anteriores, también se llevó a cabo la reacción de acilación enzimática (Esquema 103).



Esquema 103. Acilación enzimática del compuesto $(\pm)\text{-trans-77}$.

Para estas biotransformaciones se utilizaron, acetato de vinilo como agente de acilación y $t\text{BuOMe}$ a 30 °C como disolvente (Tabla 19).

Tabla 19. Acilación enzimática del compuesto (\pm)-*trans*-77 en ^tBuOMe a 30 °C.

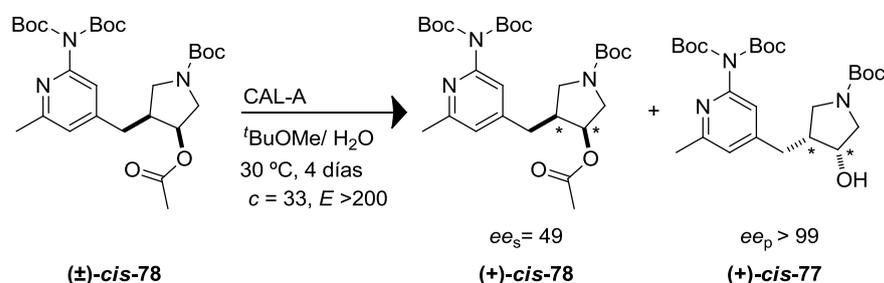
Entrada	Lipasa	t (días)	ees ^a (%)	ee _p ^a (%)	c ^b (%)	E ^c
1	CAL-A*	2	65	>99	40	>200
2	CAL-A	4	28	>99	22	>200
3	CAL-B	7	30	44	40	3
4	AK	7	49	61	44	7

^a Excesos enantioméricos de sustrato (ees) y de producto (ee_p) determinados por HPLC. ^b $c = ees / (ees + ee_p)$. ^c $E = \ln[(1-c)(1 - ees)] / \ln[(1-c)(1 + ees)]$.³²

En la reacción catalizada por la lipasa CAL-A* (entrada 1), se consiguió una excelente enantioselectividad y una conversión del 40% tras 2 días de reacción. La lipasa CAL-A (entrada 2) permitió obtener una enantioselectividad muy elevada con una conversión tras 4 días de reacción del 22% sin observarse un aumento de la misma en tiempos más prolongados. Las reacciones catalizadas tanto por CAL-B como por AK (entradas 3 y 4) fueron necesarios 7 días para alcanzar una conversión de apenas el 40% con baja enantioselectividad.

4.5.7. Resolución enzimática del sustrato (\pm)-*cis*-77 y sus derivados

En primer lugar, se llevó a cabo el estudio de la reacción de hidrólisis enzimática del compuesto (\pm)-*cis*-78 (Esquema 104).

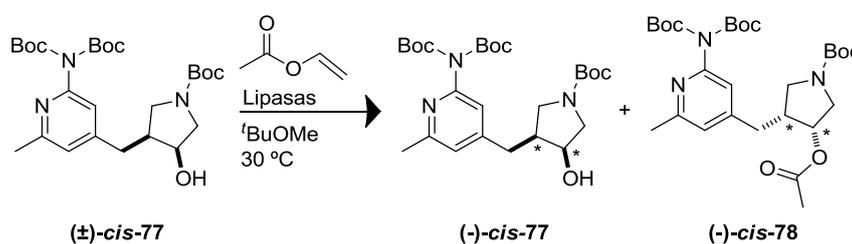


Esquema 104. Hidrólisis enzimática del compuesto (\pm)-*cis*-78.

Cuando se llevó a cabo la catálisis con 10 equivalentes de H₂O, ^tBuOMe como disolvente a 30 °C, la lipasa CAL-A, tras 4 días de reacción alcanzó el 33% de conversión dando lugar al producto

enantio puro y a una enantioselectividad mayor de 200 (Esquema 104).

Finalmente, se llevó a cabo el proceso de acilación enzimática del sustrato **(±)-cis-77** (Esquema 105).



Esquema 105. Acilación enzimática del compuesto **(±)-cis-77**.

Las acilaciones enzimáticas se llevaron a cabo en acetato de vinilo como agente de acilación y *t*BuOMe como disolvente a 30 °C, como se ha sido habitual en los casos anteriores.

Tabla 20. Acilación enzimática del compuesto **(±)-cis-77** en *t*BuOMe a 30 °C.

Entrada	Lipasa	<i>t</i> (días)	<i>ees</i> ^a (%)	<i>eer</i> ^a (%)	<i>c</i> ^b (%)	<i>E</i> ^c
1	CAL-B	3	75	>99	43	>200
2	CAL-A*	3	36	>99	27	>200
3	CAL-A	3	13	>99	11	>200

^a Excesos enantioméricos de sustrato (*ees*) y de producto (*eer*) determinados por HPLC. ^b $c = ees / (ees + eer)$. ^c $E = \ln[(1-c)(1 - ees)] / \ln[(1-c)(1 + ees)]$.³²

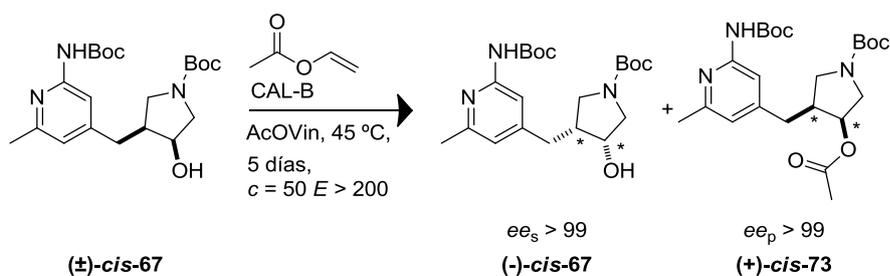
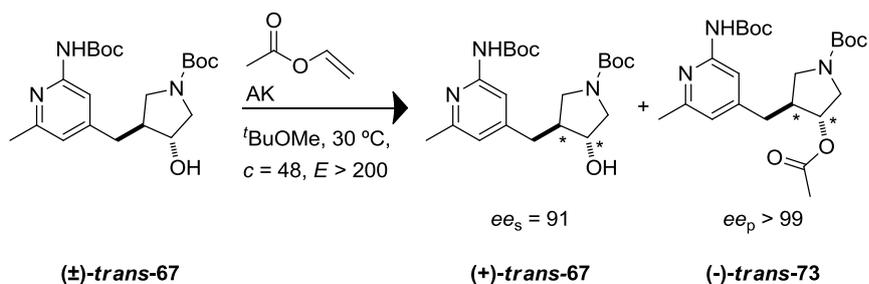
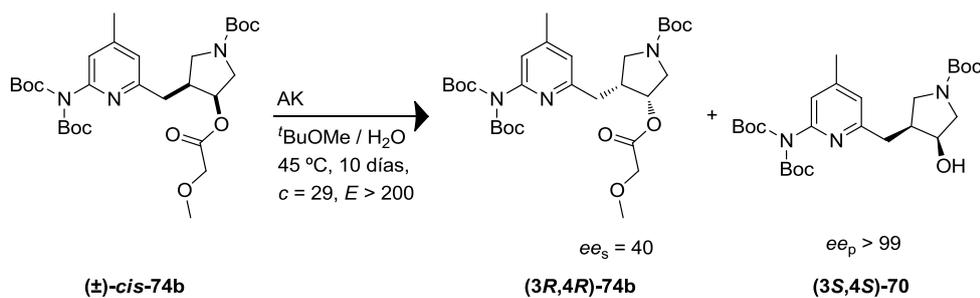
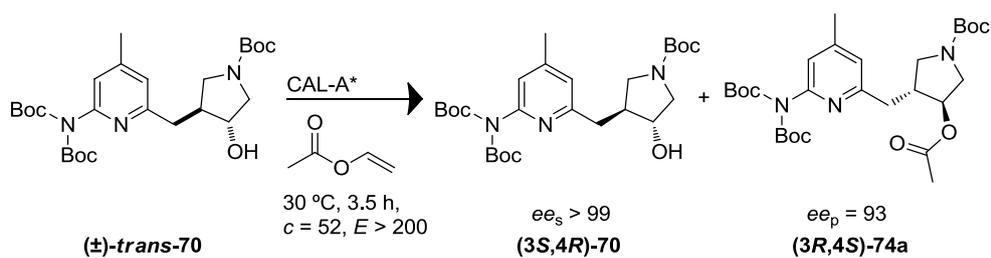
Con la lipasa CAL-B (entrada 1) como catalizador, se observa una excelente enantioselectividad y conversión cercana al 50% tras 3 días de reacción. Una vez más se observa una gran diferencia entre las lipasas CAL-A (entradas 2 y 3).

4.6. Resumen de las condiciones de reacción más favorables

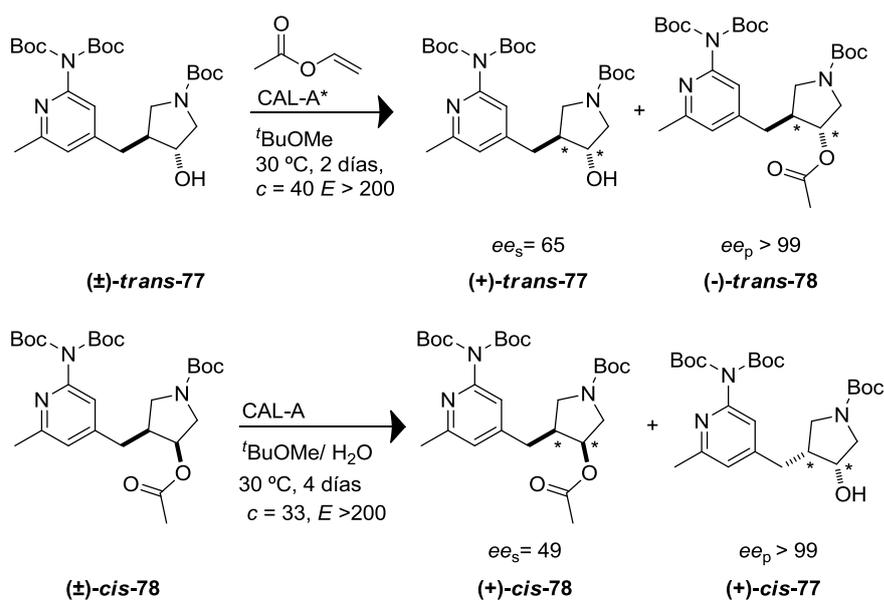
Para tener una visión conjunta de los resultados obtenidos, dado el número de sustratos que se han estudiado, se han

Capítulo 4

seleccionado los procesos más favorables en cada caso y se relacionan a continuación:



Resultados y discusión



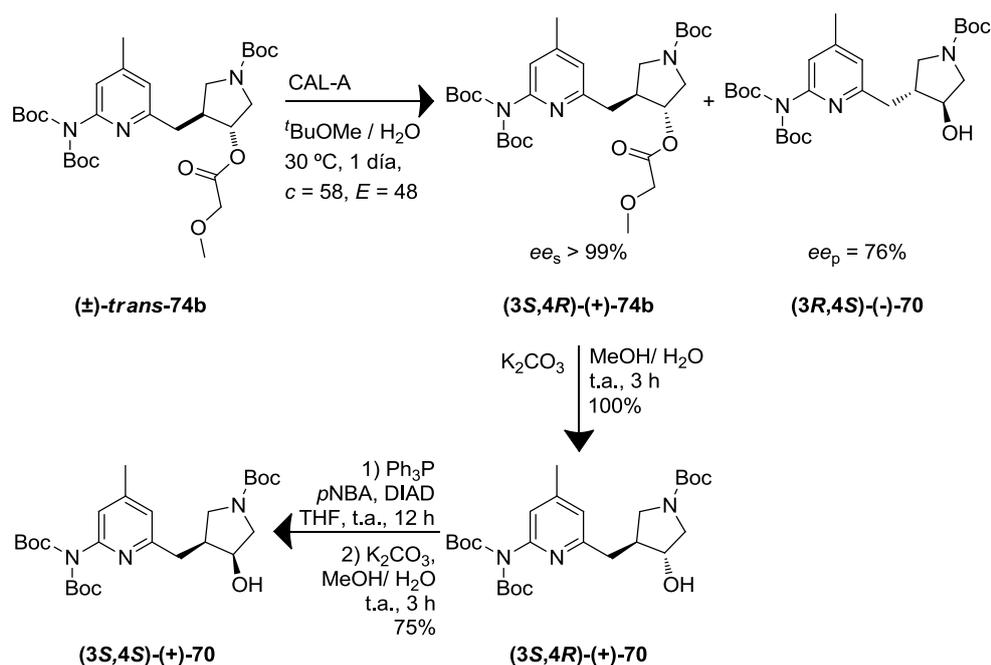
Al analizar estos resultados se concluye que es posible resolver cada uno de los sustratos mediante la selección del catalizador más adecuado y de las condiciones de reacción.

