



Universidad de Oviedo

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica

Programa de Doctorado: Síntesis y Reactividad Química

Desarrollo de procesos biocatalíticos para la preparación de
compuestos orgánicos de alto valor añadido empleando
hidrolasas y oxidorreductasas. Diseño de reacciones en cascada

Tesis Doctoral

Daniel Méndez Sánchez



Universidad de Oviedo

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica

Programa de Doctorado: Síntesis y Reactividad Química

Desarrollo de procesos biocatalíticos para la preparación de compuestos orgánicos de alto valor añadido empleando hidrolasas y oxidorreductasas. Diseño de reacciones en cascada

Memoria presentada por Daniel Méndez Sánchez para optar al grado de Doctor en Química por la Universidad de Oviedo

A mi madre
In memoriam

*“When you change the way you look at things,
the things you look at change translate”*

<<Wayne Dyer>>

Tras casi 4 años de trabajo en el grupo de Bioorgánica de la Universidad de Oviedo, ha llegado el momento de cerrar un importante capítulo de mi vida que culmina con la escritura de este libro. La presente tesis ha sido un trabajo en el que directa o indirectamente han colaborado varias personas, a las que mediante estas palabras pretendo mostrar mi agradecimiento.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis Vicente Gotor y Vicente Gotor Fernández, además de por la financiación recibida, por la oportunidad que me han dado de pertenecer a este grupo, su excelente dirección y su constante preocupación por mi tesis sobreponiendo en muchos momentos, sus compromisos laborales a los personales.

A Juan Mangas y Nicolás Ríos, por su colaboración en la realización de esta tesis actuando en numerosas ocasiones como un director más, transmitiendome consejos y conocimientos que sin duda alguna me serán de gran utilidad en mi futuro.

A todos y cada uno de mis compañeros del grupo de Bioorganica que han sido lo mejor que me llevo de todos estos años, y me han ayudado a crecer a nivel profesional pero sobre todo a nivel personal dejando una huella en mi que dudo que se borre con el paso de los años, espero de forma alguna haber podido devolveros este cariño que me llevo. De entre todos ellos, debo de agradecer especialmente a dos personas que han sido las más importantes para mí dentro de este laboratorio. La primera es Tania mi amiga de toda la vida y que en estos años me ha demostrado que no solo es una excelente profesional sino también una gran persona, la segunda persona es Alex, un tipo espectacular y un tanto peculiar que con su sentido del humor y su alegría ha conseguido hacer más llevadera mi estancia en el laboratorio, convirtiéndose en uno de mis mejores amigos.

A Dava, Humberto, Rapy, Roci y todo el resto de amigos de Candás por su compañía durante este tiempo, haciendo mucho más llevaderos los malos momentos que he podido tener durante este camino, sacándome una sonrisa siempre que estoy con ellos, sois geniales y me habéis ayudado mucho.

A toda mi familia en especial a mis abuelas y a mis tíos. A mi padre por haber estado ahí en cada momento, de mi vida ayudándome e inculcándome unos valores que me han hecho ser la persona que hoy soy.

Pero sin duda alguna, a la persona que más tengo que agradecerle no solo en esta tesis si no en mi vida, es a mi madre porque sus brazos siempre se abrían cuando quería un abrazo, su sonrisa siempre me arrancaba de la tristeza y su fuerza y amor me dieron alas para volar. Por eso y por mucho más esta tesis va por ti, como todo lo que consiga en mi vida que será en gran medida gracias a lo que tú me has dado. Sin duda esta tesis ha sido gracias a ti.

Abreviaturas y Acrónimos

Abreviaturas y Acrónimos

[α]	Rotación óptica específica
δ	Desplazamiento químico
μL	Microlitros
ν	Frecuencia
Ac	Acetilo
Ac₂O	Anhídrido acético
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADH-A	Alcohol deshidrogenasa de <i>Rhodococcus ruber</i>
AcOEt	Acetato de etilo
AcOVin	Acetato de vinilo
Ala	Alanina
AK	Lipasa de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
APCI	Ionización química a presión atmosférica
APNB	Ácido <i>p</i> -nitrobenzoico
Ar	Arilo
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
atm	Atmósfera
Bn	Bencilo
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo
BSA	Albúmina de suero bovino
Bu	<i>n</i> -Butilo
<i>t</i>BuOH	<i>tert</i> -butanol
Bz	Benzoilo
BYADH	Levadura de panadería (del inglés, <i>baker's yeast</i>)
°C	Grado(s) Celsius
<i>c</i>	Conversión
CaADH	ADH de <i>Clostridium acetobutylicum</i>
CAL-A	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> de tipo A
CAL-B	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> de tipo B
CAST	Test de saturación del centro activo del inglés (<i>Combinatorial active-site saturation test</i>)

Abreviaturas y Acrónimos

Cbz	Benciloxicarbonilo
CLEA	Agregados de enzimas por entrecruzamiento (del inglés, <i>cross-linked enzyme aggregates</i>)
cm	Centímetros
CRL	Lipasa de <i>Candida rugosa</i>
CG	Cromatografía de Gases
Cys	Cisteína
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DC	Dicroísmo circular
DEAD	Azodicarboxilato de dietilo
DEPT	Aumento de distorsión por transferencia de polarización (del inglés, <i>distorsion enhancement by polarization transfer</i>)
DIAD	Azodicarboxilato de diisopropilo
Dis.	Disolvente
DKR	Resolución cinética dinámica (del inglés, <i>dynamic kinetic resolution</i>)
DMAP	4-(<i>N,N</i> -dimetilamino)piridina
DMF	(<i>N,N</i>)-dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Clasificación enzimática
E	Enzima
<i>E</i>	Razón enantiomérica o enantioselectividad
<i>E_a</i>	Energía de activación
<i>ed</i>	Exceso diastereomérico
<i>ee</i>	Exceso enantiomérico
<i>ee_s</i>	Exceso enantiomérico de sustrato
<i>ee_p</i>	Exceso enantiomérico de producto
EM	Espectrometría de masas
ESI	Ionización por electrospray
Et	Etilo
equiv	Equivalente(s)

Abreviaturas y Acrónimos

g	Gramo(s)
GDH	Glucosa deshidrogenasa
GP	Grupo Protector
H	Horas
His	Histidina
HLADH	ADH de hígado de caballo del inglés (<i>Horse Liver ADH</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés, <i>high performance liquid chromatography</i>)
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución (del inglés, <i>high resolution mass spectrometry</i>)
Hz	Hertzios
IR	Infrarrojo
IT	Intermedio tetraédrico
J	Constante de acoplamiento
k_{cat}	Constante de velocidad
K_M	Constante de Michaelis Menten
KPi	Fosfatos (disolución reguladora preparada con fosfatos de potasio)
KR	Resolución cinética (del inglés, <i>kinetic resolution</i>)
K_2CO_3	Carbonato potásico
LBADH	ADH de <i>Lactobacillus brevis</i>
LKADH	ADH de <i>Lactobacillus kefir</i>
M	Molar
m	Multiplete
<i>m</i>-CPBA	Acido metacloroperbenzoico
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo
mg	Miligramo(s)
MHz	Megahertzios
min	Minuto(s)
mL	Mililitro(s)

Abreviaturas y Acrónimos

mmol	Milimol(es)
NAD(H)	Dinucleótido de nicotinamida adenina
NADP(H)	Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato
N Et₃	Trietilamina
NCS	<i>N</i> -Clorosuccinimida
n.d.	No determinado
P	Producto
PF	Punto de fusión
Ph	Fenilo
pH	Potencial de hidrógeno
PIDA	diacetato de iodofenilo
PPh₃	Trifenil fosfina
PPL	Lipasa de páncreas porcino
ppm	Partes por millón
Pr	<i>n</i> -Propilo
PSL	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i>
PSL-C	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> inmovilizada sobre un soporte cerámico
PSL IM	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> inmovilizada sobre tierra de diatomita
PSL SD	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> en forma de polvo fijada a diatomita
R	Resto alquílico
rd	Relación diastereomérica
rdto	Rendimiento
R_f	Factor de retención
rpm	Revoluciones por minuto
RML	Lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
S	Sustrato
SsADH	ADH hipertermófila de <i>Sulfolobus solfataricus</i>
Ser	Serina

Abreviaturas y Acrónimos

sp.	Species
t.a.	Temperatura ambiente
TBME	<i>tert</i> -Butilmetiléter
TEMPO	2,2,6,6-Tetrametil-1-piperidiniloxy
TeSADH	ADH de <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía de capa fina (del inglés, <i>thin layer chromatography</i>)
TLL	Lipasa de <i>Thermomyces lanuginosa</i>
t_R	Tiempo de retención
Tris-HCl	Hidrocloruro de tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidad de actividad enzimática
UHP	Par ionico urea peróxido de hidrogeno del inglés (<i>urea hydrogen peroxide</i>)
u.m.a.	Unidad de masa atómica
UV	Ultravioleta
v/v	Relación de volúmenes

Índice

Introducción	1
0.1. Reseña histórica	3
0.2. Ventajas e inconvenientes de los procesos enzimáticos	6
0.3. Tipos de enzimas	9
<i>0.3.1. Lipasas</i>	10
<i>0.3.1.1. Lipasa de Candida antarctica de tipo A (CAL-A)</i> ...	11
<i>0.3.1.2. Lipasa de Candida antarctica de tipo B (CAL-B)</i> ...	12
<i>0.3.1.3. Lipasa de Pseudomonas cepacia (PSL)</i>	13
<i>0.3.1.4. Lipasa de Rhizomucor miehei (RML)</i>	14
0.3.2. Alcohol deshidrogenasas	15
<i>0.3.2.1. Clasificación atendiendo al tamaño de la cadena proteica</i>	16
<i>0.3.2.2. Clasificación atendiendo a la estereoquímica del alcohol formado</i>	18
<i>0.3.2.3. Sistemas de regeneración del cofactor en oxidorreductasas</i>	19
<i>0.3.2.4. ADH de Rhodococcus ruber DSM-44541 (ADH-A)</i> 21	
<i>0.3.2.5. ADH de Lactobacillus brevis (LB-ADH)</i>	21
<i>0.3.2.6. ADH evo-1.1.200</i>	22
0.4. Desarrollo de procesos enzimáticos asimétricos	22
<i>0.4.1. Resolución cinética clásica</i>	23
<i>0.4.2. Resolución cinética dinámica</i>	25
<i>0.4.3. Desimetrización</i>	26

Índice

0.4.4. Resolución cinética dinámica reductiva	28
0.5. Catálisis concurrente	29
0.5.1. Procesos en cascada o dominó	29
0.5.2. Procesos secuenciales o tándem	30
Capítulo I: Resolución cinética de aminoalcoholes derivados de imidazol y triazol catalizados por lipasas	33
Antecedentes	35
I.1.1. Importancia de los aminoalcoholes	37
I.1.2. Preparación quimioenzimática de cis- y trans- β -aminoalcoholes cíclicos	38
I.1.3. Preparación quimioenzimática de trans- β -aminoalcoholes cíclicos derivados de pirazol	40
I.1.4. Preparación quimioenzimática de trans- β -aminoalcoholes cíclicos derivados de imidazol	40
I.1.5. Síntesis quimioenzimática de cis- y trans- β -cicloalcanoles derivados de triazol	42
Objetivos	45
Resultados y discusión	49
I.3.1. Resolución cinética del (\pm)-trans-3-(1H-imidazol-1-il)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol	51
I.3.2. Resolución cinética del (\pm)-cis-3-(1H-imidazol-1-il)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol	53
I.3.3. Resolución cinética del (\pm)-cis- y (\pm)-trans-3-(1H-triazol-1-il)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol	55
I.3.4. Resolución cinética del (\pm)-trans- y (\pm)-cis-1-(1H-imidazol-1-il)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol	56

Conclusiones	59
Parte experimental	63
<i>I.5.1. Información general</i>	65
<i>I.5.1.1. Disolventes y reactivos generales</i>	65
<i>I.5.1.2. Cromatografía</i>	65
<i>I.5.1.3. Espectroscopía infrarroja (IR)</i>	66
<i>I.5.1.4. Puntos de fusión</i>	66
<i>I.5.1.5. Espectrometría de masas (EM)</i>	66
<i>I.5.1.6. Resonancia magnética nuclear (RMN)</i>	66
<i>I.5.1.7. Rotación óptica</i>	67
<i>I.5.3. Síntesis de los amino alcoholes derivados de imidazol (±)-trans-2 a partir del correspondiente epóxido</i>	67
<i>I.5.4. Síntesis de los aminoalcoholes derivados de imidazol (±)-cis-2 a partir del amino alcohol trans</i>	67
<i>I.5.5. Síntesis del amino alcohol derivado de triazol (±)-trans-5 a partir del correspondiente epóxido</i>	68
<i>I.5.6. Síntesis de los amino alcoholes derivados de triazol (±)-cis-5 a partir del correspondiente aminoalcohol trans</i>	68
<i>I.5.7. Síntesis del amino alcohol derivado de triazol (±)-trans-8</i>	69
<i>I.5.8. Síntesis del amino alcohol derivado de triazol (±)-cis-8 a partir del correspondiente alcohol trans</i>	69
<i>I.5.9. Procedimiento general para la síntesis de los alcoholes raecémicos acetilados trans-4, cis-4, trans-6, cis-6, trans-9 y cis-9</i>	70

Índice

I.5.10. Procedimiento general para la resolución cinética enzimática de los alcoholes racémicos trans-2, cis-2, trans-5, cis-5, trans-8 y cis-8	70
Trabajo de investigación	73
Capítulo II: Desimetrización enzimática de <i>meso</i> -1,2-diaril-1,2-diaminoetanos.....	83
Antecedentes	85
II.1.1. Desimetrización enzimática de derivados de ácidos carboxílicos	89
II.1.2. Desimetrización enzimática de dioles	90
II.1.3. Desimetrización enzimática de diaminas	91
Objetivos	95
Resultados y discusión	99
II.3.1 Síntesis de las diaminas racémicas	101
II.3.2. Optimización de las condiciones de reacción para el sustrato modelo	102
II.3.3. Extensión de la metodología	104
II.3.4. Determinación de la configuración absoluta	106
Conclusiones	109
Parte experimental	113
II.5.1. Información general	115
II.5.1.1. Difracción de rayos X	115
II.5.1.2. Dicroísmo circular UV	115
II.5.2. Procedimiento general para la síntesis de las meso-diaminas 2a-h	116

Índice

<i>II.5.3. Procedimiento general para la síntesis de los correspondientes monocarbamatos racémicos 4a-h</i>	116
<i>II.5.4. Procedimiento general para la desimetrización enzimática de las meso-diaminas 2a-h con la lipasas utilizando carbonato de dialilo</i>	117
Trabajo de investigación	119
Capítulo III: Desarrollo de procesos quimioenzimáticos para la preparación de epóxidos	127
Antecedentes	129
<i>III.1.1. Oxidaciones mediadas por hidrolasas</i>	132
<i>III.1.1.1. Reacción de oxidación de alcoholes mediada por lipasas</i>	134
<i>III.1.2.2. Reacción de Baeyer-Villiger mediada por lipasas</i>	134
<i>III.1.2.3 Reacción de epoxidación mediada por lipasas</i> ...	137
Objetivos	143
Resultados y discusión	147
<i>III.3.1 Optimización de las condiciones de reacción, elección del agente oxidante, precursor del perácido y disolvente</i>	149
<i>III.3.2. Efecto de la temperatura y de las concentraciones de sustrato, UHP y ácido láurico</i>	151
<i>III.3.3. Extensión de la metodología a diferentes sustratos</i> ...	152
Conclusiones	155
Parte experimental	159
<i>III.5.1. Información general</i>	161
<i>III.5.1.1. Cromatografía</i>	161

Índice

III.5.2 Procedimiento general para la síntesis enzimática de los epóxidos 2a-j a pequeña escala.....	162
III.5.3. Procedimiento para la síntesis enzimática del epóxido 2d a gran escala	162
Trabajo de investigación	163
Capítulo IV: Desarrollo de procesos de desracemización de alcoholes secundarios empleando métodos quimioenzimáticos	171
Antecedentes	173
IV.1.1. Desracemización mediante estereoinversión	176
IV.1.2. Desracemización cíclica de alcoholes	179
Objetivos	185
Resultados y discusión	189
IV.3.1. Conversión del <i>l</i> -feniletanol en acetofenona utilizando diferentes oxidantes químicos.....	191
IV.3.2. Desracemización de alcoholes secundarios.....	196
Conclusiones	199
Parte experimental	203
IV.5.1. Información general.....	205
IV.5.2. Protocolo general para la oxidación del alcohol 1a-i utilizando el sistema I_2 /TEMPO bajo sonicación.....	205
IV.5.3. Protocolo general para la biorreducción de las cetonas 2a-i con ADH-A sobreexpresada en <i>E. coli</i>	206
IV.5.4. Protocolo general para la biorreducción de las cetonas 2a-i con LB-ADH.....	206
IV.5.5. Protocolo general para la biorreducción de las cetonas 2a-i con <i>evo-1.1.200</i>	206

Índice

<i>IV.5.6. Protocolo general para la desracemización de alcoholes 1a-i one-pot con ADH-A</i>	207
<i>IV.5.7. Protocolo general para la desracemización de alcoholes 1a-i one-pot con LB-ADH</i>	207
<i>IV.5.8. Protocolo general para la desracemización de alcoholes 1a-i one-pot con la ADH evo-1.1.200</i>	208
Trabajo de investigación	209
Capítulo V: Procesos de resolución cinética dinámica reductiva de cetonas bencílicas racémicas empleando alcohol deshidrogenasas y resinas de intercambio aniónico.....	217
Antecedentes	219
<i>V.1.1. Procesos de tipo dinámico</i>	221
<i>V.1.1.1. Procesos de tipo dinámico catalizados por lipasas</i>	222
<i>V.1.1.2. Procesos de tipo dinámico emplando alcohol deshidrogenasas</i>	224
<i>V.1.2. Importancia de los isocromanos</i>	229
Objetivos	231
Resultados y discusión	235
<i>V.3.1. Síntesis de las cetonas 2a-m a través de un reacción de alquilación</i>	237
<i>V.3.2. Optimización de los parámetros de reacción utilizando como sustrato modelo 3-fenilbutan-2-ona (2a)</i>	238
<i>V.3.2. Extensión de la metodología a una serie de bencilcetonas 2b-m</i>	242
<i>V.3.3. Extensión de la metodología a enzimas de tipo anti- Prelog</i>	244

Índice

V.3.4. Escalado de la biorreducción con 2a y síntesis del isocromano 4a	245
Conclusiones	247
Parte experimental	251
V.5.1. Información general	253
V.5.2. Procedimiento general para la síntesis de las cetonas racémicas.....	253
V.5.3. Procedimiento general para la síntesis de los alcoholes racémicos.....	253
V.5.4. Resolución cinética de la cetonas racémicas 2a-m con ADH-A sobreexpresada en <i>E. coli</i>	254
V.5.5. Resolución cinética dinámica de las cetonas racémica 2a-m con ADH-A sobreexpresada en <i>E. coli</i>	254
V.5.6. Escalado de la resolución cinética dinámica de la cetona racémica 2a con ADH-A sobreexpresada en <i>E. coli</i>	254
V.5.7. Resolución cinética dinámica de las cetonas racémicas 2a-m con la ADH evo-1.1.200.....	255
V.5.8. Resolución cinética dinámica de las cetonas racémicas 2a-m con LBADH	255
V.5.9. Procedimiento general para la ciclación del alcohol 3a	256
Trabajo de investigación	257
Conclusiones generales	259
Referencias	275

Introducción

0.1. Reseña histórica

Los principios de la Biocatálisis datan del antiguo Egipto, donde los seres humanos ya utilizaban enzimas para llevar a cabo la fermentación de azúcares para la obtención de etanol, aplicándose más adelante en la elaboración de productos diarios como el pan o el queso. En sus comienzos, la Biocatálisis se basaba en el uso de células enteras donde las bacterias o levaduras eran usadas como biocatalizadores, tendencia que continuó durante muchos años en los cuales las enzimas sólo se utilizaban con el fin de transformar la materia.¹

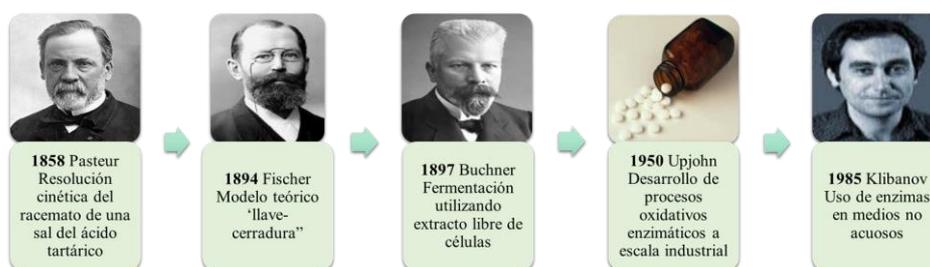


Figura 0.1. Hitos que provocaron grandes cambios en la Biocatálisis.

En 1858 Louis Pasteur marco un hito histórico en el desarrollo de la Biocatálisis al realizar la resolución cinética del ácido tartárico racémico, comprobando que si a este se le suministra el hongo *Penicillium glaucum* al medio de cultivo, la fermentación cesa tan pronto como el enantiómero (*R,R*) se ha consumido. De esta forma el ácido (*S,S*)-(-)-tartárico puede ser aislado del medio (Figura 0.1).² Este descubrimiento fue seguido unos pocos años después por una importante investigación de Emile Fischer que postuló el modelo "llave-cerradura" para dar explicación esquemática a la forma en que interaccionan los sustratos con el centro activo de las enzimas, sentando así las bases para comprender los mecanismos enzimáticos.³ También a

¹ C. M. Clouthier, J. N. Pelletier, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585.

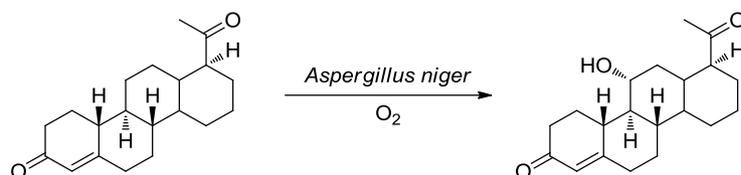
² L. Pasteur, C. R. Seances, *Acad. Sci.* **1858**, *46*, 615

³ E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985.

Introducción

finales del siglo XIX, Eduard Buchner consiguió realizar la fermentación de azúcares utilizando un extracto de células, hecho que constituyó una prueba irrefutable de que las biotransformaciones no requieren de células vivas.⁴

Aun así, la Biocatálisis no adquirió una verdadera importancia sintética hasta los años 50 del pasado siglo, cuando importantes compañías farmacéuticas desarrollaron metodologías biocatalíticas para hidroxilar esteroides de forma regio- y estereoselectiva (Esquema 0.1).



Esquema 0.1. Hidroxilación de la progesterona realizada por la compañía Upjohn en 1950.

Ya en 1985 Zaks y Klivanov descubrieron que algunas enzimas podían llevar a cabo transformaciones en medios anhidros, manteniendo prácticamente inalterada su actividad natural.⁵ Este descubrimiento desencadenó una auténtica revolución desde un punto de vista sintético, porque hasta ese momento sólo se habían desarrollado biotransformaciones en medios acuosos. Utilizar disolventes orgánicos presenta grandes ventajas, ya que permite entre otras cosas, una mejor solubilidad de los compuestos orgánicos hidrofóbicos, una recuperación más sencilla de los productos finales de reacción, y favorece los procesos de síntesis frente a otros indeseados de hidrólisis o racemización.

A finales de los años noventa se produjo otro gran avance al introducir por primera vez técnicas de ingeniería genética, que condujeron a un rápido desarrollo de la Biocatálisis. En un primer momento empezaron a utilizarse

⁴ E. Buchner, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1897**, 36, 117.

⁵ (a) G. Kirchner, M. P. Scollar, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 7072; (b) A. Zaks, A. M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, 82, 3192.

Introducción

técnicas de evolución dirigida que consistían en introducir de forma aleatoria modificaciones en la secuencia de aminoácidos de una enzima natural. Una vez obtenidas una serie de mutantes, estas se expresan en un huésped, para después realizar un test donde se seleccionan las enzimas que mejores propiedades hayan mostrado. Por último, el ciclo se repite de manera iterativa hasta que se obtiene un biocatalizador con las actividades deseadas (Figura 0.2).⁶

Recientemente, y ayudados por los avances en el campo de las técnicas computacionales de modelización molecular, se ha empezado a utilizar técnicas de diseño más racional como los test de saturación en el centro activo (*'combinatorial active-site saturation test'*, CAST),⁷ que consisten en la modificación específica de varios aminoácidos del centro activo de la enzima (Figura 0.2). Esto se traduce en la posibilidad de obtener biocatalizadores “a la carta”, que consiguen aceptar sustratos que antes eran inertes, trabajar a elevadas temperaturas e incluso cambiar la estereoquímica de los productos formados.

Si nos fijamos en la evolución histórica mostrada por la Biocatálisis, al principio los procesos enzimáticos se adaptaban a las enzimas existentes, para optimizar su rendimiento. Hoy en día, esto ha cambiado y son las enzimas las que se adaptan a los procesos, augurando un porvenir prometedor para este sector en los próximos años.

⁶ U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, 485, 185.

⁷ M. T. Reetz, M. Bocola, J. D. Carballeira, D. Zha, A. Vogel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 4192.

Introducción

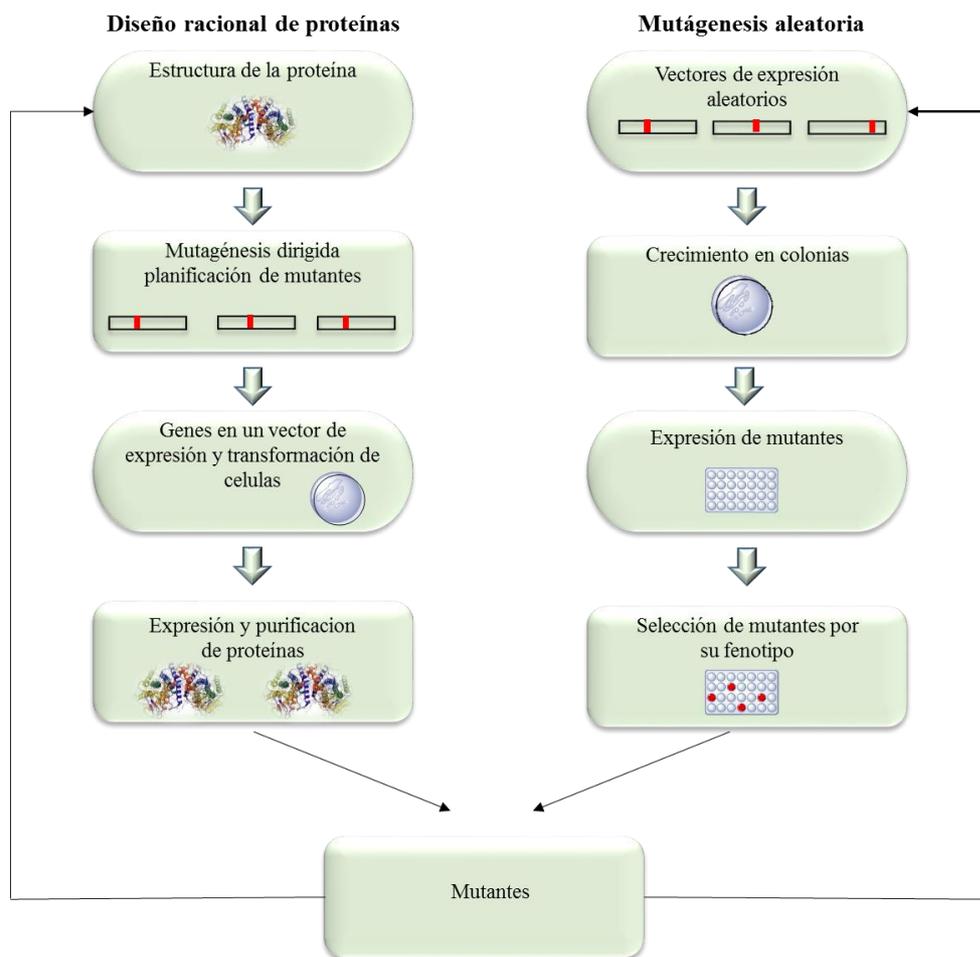


Figura 0.2. Descripción de los dos procesos de mutagénesis más importantes para la preparación de nuevos biocatalizadores con propiedades mejoradas.

0.2. Ventajas e inconvenientes de los procesos enzimáticos

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones químicas aumentando su velocidad, sin consumirse en el proceso ni modificar su estructura. Este tipo de catalizadores cumple con los principios de la Química Sostenible o “Química Verde”, los cuales han sido recogidos de forma nemotécnica e intencionada en los términos ingleses

PRODUCTIVELY (de manera productiva) y posteriormente GREENER AFRICA (por una África más verde).⁸

Las enzimas se presentan como unos catalizadores que despiertan un gran interés entre la comunidad científica, ya que por una parte catalizan procesos orgánicos respetuosos con el medio ambiente, generalmente bajo condiciones suaves de reacción (pH, presión y temperatura), siendo además biodegradables. Por otro lado, es bien conocida sus elevadas eficiencias catalíticas (hacen la reacción del orden de 10^{20} veces más rápida que la reacción no catalizada),⁸ mostrando también, altos niveles de selectividad que puede mostrarse de tres formas:⁹

- Quimioselectividad: Capacidad para diferenciar los diferentes grupos funcionales presentes en una misma molécula.
- Regioselectividad: Capacidad para diferenciar entre varios grupos funcionales químicamente idénticos presentes en una molécula y realizar una transformación sobre uno de ellos.
- Estereoselectividad: Capacidad para discriminar entre dos estereoisómeros.

Por otro lado, la pureza enantiomérica de los productos finales es un requerimiento general tanto para los procesos industriales, como para un gran número de procesos químicos convencionales, puesto que un simple cambio de un enantiómero a otro puede traer asociado grandes cambios en sus propiedades, originando respuestas biológicas completamente diferentes. Esto puede observarse claramente en la selección de enantiómeros mostrados en la Figura 0.3, los cuales presentan muy distintas propiedades.

⁸ (a) S. Wenda, S. Illner, A. Mell, U. Kragl, *Green Chem.* **2011**, *130*, 3007; (b) N. Ran, L. Zhao, Z. Chen, J. Tao, *Green Chem.* **2008**, *10*, 361.

⁹ (a) G. Zheng, J. Xu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *22*, 784; (b) N. Asfaw, Y. Chebude, A. Ejigu, B. B. Hurisso, P. Licence, R. L. Smith, S. L. Y. Tang, M. Poliakoff, *Green Chem.* **2011**, *13*, 1059.

Introducción

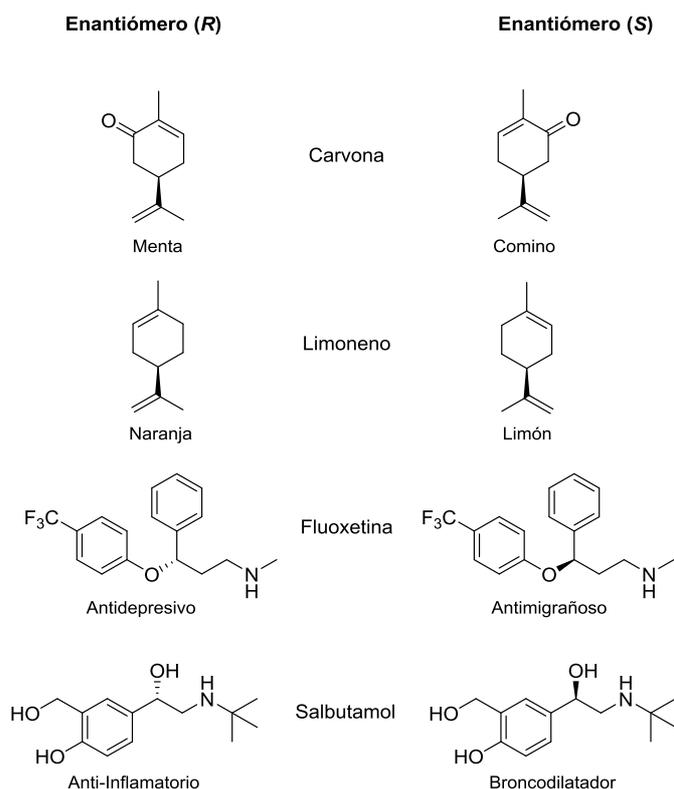


Figura 0.3. Diferente respuesta biológica de los enantiómeros de una mezcla racémica.

Si bien las enzimas presentan un gran número de ventajas, también presentan una serie de inconvenientes que no se pueden pasar por alto:

- Presentan una elevada especificidad, que puede llegar a ser un inconveniente puesto que limita mucho el número de sustratos que aceptan.
- Algunos tipos de enzimas necesitan de un cofactor para su correcto funcionamiento lo cual encarece el proceso.
- Si se trabaja en condiciones drásticas de temperatura, pH o concentraciones elevadas de sustrato, suele observarse cierta inhibición de la enzima.

Todos estos problemas se están superando de diferentes formas utilizando técnicas de inmovilización enzimática para aumentar su estabilidad, creando sistemas de regeneración del cofactor más eficientes,¹⁰ así como el uso de mímicos de cofactores para abaratar los procesos ya que 1 Kg de NADH cuesta en torno a 600000 €. El empleo de técnicas de ingeniería genética,¹¹ ha ayudado a mejorar la estabilidad de las enzimas y la búsqueda de nuevos microorganismos extremófilos que puedan funcionar en condiciones drásticas de reacción, son otros dos caminos seguidos para superar estas limitaciones.