Además, se ha constatado la influencia de la estructura del sustrato en la catálisis enzimática. Cabe destacar el hecho de que variaciones estructurales en posiciones alejadas del centro en el que tiene lugar la catálisis, como la presencia de uno o dos grupos *tert*-butoxicarbonilo sobre el grupo amino que sustituye al anillo de piridina, sean determinantes en el resultado del proceso dependiendo de la lipasa utilizada como catalizador.

4.7. Asignación de la configuración

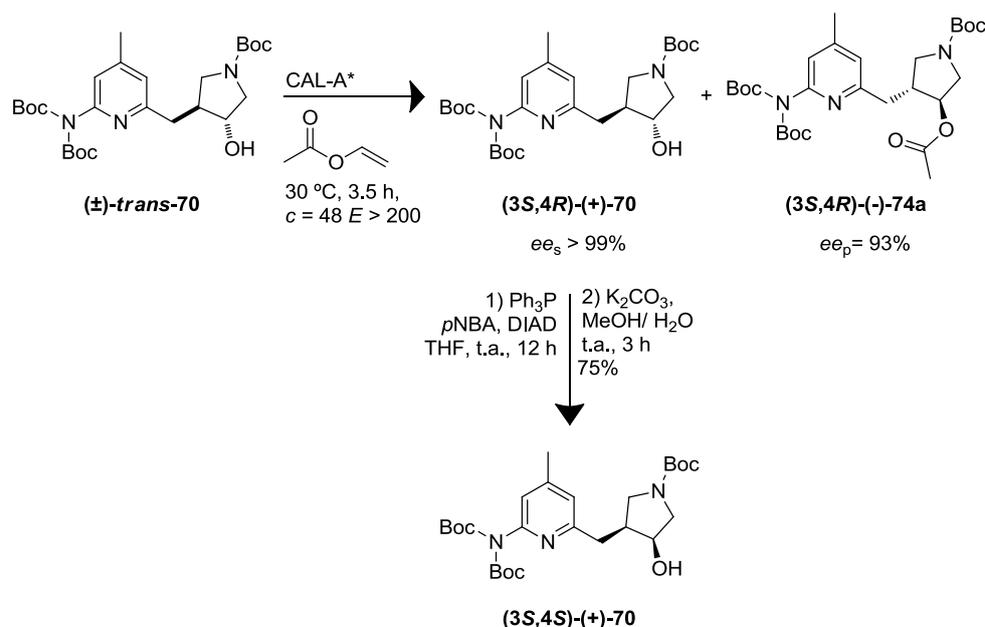
La determinación de la configuración de los compuestos enantiopuros obtenidos en las reacciones enzimáticas se lleva a cabo mediante una serie de transformaciones, comparando el producto final obtenido con el descrito previamente en la bibliografía.^{90a}

4.7.1. Asignación de la configuración del derivado (\pm)-*trans*-70



Esquema 106. Confirmación de la configuración del compuesto $(3S,4R)$ -74b.

En primer lugar, el sustrato enantiopuro remanente $(3S,4R)$ -74b obtenido en la hidrólisis catalizada por la lipasa CAL-A, se hidroliza con K_2CO_3 en una mezcla de MeOH y H_2O , dando lugar al compuesto $(3S,4R)$ -70. La inversión del hidroxilo de este derivado de configuración *trans*, se consigue mediante una reacción de Mitsunobu, obteniéndose, sin perder enantiopureza, el compuesto $(3S,4S)$ -70, siendo éste el enantiómero opuesto al descrito previamente en la bibliografía.



Esquema 107. Confirmación de la configuración del compuesto $(3S,4R)$ -70.

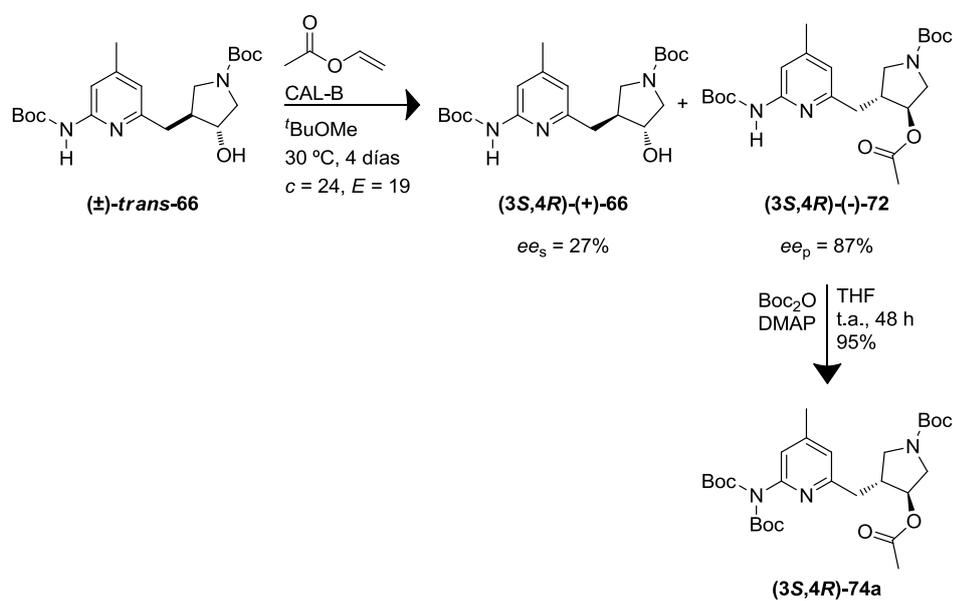
Del mismo modo, se llevó a cabo la asignación de la configuración obtenida en la reacción de acilación enzimática utilizando la lipasa CAL-A* como catalizador (Esquema 107), en la cual, al sustrato remanente enantiopuro se le hizo reaccionar bajo las condiciones de reacción de Mitsunobu, obteniéndose la inversión del grupo hidroxilo. El compuesto obtenido fue comparado mediante la medida de la desviación óptica y mediante los tiempos de retención previamente descritos en la bibliografía^{90a} mediante HPLC quiral, tras lo cual se concluyó que su configuración absoluta era $(3S,4S)$ -70.

4.7.2. Asignación de la configuración del derivado (\pm) -*trans*-66

El producto de la reacción de acilación enzimática $(3S,4R)$ -72 (Esquema 108) se hace reaccionar con *tert*-butildicarbonato en THF con el fin de obtener el compuesto $(3S,4R)$ -74a. La configuración absoluta de este derivado se asigna por comparación

Capítulo 4

con el compuesto **(3S,4R)-74a** obtenido como producto de la acilación enzimática del **(±)-trans-70** cuya asignación se explicó en el apartado anterior.



Esquema 108. Confirmación de la configuración del compuesto **(3S,4R)-66**.

Conclusiones

Conclusiones

En este capítulo se ha logrado la resolución de segmentos pirrolidínicos que forman parte de la estructura de inhibidores de óxido nítrico sintasa.

El mejor resultado para esta resolución se ha obtenido mediante la reacción de acilación enzimática de 1-*tert*-butoxicarbonil-3-{{6-[bis(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-metilpiridin-2-il}metil}-4-hidroxi-pirrolidina catalizada por CAL-A*, mediante la cual ambos enantiómeros se pueden obtener de forma enantiopura y con buen rendimiento.

La resolución de estereoisómero de configuración *cis* se logra mediante la hidrólisis de 1-*tert*-butoxicarbonil-3-{{6-[bis(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-metilpiridin-2-il}metil}-4-metoxiacetoxi-pirrolidina.

El estudio de la resolución enzimática se ha ampliado a estructuras análogas en las que el metileno está unido a la posición 4 de piridina y que presentan diferente sustitución en este anillo aromático, lo que ha permitido constatar la influencia de la estructura del sustrato en el resultado de los procesos biocatalíticos.

Parte experimental

4.8. General

Los reactivos, disolventes y técnicas de análisis han sido detalladas en la parte experimental del primer capítulo con las excepciones que se muestran a continuación.

4.8.1. Biocatalizadores

En este capítulo, además de las enzimas previamente mencionadas en el capítulo 1, se ha utilizado un nuevo preparado comercial de la lipasa de *Candida antarctica* CAL-A* (CAL-A T2-150, 3000 U/g) es comercializada por Chiralvision.

4.9. Procedimientos sintéticos

4.9.1. Síntesis del compuesto 2-(*tert*-butoxicarbonil-amino)-4,6-dimetilpiridina. 63

Bajo atmósfera inerte, se disuelve el compuesto **62** (1.0 g, 8.2 mmol), en 16 mL de *t*BuOH se le añade Boc₂O (2.8 g, 13.1 mmol) y se mantiene agitando durante 48 h a 60°C. Una vez transcurrido ese tiempo, el disolvente se evapora y el residuo se purifica por cromatografía de columna (10% AcOEt/ hexano). Se obtiene el producto puro como un sólido blanco con un 80% de rendimiento.

4.9.2. Síntesis del compuesto 1-*tert*-butoxicarbonil-3,4-epoxipirrolidina. 65

A una disolución de **64** (1.0 g, 5.9 mmol) en 35 mL de CH₂Cl₂ a 0 °C, se le añade *m*CPBA (2.0 g, 11.8 mmol). Tras 48 horas de agitación el precipitado se filtra y la mezcla se neutraliza con 1M NaOH (15 mL), para extraer posteriormente con AcOEt (3 x 15 mL). Se juntan las fases orgánicas y se secan con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evapora bajo presión reducida y el crudo se purifica

por cromatografía de columna (30% AcOEt/ hexano). Se consigue el producto como un aceite amarillo con un rendimiento del 70%.