0.3. Tipos de enzimas

En la actualidad, la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) tiene clasificados unas 3700 enzimas, pero, si las predicciones son correctas, el 90% de las enzimas existentes en la naturaleza está aún por descubrir. De las conocidas, sólo una pequeña proporción (~10%) son comerciales, ante tal cantidad de enzimas se hace necesario establecer una clasificación atendiendo al tipo de reacciones que catalizan (Tabla 0.1).¹²

¹⁰ (a) D. Dascier, S. Kambourakis, L. Hua, J. D. Rozzell, J. D. Stewart, *Org. Process. Res. Dev.* **2014**, *18*, 793; (b) R. C. Rodrigues, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernández-Lafuente, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6290; (c) M. Hartmann, X. Krostov, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6277; (d) F. Secundo, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6250; (e) R. A. Sheldon, S. Van Pelt, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223; (f) O. Barbosa, R. Torres, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, *Biomacromolecules*, **2013**, *14*, 2433; (g) K. Hernández, R. Fernández-Lafuente, *Enzym. Microb. Technol.* **2011**, *8*, 107; (h) R. C. Rodrigues, Á. Berenguer-Murcia, R. Fernández-Lafuente, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2216; (i) C. Garcia-Galan, Á. Berenguer-Murcia, R. Fernández-Lafuente, R. C. Rodrigues, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2885; (j) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, K. Buehler, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 762.

¹¹ (a) T. Quinto, V. Köller, T. R. Ward, *Top Catal* **2014**, *57*, 321; (b) C. E. Paul, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 788; (c) U. T. Bornscheuer, *Synlett* **2013**, *24*, 150; (d) A. S. Bommarius, J. K. Blum, M. J. Abrahamson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 194; (e) M. T. Reetz, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7530; (f) M. Wang, T. Si, H. Zhao, *Bioresour. Technol.* **2012**, *115*, 117.

¹² K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*. 6ª Ed.; Springer, Berlín (Alemania), **2011**.

Introducción

Tabla 0.1. Clasificación de las enzimas de acuerdo a las reacciones que catalizan.

Clasificación	Nombre	Tipo de reacción catalizada
EC.1	Oxidorreductasas	Oxidación de alcoholes, dobles enlaces o cetonas. Reducción de cetonas o dobles enlaces
EC.2	Transferasas	Transferencia de grupos acilo, fosforilo, glicosilo o amino
EC.3	Hidrolasas	Hidrólisis de ésteres, péptidos, glicéridos
EC.4	Liasas	Adición a enlaces múltiples
EC.5	Isomerasas	Isomerización de olefinas, racemización
EC.6	Ligasas	Formación de enlaces C-O, C-N, C-S y C-P

En esta Tesis Doctoral se han desarrollado una serie de procesos quimioenzimáticos para obtener productos de elevado interés, utilizando principalmente dos clases de enzimas, las lipasas que pertenecen al grupo de las hidrolasas (EC.3) y las alcohol deshidrogenasas (ADHs) pertenecientes al grupo de las oxidorreductasas (EC.1). Por ello a este punto se hace necesario realizar una breve introducción sobre ambos tipos de biocatalizadores.

0.3.1. Lipasas

Dentro de la clase de las hidrolasas destacan las lipasas debido a su gran versatilidad sintética, siendo una de las familias de enzimas más utilizadas en síntesis orgánica. Su función natural es la de hidrolizar ésteres insolubles en agua como por ejemplo: mono-, di- o triacilgliceroles. Como otras hidrolasas, entre sus mayores ventajas destaca su alta actividad en disolventes no acuosos, propiedad que las hace muy interesantes de cara a su uso en procesos industriales especialmente dentro del sector farmacéutico, alimentario o textil.

Introducción

En esta memoria se han empleado principalmente y de manera exitosa, las lipasas de *Candida antarctica* de tipo A (CAL-A), la de tipo B (CAL-B), la de *Pseudomonas cepacia*, (PSL) y de *Rhizomucor miehei* (RML). Por ello parece conveniente llevar a cabo una breve descripción de su origen, estructura y propiedades en este momento.

En el caso de la CAL-A y la CAL-B, ambas enzimas fueron descubiertas en los años 60, por una expedición japonesa a la Antártida, la cual buscaba enzimas que pudieran actuar en condiciones extremas. Así, fueron aisladas de la levadura de *Candida antarctica* encontrada en los sedimentos del lago Vanda. Posteriormente, fueron purificadas, clonadas y caracterizadas para ser hoy en día comercializadas por diversas empresas biotecnológicas.

0.3.1.1. Lipasa de *Candida antarctica* de tipo A (CAL-A)

Es una proteína monomérica de aproximadamente 431 aminoácidos cuyo pH óptimo es de 7, habiéndose descrito su estructura tridimensional mediante análisis de difracción de rayos X (Figura 0.4).¹³

¹³ D. J. Ericsson, A. Kasrayan, P. Johansson, T. Bergfors, A. G. Sandström, J.-E. Bäckvall, S. L. Mowbray, *J. Mol. Biol.* **2008**, 376, 109.

Introducción

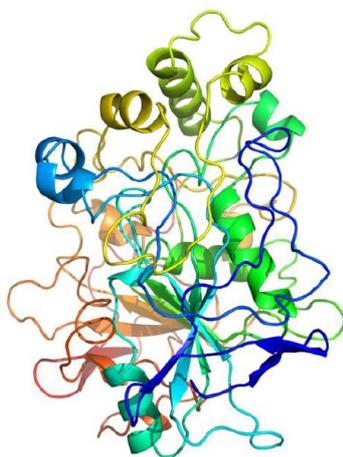


Figura 0.4. Estructura tridimensional de la lipasa de *Candida antarctica* de tipo A.

Entre las propiedades de esta enzima, destaca la elevada estabilidad térmica, habiéndose descrito reacciones a temperaturas cercanas a los 90 °C y una elevada afinidad por sustratos muy impedidos como pueden ser aminas secundarias o alcoholes terciarios.¹⁴

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

Es una proteína globular pequeña de aproximadamente 317 aminoácidos, que adopta una conformación tridimensional conocida como pliegue de la hidrolasa. La estructura de esta enzima, ha sido estudiada ampliamente mediante análisis de difracción de rayos X (Figura 0.5),¹⁵ revelando que no presenta casi activación interfacial, posee baja actividad tanto hacia triglicéridos como a ácidos grasos de cadena larga, y además presenta una menor estabilidad térmica respecto a la CAL-A. Esta lipasa se

¹⁴ P. Domínguez de María, C. Carboni-Oerlemans, B. Tuin, G. Bargeman, A. van der Meer, R. van Gemert, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2005**, 37, 36.

¹⁵ (a) J. Uppenberg, N. Öhmer, M. Norin, K. Hult, G. J. Kleywegt, S. Patkar, V. Waagen, T. Anthonsen, T. A. Jones, *Biochemistry* **1995**, 34, 16838; (b) J. Uppenberg, S. Patkar, T. Bergfors, T. A. Jones, *J. Mol. Biol.* **1994**, 235, 790; (c) J. Uppenberg, M. T. Hansen, S. Patkar, T. A. Jones, *Structure* **1994**, 2, 293.

puede obtener en forma de distintos preparados que sólo se diferencian entre sí en la forma de inmovilizar la enzima.

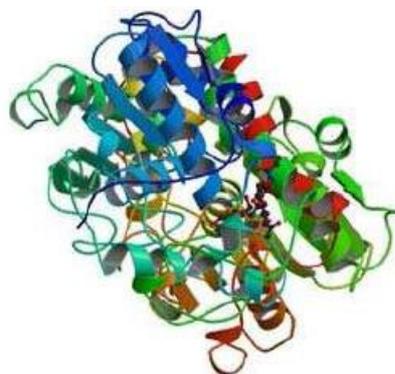


Figura 0.5. Estructura tridimensional de la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B.

En este trabajo se ha utilizado la enzima comercializada por la empresa Novozymes, en su forma “Novozyme 435”, puesto que presenta unas limitaciones difusionales mínimas y al estar inmovilizada sobre una resina polimérica su recuperación es sencilla a través de un simple filtrado una vez finalizada la reacción. Su aplicación a la preparación de derivados nitrogenados ha sido ampliamente estudiada, siendo considerada como uno de los catalizadores más eficientes para la preparación de aminas, amidas y carbamatos en forma ópticamente activa.¹⁶

0.3.1.3. Lipasa de Pseudomonas cepacia (PSL)

Es una hidrolasa serínica, cuya estructura tridimensional ha sido elucidada mediante análisis de difracción de rayos X (Figura 0.6), presentando la típica estructura de pliegues α/β presente en otras hidrolasas. Está formada por 320 aminoácidos y con un peso molecular de 34 kDa, al contrario que la CAL-B muestra una conformación abierta en ausencia de inhibidor.

¹⁶ V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, 797.

Introducción

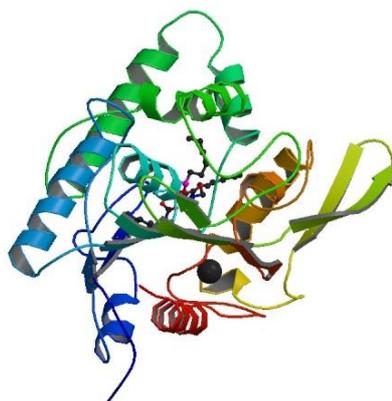


Figura 0.6. Estructura tridimensional de la lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

Esta lipasa ha sido ampliamente utilizada en la resolución de alcoholes secundarios mediante procesos de acilación o hidrólisis,¹⁷ en la preparación de β -aminoácidos a través de procesos de aminólisis,¹⁸ además de en la resolución y desimetrización de alcoholes primarios donde, ha mostrado una elevada selectividad comparándola con otras lipasas. Hoy en día, se le conoce también con el nombre de *Burkholderia cepacia*.

0.3.1.4. Lipasa de *Rhizomucor miehei* (RML)

Aunque mucho menos utilizada que las anteriores, esta lipasa descubierta en 1975 tiene un peso molecular de 31.6 kDa y está formada por 269 aminoácidos (Figura 0.7).¹⁹

¹⁷ (a) A. Kirschner, P. Langer, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2871; (b) M. Bucciarelli, P. Davoli, A. Forni, I. Moretti, F. Prati, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 2489; (c) A. Kamal, M. Sandbhor, K.V. Ramana, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 815.

¹⁸ A. Liljeblad, L. T. Kanerva, *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 5831.

¹⁹ R. C. Rodrigues, R. Fernández-Lafuente, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *64*, 1.

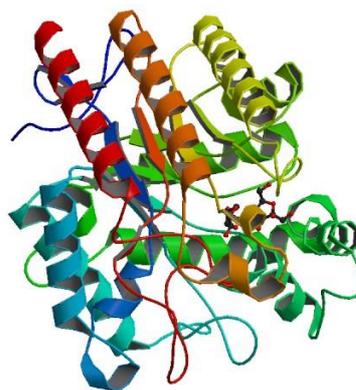


Figura 0.7. Estructura tridimensional de la lipasa de *Rhizomucor miehei*.

Esta lipasa se utiliza habitualmente en algunos procesos industriales, destacando sobre todos ellos su utilización en la producción de biodiesel, donde ha sido la hidrolasa que mejores resultados ha mostrado.

0.3.2. Alcohol deshidrogenasas

Las ADHs son un tipo de enzimas pertenecientes a la clase de las oxidorreductasas, que son capaces de catalizar la reducción de un grupo carbonilo a través de la entrada de un hidruro por una de las caras de la cetona. Además, pueden catalizar la reacción reversa de oxidación de alcoholes a los correspondientes derivados carbonílicos en función de las condiciones de reacción.

Estas enzimas se pueden clasificar atendiendo a dos criterios, uno estructural en función del tamaño de la cadena proteica que posee la enzima, y el otro en función del mecanismo de reacción y la configuración absoluta del alcohol formado. Para el correcto funcionamiento de este tipo de enzimas se hace necesario la presencia de un cofactor pirimidínico [NAD(P)H o NAD(P)⁺].²⁰

²⁰ H. Wu, C. Tian, X. Song, C. Liu, D. Yang, Z. Jiang, *Green Chem.* **2013**, *15*, 1773.

Introducción

0.3.2.1. Clasificación atendiendo al tamaño de la cadena proteica

En cuanto al tamaño de la cadena proteica las ADHs se clasifican en ADHs de cadena larga (600-750 aminoácidos), ADHs de cadena media (~350 aminoácidos) y ADHs de cadena corta (~250 aminoácidos). En esta Tesis Doctoral se han empleado principalmente aquellas pertenecientes a las dos últimas familias.

Las ADHs de cadena corta son las más comunes puesto que se conocen unas 46000 enzimas de las que solo se han descrito la estructura cristalina de unas 300. En cuanto a su mecanismo de actuación (Figura 0.8A) utilizan un residuo de la tirosina del centro activo de la enzima que debe encontrarse en su forma desprotonada (para abstraer el protón) cuando se quiere oxidar el alcohol, o protonada (para ceder el protón activando la cetona) en el caso de la biorreducción. Un ejemplo de este tipo de enzimas es la alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus brevis* (LB-ADH), que se usará a lo largo de este trabajo (Figura 0.8B).

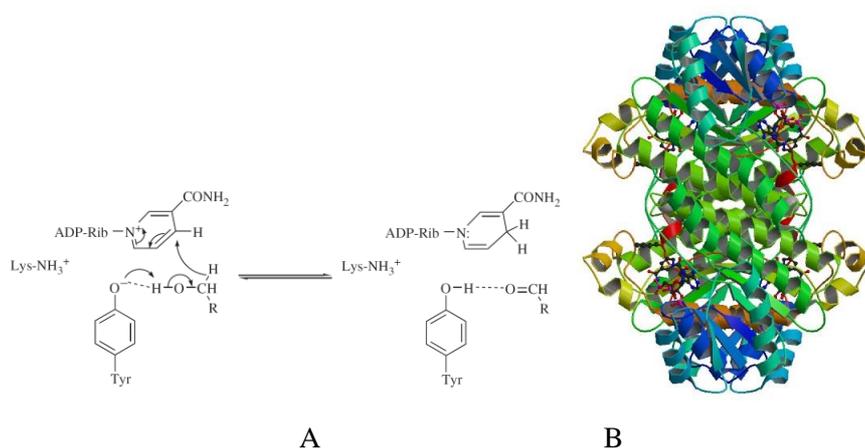


Figura 0.8. A) Rol de la tirosina en el mecanismo de reacción de una ADH de cadena corta; B) Representación de una ADH de cadena corta (ADH de *Lactobacillus brevis*, LB-ADH).

El grupo de las ADHs de cadena media consta de unas 15000 enzimas conocidas y su subclase más importante son las enzimas dependientes de

Introducción

Zn^{2+} . Estructuralmente son enzimas más complejas que las de cadena corta porque poseen dos subunidades. En el centro activo de la enzima se encuentra un ión Zn^{2+} tetracoordinado por dos residuos de cisteína y uno de histidina junto con una molécula de agua. Esta última es sustituida por el ión alcóxido resultante la reducción del grupo carbonilo y facilita la ruptura del enlace O-H del alcohol cuando es oxidado.²¹ Por otro lado, cuando se incubaba la proteína con agentes quelantes, el catalizador no muestra desactivación por extracción del átomo de Zn^{2+} presente en el centro activo, lo que evidencia la fuerza de su unión con los aminoácidos presentes en la proteína y da veracidad al mecanismo expuesto en la Figura 0.9b.²²

A esta familia pertenecen la ADH de hígado de caballo (HLADH), la de levadura de panadería (YADH) o la de *Rhodococcus ruber* DSM 44541²³ (ADH-A; Figura 0.9A) que será muy utilizada a lo largo de esta Tesis Doctoral. Un ejemplo de su mecanismo de actuación simplificado se recoge en la Figura 0.9B.

²¹ *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Eds. P. A. Frey, A. D. Hegeman, Oxford University Press, Nueva York, **2007**.

²² (a) B. Kosjek, W. Stampfer, M. Pogorevc, W. Goessler, K. Faber, W. Kroutil, *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *86*, 55; (b) O. Danielsson, S. Atrian, T. Luque, L. Hjelmqvist, R. González-Duarte, H. Jörnvall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 4980.

²³ (a) B. Kosjek, W. Stampfer, M. Pogorevc, W. Goessler, K. Faber, W. Kroutil, *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *86*, 55; (b) W. Stampfer, B. Kosjek, W. Kroutil, K. Faber, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *81*, 865; (c) W. Stampfer, B. Kosjek, K. Faber, W. Kroutil, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 275; (d) W. Stampfer, B. Kosjek, K. Faber, W. Kroutil, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 402.