4.9.3. Síntesis de los compuestos (\pm)-*trans*-66 y (\pm)-*trans*-67

Una disolución del compuesto **63** (738 mg, 3.3 mmol) en 6 mL de THF se enfría a -78°C . Se añade $n\text{BuLi}$ (1.6 M en hexano, 5.1 mL, 8.3 mmol) gota a gota bajo atmósfera de argón y protegido de la luz. La disolución cambia de incolora a naranja. Una vez se obtiene ese color, se retira el baño y se mantiene protegido de la luz agitando a temperatura ambiente durante 45 min. Tras este tiempo, la disolución adquiere un color rojo oscuro. Seguidamente, se vuelve a poner a -78°C y se añade el compuesto **65** (768.0 mg, 4.1 mmol) gota a gota disuelto en 7 mL de THF. Se mantiene a esa temperatura durante 1 hora tras la cual se deja agitando durante 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se añade agua fría y se extrae con AcOEt (3 x 15 mL). Se juntan las fases orgánicas y se secan con Na_2SO_4 anhidro. Una vez evaporado el disolvente, se purifica el crudo resultante por cromatografía de columna (40% AcOEt/ hexano) obteniendo un 53% de rendimiento de la mezcla de ambos productos sólidos puros; siendo respectivamente un 70% del compuesto (\pm)-*trans*-66 y un 30% del (\pm)-*trans*-67.

4.9.4. Síntesis de los derivados acilados (\pm)-*trans*-72, (\pm)-*trans*-73, (\pm)-*trans*-74a,b, (\pm)-*cis*-74a,b, (\pm)-*cis*-73, (\pm)-*trans*-78, (\pm)-*cis*-78

Bajo atmósfera inerte se disuelve el correspondiente alcohol (\pm)-*trans*-66, (\pm)-*trans*-67, (\pm)-*cis*-67 (\pm)-*trans*-70, (\pm)-*cis*-70, (\pm)-*trans*-77 o (\pm)-*cis*-77 (0.20 mmol) en 3 mL de CH_2Cl_2 , se le añade DMAP (6.4 mg, 0.05 mmol), Et_3N (55.8 μL , 0.4 mmol) y el cloruro de acilo correspondiente (0.4 mmol). Pasadas 12 horas se extrae 3

veces (3 x 15 mL) con H₂O. Se juntan las fases orgánicas y se secan con Na₂SO₄ anhidro. Una vez evaporado el disolvente, el crudo de reacción se purifica mediante cromatografía de columna (40% AcOEt/ hexano), obteniéndose los productos como aceites amarillos con un rendimiento entre el 83 y el 95%.

4.9.5. Síntesis de los compuestos (±)-*cis*-67, (±)-*cis*-70 y (±)-*cis*-77

A una suspensión del alcohol correspondiente (±)-*trans*-66, (±)-*trans*-67, (±)-*trans*-70 o (±)-*trans*-77 (0.5 mmol) en THF seco (5.3 mL) se adiciona por este orden y tras la completa disolución del anterior: Ph₃P (206.0 mg, 0.8 mmol), *p*NBA (177.0 mg, 1.1 mmol), seguidamente se pone la reacción a 0 °C y se añade gota a gota DIAD (205.3 µL, 1.1 mmol). La mezcla se deja agitando 12 horas tras las cuales se evapora el disolvente y se procede al paso de desprotección, para el cual, se disuelve el crudo en una mezcla de MeOH/ H₂O (3 mL/3 mL) y se le añade K₂CO₃ (145.0 mg, 1.1 mmol). La mezcla se deja agitar durante 2 horas y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo se suspende en AcOEt (8 mL) y se extrae con H₂O (3 x 10 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ y el disolvente se evapora bajo presión reducida. El producto se purifica por cromatografía de columna (30% AcOEt/ hexano), obteniéndose como aceite blanco con un 70-75% de rendimiento.

4.9.6. Síntesis de los derivados (±)-*trans*-68 y (±)-*trans*-75

Bajo atmósfera inerte, se disuelve en 10 mL de CH₂Cl₂ el compuesto (±)-*trans*-66 o (±)-*trans*-67 (420.0 mg, 1.1 mmol). Al medio se añade imidazol (175.0 mg, 2.6 mmol) y TBDMSCl (194.0 mg, 1.3 mmol). La reacción se deja agitando durante 12 horas a temperatura ambiente. La fase orgánica se lava con H₂O (3x 10 mL), se seca con Na₂SO₄ y el disolvente se evapora bajo presión reducida. El crudo se purifica por cromatografía de columna (40%

Capítulo 4

AcOEt/ hexano), obteniéndose el producto puro como un aceite amarillo con un rendimiento entre el 93- 95%.

4.9.7. Síntesis de los derivados (\pm)-*trans*-69 y (\pm)-*trans*-76

Los compuestos anteriores (\pm)-*trans*-68 o (\pm)-*trans*-75 (1.0 g, 1.9 mmol), se disuelven bajo atmósfera inerte en 13 mL de THF. A esta disolución se le añade DMAP (116.0 mg, 0.9 mmol) y Boc₂O (628.0 mg, 2.8 mmol), manteniendo la agitación durante 2 días. Transcurrido ese tiempo, se evapora el disolvente a presión reducida y se purifica el crudo de reacción mediante cromatografía de columna (20% AcOEt/ hexano). Se obtiene el producto puro como aceite amarillo con un 95% de rendimiento.

4.9.8. Síntesis de los derivados (\pm)-*trans*-70 y (\pm)-*trans*-77

A una disolución de los compuestos (\pm)-*trans*-69 o (\pm)-*trans*-76 (1.0 g, 1.6 mmol) en 16 mL de THF se le añade TBAF (2.3 mL, 2.3 mmol). La mezcla se deja agitando durante 1 hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se añaden 20 mL de H₂O y se extrae con AcOEt (3 x 15mL). La fase orgánica se seca en Na₂SO₄ y se evapora a presión reducida, obteniéndose el producto sin necesidad de una purificación posterior con un rendimiento cuantitativo.

4.9.9. Síntesis del derivado 1-*tert*-Butoxicarbonil-3-{{6-[bis(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-metilpiridin-2-il}metil}4-hidroxi-pirrolidina (3*R*,4*S*)-70

El compuesto (3*R*,4*S*)-74b (20.0 mg, 0.03 mmol) se disuelve en una mezcla MeOH/ H₂O (1 mL/ 1 mL) y se añade K₂CO₃ (9.6 mg, 0.1 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. Seguidamente se evapora el disolvente bajo presión reducida y se disuelve el crudo en AcOEt (8 mL). La suspensión resultante se lava con agua (3 x 15 mL) y la fase orgánica se seca con Na₂SO₄. El

producto **(3R,4S)-70** se obtiene como un aceite transparente de manera cuantitativa sin necesidad de purificación.

4.9.10. Procedimiento general para las acilaciones enzimáticas

La mezcla de reacción contiene la correspondiente 3-hidroxi-4-alkilpirrolidina (0.1 mmol), la lipasa (100.0 mg) y el agente de acilación (5 equivalentes) en ^tBuOMe (1.0 mL). Se agita a 30°C (para algunos sustratos se incrementó la temperatura a 45 °C, ver Tabla 13 y Tabla 17) y 250 rpm en un agitador orbital. El progreso de la reacción se estudia mediante HPLC hasta la conversión requerida. La enzima se elimina mediante filtración y se lava con ^tBuOMe. El disolvente se elimina a presión reducida y el crudo se purifica mediante cromatografía de columna (40% hexano/ AcOEt).

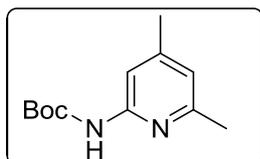
4.9.11. Procedimiento general para las hidrólisis enzimáticas

La mezcla de reacción contiene el correspondiente sustrato esterificado (0.1 mmol), la lipasa (100.0 mg) y 10 equivalentes de H₂O (para algunos sustratos fue requerido el uso de disolución tampón, ver Tabla 15) en ^tBuOMe (1.0 mL). Se agita a 30°C y 250 rpm en un agitador orbital. El progreso de la reacción se estudia mediante HPLC hasta la conversión requerida. La enzima se elimina mediante filtración y se lava con ^tBuOMe. El disolvente se elimina a presión reducida y el crudo se purifica mediante cromatografía de columna (40% hexano / AcOEt).

4.10. Datos experimentales

En esta sección se han recogido los datos experimentales de los compuestos que han formado parte de este capítulo.

2-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4,6-dimetilpiridina. 63



Fórmula molecular: C₁₂H₁₈N₂O₂

Estado físico: sólido blanco

Peso molecular: 222.28 g/mol

Rf: (20% AcOEt/ hexano): 0.48

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.72 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 2.39 (s, 3H, CH₃), 2.29 (s, 3H, CH₃), 1.50 (s, 9H, CH₃).

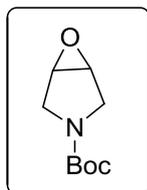
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 156.7 (C), 153.0 (C), 151.7 (CO), 150.1 (C), 119.5 (CH), 110.1 (CH), 80.9 (C), 28.6 (CH₃), 24.1 (CH₃), 21.6 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3413.97, 3054.14, 2985.99, 1711.98 cm⁻¹

Rendimiento: 80%

Punto de fusión: 56-58 °C

1-*tert*-Butoxicarbonil-3,4-epoxipirrolidina. 65



Fórmula molecular: C₉H₁₅NO₃

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 185.22 g/mol

Rf: (30% AcOEt/ hexano): 0.35

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 3.78 (dd, *J* = 22.3, 12.8 Hz, 2H, CH₂), 3.67 (d, *J* = 1.1 Hz, 2H, CH₂), 3.31 (dd, *J* = 12.8, 2.8 Hz, 2H, CH), 1.45 (s, 9H, CH₃).

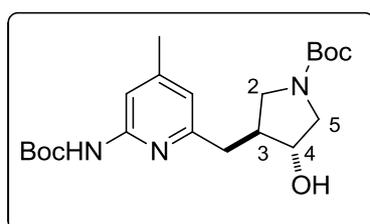
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 155.2 (CO), 80.2 (C), 56.0 (CH), 55.5 (CH), 47.7 (CH₂), 47.3 (CH₂), 28.8 (CH₃).

IR (NaCl): ν, 1695.47 cm⁻¹

Rendimiento: 70%

Punto de fusión: 56-58 °C

1-*tert*-Butoxicarbonil-3-[[6-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-metilpiridin-2-il]metil]-4-hidroxi-pirrolidina. (\pm)-*trans*-66



Fórmula molecular: C₂₁H₃₃N₃O₅

Estado físico: sólido blanco

Peso molecular: 407.50 g/mol

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.37

HRMS-(ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₂₁H₃₃N₃NaO₅]⁺ 430.2312 *m/z* encontrada: 430.2306.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.60 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 4.06 (dd, *J* = 13.4, 6.7 Hz, 1H, H-4), 3.76 – 3.49 (m, 2H, H-2 y H-5), 3.28 – 2.91 (m, 2H, H-2 y H-5), 2.85 – 2.54 (m, 2H, CH₂), 2.48 – 2.30 (m, 1H, H-3), 2.25 (s, 3H, CH₃), 1.43 (s, 9H, CH₃), 1.39 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 157.4 (CO), 154.5 (CO), 152.4 (C), 151.4 (C), 150.6 (C), 119.3 (CH), 110.7 (CH), 80.8 (C), 79.3 (C), 75.0 y 74.4 (C-4), 52.5 y 52.2 (C-5), 49.6 y 49.2 (C-2), 45.1 y 44.7 (C-3), 39.0 (CH₂), 28.4 (CH₃), 28.2 (CH₃), 21.3 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3411.41; 3054.15; 2981.93; 1712.00; 1686.67 cm⁻¹

Rendimiento: 70%

Punto de fusión: 42-47 °C

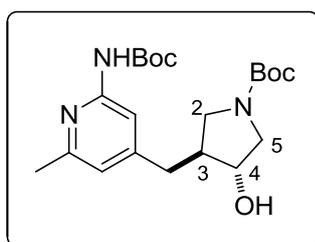
HPLC (210, 215 nm): **columna:** IA (Hexano: Isopropanol 90:10); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* (3*R*,4*S*) = 11.302 y *t_R* (3*S*,4*R*) = 11.882 min.

(3*S*,4*R*)-1-*tert*-Butoxicarbonil-3-[[6-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-metilpiridin-2-il]metil]-4-hidroxi-pirrolidina:

[α]_D²⁰: + 4.2 (*c* = 1, CH₂Cl₂) *ee* = 89% **(3*S*,4*R*)-(+)-66**

Rendimiento: 25 %

1-*tert*-Butoxicarbonil-3-([3-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-metilpiridin-4-il]metil)-4-hidroxi-pirrolidina. (±)-*trans*-67



Fórmula molecular: C₂₁H₃₃N₃O₅

Estado físico: sólido blanco

Peso molecular: 407.50 g/ mol

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.35

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₂₁H₃₃N₃NaO₅]⁺ 430.2312 *m/z* encontrada: 430.2276.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.56 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 4.06 (dd, *J* = 9.9, 5.1 Hz, 1H, H-4), 3.67 (m, 1H, H-5), 3.57 (m, 1H, H-2), 3.24 (m, 1H, H-5), 3.11 (m, 1H, H-2), 2.76 (m, 2H, CH₂), 2.47 (m, 1H, H-3), 2.39 (s, 3H, CH₃), 1.50 (s, 9H, CH₃), 1.45 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 156.8 (CO), 154.6 (CO), 152.5 (C), 151.5 (C) y 151.3 (C), 118.6 (CH), 109.3 (CH), 80.9 y 79.5 (C), 74.4 y 73.8 (C-4), 52.5 (C-5), 48.9 (C-2), 46.9 y 46.3 (C-3), 37.0 (CH₂), 28.5 (CH₃), 28.3 (CH₃), 23.9 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3411.41; 3054.15; 2981.93; 1712.00; 1686.67 cm⁻¹

Rendimiento: 30%

Punto de fusión: 42-44 °C

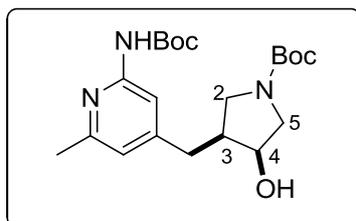
HPLC (210, 215 nm): **columna:** IA (Hexano: Isopropanol 90:10); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* = 8.180 y 9.056 min.

(+)-1-*tert*-Butoxicarbonil-3-([3-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-metilpiridin-4-il]metil)-4-hidroxi-pirrolidina:

[α]_D²⁰: + 20.0 (*c* = 1, MeOH) *ee* >91% (+)-*trans*-67.

Rendimiento: 48 %

**1-*tert*-Butoxicarbonil-3- $\{[3-(tert-butoxicarbonilamino)-4-$
metilpiridin-4-il]metil}-4-hidroxi**pirrolidina. (\pm)-*cis*-67



Fórmula molecular: C₂₁H₃₃N₃O₅

Estado físico: aceite incoloro

Peso molecular: 407.50 g/mol

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.35

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₂₁H₃₄N₃O₅] + 408.2493 *m/z* encontrada 408.2480.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.61 (s, 1H), 6.68 (s, 1H), 4.18 (s, 1H, H-4), 3.47 (m, 3H, H-2 y H-5), 3.18 (t, *J* = 10.7 Hz, 1H, H-5 o H-2), 2.89 (m, 1H, CH₂), 2.67 (m, 1H, CH₂), 2.39 (s, 3H, CH₃), 2.36 – 2.25 (m, 1H, H-3), 1.50 (s, 9H, CH₃), 1.44 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 156.7 (CO), 154.5 (CO), 152.5 (C), 152.2 (C), 151.5 (C), 118.7 (CH), 109.2 (CH), 80.8 (C), 79.5 (C), 71.5 (C-4), 55.0 (C-5), 48.7 (C-2), 44.4 (C-3), 32.7 (CH₂), 28.5 (CH₃), 28.3 (CH₃), 23.9 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3411.41; 3054.15; 2981.93; 1712.00; 1686.67 cm⁻¹

Rendimiento: 70%

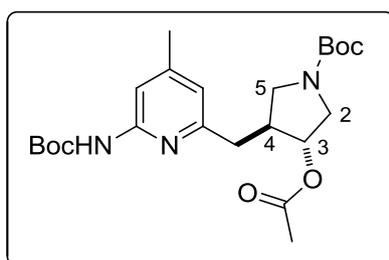
HPLC (210, 215 nm): **columna:** IA (Hexano: Isopropanol 90:10); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* = 7.441 y 8.267 min.

**(-)-1-*tert*-Butoxicarbonil-3- $\{[3-(tert-butoxicarbonilamino)-4-$
metilpiridin-4-il]metil}-4-hidroxi**pirrolidina:

[α]_D²⁰: -30.0 (*c* = 1, MeOH) *ee* >99% (-)-*cis*-67

Rendimiento: 48 %

3-Acetoxy-1-*tert*-butoxicarbonil-4-[[6-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-metilpiridin-2-il]metil]pirrolidina. (\pm)-*trans*-72



Fórmula molecular: C₂₃H₃₅N₃O₆

Peso molecular: 449.54 g/ mol

Estado físico: aceite amarillo

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.7

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₂₃H₃₆N₃O₆]⁺ 450.2599 *m/z*, encontrada: 450.2624.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.64 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 5.01 (s, 1H, H-3), 3.74 (dd, *J* = 12.5, 5.6 Hz, 1H, H-2), 3.55 (m, 1H, H-5), 3.27 (m, 2H, H-2 y H-5), 2.72 (m, 2H, CH₂ y H-4), 2.60 (m, 1H, CH₂), 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.03 (s, 3H, CH₃), 1.53 (s, 9H, CH₃), 1.46 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.6 (CO), 156.6 (CO), 154.5 (CO), 152.3 (C), 151.4 (C), 149.8 (C), 119.2 (CH), 110.5 (CH), 80.9 (C), 79.6 (C), 76.8 y 76.0 (C-3), 50.4 y 50.1 (C-2), 49.0 y 48.6 (C-5), 42.7 (C-4), 38.8 (CH₂), 28.5 (CH₃), 28.3 (CH₃), 21.3 (CH₃), 21.0 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3416.33, 2253.01, 1709.63 cm⁻¹

Rendimiento: 84%

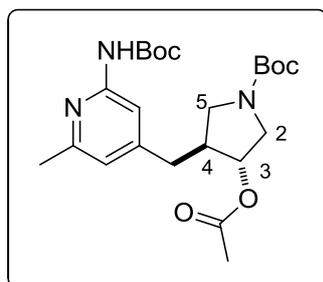
HPLC (210, 215 nm): **columna:** IA (Hexano: Isopropanol 90:10); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* (3*S*,4*R*) = 7.973 y *t_R* (3*R*,4*S*) = 8.583 min.

(3*S*,4*R*)-3-Acetoxy-1-*tert*-butoxicarbonil-4-[[6-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-metilpiridin-2-il]metil]pirrolidina:

[α]_D²⁰: - 3.1 (*c* = 1, CH₂Cl₂) *ee* = 60% (3*S*,4*R*)-(+)-72

Rendimiento: 33 %

3-Acetoxi-1-*tert*-butoxicarbonil-4-[[3-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-metilpiridin-4-il]metil]pirrolidina. (±)-*trans*-73



Fórmula molecular: C₂₃H₃₅N₃O₆

Peso molecular: 449.54 g/ mol

Estado físico: aceite amarillo

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.60

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₂₃H₃₆N₃O₆]⁺ 450.2599 *m/z*, encontrada: 450.2605.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.64 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 4.93 (m, 1H, H-3), 3.77 (dd, *J* = 12.5, 5.7 Hz, 1H, H-2), 3.37 (m, 2H, H-2 y H-5), 3.17 (m, 1H, H-5), 2.74 (dd, *J* = 12.4, 5.3 Hz, 1H, CH₂), 2.54 (m, 2H, H-4 y CH₂), 2.39 (s, 3H, CH₃), 2.05 (s, 3H, CH₃), 1.52 (s, 9H, CH₃), 1.45 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.6 (CO), 156.5 (CO), 154.4 (CO), 152.5 (C), 151.7 (C), 150.9 (C), 118.6 (CH), 109.4 (CH), 80.8 (C), 79.8 (C), 76.3 (C-3), 50.4 (C-2), 48.4 (C-5), 43.2 (C-4), 38.9 (CH₂), 28.4 (CH₃), 28.2 (CH₃), 23.4 (CH₃), 21.0 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3416.33, 2253.01, 1709.63 cm⁻¹

Rendimiento: 87%

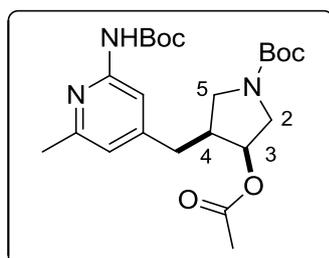
HPLC (210, 215 nm): **columna** IA (Hexano: Isopropanol 90:10); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* = 7.778 y 8.288 min.

(-)-3-Acetoxi-1-*tert*-butoxicarbonil-4-[[3-(*tert*-butoxicarbonil-amino)-4-metilpiridin-4-il]metil]pirrolidina:

[α]_D²⁰: -2.1 (*c* = 1, MeOH) *ee* >99% (-)-*trans*-73

Rendimiento: 48 %

3-Acetoxi-1-*tert*-butoxicarbonil-4-[[3-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-metilpiridin-4-il]metil]pirrolidina. (\pm)-*cis*-73



Fórmula molecular: C₂₃H₃₅N₃O₆

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 449.54 g/ mol

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.60

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₂₃H₃₆N₃O₆]⁺ 450.2599 *m/z* encontrada: 450.2590.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.63 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 5.13 (s, 1H, H-3), 3.62 – 3.40 (m, 3H, H-2 y H-5), 3.18 (m, 1H, H-5), 2.89 – 2.73 (m, 1H, H-4), 2.66 (m, 2H, CH₂), 2.42 (s, 3H, CH₃), 2.17 (s, 3H, CH₃), 1.52 (s, 9H, CH₃), 1.46 (s, 9H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.6 (CO), 158.5 (CO), 156.9 (CO), 154.2 (C), 152.4 (C), 151.6 (C), 151.0 (C), 118.1 (CH), 109.0 (CH), 80.7 (C), 79.6 (C), 74.4 (C-3), 52.8 (C-2), 48.8 (C-5), 44.5 (C-4), 32.9 (CH₂), 28.4 (CH₃), 28.2 (CH₃), 23.8 (CH₃), 21.0 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3416.33, 2253.01, 1709.63 cm⁻¹

Rendimiento: 87%

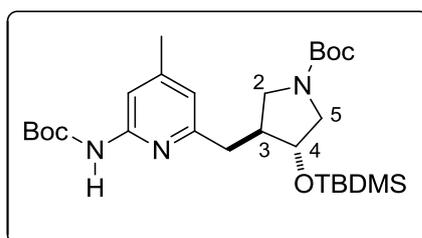
HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 80:20); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* = 18.228 y 20.214 min.