Introducción

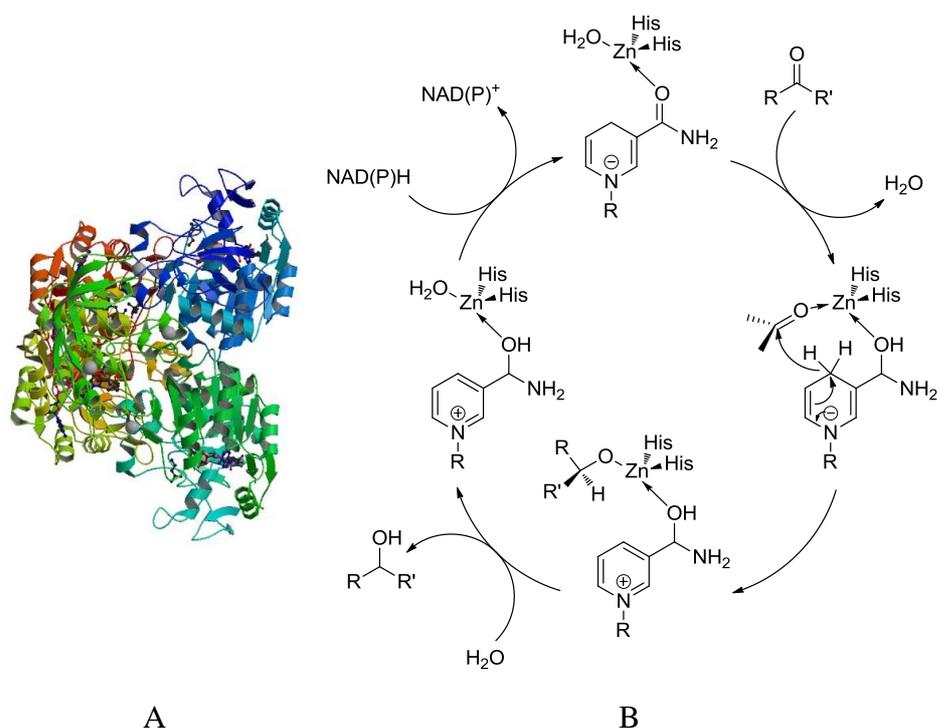


Figura 0.9. A) Representación de la estructura de una ADH de cadena media (ADH-A); B) Mecanismo simplificado de reducción de una cetona realizado por una ADH dependiente de Zn.

0.3.2.2. Clasificación atendiendo a la estereoquímica del alcohol formado

Otra forma de clasificar las ADHs es en función de su capacidad de ceder un hidruro a una de las caras de la cetona cuando es reducida (o a abstraerlo de uno de los enantiómeros del alcohol secundario cuando es oxidado). La selectividad de estas enzimas en la adición del hidruro a una de las caras de la cetona suele estar de acuerdo con lo establecido por Vladimir Prelog en 1964.²⁴ Según dicho comportamiento estereoquímico, las ADHs suelen seguir la llamada “*regla de Prelog*” (Figura 0.10), la cual establece que las deshidrogenasas transfieren el hidruro por la cara *re* de la cetona

²⁴ V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **1964**, 9, 119.

proquiral dando lugar al alcohol de configuración *S*. Contrariamente, cuando el hidruro se transfiere por la cara *si*, se obtiene el alcohol de configuración *R*, y la ADH se dice que es de tipo *anti-Prelog*.

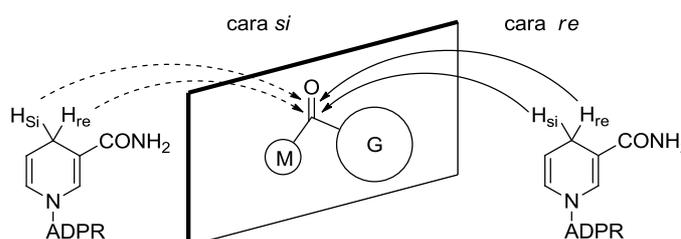
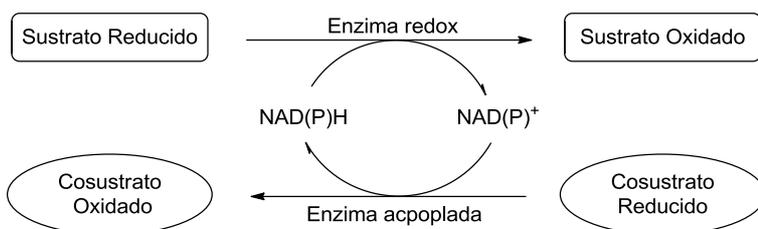


Figura 0.10. Transferencia estereoselectiva del hidruro a una de las dos caras del grupo carbonilo de una cetona.

0.3.2.3. Sistemas de regeneración del cofactor en oxidorreductasas

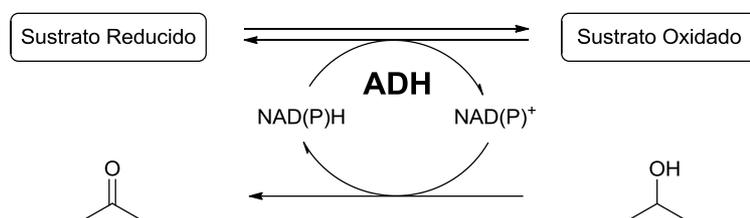
El elevado precio de los cofactores que utilizan este tipo de enzimas hace necesario su reciclaje debido a la imposibilidad de utilizarlo en cantidades estequiométricas.²¹ Esta regeneración ocurre de manera simultánea a la reducción de la cetona, para lo cual se pueden emplear muy diversas metodologías, como pueden ser técnicas fotoquímicas, eléctricas o utilizando catalizadores metálicos u otras enzimas.¹⁰ Los dos métodos enzimáticos más utilizados en Biocatálisis son los denominados “sistema acoplado” y “sustrato acoplado” (Esquema 0.2). El primero de ellos consiste en acoplar una reacción con otra enzima diferente que permita regenerar el cofactor. Este sistema posee la ventaja de que sirve para todo tipo de reacciones enzimáticas y conduce a una rápida activación de la enzima, pero su principal desventaja es que sigue siendo bastante caro económicamente hablando.

Introducción



Esquema 0.2. Sistema de regeneración del cofactor utilizando una enzima acoplada.

El segundo sistema consiste en utilizar un exceso de un alcohol de bajo coste, generalmente isopropanol o etanol, que pueda ser oxidado por la misma enzima que lleva a cabo la reducción formándose acetona o acetaldehído respectivamente, que es el método que hemos utilizado.



Esquema 0.3. Sistema de regeneración del cofactor pirimidínico utilizando un cosustrato acoplado como es el isopropanol.

A lo largo de esta Tesis Doctoral se han usado principalmente tres alcohol deshidrogenasas. La ADH de *Rhodococcus ruber* DSM 44541 (ADH-A) en su forma sobreexpresada en *E. coli*, la de *Lactobacillus brevis* (LB-ADH) y la evo-1.1.200, estas dos últimas en su forma comercial. Como sistema de regeneración de cofactor para todas ellas se ha utilizado el sistema de sustrato acoplado eligiendo como alcohol el isopropanol y utilizando un 2-3% en volumen, cantidad que es perfectamente tolerada por estas tres enzimas.

0.3.2.4. ADH de *Rhodococcus ruber* DSM-44541 (ADH-A)

Esta enzima de cadena media y preferencia *Prelog* es dependiente de NADH y Zn^{2+} , fue descubierta en 2002, posee 352 aminoácidos y un peso molecular de 38 kDa (Figura 0.11).^{23a,b} Ha sido sobreexpresada en *Escherichia coli*, lo cual ha aumentado notablemente su estabilidad pudiendo ser utilizada en medios casi anhidros, consiguiendo así muy buenos resultados con cetonas hidrofóbicas.²⁵

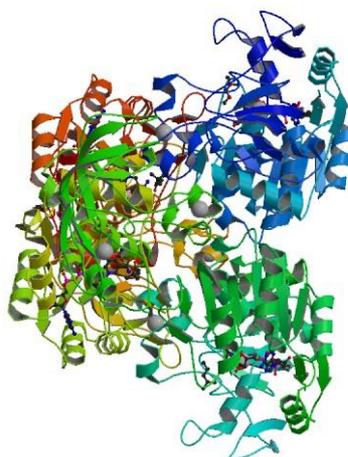


Figura 0.11. Estructura tridimensional ADH-A de *Rhodococcus ruber*.

0.3.2.5. ADH de *Lactobacillus brevis* (LB-ADH)

Esta alcohol deshidrogenasa *anti-Prelog* de cadena corta tiene 251 aminoácidos y un peso molecular de 26.6 kDa ha sido aplicada a un gran número de sustratos con excelentes resultados.²⁶

²⁵ (a) M. Karabec, A. Lyskowski, K. C. Tauber, G. Steinkellner, W. Kroutil, G. Grogan, K. Gruber, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 6314; (b) K. Edegger, C. C. Gruber, T. M. Poessl, S. R. Wallner, I. Lavandera, K. Faber, F. Niehaus, J. Eck, R. Oehrlein, A. Hafner, W. Kroutil, *Chem. Commun.* **2006**, 2402.

²⁶ (a) S. Leuchs, L. Greiner, *Chem. Biochem. Eng. Q.* **2011**, 25, 267; (b) W. Hummel, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **1997**, 58, 145.

Introducción

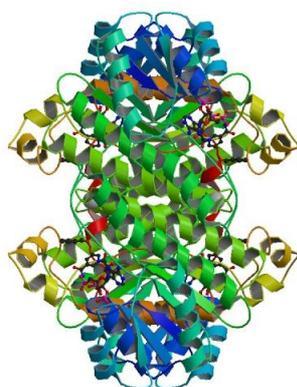


Figura 0.12. Estructura tridimensional ADH de *Lactobacillus brevis* (LB-ADH).

0.3.2.6. ADH evo-1.1.200

Poco se sabe de la estructura de esta ADH *anti-Prelog* debido a que es comercial desde hace pocas fechas, sin que el proveedor (Evocatal) haya hecho pública su secuencia de aminoácidos. Únicamente se sabe que es dependiente de Mg^{2+} , lo cual hace intuir que se trata de una ADH de cadena corta. Hasta la fecha ha mostrado excelentes resultados en la reducción de cetonas hidrofóbicas, llegando a mostrar actividad cuando trabaja a porcentajes elevados de disolventes orgánicos como el hexano o el tolueno.²⁷

0.4. Desarrollo de procesos enzimáticos asimétricos

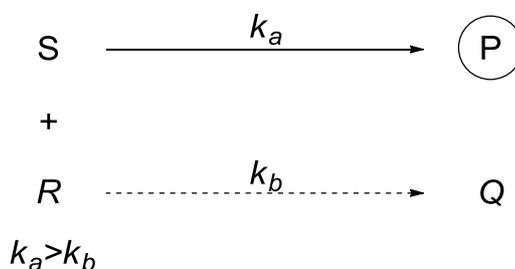
Las estrategias asimétricas más empleadas para obtener compuestos ópticamente activos, se basan en la resolución cinética de racematos y la

²⁷ (a) A. Díaz-Rodríguez, N. Ríos-Lombardía, J. H. Sattler, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, W. Kroutil, V. Gotor, *Catal. Sci. Technol.* **2015**, 5, 1443; (b) R. Zuhse, C. Leggewie, F. Hollmann, S. Kara, *Org. Process Res. Dev.* **2015**, 19, 369; (c) R. C. Simon, E. Busto, N. Richter, F. Belaj, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 111; (d) S. Kara, D. Spickermann, A. Weckbecker, C. Leggewie, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *ChemCatChem*, **2014**, 6, 973.

asimetrización de sustratos proquirales o formas *meso*. A continuación se detallan las características principales de los procesos estudiados en esta memoria.

0.4.1. Resolución cinética clásica

Este es el método más utilizado hoy en día a nivel industrial para la obtención de compuestos enantioméricamente puros,²⁸ consistiendo en la separación total o parcial de dos enantiómeros de una mezcla racémica (Esquema 0.4). Este concepto se basa en la diferente velocidad de reacción de los enantiómeros presentes en la mezcla racémica. Así, en un caso ideal solo se consigue que reaccione completamente uno de los enantiómeros lo cual por otro lado supone una limitación inherente al método, ya que no permite obtener conversiones superiores al 50% en un compuesto enantiopuro.



Esquema 0.4. Resolución cinética clásica de una mezcla racémica.

En una resolución cinética la concentración de cada enantiómero no permanece constante a lo largo de toda la reacción por lo que la velocidad de reacción varía con la conversión. También dependen de la conversión, los excesos enantioméricos, por lo que para poder comparar correctamente dos resoluciones cinéticas se hace necesario definir un nuevo término, como es la “razón enantiomérica” (*E*), la cual relaciona los excesos

²⁸ M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stüner, T. Zelinski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788.

Introducción

enantioméricos tanto de sustrato como de producto (Ecuación 1) y mide la capacidad de una enzima para distinguir entre ellos bajo unas determinadas condiciones de reacción.²⁹

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

Ecuación 1

Existen más métodos para el cálculo de valores de E ,³⁰ siendo el grado de conversión (c), los excesos enantioméricos de sustrato y producto (ee_s y ee_p) y el tiempo de reacción (t), las variables experimentales que pueden ser útiles para conocer el valor de esta magnitud. Para reacciones irreversibles que siguen una cinética de Michaelis-Menten y en las que no existe inhibición por producto, la E también puede ser determinada por las Ecuaciones 2, 3 y 4.

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

Ecuaciones 2-4

Como regla general, valores de E inferiores a 15 no tienen aplicaciones válidas en síntesis, mientras que valores superiores a 100 garantizan una buena selectividad del proceso, así como su aplicación en síntesis orgánica. Ejemplos de este tipo de transformaciones son las

²⁹ C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294.

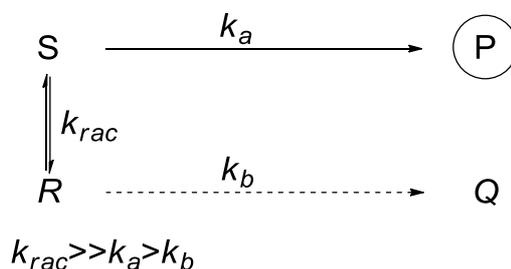
³⁰ A. J. J. Straathof, J. A. Jongejan, *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *21*, 559.

resoluciones de alcoholes, aminas o ésteres racémicos catalizadas por lipasas, o la oxidación selectiva de alcoholes secundarios empleando ADHs.

En el capítulo 1 de esta memoria, se estudiarán este tipo de procesos para la obtención de alcoholes y ésteres de forma enantiopura mediante procesos de acilación enzimática catalizada por lipasas.

0.4.2. Resolución cinética dinámica

En este tipo de procesos, se combina una resolución cinética con un proceso de racemización, consiguiendo superar así la principal limitación de las resoluciones cinéticas, y siendo posible obtener un 100% de rendimiento en un producto enantiopuro a partir de la mezcla racémica (Esquema 0.5).



Esquema 0.5. Resolución cinética dinámica de una mezcla racémica.

Para que estos procesos sean eficientes es necesario que cumplan ciertas condiciones, como que la resolución cinética clásica transcurra con enantioselectividades elevadas ($E > 20$) siendo, además la velocidad de la reacción de racemización al menos 10 veces superior a la de la resolución cinética.

Para llevar a cabo estos procesos de racemización, los métodos desarrollados más importantes son los enzimáticos (empleando racemasas), utilización de resinas de intercambio iónico,³¹ uso de medios de reacción

³¹ C. Rodríguez, G. de Gonzalo, A. Rioz-Martínez, D. E. Torres-Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 1121.

Introducción

que permitan la racemización mediante la abstracción de protones (pHs básicos), sistemas radicalarios,³² pero sin duda los más empleados en la actualidad son los que utilizan catalizadores metálicos para llevar a cabo el proceso de racemización.

Se han descrito un gran cantidad de ejemplos de resoluciones cinéticas dinámicas tanto para alcoholes como para aminas obteniendo los correspondientes esteres o amidas con excelentes excesos enantioméricos y conversiones.³³

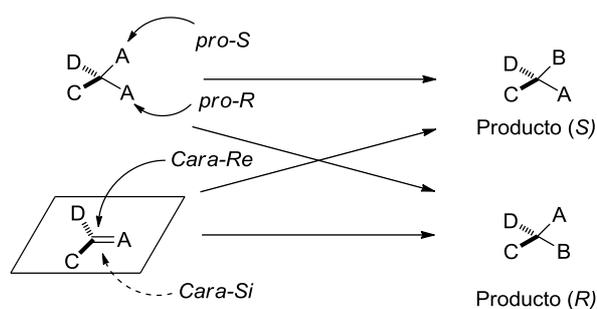
0.4.3. Desimetrización

Son procesos en que se realiza una modificación que elimina uno o más elementos de simetría. Al partir de sustratos proquirales o formas *meso* se puede llegar a rendimientos máximos del 100% (Esquema 0.6), haciendo uso de la capacidad de las enzimas para discriminar entre grupos o caras enantiotópicas de un sustrato proquiral o *meso*.³⁴

³² (a) L. El Blidi, M. Nechab, N. Vanthuyme, S. Gastaldi, P.M. Bertrand, G. Gil, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2901; (b) S. Gastaldi, S. Escoubet, N. Vanthuyme, G. Gil, M. P. Bertrand, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 837.