(-)-3-Acetoxi-1-*tert*-butoxicarbonil-4-[[3-(*tert*-butoxicarbonil-amino)-4-metilpiridin-4-il]metil]pirrolidina:

[α]_D²⁰: -1.1 (*c* = 1, CH₂Cl₂) *ee* >99% (-)-*cis*-73

Rendimiento: 49 %

**1-*tert*-Butoxicarbonil-3-{[6-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-metilpiridin-2-il]metil}4-(*tert*-butildimetilsililoxi)pirrolidina.
(±)-*trans*-68**



Fórmula molecular: C₂₇H₄₇N₃O₅Si

Peso molecular: 521.33 g/ mol

Estado físico: aceite incoloro

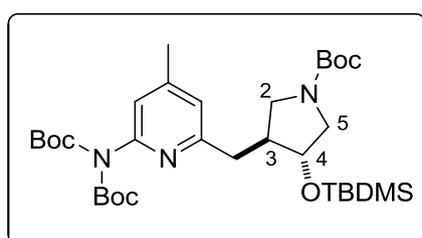
Rf: (30% AcOEt/ hexano): 0.65

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.17 (s, 1H), 6.62 (s, 1H), 4.08 – 3.92 (m, 2H, H-4 y H-2 o H-5), 3.60 (m, 2H, H-2 o H-5), 3.12 (m, 2H, H-2 y H-5), 2.87 – 2.71 (m, 1H, CH₂), 2.45 (m, 2H, H-3 y CH₂), 2.31 (s, 3H, CH₃), 1.60 – 1.40 (m, 18H, CH₃), 0.99 – 0.86 (m, 9H, TBDMS), 0.03 (s, 6H, TBDMS).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 156.1 (CO), 155.1(CO), 152.8 (C), 151.7 (C), 119.4 (CH), 110.4 (CH), 81.2 (C), 79.8 (C), 74.7 (C-4), 53.3 y 53.2 (C-5), 49.0 y 48.8 (C-2), 47.1 (C-3), 39.4 (CH₂), 28.9 (CH₃), 28.6 (CH₃), 26.1 (TBDMS), 21.6 (CH₃), 18.4 (TBDMS), -4.3 (TBDMS).

Rendimiento: 95%

1-*tert*-Butoxicarbonil-3-{{6-[bis(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-metilpiridin-2-il}metil}-4-(*tert*-butildimetilsililoxi)pirrolidina. (±)-*trans*-69



Fórmula molecular: C₃₂H₅₅N₃O₇Si

Estado físico: espuma incolora

Peso molecular: 621.88 g/ mol

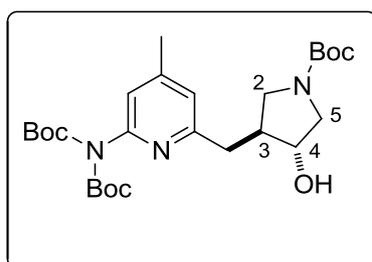
Rf: (20% AcOEt/ hexano): 0.12

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.26 (s, 1H), 6.60 (s, 1H), 4.05 – 3.88 (m, 1H, H-4), 3.73 – 3.38 (m, 2H, H-2 y H-5), 3.13 (m, 2H, H-2 y H-5), 2.88 – 2.66 (m, 1H, CH₂), 2.44 (q, *J* = 8.7 Hz, 2H, H-3 y CH₂), 2.29 (s, 3H, CH₃), 1.45 (m, 27H, CH₃), 0.90 (s, 9H, TBDMS), 0.06 (s, 6H, TBDMS).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 158.7 (CO), 154.5 (CO), 151.8 (C), 151.4 (C), 122.5 (CH), 119.5 (CH), 82.9 (C), 79.2 (C), 75.0 y 74.3 (C-4), 53.0 y 52.4 (C-5), 48.7 y 48.2 (C-2), 46.5 y 45.9 (C-3), 38.9 y 38.7 (CH₂), 28.5 (CH₃), 27.9 (CH₃), 25.7 (TBDMS), 21.0 (CH₃), 18.0 (TBDMS), -4.6 y -4.8 (TBDMS).

Rendimiento: 95%

1-*tert*-Butoxicarbonil-3-{{6-[bis(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-metilpiridin-2-il}metil}-4-hidroxi-pirrolidina. (±)-*trans*-70



Fórmula molecular: C₂₆H₄₁N₃O₇

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 507.62 g/mol

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.17

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 6.89 (m, 2H), 4.22 – 4.01 (m, 1H, H-4), 3.63 (m, 2H, H-2 y H-5), 3.14 (m, 1H, H-5), 3.07 – 2.96 (m, 1H, H-2), 2.80 (m, 2H, CH₂), 2.47 – 2.34 (m, 1H, H-3), 2.31 (s, 3H, CH₃), 1.41 (m, 27H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 159.1 (CO), 154.9 (C), 151.8 (C), 150.8 (C), 123.7 (CH), 120.8 (CH), 83.7 (C), 79.6 (C), 75.3 y 74.6 (C-4), 53.1 (C-5), 49.7 (C-2), 45.0 (C-3), 39.5 (CH₂), 28.8 (CH₃), 28.3 (CH₃), 21.3 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3411.41; 3054.15; 2981.93; 1712.00; 1686.67 cm⁻¹

Rendimiento: 100%

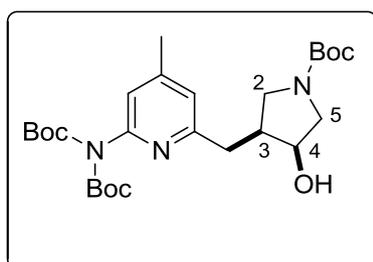
HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 70:30); 30 °C, 0.8 mL/min, t_R (3*R*,4*S*) = 9.548 y t_R (3*S*,4*R*) = 10.241 min.

(3*S*,4*R*)-1-*tert*-Butoxicarbonil-3-{{6-[bis(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-metilpiridin-2-il}metil}-4-hidroxi-pirrolidina:

[α]_D²⁰: + 3.0 (c = 1, CH₂Cl₂) ee >99%. **(3*S*,4*R*)-(+)-70**

Rendimiento: 48 %

1-*tert*-Butoxicarbonil-3-{{6-[bis(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-metilpiridin-2-il}metil}-4-hidroxi-pirrolidina. (±)-*cis*-70



Fórmula molecular: C₂₆H₄₁N₃O₇

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 507.62 g/mol

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.20

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.01 – 6.93 (m, 2H), 4.06 (s, 1H, H-4), 3.70 – 3.50 (m, 1H, H-2), 3.50 – 3.40 (m, 2H, H-5), 3.21 (t, *J* = 10.7 Hz, 1H, H-2), 3.02 – 2.92 (m, 1H, CH₂), 2.85 (m, 1H, CH₂), 2.38 (s y m, 4H, CH₃ y H-3), 1.48 (m, 27H, CH₃).

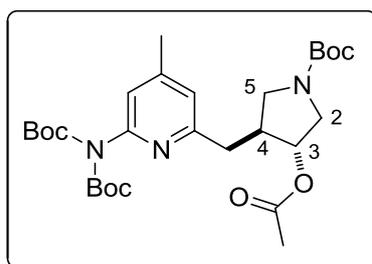
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ: 158.8 (CO), 154.4 (C), 151.5 (C), 122.7 (CH), 120.4 (CH), 83.5 (C), 79.1 (C), 70.7 (C-4), 53.6 (C-5), 49.0 (C-2), 44.7 (C-3), 35.0 (CH₂), 28.5 (CH₃), 27.9 (CH₃), 21.0 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3411.41; 3054.15; 2981.93; 1712.00; 1686.67 cm⁻¹

Rendimiento: 100%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** ADH (Hexano: Isopropanol 90:10); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* (3*R*,4*R*) = 7.209 y *t_R* (3*S*,4*S*) = 9.223 min.

3-Acetoxi-1-*tert*-butoxicarbonil-4-{{6-[bis(*tert*-butoxicarbonil)-amino]-4-metilpiridin-2-il}metil}pirrolidina. (±)-*trans*-74a



Fórmula molecular: C₂₈H₄₃N₃O₈

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 549.31 g/mol

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.40

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₂₈H₄₃N₃NaO₈]⁺ 572.2942 *m/z*, encontrada 572.2948.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 6.95 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 4.97 (s, 1H, H-3), 3.74 (dd, *J* = 12.5, 5.4 Hz, 1H, H-2), 3.49 (m, 1H, H-5), 3.44 – 3.11 (m, 2H, H-2 y H-5), 2.86 – 2.72 (m, 2H, CH₂ y H-4), 2.66 (m, 1H, CH₂), 2.34 (s, 3H, CH₃), 2.02 (s, 3H, CH₃), 1.45 (m, 27H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.5 (CO), 157.6 (CO), 154.4 (CO), 151.9 (C), 151.3 (C), 149.8 (C), 122.7 (CH), 119.7 (CH), 82.9 (C), 79.6 (C), 76.0 (C-3), 50.5 y 50.1 (C-2), 48.9 y 48.6 (C-5), 43.3 y 42.6 (C-4), 39.0 y 38.8 (CH₂), 28.5 (CH₃), 27.9 (CH₃), 21.0 (CH₃), 20.9 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3055.08, 2985.27, 1732.58, 1697.14 cm⁻¹

Rendimiento: 90%

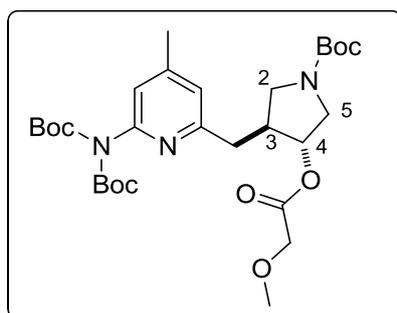
HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 70:30); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* (3*S*,4*R*) = 12.353 y *t_R* (3*R*,4*S*) = 18.662 min.

(3*R*,4*S*)-3-Acetoxi-1-*tert*-butoxicarbonil-4-{{6-[bis(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-metilpiridin-2-il}metil}pirrolidina:

[α]_D²⁰: + 10.0 (*c* = 1, CH₂Cl₂) *ee* >99% **(3*R*,4*S*)-(+)-74a**

Rendimiento: 45 %

1-*tert*-Butoxicarbonil-3-{{6-[bis(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-metilpiridin-2-il}metil}-4-metoxiacetoxipirrolidina. (±)-*trans*-74b



Fórmula molecular: C₂₉H₄₅N₃O₉

Peso molecular: 579.32 g/mol

Estado físico: aceite amarillo

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.28

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₂₉H₄₅N₃NaO₉]⁺ 602.3048 *m/z*, encontrada 602.3069.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 6.96 (s, 1H), 6.86 (s, 1H), 5.10 (m, 1H, H-4), 3.98 (s, 2H, CH₂), 3.86 – 3.72 (m, 1H, H-5), 3.50 (m, 1H, H-2), 3.43 (s, 3H, CH₃), 3.37 (m, 1H, H-5), 3.22 (m, 1H, H-2), 2.84 (s, 2H, CH₂ y H-3), 2.74 – 2.57 (m, 1H, CH₂), 2.34 (s, 3H, CH₃), 1.45 (m, 27H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 169.7 (CO), 157.5 (CO), 154.4 (CO), 152.0 (C), 151.4 (C), 149.8 (C), 122.7 (CH), 119.7 (CH), 82.9 (C), 79.67 (C), 77.3 y 76.5 (C-4), 69.6 (CH₂), 59.4 (CH₃), 50.5 (C-5), 48.8 y 48.5 (C-2), 43.3 y 42.6 (C-3), 39.0 (CH₂), 28.4 (CH₃), 28.2 (CH₃), 27.9 (CH₃), 20.9 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3054.76, 2986.96, 1731.21, 1689.99 cm⁻¹

Rendimiento: 95%

HPLC (210, 215 nm): columna: IC (Hexano: Isopropanol 70:30); 30 °C, 0.8 mL/min, t_R (3*R*,4*S*) = 17.494 y t_R (3*S*,4*R*) = 29.748 min.