³³ (a) O. Verho, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3996; (b) P. Hoyos, V. Pace, A. R. Alcántara, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 2585; (c) M. Ahmed, T. Kelly, A. Ghanem, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 6781; (d) Y. Kim, J. Park, M.-J. Kim, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 271; (e) H. Pellisier, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3769; (f) H. Pellisier, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 659; (g) N. J. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 115; (h) J. H. Lee, K. Han, M.-J. Kim, J. Park, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 999; (i) M.-J. Kim, J. Park, Y. K. Choi, en *Multi-Step Enzyme Catalysis*, Ed. E. García-Junceda, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, pp. 1; (j) B. Martín-Matute, J.-E. Bäckvall, en *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, Eds. V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, pp. 89.

³⁴ E. Schoffers, A. Golbiowski, C. R. Johnson, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 3769.



Esquema 0.6. Esquema general del proceso de desimetrización enzimática de compuestos proquirales o formas *meso*.

Centrándonos en las hidrolasas, este tipo de metodología ha sido aplicada con éxito a una gran variedad de sustratos, como pueden ser derivados carboxílicos (ácidos, ésteres y nitrilos), dioles y en menor medida con diaminas.³⁵ Debido a que en este caso no se parte de mezclas racémicas, la ecuación de la razón enantiomérica viene dada única y exclusivamente por el valor del exceso enantiomérico de producto (ee_p), y la fórmula se muestra en la Ecuación 5. Sin embargo, en este tipo de procesos a menudo en lugar de usar el valor de E , se usa directamente el valor de ee_p como reflejo más simple de lo que ocurre en el proceso enzimático. Esto es posible gracias a que el ee_p permanece constante en el tiempo durante toda la reacción, siempre que la reacción sea irreversible.

$$E = \frac{1+ee_p}{1-ee_p}$$

Ecuación 5

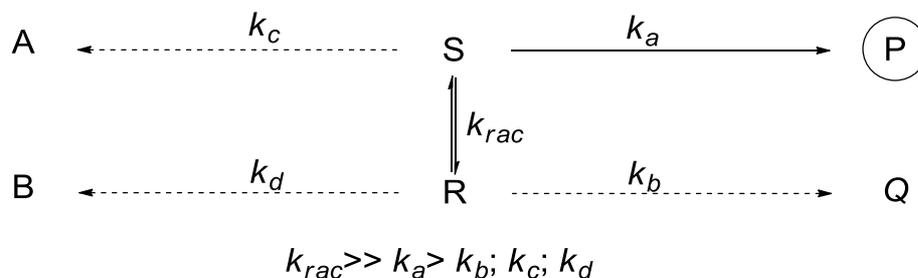
En el capítulo 2 de esta Tesis Doctoral se estudiará la desimetrización enzimática de una familia de *meso*-diaminas para obtener los correspondientes monocarbamatos enantioenriquecidos.

³⁵ E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, PR110 (Update de *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 313).

Introducción

0.4.4. Resolución cinética dinámica reductiva

En este tipo de procesos tienen lugar de forma simultánea un proceso de resolución cinética y otro de desimetrización. Así, uno de los enantiómeros de una mezcla racémica se transforma selectivamente, mientras el otro enantiómero se racemiza en el medio de reacción permitiendo conseguir uno de los cuatro diastereómeros posibles con un rendimiento teórico del 100% (Esquema 0.7).³⁶



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

Son bastante escasos los ejemplos de este tipo de procesos en la bibliografía, limitándose estos a la resolución de profenos³⁷ y a la reducción de β -cetoésteres.³⁸ En el capítulo 5 de esta Tesis Doctoral nos centraremos

³⁶ G. A. Applegate, D. B. Berkowitz, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, 357, 1619.

³⁷ (a) J. A. Friest, Y. Maezato, S. Broussy, P. Blum, D. B. Berkowitz. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 5930; (b) D. Giacomini, P. Galletti, A. Quintavalla, G. Gucciardo, F. Paradisi. *Chem. Comm.* **2007**, 43, 4038.

³⁸ (a) A. Cuetos, A. Rioz-Martínez, F. R. Bisogno, B. Grischek, I. Lavandera, G. de Gonzalo, W. Kroutil, V. Gotor. *Adv. Synth. Catal.* **2012**, 354, 1743; (b) D. Kalaitzakis, S. Kambourakis, J. D. Rozzell, I. Smonou. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, 18, 2418; (c) S. K. Padhi, I. A. Kaluzna, D. Buisson, R. Azerad, J. D. Stewart. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, 18, 2133; (d) D. Zhu, C. Mukherjee, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, L. Hua. *Tetrahedron* **2006**, 62, 901; (e) D. Kalaitzakis, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, I. Smonou. *Org. Lett.* **2005**, 7, 4799; (f) I. A. Kaluzna, T. Matsuda, A. K. Sewell, J. D. Stewart. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 12827; (g) K. Nakamura, Y. Kawai, T. Miyai, S. Honda, N. Nakayima, A. Ohno. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, 64, 1467; (h) N. Nakamura, T. Miyai, K. Ushio, S. Oka, A. Ohno. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, 61, 2089.

en el desarrollo de este tipo de procesos para la resolución de cetonas bencílicas racémicas.

0.5. Catálisis concurrente

La catálisis concurrente puede definirse como aquella en la que existe una acción, de dos o más ciclos catalíticos en un único reactor, pudiendo ocurrir de un modo cooperativo. En estos casos, cada uno de los catalizadores debe ser compatible con los sustratos, intermedios y demás reactivos presentes en el medio de reacción, y además las enzimas deben ser lo más selectivas posibles en la secuencia de reacciones.

Por estos motivos, este tipo de sistemas constituyen un gran desafío para los químicos sintéticos y ofrece muchas oportunidades para mejorar una transformación química compleja, disminuyendo las pérdidas de rendimiento y tiempo comúnmente asociadas al aislamiento de los productos intermedios, hechos que se traducen en una disminución de los rendimientos y costes globales. Estos procesos se clasifican en procesos en cascada o dominó y en procesos *secuenciales o tándem*.³⁹

0.5.1. Procesos en cascada o dominó

En estos procesos el material de partida sufre una o más transformaciones de manera continuada, es decir, no existe la posibilidad de aislar el intermedio, debido habitualmente a causas de estabilidad. Este intermedio evoluciona rápidamente hacia el producto final, evitándose así reacciones indeseadas y obteniendo rendimientos superiores a los que se conseguirían llevando a cabo esas reacciones de manera separada.

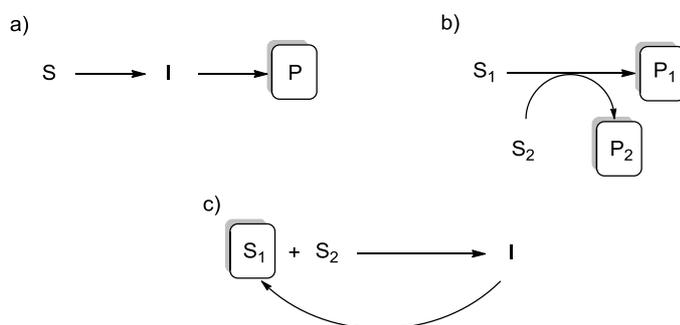
Se han descrito numerosas reacciones en cascada utilizando diferentes tipos de catalizadores. Estas incluyen sistemas quimioenzimáticos, multienzimáticos y procesos en los que se combinan metales y enzimas.

³⁹ E. García-Junceda, I. Lavandera, D. Rother, J. H. Schrittwieser, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, *114*, 1.

Introducción

Recientemente se ha comenzado a clasificar este tipo de procesos en tres tipos, que se representan gráficamente en el Esquema 0.8:

- Lineales: el sustrato se convierte en un único producto sin aislar intermedio alguno
- Paralelas: dos sustratos son transformados en dos productos diferentes por dos biocatalizadores conectados por cofactores o cosustratos, se denominan ortogonales en el caso de que uno de los productos que se genera se utilice para volver a regenerar ese sustrato.
- Cíclicas: una mezcla de sustratos se transforma en un intermedio que es convertido de nuevo en uno de los sustratos. Un ejemplo de ellas son los procesos de desracemización.



Esquema 0.8. Esquema de procesos en cascada: a) lineales, b) paralelos, c) cíclicos.

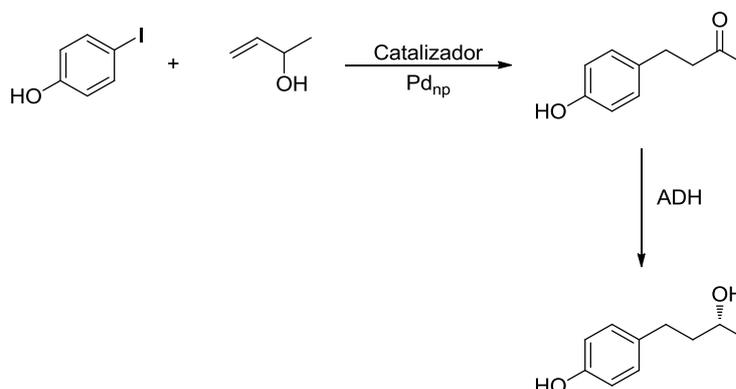
0.5.2. Procesos secuenciales o tándem

En este caso, los procesos también tienen lugar de manera consecutiva, pero las condiciones de reacción pueden variar a lo largo del proceso. Así, cada una de las reacciones puede llevarse a cabo por separado porque el intermedio es lo suficientemente estable como para poder ser aislado y caracterizado.

En este punto existe cierta controversia porque ciertos autores diferencian estos procesos de aquellos en cascada de acuerdo a la

estabilidad del intermedio.⁴⁰ Sin embargo, otros no hacen tal distinción, para estos últimos, la única diferencia es el cambio de alguna condición experimental o la adición de reactivos o catalizadores.⁴¹

En estos últimos años se han desarrollado estrategias eficientes para mejorar este tipo de procesos, en los que se combinan múltiples catalizadores en varios pasos. Hay ejemplos del uso de enzimas combinadas con catalizadores metálicos, organocatalizadores u otras enzimas. Un buen ejemplo es la obtención de 1,3-dioles diastereoméricamente puros por combinación de una oxidorreductasa y un catalizador de paladio (Esquema 0.9).⁴² En un primer paso, el Pd inmovilizado sobre nanopartículas de sílice cataliza una reacción tipo Heck formando la correspondiente cetona intermedia para posteriormente, en un segundo paso, obtener el alcohol enantioenriquecido a través de una biorreducción con una ADH con unos excesos enantioméricos excelentes. Este tipo de procesos serán utilizados en el capítulo 4 de esta Tesis Doctoral.



Esquema 0.9. Proceso tándem combinando una reacción tipo Heck catalizada por paladio y una alcohol deshidrogenasa para obtener dioles quirales.

⁴⁰ S. E. Denmark, A. Thorarensen, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 137.

⁴¹ T. Hudlicky, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 3.

⁴² K. Baer, M. Krauß, W. Hummel, A. Berkessel, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 49, 9355.

Capítulo I: Resolución cinética de
aminoalcoholes derivados de imidazol y
triazol catalizados por lipasas

Antecedentes

I.1.1. Importancia de los aminoalcoholes

Uno de los grandes retos en la química orgánica es la búsqueda de nuevos auxiliares quirales que permitan llevar a cabo procesos de síntesis con elevadas inducciones asimétricas. En este sentido y como se ha comentado en la introducción de esta Tesis Doctoral, las metodologías enzimáticas y en concreto el empleo de lipasas en disolventes orgánicos ofrece una gran versatilidad para la preparación de compuestos en forma ópticamente activa.

Los β -aminoalcoholes tienen un gran potencial como precursores de moléculas con actividad farmacológica y biológica como alcaloides o antibióticos,⁴³ de ahí el gran interés en aplicar las metodologías enzimáticas para preparar este tipo de sustratos de una manera estereoselectiva. En concreto aquellos que presentan anillos de triazol o imidazol, han suscitado un creciente interés en los últimos años debido a sus propiedades antifúngicas y antibióticas, como puede ser el caso del Miconazol y Fluconazol (Figura I.1)

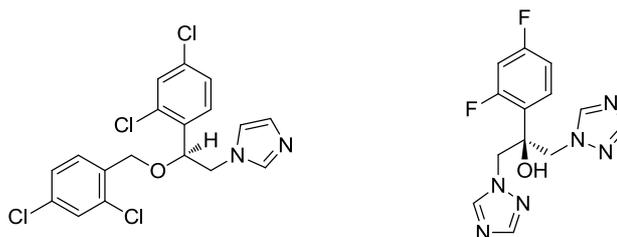


Figura I.1. Estructura del Miconazol y Fluconazol.

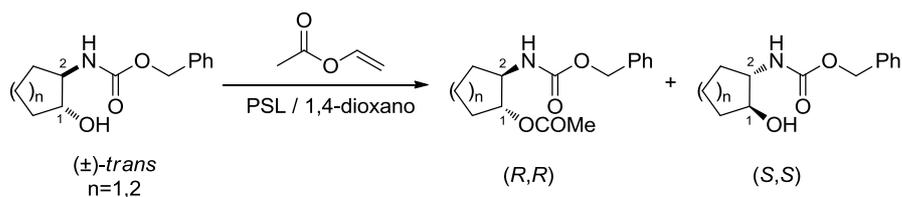
En este capítulo abordaremos la síntesis de *cis*- y *trans*-tetrahidronaftalenoles derivados tanto de imidazol como de 1,2,4-triazol

⁴³ (a) L. E. Overman, L. T. Mendelson, E. J. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6629; (b) A. Pecunioso, M. Maffei, C. Marchioro, L. Rossi, B. Tamburini, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 775; (c) D. Gala, D. DiBenedetto, G. Gloor, J. Jenkins, M. Kugelman, D. Maloney, A. Miller, *Org. Process Res. Dev.* **2004**, *8*, 396.

debido a las importantes aplicaciones que puedan tener en diversos campos como pueden ser la química médica o la catálisis asimétrica. Es por ello, que a continuación se describen ejemplos de resoluciones cinéticas de β -aminoalcoholes estructuralmente similares a los que se estudiarán en este capítulo, empleando lipasas como biocatalizadores.

I.1.2. Preparación quimioenzimática de *cis*- y *trans*- β -aminoalcoholes cíclicos

La resolución de aminoalcoholes viene limitada por la aparición de procesos de migración química de grupos acilo, por lo que es conveniente la protección del grupo amino previa a la resolución enzimática. Nuestro grupo de investigación ha sido pionero en la resolución de este tipo de compuestos, así la PSL ha demostrado ser un catalizador eficiente de la acilación de *trans*-2-aminociclohexanoles y *trans*-2-aminociclopentanoles protegidos en el grupo amino con el grupo benciloxicarbonilo (Cbz), obteniéndose excelentes excesos enantioméricos y elevados rendimientos tanto para los correspondientes alcoholes como acetatos (Esquema I.1).⁴⁴

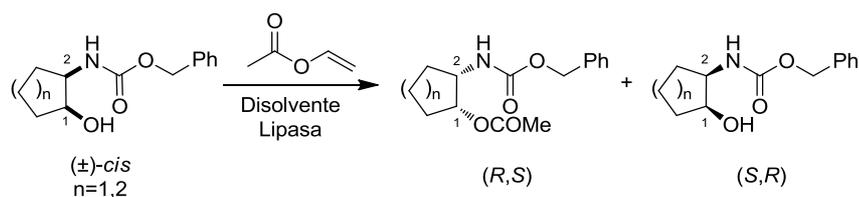


Esquema I.1. Resolución enzimática de (\pm) -*trans*-2-aminocicloalcanoles N-protectados.

Esta metodología se extendió posteriormente a la resolución de los *cis*-aminoalcoholes análogos, mostrando la PSL los mejores resultados para el ciclo de 5 mientras que para el ciclo de 6 la CAL-B mostró una mejor

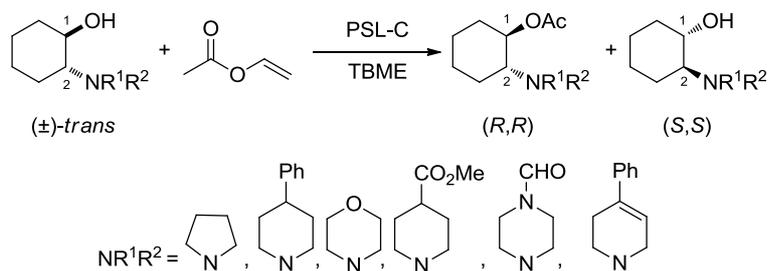
⁴⁴ A. Luna, A. Maestro, C. Astorga, V. Gotor, *Tetrahedrom: Asymmetry* **1999**, *10*, 1969.

selectividad, aislando tras 7 días de reacción tanto el acetato como el alcohol en forma enantiopura y con un elevado rendimiento.⁴⁵



Esquema I.2. Resolución enzimática de (\pm) -*cis*-2-aminocicloalcanos *N*-protegidos.