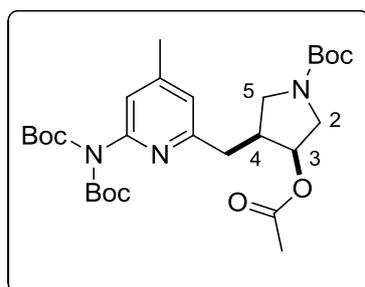
(3*R*,4*S*)-1-*tert*-Butoxicarbonil-3-{{6-[bis(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-metilpiridin-2-il}metil}-4-metoxiacetoxipirrolidina:

[α]_D²⁰: + 3.9 (*c* = 1, CH₂Cl₂) *ee* >99% (3*R*,4*S*)-(+)-74b

Rendimiento: 40 %

3-Acetoxi-1-*tert*-butoxicarbonil-4-{{6-[bis(*tert*-butoxicarbonil)-amino]-4-metilpiridin-2-il}metil}pirrolidina.

(±)-*cis*-74a



Fórmula molecular: C₂₈H₄₃N₃O₈

Peso molecular: 549.66 g/ mol

Estado físico: aceite amarillo

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.51

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₂₈H₄₃N₃NaO₈]⁺ 572.2942 *m/z*, encontrada 572.2942.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 6.93 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.84 (s, 1H), 5.18 (d, *J* = 16.5 Hz, H-3), 3.63 – 3.41 (m, 3H, H-2 y H-5), 3.15 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H, H-5), 2.94 (m, 1H, CH₂), 2.77 (m, 2H, CH₂ y H-4), 2.34 (s, 3H, CH₃), 2.12 (s, 3H, CH₃), 1.45 (m, 27H, CH₃).

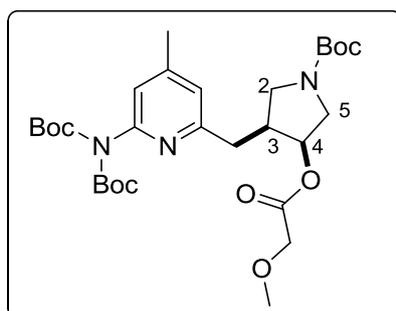
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.5 (CO), 158.0 (CO), 151.9 (C), 151.3 (C), 149.8 (C), 122.4 (CH), 119.8 y 119.7 (CH), 82.9 (C), 79.5 (C), 74.7 y 73.9 (C-3), 52.8 y 52.4 (C-2), 49.1 y 48.8 (C-5), 42.1 y 41.5 (C-4), 34.9 (CH₂), 28.4 (CH₃), 28.3 (CH₃), 27.9 (CH₃), 21.1 (CH₃), 20.9 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3055.01, 2986.33, 1735.08, 1696.74 cm⁻¹

Rendimiento: 87%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 70:30); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* = 15.760 y 24.216 min.

1-*tert*-Butoxicarbonil-3-{{6-[bis(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-metilpiridin-2-il}metil}-4-metoxiacetoxipirrolidina. (±)-*cis*-74b



Fórmula molecular: C₂₉H₄₅N₃O₉

Estado físico: aceite incoloro

Peso molecular: 579.32 g/ mol

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.42

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₂₉H₄₅N₃NaO₉]⁺ 602.3048 *m/z*, encontrada 602.3030.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.03 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 5.32 (s, 1H, H-4), 4.12 (s, 2H, CH₂), 3.60 (m, 2H, H-2 y H-5), 3.52 – 3.44 (m, 2H, H-2 y H-5), 3.23 (m, 4H, CH₃ y H-3), 2.95 (m, 2H, CH₂), 2.40 (s, 3H, CH₃), 1.47 (m, 27H, CH₃).

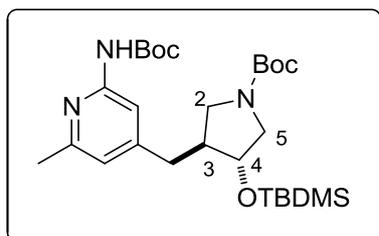
¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.3 y 170.2 (CO), 158.3 (CO), 154.8 (CO), 154.5 (CO), 152.3 (C), 151.8 (C), 150.3 (C), 122.8 (CH), 120.4 y 120.3 (CH), 83.4 (C), 80.0 (C), 75.7 y 74.8 (C-4), 70.1 y 70.0 (CH₂), 59.8 y 59.7 (CH₃), 53.1 y 52.8 (C-5), 49.4 y 49.1 (C-2), 42.6 y 41.9 (C-3), 35.2 (CH₂), 28.8 (CH₃), 28.3 (CH₃), 21.4 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3055.12, 2984.41, 1786.18, 1752.52, 1690.87 cm⁻¹

Rendimiento: 95%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 70:30); 30 °C, 0.8 mL/min, t_R (3*S*,4*S*) = 15.769 y t_R (3*R*,4*R*) = 19.969 min.

**1-*tert*-Butoxicarbonil-3- $\{$ 3-(*tert*-butoxicarbonilamino)-4-metilpiridin-4-il $\}$ metil $\}$ -4-(*tert*-butildimetilsililoxi)pirrolidina.
(\pm)-*trans*-75**



Fórmula molecular: C₂₇H₄₇N₃O₅Si

Peso molecular: 521.33 g/ mol

Estado físico: aceite incoloro

Rf: (30% AcOEt/ hexano): 0.65

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₂₇H₄₈N₃O₅Si]⁺ 522.3358 *m/z*, encontrada 522.3349.

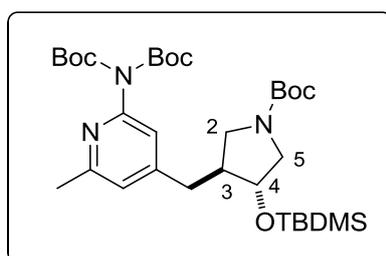
¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 7.58 (s, 1H), 6.64 (s, 1H), 3.94 (m, 1H, H-4), 3.60 (m, 1H, H-5), 3.44 (m, 1H, H-2), 3.14 (m, 1H, H-5), 3.03 (m, 1H, H-2), 2.79 (m, 1H, CH₂), 2.53 – 2.31 (m, 5H, CH₂ y H-3, CH₃), 1.60 – 1.40 (m, 18H, CH₃), 0.99 – 0.86 (m, 9H, TBDMS), 0.03 (s, 6H, TBDMS).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 157.1 (CO), 155.0 (CO), 152.8 (C), 151.8 (C), 118.8 (CH), 109.6 (CH), 81.2 (C), 79.8 (C), 75.4 (C-4), 53.0 y 52.7 (C-5), 49.0 y 48.8 (C-2), 46.2 (C-3), 37.3 (CH₂), 28.9 (CH₃), 28.6 (CH₃), 26.1 (TBDMS), 24.3 (CH₃), 18.4 (TBDMS), -4.3 (TBDMS).

IR (NaCl): ν 3054.26, 2963.00, 1782.24, 1725.05, 1685.39 cm⁻¹

Rendimiento: 93%

1-*tert*-Butoxicarbonil-3-{{3-[bis(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-metilpiridin-4-il}metil}-4-(*tert*-butildimetilsililoxi)pirrolidina. (±)-*trans*-76



Fórmula molecular: C₃₂H₅₅N₃O₇Si

Estado físico: espuma incolora

Peso molecular: 621.88 g/ mol

Rf: (20% AcOEt/ hexano): 0.12

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₂₇H₄₈N₃NaO₇Si]⁺ 644.3701 *m/z*, encontrada 644.3704.

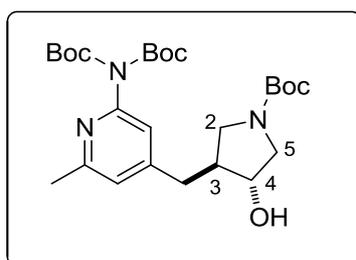
¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 6.88 (s, 2H), 3.95 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, H-4), 3.53 (m, 2H, H-2 y H-5), 3.20 – 2.77 (m, 3H, H-2, H-5 y CH₂), 2.50 (s, 3H, CH₃), 2.36 (m, 2H, H-3 y CH₂), 1.45 (m, 27H, CH₃), 0.90 (s, 9H, TBDMS), 0.06 (s, 6H, TBDMS).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 157.8 (CO), 154.5 (CO), 151.8 (C), 151.4 (C), 121.9 (CH), 118.5 (CH), 82.9 (C), 79.5 (C), 74.9 y 74.3 (C-4), 52.7 y 52.2 (C-5), 48.4 y 48.2 (C-2), 47.2 y 46.6 (C-3), 36.4 y 36.3 (CH₂), 28.5 (CH₃), 27.9 (CH₃), 25.7 (TBDMS), 24.0 (CH₃), 18.0 (TBDMS), -4.6 y -4.8 (TBDMS).

IR (NaCl): ν 3055.02, 2986.34, 1783.53, 1751.00, 1723.76, 1687.85 cm⁻¹

Rendimiento: 95%

1-*tert*-Butoxicarbonil-3-{{3-[bis(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-metilpiridin-4-il}metil}-4-hidroxi-pirrolidina. (±)-*trans*-77



Formula molecular: C₂₆H₄₁N₃O₇

Estado físico: sólido blanco

Peso molecular: 507.62 g/ mol

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.20

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₂₆H₄₁N₃NaO₇]⁺ 530.2837 *m/z*, encontrada 530.2822.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 6.89 (s, 2H), 4.02 (s, 1H, H-4), 3.69 – 3.41 (m, 2H, H-2 y H-5), 3.21 (m, 1H, H-5), 3.03 (m, 1H, H-2), 2.80 - 2.6 (m, 1H, CH₂), 2.60 – 2.30 (m, 5H, CH₃, H-3 y CH₂), 1.44 (m, 27H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 157.9 (CO), 154.6 (CO), 151.7 (C), 151.4 (C), 151.0 (C), 122.2 (CH), 118.5 (CH), 83.0 (C), 79.6 (C), 74.2 y 73.6 (C-4), 52.5 y 52.2 (C-5), 48.7 (C-2), 46.6 y 46.1 (C-3), 36.4 (CH₂), 28.5 (CH₃), 27.9 (CH₃), 24.0 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3054.85, 2986.88, 1783.12, 1752.53, 1685.64.

Rendimiento: 100%

Punto de fusión: 147-150 °C

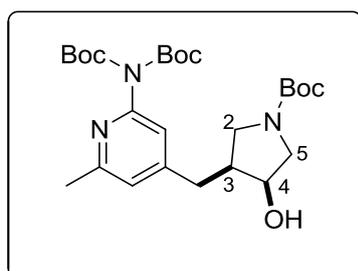
HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 70:30); 30 °C, 0.8 mL/min, t_R = 10.742 y 14.146 min.

(+)-1-*tert*-Butoxicarbonil-3-{{3-[bis(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-metilpiridin-4-il}metil}-4-hidroxi-pirrolidina:

[α]_D²⁰: + 1.2 (c = 1, MeOH) *ee* >99% **(+)-*trans*-77**

Rendimiento: 10 %

1-*tert*-Butoxicarbonil-3-{{3-[bis(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-metilpiridin-4-il}metil}-4-hidroxi-pirrolidina. (±)-*cis*-77



Fórmula molecular: C₂₆H₄₁N₃O₇

Peso molecular: 507.62 g/ mol

Estado físico: sólido blanco

Rf: (40 % AcOEt/ hexano): 0.31

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₂₆H₄₁N₃NaO₇]⁺ 530.2837 *m/z*, encontrada 530.2831.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 6.95 (s, 2H), 4.12 (m, 1H, H-4), 3.44 (m, 3H, H-2 y H-5), 3.19 (m, 1H, H-2), 2.96 – 2.85 (m, 1H, CH₂), 2.75 – 2.65 (m, 1H, CH₂), 2.49 (s, 3H, CH₃), 2.38 – 2.27 (m, 1H, H-3), 1.45 (m, 27H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 157.8 (CO), 154.7 (CO), 151.7 (C), 151.5 (C), 122.2 (CH), 118.6 (CH), 82.9 (C), 79.5 (C), 71.1 y 70.3 (C-4), 55.3 y 55.0 (C-5), 48.6 y 48.3 (C-2), 44.9 y 44.3 (C-3), 32.2 (CH₂), 28.5 (CH₃), 27.9 (CH₃), 27.0 (CH₃), 24.0 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3055.16, 2987.00, 1684.68 cm⁻¹

Rendimiento: 70%

Punto de fusión: 170-174 °C

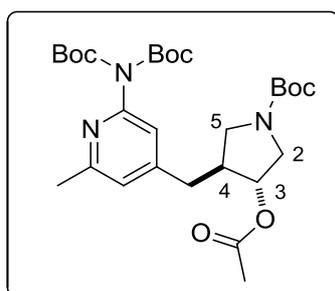
HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 70:30); 30 °C, 0.8 mL/min, t_R = 7.692 y 12.962 min.

(-)-1-*tert*-Butoxicarbonil-3-{{3-[bis(*tert*-butoxicarbonil)amino]-4-metilpiridin-4-il}metil}-4-hidroxi-pirrolidina:

[α]_D²⁰: -2.3 (c = 1, CH₂Cl₂) ee = 75% (-)-*cis*-77

Rendimiento: 35 %

3-Acetoxi-1-*tert*-butoxicarbonil-4-{{3-[bis(*tert*-butoxicarbonil)-amino]-4-metilpiridin-4-il}metil}pirrolidina. (±)-*trans*-78



Fórmula molecular: C₂₈H₄₃N₃O₈

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 549.66 g/ mol

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.40

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₂₈H₄₃N₃NaO₈]⁺ 572.2942 *m/z*, encontrada 572.2944.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 6.94 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 4.95 (m, 1H, H-3), 3.77 (m, 1H, H-2 o H-5), 3.58 – 3.12 (m, 3H, H-2 y H-5), 2.79 (m, 1H, CH₂), 2.51 (m, 5H, CH₃, CH₂, H-4), 2.06 (s, 3H, CH₃), 1.47 (m, 27H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.2 (CO), 157.9 (CO), 151.9 (C), 151.3 (C), 150.0 (C), 122.0 (CH), 118.3 (CH), 82.9 (C), 79.8 (C), 75.9 (C-3), 50.3 y 49.9 (C-2), 48.3 (C-5), 44.5 y 43.3 (C-4), 36.4 (CH₂), 28.4 (CH₃), 27.9 (CH₃), 24.0 (CH₃), 21.0 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3055.20, 2983.35, 1738.23, 1691.74 cm⁻¹

Rendimiento: 90%

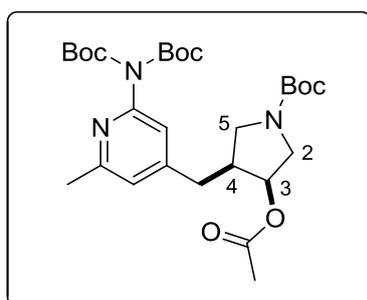
HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 70:30); 30 °C, 0.8 mL/min, t_R = 14.444 y 25.777 min.

(-)-3-Acetoxi-1-*tert*-butoxicarbonil-4-{{3-[bis(*tert*-butoxicarbonil)-amino]-4-metilpiridin-4-il}metil}pirrolidina:

[α]_D²⁰: -1.6 (c = 1, CH₂Cl₂) ee = 65 %. **(-)-*trans*-78**

Rendimiento: 13 %

3-Acetoxi-1-*tert*-butoxicarbonil-4-{{3-[bis(*tert*-butoxicarbonil)-amino]-4-metilpiridin-4-il}metil}pirrolidina. (±)-*cis*-78



Fórmula molecular: C₂₈H₄₃N₃O₈

Estado físico: aceite amarillo

Peso molecular: 549.66 g/ mol

Rf: (40% AcOEt/ hexano): 0.41

HRMS (ESI⁺, *m/z*) calculada para [C₂₈H₄₃N₃NaO₈]⁺ 572.2942 *m/z*, encontrada 572.2947.

¹H NMR (300.13 MHz, CDCl₃): δ 6.92 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 5.16 (d, *J* = 22.1 Hz, 1H, H-3), 3.69 – 3.39 (m, 3H, H-2 y H-5), 3.25 – 3.10 (m, 1H, H-2 o H-5), 2.82 (s, 1H, CH₂), 2.72 – 2.54 (m, 2H, CH₂ y H-4), 2.48 (s, 3H, CH₃), 2.14 (s, 3H, CH₃), 1.49 – 1.42 (m, 27H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ 170.1 (CO), 157.9 (CO), 151.9 (C), 151.3 (C), 150.7 (C), 121.6 (CH), 118.1 (CH), 82.9 (C), 79.7 (C), 73.4 (C-3), 52.7 y 52.3 (C-2), 48.8 (C-5), 43.3 y 42.6 (C-4), 32.5 (CH₂), 28.4 (CH₃), 27.9 (CH₃), 23.4 (CH₃), 21.0 (CH₃).

IR (NaCl): ν 3054.99, 2986.17, 1738.78, 1691.88 cm⁻¹

Rendimiento: 87%

HPLC (210, 215 nm): **columna:** IC (Hexano: Isopropanol 70:30); 30 °C, 0.8 mL/min, *t_R* = 15.064 y 23.261 min.

(-)-3-Acetoxi-1-*tert*-butoxicarbonil-4-{{3-[bis(*tert*-butoxicarbonil)-amino]-4-metilpiridin-4-il}metil}pirrolidina:

[α]_D²⁰: - 1.0 (*c* = 1, CH₂Cl₂) *ee* >99% (-)-*cis*-78

Rendimiento: 31 %

Referencias

1. T. Hudlicky, J. W. Reed, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 3117-3132.
2. S. E. Milner, A. R. Maguire, *Arkivoc* **2012**, (i), 321-382.
3. A. Ghanem, *Tetrahedron* **2007**, 63, 1721-1754.
4. a) V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, "Combination of biocatalysis and Chemical Catalysis for the Preparation of Pharmaceuticals through Multi-Step Syntheses" en *Multi-Step Enzyme Catalysis: Biotransformations and Chemoenzymatic Synthesis*. Wiley-VHC **2008**, Weinheim (Germany). Capítulo 10. Pags 213-233; b) S. Panke, M. Wubbolts, *Current opinion in Chemical Biology* **2005**, 9, 188-194; c) T. Zelinsky, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2004**, 43, 788-824.
5. a) R. Wohlgemuth, I. Plazl, P. Znidarsic-Plazl, K. V. Gernaey, J. M. Woodley, *Trends in Biotechnol.* **2015**, 33, 302-314; b) J-M. Choi, S-S. Han, H-S. Kim, *Biotechnol. Adv.* **2015**, doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.014
6. K. K.-C. Liu, S. M. Sakya, C. J. O'Donnell, A. C. flick, J. Li, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 1136-1154.
7. B. Kasprzyk-Hordern, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 4466-4503.
8. R. Breitling, E. Takano, *Curr. Opin. Biotech.* **2015**, 35, 46-51.
9. a) P. T. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 301-312; b) T. J. Collins, in *Green Chemistry*, Macmillan Encyclopedia of Chemistry, Simon and Schuster Macmillan, New York, **1997**, vol. 2, págs. 691-697.
10. a) I. T. Horváth, P. T. Anastas, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 2167-2168; b) I. T. Horváth, P. T. Anastas, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 2169-2173.
11. R. A. Sheldon, F. van Rantwijk, *Aust. J. Chem.* **2004**, 57, 281-289.
12. V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales. *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*. Willey-VCH.Weinheim **2008**
13. a) U. T. Bornscheuer *Synlett* **2013**, 24, 150-156; b) M. B. Quin, C. Schmidt-Dannert. *ACS Catal.* **2011**, 1, 1017-1021.
14. L. Cao, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, 9, 217-226.

Referencias

- 15.** a) G. Kirchner, M. P. Scollar, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7072-7076; b) A. Zaks, A. M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 3192-3196.
- 16.** a) G. Carrea, S. Riva. *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Medium*. Wiley-VCH. Weinheim **2008**; b) S. Hazarika, P. Goswami, N. N. Dutta, A. K. Hazarika. *Chem. Eng. J.* **2002**, *85*, 61-68; c) A. M. Azevedo, D. M. F. Prazeres, J. M. S. Cabral, L. P. Fonseca, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *15*, 147-153; d) H. Sztajer, H. Lunsdorf, H. Erdmann, U. Menge, R. Schmid. *Biochim. Biophys. Acta* **1992**, *1124*, 253-261; e) A. Zaks, A. M. Klivanov. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 3194-3201.
- 17.** D. N. Tran, K. J. Balkus Jr. *ACS Catal.* **2011**, *1*, 956-968.
- 18.** R. A. Sheldon, *Org. Process. Res. Dev.* **2011**, *15*, 213-223.
- 19.** R. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608-1633.
- 20.** a) V. Gotor, *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6*, 420-426; b) V. Gotor, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2189-2197.
- 21.** U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis*, 2^o Ed. Wiley-VCH. **2006**.
- 22.** a) V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *40*, 111-120; b) R. D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608-1633; c) A. Ghanem, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1721-1754.
- 23.** a) J. B. Jones, J. F. Beck, in *Applications of Biochemical Systems in Organic Chemistry*, Eds. J. B. Jones, C. J. Sih, D. Perlman, parte I, Wiley **1976**, 107; b) R. J. Kazlauskas, H. K. Weber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, *2*, 121-126.
- 24.** M. Wiggers, J. Holt, R. Kourist, S. Bartsch, I. W. C. E. Arends, A. J. Minnaard, W. T. Bornscheuer, U. Hanefeld. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *60*, 82-86.
- 25.** a) S. Gedey, A. Liljeblad, L. Lázár, F. Fülöp, L. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 105-110; b) T. Liljeblad, L. Kanerva, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5831-5854.

- 26.** S. Lutz, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2743-2748.
- 27.** V. Gotor, *Biocatal. Biotransform.* **2000**, *18*, 87-103.
- 28.** I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 201-209.
- 29.** V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 1125-1143.
- 30.** R. J. Kazlauskas, A. N. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665.
- 31.** R. S. Cahn, S. C. Ingold, V. Prelog, *Angew. Chem.* **1966**, *5*, 385-415.
- 32.** C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294-7299.
- 33.** A. J. J. Straathof, J. A. Jongejan, *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *21*, 559-571.
- 34.** a) C. Cativiela, M. Ordoñez, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1-63; b) M. I. Calaza, C. Cativiela, *Eur. J. Chem.* **2008**, *20*, 3427-3448; c) C. Cativiela, M. D. Díaz de Villegas, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 569- 623; d) H. Vogt, S. Bräse, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 406-430; e) Y. Ohfuné, T. Shinada, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 5127-5143.
- 35.** a) P. M. Dewick, *Medicinal Natural Products-A Biosynthetic Approach*; Wiley: Chinchester **1997**; b) G. A. Cordell, *Introduction to Alkaloids-A Biogenetic approach*; Wiley: New York **1981**.
- 36.** a) X. Florence, S. Seville, P. Tullio, P. Lebrun, B. Pirotte, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7723-7731; b) V. Calderone, L. Testai, A. Martelli, S. Rapposelli, M. Digiacomo, A. Balsamo, M. C. Breschi, *Biochem.Pharmacol.* **2010**, *79*, 39-47; c) R. C. Gadwood, L. M. Thomasco, V. E. Gropii, B.-A. Burnett, S. J. Humphrey, M. P. Smith, W. Watt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 2101-2104.
- 37.** X. Florence, S. Seville, P. de Tullio, P. Lebrun, B. Pirotte, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7723-7731.
- 38.** a) S. Rapposelli, V. Calderone, R. Cirilli, M. Digiacomo, C. Faggi, F. La Torre, M. Manganaro, A. Martelli, L. Testai, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 1477-1480; b) M. C. breschi, V. Calderone, A. Martelli, F.