Años más tarde, se describió la síntesis de aminoalcoholes donde el grupo amino pertenece a un heterociclo saturado (Esquema I.3).⁴⁶ Esta resolución se estudió para una serie de heterociclos como son la pirrolidina, la morfolina o derivados de la piperidina, consiguiendo realizar sus resoluciones enzimáticas cuando la PSL se encontraba inmovilizada sobre un soporte cerámico. Así, utilizando unas condiciones similares a las de los ejemplos anteriores, se aislaron en todos los casos los correspondientes productos enantiopuros y los sustratos con excesos enantioméricos altos.



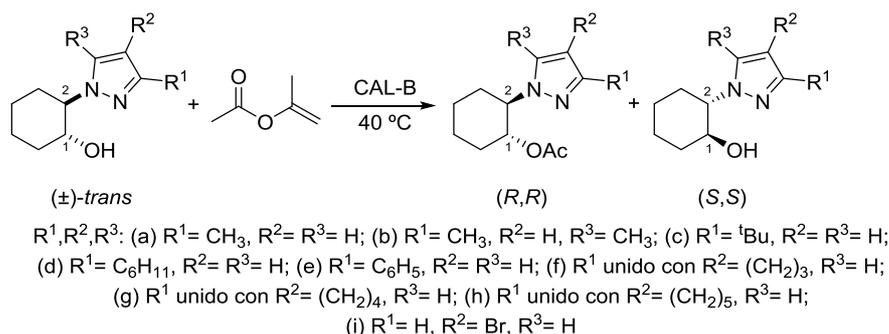
Esquema I.3. Resolución cinética enzimática de (\pm) -*trans*-2-(*N,N*-dialquilamino)ciclohexanoles.

⁴⁵ A. Luna, C. Astorga, F. Fülöp, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 4483.

⁴⁶ J. González-Sabín, V. Gotor, F. Rebolledo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, 15, 1335.

I.1.3. Preparación quimioenzimática de *trans*- β -aminoalcoholes cíclicos derivados de pirazol.

Thiel y colaboradores, describieron la resolución de cicloalcoholes derivados del pirazol consiguiendo tanto producto como sustrato enantiopuros tras una resolución empleando acetato de isopropenilo como donador de acilo y un posterior proceso de recristalización en *n*-hexano.⁴⁷ Para ello utilizaron la CAL-B como catalizador consiguiendo obtener una familia de pirazoles con diferentes patrones de sustitución y altos excesos enantioméricos (Esquema I.4).



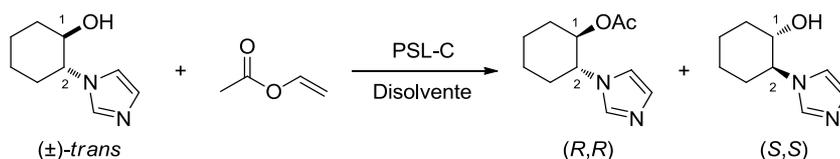
Esquema I.4. Resolución enzimática de (\pm) -*trans*-2-(1-pirazoil)ciclohexanoles sustituidos.

I.1.4. Preparación quimioenzimática de *trans*- β -aminoalcoholes cíclicos derivados de imidazol

A la vista de la gran importancia que pueden poseer este tipo de compuestos, en nuestro grupo de investigación se realizaron una serie de trabajos encaminados a resolver cicloalcoholes derivados de imidazol. Así, en el año 2007 se publicó la resolución de derivados del (\pm) -*trans*-2-(1*H*-imidazol-1-il)ciclohexanol, consiguiendo excelentes resultados cuando se utiliza la PSL-C, acetato de vinilo y THF o TBME como disolvente,

⁴⁷ (a) M. Barz, H. Glas, W. R. Thiel, *Synthesis* **1998**, 1269; (b) M. Barz, E. Herdtweck, W. R. Thiel, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 1717.

obteniéndose tanto el (*R,R*)-alcohol como el (*S,S*)-acetato en forma enantiopura (Esquema I.5).⁴⁸



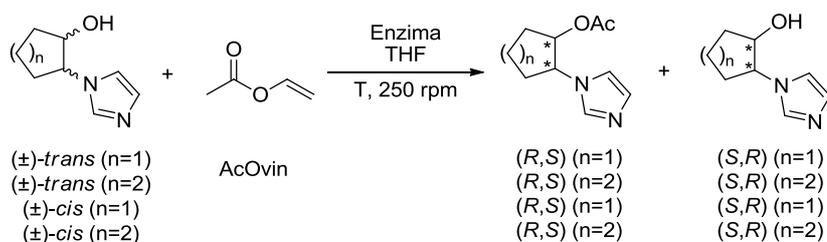
Esquema I.5. Resolución de cicloalcoholes derivados del imidazol catalizada por la PSL-C.

Del mismo modo, se extendió esta metodología tanto a ciclohexanoles *cis* como a ciclopentanoles *cis* y *trans*, siendo la CAL-B quien mostrará los mejores resultados en la acilación del (*1R,2S*)-*trans*-2-(*1H*-imidazol-1-il)ciclopentanol, mientras que la PSL fue la que mejores resultados proporcionó en la resolución cinética del derivado *cis*. En ambos casos se empleó acetato de vinilo como agente acilante y THF seco como disolvente. Sin embargo, cuando se intentó la resolución enzimática del *cis*-2-(*1H*-imidazol-1-il)ciclohexanol racémico, todas las lipasas probadas mostraron bajas enantioselectividades, esta limitación se superó realizando la inversión de Mitsunobu y su correspondiente desprotección sobre el derivado *trans* enantiopuro (Esquema I.6).⁴⁹

⁴⁸ E. Busto, V. Gotor-Fernández, N. Ríos-Lombardía, E. García-Verdugo, I. Alfonso, S. García-Granda, A. Menéndez-Velázquez, M. I. Burguete, S. V. Luis, V. Gotor. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5251.

⁴⁹ N. Ríos-Lombardía, R. Porcar, E. Busto, I. Alfonso, J. Montejo-Bernardo, S. García-Granda, V. Gotor, S. V. Luis, E. García-Verdugo, V. Gotor-Fernández, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 1921.

Capítulo I: Resolución cinética de aminoalcoholes derivados de imidazol y triazol

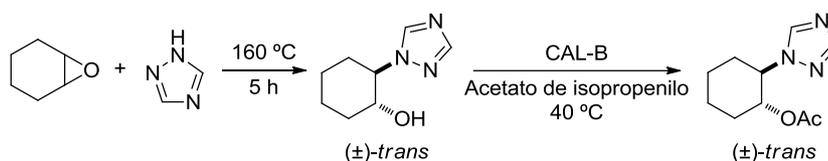


Esquema I.6. Resolución enzimática de cicloalcoholes *cis*- y *trans*- derivados de imidazol.

Cabe destacar que con los productos obtenidos en estos trabajos se sintetizaron líquidos iónicos que fueron utilizados como relleno de columnas de cromatografía de gases, además de como auxiliares quirales en reacciones de adición tipo Michael donde se obtuvieron buenas inducciones quirales.

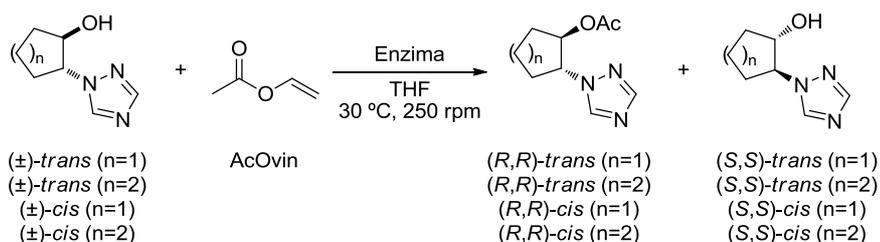
I.1.5. Síntesis quimioenzimática de *cis*- y *trans*- β -cicloalcoholes derivados de triazol

Thiel y colaboradores llevaron a cabo la síntesis y posterior resolución del (\pm) -*trans*-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)ciclohexanol, obteniendo únicamente este isómero con altos rendimientos tras reacción del 1,2,4-triazol con el óxido de ciclohexeno.^{47a} Sin embargo, su resolución enzimática empleando las condiciones utilizadas para los pirazoles sustituidos, es decir, CAL-B como biocatalizador, acetato de isopropenilo como agente acilante y disolvente a 40 °C, no condujo a ningún tipo de estereoselectividad (Esquema I.7).



Esquema I.7. Síntesis química y resolución enzimática de resolución enzimática de (±)-*trans*-2-(1-*H*-1,2,4-triazol-1-il)ciclohexanol.

En nuestro grupo de investigación se decidió estudiar en profundidad la resolución de este tipo de sustratos buscando otro tipo de catalizadores enzimáticos para la resolución de este tipo de derivados. Así se logró realizar la síntesis química de los derivados *cis* y *trans*-2-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)cicloalcanol, para después llevar a cabo su resolución cinética utilizando para ello la CAL-B y la PSL, mostrando ambas enzimas excelentes enantioselectividades para la acetilación de los derivados *trans* tanto del ciclo de 5 como de 6 empleando en ambos casos acetato de vinilo como agente acilante y THF como disolvente (Esquema I.8).⁵⁰



Esquema I.8. Resolución enzimática de cicloalcanoles *cis* y *trans* derivados de triazol.

En el mismo trabajo de investigación, también se estudió la resolución de los derivados *cis* (Esquema I.8) y los resultados observados fueron

⁵⁰ R. Porcar, N. Ríos-Lombardía, E. Busto, V. Gotor-Fernández, J. Montejo-Bernardo, S. García-Granda, S. V. Luis, V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Verdugo, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 892.

similares a los anteriores cuando se utilizó la PSL, pero desafortunadamente la CAL-B no mostró ningún tipo de actividad sobre estos derivados.

Como ha quedado patente en los antecedentes de este capítulo estos compuestos pueden poseer importantes propiedades en muy diversos campos. En este capítulo nos centraremos en sintetizar derivados del tetrahidronaftaleno racémicos para abordar posteriormente su resolución, ya que este tipo de sustratos en su forma racémica han mostrado buenas actividades biológicas contra enfermedades tan extendidas como la leishmaniosis.⁵¹

⁵¹ V. K. Marrapu, N. Srinivas, M. Mittal, N. Shakya, S. Gupta, K. Bhandari, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1407.

Objetivos

Capítulo I: Resolución cinética de aminoalcoholes derivados de imidazol y triazol

Como hemos visto en los antecedentes hay varios ejemplos de síntesis quimioenzimática de derivados de pirazol, triazol e imidazol derivados de cicloalcanoles, mientras que no existen ejemplos de la resolución de tetrahidronaftalenos, siendo la importancia biológica de estos muy alta en el tratamiento de diversas enfermedades. Por todo esto, nos hemos planteados una serie de objetivos como son:

La síntesis química eficiente de cicloalcanoles derivados de naftaleno racémicos, tanto de configuración *cis* y *trans*.

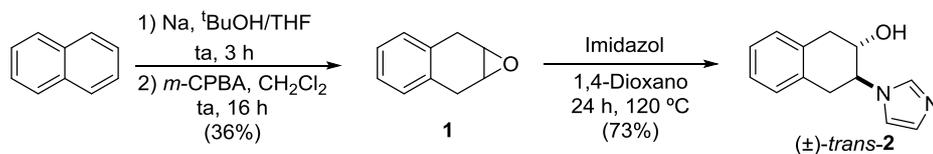
Estudiar su resolución cinética utilizando lipasas optimizando todos los parámetros que afectan a la reacción.

Comparar el comportamiento de las distintas lipasas con el fin de conocer la influencia de los restos de imidazol o triazol en los sustratos de partida.

Resultados y discusión

I.3.1. Resolución cinética del (\pm)-*trans*-3-(1*H*-imidazol-1-il)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol

Para la síntesis de este compuesto se siguió una ruta sintética ya descrita,⁵² que consiste en la reducción de Birch del naftaleno, seguida de una posterior epoxidación utilizando ácido *meta*-cloroperbenzoico (*m*-CPBA) en medio acuoso para obtener el epóxido con un rendimiento global del 36% (Esquema I.9).⁵³ El epóxido formado **1** se hizo reaccionar con un ligero exceso de imidazol (1.2 equivalentes), en un tubo sellado con dioxano a 120 °C durante 24 h para obtener el correspondiente alcohol (\pm)-*trans*-**2** con buenos rendimientos (73%).



Esquema I.9. Síntesis del imidazol racémico (\pm)-*trans*-**2**.

A continuación, se realizó un test enzimático con el que se evaluó la actividad de una serie de lipasas en la acilación de (\pm)-*trans*-**2** utilizando 3 equivalentes de acetato de vinilo (**3**). Como disolvente se empleó THF, debido a la excelente solubilidad del alcohol en el mismo. De todas las lipasas probadas (AK, CRL, PPL, TLL, RML, CAL-B, CAL-A y PSL) solo esta última mostró algún tipo de actividad y buenas enantioselectividades. Aprovechando la disponibilidad de varias clases de esta enzima en el laboratorio, se estudió el comportamiento de las dos que estaban soportadas sobre diatomita PSL-IM y PSL-IM II (entradas 1 y 2 de la Tabla I.1) que difieren entre sí en las actividades que presentan (943 U/g y 816 U/g

⁵² M. D. Perez, C. Borek, S. R. Forrest, M. E. Thompson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9281.

⁵³ L. F. Tietze, A. Heins, M. Soleiman-Beigi, C. Raith, *Heterocycles* **2009**, *77*, 1123.

respectivamente), e incluso se probó a aumentar la temperatura a 45 °C observándose una clara pérdida de selectividad (entrada 3).

Tabla I.1. Resolución cinética clásica del alcohol (\pm)-*trans*-2 utilizando diferentes preparados de PSL, 3 equivalentes de acetato de vinilo (**3**) como donador de acilo a 250 rpm.

$(\pm)\text{-trans-2} + \text{3} \xrightarrow[\text{Disolvente orgánico, T, 48 h, 250 rpm}]{\text{Lipasa}}$
 $(2R,3R)\text{-4} + (2S,3S)\text{-2}$

Entrada	Enzima ^a	Dvte	T (°C)	ee_p (%) ^b	ee_s (%) ^b	c (%) ^c	E^d
1 ^e	PSL IM (1:1)	THF	30	97	18	16	79
2	PSL IM II (1:1)	THF	30	99	11	10	>200
3	PSL IM II (1:1)	THF	45	95	25	20	50
4	PSL-C I (1:1)	THF	30	95	83	46	102
5	PSL-C I (2:1)	THF	30	95	82	46	99
6	PSL-C I (1:1)	MTB E	30	94	8	8	35

^a Carga de enzima entre paréntesis (relación enzima: alcohol en peso).

^b Excesos enantioméricos de sustrato y producto calculados por HPLC utilizando una columna quiral.

^c Conversión: $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$.

^d Razón enantiomérica: $E = \ln[(1-c) \times (1-ee_p)] / \ln[(1-c) \times (1+ee_p)]$.⁵⁴

^e Reacción a 38 h.

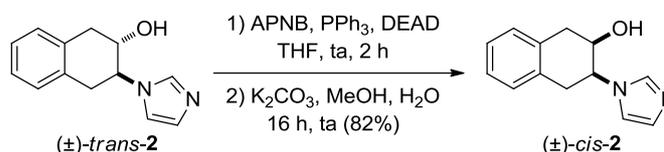
A diferencia de los resultados obtenidos con la lipasa anterior cuando esta se utiliza inmovilizada sobre un soporte cerámico (PSL-C I) se observan conversiones del 46% y altas enantioselectividades (entrada 4). Se intentaron mejorar estos resultados aumentando la carga de enzima pero no condujo a una mayor selectividad. Se evaluaron también, otro tipo de disolventes pero como el 2-metiltetrahidrofurano, el cual no disolvió el alcohol o *tert*-butilmetiléter (TBME) que si bien conseguía disolver bien el

⁵⁴ C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *102*, 7294.

alcohol mostró peores resultados en términos de selectividad y llevo a conversiones mucho más bajas que con THF.

I.3.2. Resolución cinética del (\pm)-*cis*-3-(1*H*-imidazol-1-il)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol

Para explorar la reactividad del derivado (\pm)-*cis* de este tipo de compuestos nos propusimos conseguir su síntesis a través de una inversión de Mitsunobu seguido de un paso de una desprotección como se indica en el esquema I.10, para ello partiendo del correspondiente derivado *trans* se utilizó el ácido *para*-nitrobenzoico (APNB), trifenilfosfina (Ph₃P) y azadicarboxilato de dietilo (DEAD) en THF para realizar la inversión de la posición 2. A continuación se realizó el paso de desprotección, sin aislamiento del intermedio, utilizando una mezcla de agua/metanol en medio básico. Obteniéndose así el alcohol (\pm)-*cis*-2 con un rendimiento del 82%.



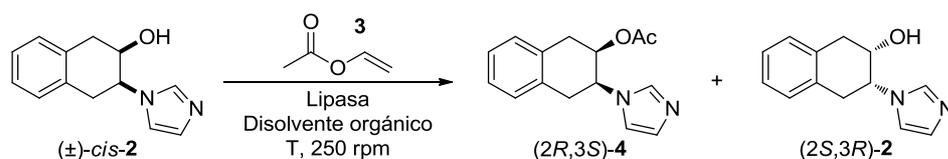
Esquema I.10. Transformación del alcohol (\pm)-*trans*-2 en el alcohol racémico (\pm)-*cis*-2 mediante inversión de Mitsunobu y posterior desprotección.

Una vez sintetizado el alcohol (\pm)-*cis*-2 se procedió a estudiar su resolución cinética usando diferentes preparados de PSL y CAL-B, pero desafortunadamente solo la PSL mostró buenos resultados (Tabla I.2). Todas las reacciones se realizaron en THF para asegurar la correcta solubilización del sustrato de partida, con 3 equivalentes de acetato de vinilo.

En cuanto a los resultados obtenidos, las PSL inmovilizadas sobre diatomitas mostraron buenas selectividades en la formación del correspondiente acetato pero muy bajas conversiones (entradas 1 y 2). Por

otro lado, cuando se utilizó la PSL-C I en THF se consiguió una conversión del 32% con 97% de *ee* del acetato, nos decidimos a probar otro disolvente como el TBME pero, si bien condujo a una mejor estereodiscriminación, la conversión fue mucho más baja (entrada 4). Tratando de aumentar las conversiones para aproximarnos al ideal del 50%, se decidió aumentar la temperatura y la carga de enzima, pero si bien las conversiones fueron superiores a tiempos más cortos, se observó una pérdida de selectividad que nos llevó a abandonar esta vía (entradas 5, 6 y 7).

Tabla I.2. Resolución cinética clásica del alcohol (\pm)-*cis*-**2** utilizando diferentes preparados de PSL, 3 equivalentes de acetato de vinilo **3** como donador de acilo a 250 rpm.



Entrada	Enzima ^a	T (°C)	t (h)	<i>ee_p</i> (%) ^b	<i>ee_s</i> (%) ^b	<i>c</i> (%) ^c	<i>E</i> ^d
1	PSL IM (1:1)	30	48	95	15	14	45
2	PSL IM I (1:1)	30	48	99	7	7	>200
3	PSL-C I (1:1)	30	48	97	45	32	102
4 ^e	PSL-C I (1:1)	30	48	99	9	8	>200
5	PSL-C I (2:1)	30	24	86	54	39	22
6	PSL-C I (2:1)	45	24	95	71	43	83
7	PSL-C I (2:1)	60	24	86	94	53	47

^a Carga de enzima entre paréntesis (relación enzima: alcohol en peso).

^b Excesos enantioméricos de sustrato y producto calculados por HPLC utilizando una columna quiral.

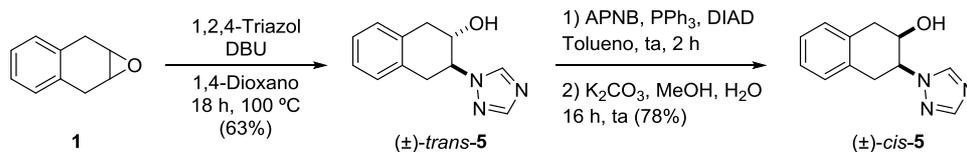
^c Conversión: $c = ees/(ees+ee_p)$.

^d Razón enantiomérica: $E = \ln[(1-c) \times (1-ee_p)] / \ln[(1-c) \times (1+ee_p)]$.⁵⁴

^e TBME como disolvente.

Una vez evaluada la reactividad de los derivados *cis* y *trans* derivados de imidazol nos propusimos realizar los mismos estudios pero con los derivados de triazol. Para ello en un primer momento, se probó la misma ruta sintética que para el compuesto **2** pero en el paso de apertura del epóxido se observaron mezclas del triazol deseado con el isómero simétrico

(Esquema I.11). Buscando minimizar la obtención de este producto, se probó a utilizar 1 equivalente del 1,2,4-triazol y 2 equivalentes de 1,8-diazabicycloundec-7-eno (DBU) que actúa como base consiguiendo llegar a un 63% de rendimiento aislado tras purificación por cromatografía de columna, sin apreciar formación alguna del producto no deseado. Para la síntesis del derivado (\pm)-*cis* se realizó en condiciones idénticas a las utilizadas para el imidazol (\pm)-*cis*-**2** consiguiendo un rendimiento del 78%. Posteriormente tras un trabajo de optimización de la reacción, este rendimiento se consiguió llevar al 83% utilizando tolueno como disolvente en lugar de THF y azadicarboxilato de diisopropilo (DIAD) en vez del DEAD.



Esquema I.11. Síntesis de los triazoles racémicos (\pm)-*trans*-**5** y (\pm)-*cis*-**5**.

I.3.3. Resolución cinética del (\pm)-*cis*- y (\pm)-*trans*-3-(1*H*-triazol-1-il)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol

Para la resolución de estos derivados se utilizaron las condiciones previamente optimizadas para el sustrato **2**, es decir, 3 equivalentes de acetato de vinilo, THF como donador de acilo, THF como disolvente (0.1 M), a 30 °C y con una relación en peso enzima:sustrato 1:1 (Tabla I.3). Para estos sustratos en todos los casos se consiguieron selectividades mucho mejores que para los derivados imidazol lo que indica que la presencia de un átomo de nitrógeno más en la molécula tiene un claro efecto beneficioso en la actividad de la PSL. Así, con el alcohol *trans*-**5** se consiguió resolver de forma satisfactoria con un 48% de conversión y un 99% de *ee* cuando se utiliza la PSL-C I como biocatalizador (entrada 3).

Tabla I.3. Resolución cinética clásica de los alcoholes (\pm)-*trans*-**5** y (\pm)-*cis*-**5** utilizando diferentes preparados de PSL, 3 equivalentes de acetato de vinilo (**3**) como donador de acilo a 250 rpm.

Entrada	(\pm)- 5	Enzima	ee_p (%) ^a	ee_s (%) ^a	c (%) ^b	E^c
1	<i>trans</i>	PSL IM	98	35	28	140
2	<i>trans</i>	PSL IM II	99	19	19	>200
3	<i>trans</i>	PSL-C I	99	93	48	>200
4	<i>cis</i>	PSL IM II	99	7	7	>200
5	<i>cis</i>	PSL-C I	>99	29	23	>200

^a Excesos enantioméricos de sustrato y producto calculados por HPLC utilizando una columna quirál.

^b Conversión: $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$.

^c Razón enantiomérica: $E = \ln[(1-c) \times (1-ee_p)] / \ln[(1-c) \times (1+ee_p)]$.⁵⁴

I.3.4. Resolución cinética del (\pm)-*trans*-y (\pm)-*cis*-1-(1*H*-imidazol-1-il)-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-2-ol

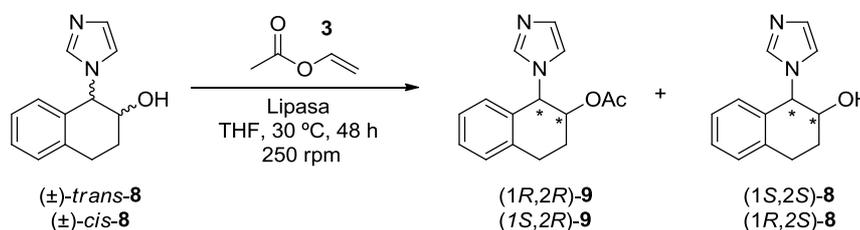
Basándonos en las excepcionales propiedades contra la leishmaniosis mostrada por los derivados racémicos de estos tetrahidronaftoles derivados de imidazol, nos planteamos llevar a cabo su resolución cinética. Para la síntesis del racémico *trans* se siguió una ruta sintética similar a la descrita en la bibliografía,⁵⁵ después para preparar el derivado (\pm)-*cis*-**8** se realizó a través de la misma ruta sintética utilizada previamente para la síntesis del triazol (\pm)-*cis*-**5** obteniéndose este sustrato con un 81% de rendimiento a partir del derivado *trans*.

Finalmente se estudió la resolución cinética de ambos isómeros observándose que tanto la PSL como la CAL-B mostraban algún tipo de actividad con estos sustratos, siendo la PSL-C I (entradas 2 y 5, Tabla I.4) la

⁵⁵ V. K. Marrapu, N. Srinivas, M. Mittal, N. Shakya, S. Gupta, K. Bhandari, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1407.

que mejores resultados muestra tanto para el alcohol (\pm)-*trans*-**8** (43% de conversión, 96% *ee* del acetilado) como para el derivado (\pm)-*cis*-**8** (50% de conversión, 98% *ee*).

Tabla I.4. Resolución cinética clásica de los alcoholes (\pm)-*trans*-**8** y (\pm)-*cis*-**8**, 3 equivalentes de acetato de vinilo **3** como donador de acilo a 250 rpm.



Entrada	(\pm)- 8	Enzima	<i>ee_p</i> (%) ^a	<i>ee_s</i> (%) ^a	<i>c</i> (%) ^b	<i>E</i> ^c
1	<i>trans</i>	PSL IM	>99	<3	<3	>200
2	<i>trans</i>	PSL-C I	96	85	19	133
3	<i>trans</i>	CAL-B	>99	41	30	>200
4	<i>cis</i>	PSL IM II	----	----	----	----
5	<i>cis</i>	PSL-C I	98	98	50	>200
6	<i>cis</i>	CAL-B	----	----	----	----

^a Excesos enantioméricos de sustrato y producto calculados por HPLC utilizando una columna quiral.

^b Conversión: $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$.

^c Razón enantiomérica: $E = \ln[(1-c) \times (1-ee_p)] / \ln[(1-c) \times (1+ee_p)]$.⁵⁴

Conclusiones

En este capítulo se describe la síntesis química de *cis* y *trans*-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)tetrahidronaftalenoles y *trans*-3-(1*H*-imidazol-1-il)tetrahidronaftalenoles con muy buenos rendimientos, así como de sus correspondientes derivados acetilados con el fin de desarrollar métodos de HPLC empleando columnas de relleno quiral.

Para llevar a cabo su resolución por acilación enzimática se ha estudiado el comportamiento de diversas lipasas, siendo la de *Pseudomonas cepacia* la que ha mostrado una excelente selectividad utilizando acetato de vinilo como agente acilante y THF como disolvente, obteniéndose los compuestos acetilados con elevados excesos enantioméricos.

Por último en el caso de la resolución de *cis* y *trans*-1-(1*H*-imidazol-1-il)tetrahidronaftalenoles, la CAL-B mostró los mejores resultados en la resolución del isómero *trans*, mientras que la PSL mostró la mejor selectividad con derivado *cis*.

Los resultados de este trabajo de investigación se encuentran recogidos en el artículo titulado “*Asymmetric synthesis of azolium-based 1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-ols through lipase-catalyzed resolutions*” de D. Méndez-Sánchez, N. Ríos-Lombardía, V. Gotor y V. Gotor-Fernández, que ha sido publicado en *Tetrahedron: Asymmetry*, **2015**, *26*, 760-767.

Parte experimental

1.5.1. Información general

1.5.1.1. Disolventes y reactivos generales

Las lipasas PSL-IM (943 U/g) y la PSL-IM II (816 U/g) inmovilizadas sobre diatomita fueron donadas por Amano Pharmaceutical. Las lipasas de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre partículas de cerámica (PSL-C I, 1950 U/g), la de *Pseudomonas fluorescens* (AK, 23700 U/mg), la lipasa de *Candida Rugosa* (CRL, 1410 U/g), la lipasa de páncreas porcino (PPL, 46 U/mg) y de *Candida cylindracea* (CCL, 1.41 U/mg) se adquirieron a Sigma-Aldrich. Las lipasas de *Rhizomucor miehei* (RML, 150 U/g), de *Thermomyces lanuginosus* (TLL, 250 IUN/g) y de *Candida antarctica* de tipo B (Novozyme SP-435L, CAL-B, 7300 PLU/g) inmovilizada por adsorción sobre Lewait E fueron donadas por Novozymes. La lipasa de *Candida antarctica* de tipo A (CAL-A, 2.6 U/mg de sólido) se adquirió a Codexis.

Todo el resto de reactivos se compraron a Aldrich, Fluka o Alfa Aesar y se usaron sin modificación alguna. En todos los casos se utilizaron disolventes con alto grado de pureza y en los casos necesarios fueron secados con sodio (tetrahidrofurano, dioxano y *tert*-butilmetiléter) o hidruro de cálcico (diclorometano, acetonitrilo y metanol) y almacenados bajo nitrógeno.

1.5.1.2. Cromatografía

Para la cromatografía de capa fina (TLC, *Thin-layer chromatography*) se usaron placas de sílica Merck Gel 60 F254 y se visualizaron utilizando una lámpara de UV y un revelador de permanganato potásico (1% KMnO₄, 5% K₂CO₃ y 5% NaOH).

Para la cromatografía de columna se utilizó sílica gel 60 (230-400 mesh).

Capítulo I: Resolución cinética de aminoalcoholes derivados de imidazol y triazol

Para los análisis de cromatografía de gases se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard 6890 Series II usando como columnas: las acquirales HP-1 (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm), HP-5 (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm) y las quirales CP-Chirasil-DEX-CB (25 m × 0.25 mm × 0.25 μm) y Rt-β-dexe (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm).

Los análisis de HPLC se realizaron con un cromatógrafo de marca Hewlett Packard 1100 LC, con detección UV a longitudes de onda de 210 y 215 nm. Las columnas utilizadas fueron las Chiralcel OJ-H, OD-H y AS, así como las Chiralpak IA e IC. Como fase móvil se utilizaron mezclas de hexano y 2-propanol.

1.5.1.3. Espectroscopía infrarroja (IR)

Los espectros de IR se midieron en un espectrómetro Perkin-Elmer 1720-X infrared Fourier con pastillas de NaCl. Las bandas de absorbancia se describen en su máximo (ν) y se expresan en cm^{-1} .

1.5.1.4. Puntos de fusión

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Gallenkamp en tubos abiertos y son mostrados sin corrección alguna.

1.5.1.5. Espectrometría de masas (EM)

Los experimentos de espectrometría de masas por ESI^+ o APCI^+ se realizaron en un Finigan MAT 95 acoplado a un cromatógrafo HP1100 y para los ESI-TOF HRMS (masas de alta resolución) en un espectrómetro Bruker MicroTofQ. Los resultados se muestran en unidades de masa atómica (uma).

1.5.1.6. Resonancia magnética nuclear (RMN)

^1H -, ^{13}C -RMN y DEPT se obtuvieron usando los espectrómetros Bruker DPX-300 (^1H , 300.13 MHz y ^{13}C , 75.5 MHz) y Bruker AV-300 (^1H ,

300.13 MHz y ^{13}C , 75.5 MHz). Los desplazamientos químicos (δ) se dan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz).

Correlaciones homonucleares escalares (^1H - ^1H) con una secuencia de pulsos COSY.

Correlaciones homonucleares bipolares (^1H - ^1H) con una secuencia de pulsos NOESY.

Correlaciones heteronucleares escalares (^1H - ^{13}C) a través de varios enlaces con una secuencia HMBC.

Correlaciones heteronucleares escalares (^1H - ^{13}C) a través de un enlace con una secuencia HSQC.

1.5.1.7. Rotación óptica

Las rotaciones ópticas se midieron con un polarímetro Perkin-Elmer 241 y las unidades vienen dadas en 10^{-1} grado $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$.

1.5.3. Síntesis de los amino alcoholes derivados de imidazol (\pm)-trans-2 a partir del correspondiente epóxido

En un tubo sellado se añade una disolución de imidazol (227 mg, 3.23 mmol), epóxido **1** (403 mg, 2.77 mmol) en 1,4-dioxano (1.4 mL) y se deja reaccionar a 120 °C hasta la desaparición completa del producto de partida. A continuación, se evapora el disolvente bajo presión reducida y el crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (2-6% MeOH/ CH_2Cl_2), aislando el alcohol (\pm)-trans-**2** como un sólido blanco (73%).

1.5.4. Síntesis de los aminoalcoholes derivados de imidazol (\pm)-cis-2 a partir del amino alcohol trans

Reacción de Mitsunobu: A una suspensión del alcohol (\pm)-trans-**2** (100 mg, 1.68 mmol) en THF seco (25.4 mL), se adicionan sucesivamente APNB (625 mg, 3.73 mmol), PPh_3 (981 mg, 3.73 mmol) y DEAD (683 μL , 3.73 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agita durante 2 h, no

siendo detectado después de ese tiempo material de partida mediante análisis de cromatografía de capa fina (10% MeOH/CH₂Cl₂). Se evapora el disolvente bajo presión reducida, y el crudo que contiene el éster no se purifica empleándose en el posterior paso de desprotección.