Referencias

- Minutolo, S. Rapposelli, L. Testai, F. Tonelli, A. Balsamo, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7600-7602.
- 39.** R. Kourist, P. Domínguez de María, U. T. Bornscheuer, *ChemBioChem.* **2008**, *9*, 491-498.
- 40.** H. Hellstrom, A. Steinreiber, S. F. Mayer, K. Faber, *Biotechnol. Lett.* **2001**, *23*, 169-173.
- 41.** A. Fujino, M. Asano, H. Yamaguchi, N. Shirasaka, A. Sakoda, M. Ikunaka, R. Obata, S. Nishiyama, T. Sugai, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 979-983.
- 42.** M. Majeric-Elenkov, W. Hoeffken, L. Tang, B. Hauer, D. B. Janssen, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 2279-2285.
- 43.** S. H. Krishna, M. Persson, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 2693-2696.
- 44.** J. F. Coope, B. G. Main, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1393-1398.
- 45.** J. Holt, I. W. C. E. Arends, A. J. Minnaard, U. Hanefeld, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1341-1344.
- 46.** a) B. Heinze, R. Kourist, L. Fransson, K. Hult, U. T. Bornscheuer, *Protein Eng. Des. Sel.* **2007**, *20*, 125-131; b) R. Kourist, S. Bartsch, U. T. Bornscheuer, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1393-1398.
- 47.** L. F. Solares, R. Brieva, M. Quirós, I. Llorente, M. Bayod, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 341-345.
- 48.** V. Recuero, M. Ferrero, V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 994-1002.
- 49.** Z. Guerrab, S. Schweiger, B. Daou, M. Ahmar, B. Cazes, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 1752-1757.
- 50.** J. A. Rodríguez-Rodríguez, V. Gotor, R. Brieva, *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 1218-1224.
- 51.** S. Yadav, B. V. S. Reddy, M. S. Reddy, A. R. Prasad, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 9703-9706.
- 52.** M. Baumann, B. H. Hauer, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 4781-4790.

- 53.** Lysek, P. Vogel, *Helv. Chim. Acta* **2004**, 87, 3167-3181.
- 54.** Y. S. Lee, J. Y. Lee, S. H. Jung, E. Woo, D. H. Suk, S. H. Seo, H. J. Park, *Antibiot.* **1994**, 47, 609-612.
- 55.** B. G. Davis, M. A. T. Maughan, T. M. Chapman, R. Villard, S. Courtney, *Org. Lett.* **2002**, 4, 103-106.
- 56.** Y. Tsuzuki, K. Tomita, K. Shibamori, Y. Sato, S. Kashimoto, K. Chi, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 2097-2109.
- 57.** M. Pichon, B. Figarede, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 927-964.
- 58.** T. Okada, K. Ezumi, M. Yamakawa, H. Sato, T. Tsuji, T. Tsushima, K. Motokawa, Y. Komatsu, *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, 41, 126-131.
- 59.** a) C. Xue, A. Wang, D. Meloni, S. Friedman, B. Metcalf, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 29, 7473-7478; b) S. L. Deshmane, S. Kremlev, S. Amini, B. E. Sawaya, *J. Interf. Cytok. Res.* **2009**, 29, 313-326.
- 60.** D. Rejman, N. Panova, P. Klener, B. Maswabi, R. Pohl, I. Rosenberg, *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 1612-1621.
- 61.** M. D. Ennis, K. E. Frank, J-M Fu, R. L. Hoffman, P. R. Verhoest, WO2004099201 A1 **2004**, CAN141: 410966, WO2003045924 A1 **2003**, CAN139: 6891.
- 62.** W. Wang, H. Jin, N. Fuselli, T. S. Mansour, *Biorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, 7, 2567-2572.
- 63.** A. Börner, J. Holz, H. Kagan, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 5273-5276.
- 64.** S. E. Schaus, J. F. Larrow, E. N. Jacobsen, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 4197-4199.
- 65.** K. Arai, M. M. Salter, Y. Yamashita, S. Kobayashi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 955-957.
- 66.** M. Martin, A. E. Hellani, J. Yang, J. Collin, S. Bezzenine-Lafollée, *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 9801-9808.
- 67.** V. Recuero, R. Brieva, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, 19, 1684-1688.

Referencias

- 68.** J. A. Rodríguez-Rodríguez, R. Brieva, V. Gotor, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 6789-6796.
- 69.** J. A. Rodríguez-Rodríguez, F. J. Quijada, R. Brieva, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron* **2013**, *69*, 5407-5412.
- 70.** A. Kamal, A. A. Sahik, M. Sandbhor, M. S. Malik, S. Azeeza, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2876-2883.
- 71.** a) R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665; b) K. Lemke, M. Lemke, F. Theil, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6268-6273.
- 72.** B. E. Fink, A. V. Gavai, G. D. Vite, P. Chen, H. Mastalerz, D. J. Norris, J. S. Tokarski, Y. Zhao, W. -C. Han, WO2005066176 A1 **2005**, CAN160:278922.
- 73.** T. B. Hopkins, X. Cai, T. R. Chan, P. Conlon, M. Humora, T. J. Jenkins, J. M. MacPhee, X. Shi, R. A. Miller, A. Thompson, WO2013185082 A2 **2013**, CAN160:69958.
- 74.** a) S. M. N. Efange, A. Khare, S. M. Parsons, R. Bau, T. Metzenthin, *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 985-989; b) A. B. Khare, R. B. Langason, S. M. Parsons, R. H. Mach, S. M. N. Efange, *Nucl. Med. Biol.* **1999**, *26*, 609-617; c) S. M. N. Efange, R. H. Mach, A. Khare, R. H. Michelson, P. A. Nowak, P. H. Evora, *App. Radiat. Isot.* **1994**, *45*, 465-472.
- 75.** S. J. Atkinson, M. D. Barker, M. Campbell, H. Diallo, C. Dovault, N. S. Garten, J. Liddle, R. J. Sheppard, A. L. Walker, C. Wellaway, D. M. Wilson, WO 2014015905 A1 **2014**, CAN160:278922.
- 76.** A. Mochizuki, Y. Nakamoto, H. Naito, K. Uoto, T. Ohta, *Bioorg. Med. Chem Lett.* **2008**, *18*, 782-787.
- 77.** I. S. Young, A. Ortiz, J. R. Sawyer, D. A. Conlon, F. G. Bueno, S. W. Leung, J. L. Burt, E. W. Sortore, *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16*, 1558-1565.
- 78.** A. Ortiz, I. S. Young, J. R. Sawyer, Y. Hsiao, A. Singh, M. Sugiyama, R. M. Corbett, M. Chau, Z. Shi, D. A. Conlon, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 5253-5257.

- 79.** O. G. Ganina, I. S. Veselov, G. V. Grishina, A. Yu. Fedorov, I. P. Beletskaya, *Russ. Chem. Bull.* **2006**, *55*, 1642-1647.
- 80.** O. Tokuda, T. Aikawa, T. Ikemoto, I. Kurimoto, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2832-2834.
- 81.** M. Scheunemann, L. Henning, U. Funke, J. Steinbach, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3448-3456.
- 82.** A. Fürst, Pl. A. Plattner, *Helv. Chim. Acta* **1949**, *32*, 275-283.
- 83.** G. S. Basarab, P. J. Hill, C. E. Garner, K. Hull, O. Green, B. A. Sherer, P. B. Dangel, J. I. Manchester, S. Bist, S. Hauck, F. Zhou, M. Uria-Nickelsen, R. Illingworth, R. Alm, M. Rooney, A. E. Eakin, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 6060-6082.
- 84.** M. T. Burger, W. Han, J. Lan, G. Nishiguchi, C. Bellamacina, M. Lindval, G. Atallah, Y. Ding, M. Mathur, C. McBride, E. L. Beans, K. Muller, V. Tamez, Y. Zhang, K. Huh, P. Feucht, T. Zavorotinskaya, Y. Dai, J. Holash, J. Castillo, J. Langowski, Y. Wang, M. Yu Chen, P. D. García, *J. Med. Lett.* **2013**, *4*, 1193-1197.
- 85.** D. Chang, M. F. Heringa, B. Witholt, Z. Li, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8599-8606.
- 86.** L. F. Solares, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 3284-3291.
- 87.** F. Theil, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 2905-2919.
- 88.** V. H. Rawal, R. J. Jones, M. P. Cava, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 19-28.
- 89.** F. Garro-Helion, A. Merzouk, F. Guibé, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6109-6113.
- 90.** a) F. Xue, J. M. Kraus, K. J. Labby, H. Ji, J. Mataka, G. Xia, H. Li, S. L. Delker, L. J. Roman, P. Matasek, T. L. Poulos, R. Silverman, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6399-6403; b) H. Li, F. Xue, J. M. Kraus, H. Ji, K. J. Labby, J. Mataka, S. L. Delker, P. Matasek, L. J. Roman, T. L. Poulos, R. Silverman, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1333-1343; c) P. C. Trippier, K. J. Labby, D. D. Hawker, J. Mataka, R. Silverman, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 3121-3147.

Referencias

- 91.** a) H. Ji, B. Z. Stanton, J. Igarashi, H. Li, P. Matasek, L. Roman, T. L. Poulos, R. Silverman, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3900-3914; b) H. Ji, S. Delker, H. Li, P. Matasek, L. Roman, T. L. Poulos, R. Silverman, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 7804-7824; c) J. M. Kraus, R. Silverman, US8618143 B1 **2013**, CAN, *160*:125937; d) F. Xue, H. Li, S. L. Delker, J. Fang, P. Matasek, L. Roman, T. L. Poulos, R. Silverman, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14229-14238; e) G. R. Lawton, H. R. Ranaivo, L. K. Wing, H. Ji, F. Xue, P. Matasek, L. J. Roman, D. M. Watterson, R. Silverman, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2371-2380.
- 92.** a) B. R. Crane, A. S. Arvai, R. Gauchhui, C. Wu, D. K. Ghosh, D. E. Getzoff, D. J. Stuehr, J. A. Tainer, *Science* **1997**, *278*, 425-431; b) C. S. Raman, H. Li, P. Matasek, V. Kral, B. S. Masters, T. L. Poulos, *Cell*. **1998**, *95*, 939-950.
- 93.** P. Lin, L. Chang, R. J. DeVita, J. R. Young, R. Eid, X. Tong, S. Xheng, R. G. Ball, N. N. Tsou, G. G. Chicchi, M. M. Kurtz, K.C. Tsao, A. Wheeldon, E. J. Carlson, W. Eng, H. D. burns, R. J. Hargreaves, S. G. Mills, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 5191-5198.
- 94.** R. L. Barreto, M. J. S. Carpes, C. C. Santana, C. R. D. Correia, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 435-442.
- 95.** a) A. Villar-Barro, R. Brieva, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24*, 694-698; b) A. Villar-Barro, R. Brieva, V. Gotor, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5563-5568.