Paso de desprotección: A una disolución del crudo de la reacción de inversión de Mitsunobu en una mezcla de MeOH y H₂O (3.1 mL/3.1 mL), se le añade K₂CO₃ (514 mg, 3.73 mmol) y se agita durante 16 h. El MeOH se evapora bajo presión reducida y la suspensión resultante se disuelve en H₂O (15 mL) a la que se adiciona una disolución de brine (5 mL), y se extrae con AcOEt (3×20 mL). Se combinan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄, se filtra la disolución y el disolvente se evapora bajo presión reducida. El crudo resultante se purifica por columna cromatográfica (2-6% MeOH/CH₂Cl₂) aislándose el alcohol (±)-*cis*-**2** como un sólido blanco (82%).

*1.5.5. Síntesis del amino alcohol derivado de triazol (±)-*trans*-5 a partir del correspondiente epóxido*

Sobre una disolución de 1,2,4-triazol (96 mg, 1.38 mmol) y óxido de 1,4-dihidronaftaleno (**1**, 200 mg, 1.38 mmol) en 1,4-dioxano (1.8 mL), se adiciona gota a gota DBU (0.42 mL, 2.76 mmol) en 1,4-dioxano (0.42 mL) durante 1 hora empleando un embudo de adición. La disolución resultante se agita a 100 °C durante 18 horas, transcurrido este tiempo se elimina el disolvente por destilación a presión reducida. El crudo resultante se purifica por cromatografía de columna (2-10% MeOH/CH₂Cl₂), aislándose el alcohol racémico (±)-*trans*-**5** como un sólido blanco (63%)

*1.5.6. Síntesis de los amino alcoholes derivados de triazol (±)-*cis*-5 a partir del correspondiente aminoalcohol *trans**

Reacción de Mitsunobu: Una suspensión del alcohol (±)-*trans*-**5** (0.47 mmol) en tolueno seco (6.8 mL), se adiciona sucesivamente APNB (156 mg, 0.93 mmol), PPh₃ (246 mg, 0.93 mmol), esta suspensión calienta hasta disolución completa y después se deja enfriar, a continuación se añade

DIAD (181 μ L, 0.93 mmol) todo ello bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agita durante 2 h, no siendo detectado después de ese tiempo material de partida mediante análisis de cromatografía de capa fina (1-2% MeOH/CH₂Cl₂). Se evapora el disolvente bajo presión reducida, y el crudo que contiene el éster no se purifica empleándose en el posterior paso de desprotección.

Paso de desprotección: A una disolución del crudo de la reacción de inversión de Mitsunobu en una mezcla de MeOH y H₂O (800 μ L/ 800 μ L), se le añade K₂CO₃ (140 mg, 0.93 mmol) y se agita durante 16 h. El MeOH se evapora bajo presión reducida y la suspensión resultante se disuelve en H₂O (7 mL) a la que se adiciona una disolución de brine (3 mL), y se extrae con AcOEt (4 \times 10 mL). Se combinan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄, se filtra la disolución y el disolvente se evapora bajo presión reducida. El crudo resultante se purifica por columna cromatográfica (2-6% MeOH/CH₂Cl₂) aislándose el alcohol (\pm)-*cis*-**5** como sólido blanco (83% de rendimiento).

*I.5.7. Síntesis del amino alcohol derivado de triazol (\pm)-*trans*-**8**.*

El alcohol (\pm)-*trans*-**8** se sintetiza siguiendo el protocolo descrito por Marrapu y colaboradores.⁵⁵

*I.5.8. Síntesis del amino alcohol derivado de triazol (\pm)-*cis*-**8** a partir del correspondiente alcohol *trans**

Reacción de Mitsunobu: Una suspensión del alcohol (\pm)-*trans*-**8** (100, 0.47 mmol) en tolueno seco (6.8 mL), se adiciona sucesivamente APNB (156 mg, 0.93 mmol), PPh₃ (246 mg, 0.93 mmol), esta suspensión calienta hasta disolución completa y después se deja enfriar, a continuación se añade DIAD (181 μ L, 0.93 mmol) todo ello bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agita durante 2 h, no siendo detectado después de ese tiempo material de partida mediante análisis de cromatografía de capa fina (1-2% MeOH/CH₂Cl₂). Se evapora el disolvente bajo presión reducida, y el crudo

que contiene el éster no se purifica empleándose en el posterior paso de desprotección.

Paso de desprotección: A una disolución del crudo de la reacción de inversión de Mitsunobu en una mezcla de MeOH y H₂O (800 μ L/800 μ L), se le añade K₂CO₃ (140 mg, 0.93 mmol) y se agita durante 16 h. El MeOH se evapora bajo presión reducida y la suspensión resultante se disuelve en H₂O (7 mL) a la que se adiciona una disolución de brine (3 mL), y se extrae con AcOEt (4 \times 10 mL). Se combinan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄, se filtra la disolución y el disolvente se evapora bajo presión reducida. El crudo resultante se purifica por columna cromatográfica (2-6% MeOH/CH₂Cl₂) aislándose el alcohol (\pm)-*cis*-**8** como un sólido blanco (76%).

I.5.9. Procedimiento general para la síntesis de los alcoholes raecémicos acetilados *trans*-4, *cis*-4, *trans*-6, *cis*-6, *trans*-9 y *cis*-9

Sobre una disolución del correspondiente alcohol racémico (0.14 mmol) en CH₂Cl₂ seco (1.4 mL) se añade sucesivamente, NEt₃ (59 μ L, 0.42 mmol), DMAP (5 mg, 0.04 mmol) y Ac₂O (26 μ L, 0.28 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agita durante 2 h y transcurrido este tiempo se elimina el disolvente por destilación a presión reducida. El crudo resultante se purifica por cromatografía de columna (1-3% MeOH/CH₂Cl₂), aislándose los acetatos correspondientes con rendimientos (89-97%).

I.5.10. Procedimiento general para la resolución cinética enzimática de los alcoholes racémicos *trans*-2, *cis*-2, *trans*-5, *cis*-5, *trans*-8 y *cis*-8

Sobre una suspensión del correspondiente alcohol (30 mg, 0.14 mmol) y la enzima correspondiente, se añade acetato de vinilo (39 μ L, 0.42 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La reacción se agita a 250 rpm durante el tiempo necesario a 30 °C. Las alícuotas son tomadas regularmente para el seguimiento de la reacción y estas se detienen a las 38 o 48 h. El enzima se filtra utilizando CH₂Cl₂ (3 \times 5 mL), el disolvente se evapora bajo presión reducida y el crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna

Capítulo I: Resolución cinética de aminoalcoholes derivados de imidazol y triazol

(2-10% MeOH/CH₂Cl₂) obteniendo los correspondientes alcoholes y acetatos con elevada pureza óptica.

Trabajo de investigación

Capítulo II: Desimetrización enzimática de
meso-1,2-diaril-1,2-diaminoetanos

Antecedentes

Las diaminas forman parte del esqueleto estructural de numerosos productos naturales y compuestos bioactivos,⁵⁶ además de servir como precursores sintéticos de un gran número de derivados nitrogenados con importantes aplicaciones en el campo de la química médica⁵⁷ o la química de materiales.⁵⁸ En la Figura II.1 se han representado la estructura de dos diaminas como son *cis*-diaminodicloroplatino (II), también conocido como cisplatino, que es un medicamento ampliamente empleado en quimioterapia, y el complejo $\text{ZnTe}(\text{bda})_{0.5}$ con excelentes propiedades como conductor eléctrico.

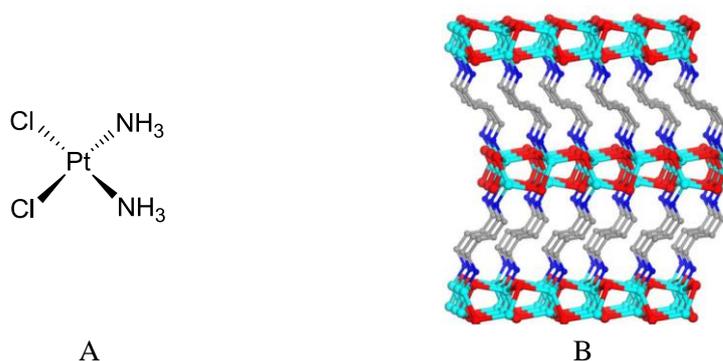


Figura II.1. A) Estructura del cisplatino, fármaco con actividad antitumoral; B) α - $\text{ZnTe}(\text{bda})_{0.5}$ compuesto cristalino utilizado como semiconductor (N, C, Zn, Te).

Las diaminas ópticamente activas entre las que destaca particularmente la 1,2-ciclohexanodiamina, presentan un gran abanico de posibilidades en síntesis asimétrica, como auxiliares quirales o ligandos (Figura II.2).⁵⁹ Además, la presencia de dos grupos amino en su estructura

⁵⁶ (a) S. R. S. S. Kotti, C. Timmons, G. Li, *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, *67*, 101; (b) G. F. Busscher, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *Chem. Rev.* **2005**, *105*.

⁵⁷ R. A. Casero Jr., P. M. Woster, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4551.

⁵⁸ X. Huang, M. Roushan, T. J. Emge, W. Bi, S. Thiagarajan, J. Cheng, R. Yang, J. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7871.

⁵⁹ (a) D. S. Surry, S. L. Buchwald, *Chem. Sci.* **2010**, *1*, 13; (b) C. Anaya de Parodi, E. Juaristi, *Synlett* **2006**, 2699; (b) J. González-Sabín, F. Rebolledo, V. Gotor, *Chem. Soc.*

da lugar a múltiples posibilidades en cuanto a su funcionalización, ventaja que ha sido aprovechada para la preparación de estructuras macrocíclicas.⁶⁰ Este tipo de compuestos han sido empleados con éxito en diversas aplicaciones, ya sea como agentes de solvatación quirales o receptores aniónicos entre otras.⁶¹

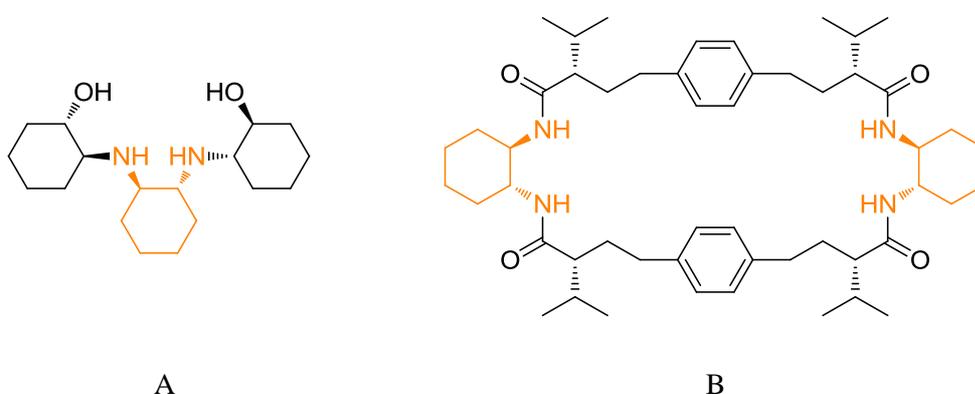


Figura II.2 A) Auxiliar quiral empleado en un gran número de procesos químicos; B) Macrociclo en el que está presente el bloque diamino.

Como ya se ha explicado en la introducción general, las desimetrizaciones son transformaciones asimétricas que presentan como principal característica que al partir de formas *meso* o compuestos proquirales, se puede alcanzar un rendimiento máximo teórico del 100%. En la bibliografía existen un gran número de ejemplos de este tipo de procesos llevados a cabo con catalizadores metálicos u organocatalizadores.⁶² Sin embargo, en este capítulo nos centraremos únicamente en los procesos de desimetrización catalizados por enzimas, los cuales han adquirido una gran relevancia en los últimos años.³⁵

Rev. **2009**, 38, 1916; (d) F. Cardona, A. Goti, *Nat. Chem.* **2009**, 1, 269; (e) J.-C. Kizirian, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 140.

⁶⁰ I. Alfonso, *Mini-Rev. Org. Chem.* **2008**, 5, 33.

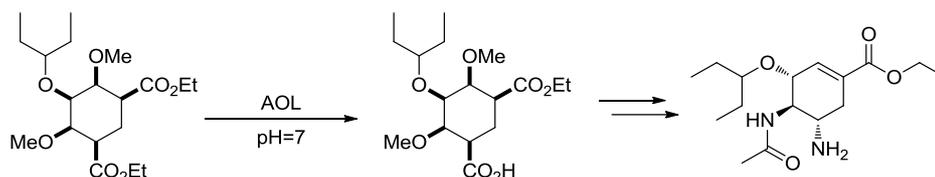
⁶¹ I. Alfonso, *Curr. Org. Synth.* **2010**, 7, 1.

⁶² H. Fernández-Pérez, P. Etayo, J. R. Lao, J. L. Núñez-Rico, A. Vidal-Ferran, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 10666.

Particularmente, nos centraremos en las desimetrizaciones catalizadas por lipasas, las cuales han permitido la asimetrización de una amplia variedad de sustratos como ácidos carboxílicos, ésteres, nitrilos, dicetonas o dioles. A continuación, se resumen algunos de los ejemplos más significativos descritos en estos últimos años.

II.1.1. Desimetrización enzimática de derivados de ácidos carboxílicos

La desimetrización enzimática de diésteres proquirales ha sido ampliamente estudiada permitiendo desarrollar procesos de hidrólisis selectivos para formar ácidos carboxílicos en medio acuoso, como por ejemplo en la síntesis de Tamiflu descrita por Goswami y Kissick (Esquema II.1).⁶³



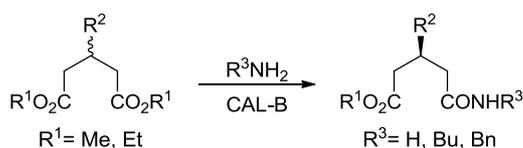
Esquema II.1. Ejemplo de desimetrización enzimática de un precursor del Tamiflu.

También existen ejemplos de desimetrizaciones enzimáticas de diésteres empleando aminas primarias o amoníaco como nucleófilos, en lugar de agua, que son conocidas como reacciones de aminólisis o amonólisis respectivamente (Esquema II.2).⁶⁴

⁶³ A. Goswami, T. P. Kissick, *Org. Process Res. Dev.* **2009**, *13*, 483.

⁶⁴ (a) M. López-García, I. Alfonso, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 603; (b) V. M. Sánchez, F. Rebolledo, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1464.

Capítulo II: Desimetrización enzimática de meso-1,2-diaril-1,2-diaminoetanos

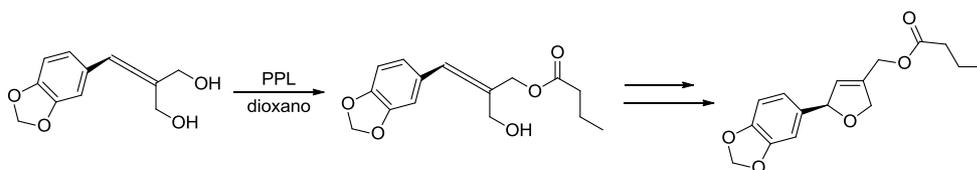


Esquema II.2. Ejemplo de desimetrización enzimática mediante un proceso de aminólisis o amonólisis.

II.1.2. Desimetrización enzimática de dioles

Existen dos posibilidades para la desimetrización de dioles en función del biocatalizador empleado, bien usar alcohol deshidrogenasas para realizar la oxidación selectiva de uno de los grupos alcohol, dando lugar a un grupo cetona, aldehído o ácido carboxílico, o bien emplear una lipasa capaz de acilar selectivamente uno de los grupos hidroxilo.⁶⁵

Cabe destacar el trabajo desarrollado por Deska y colaboradores acerca de la desimetrización de dioles alénicos (Esquema II.3),⁶⁶ sustratos muy versátiles como precursores de productos naturales con elevado interés farmacológico como el hyperion.



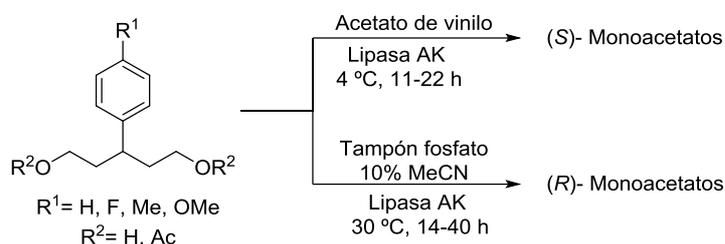
Esquema II.3. Desimetrización de dioles para la síntesis de un fármaco útil en el tratamiento de la diabetes de tipo II comercializado bajo el nombre de hyperion.

En este apartado nuestro grupo posee una amplia experiencia, habiendo desarrollado la desimetrización de 3-aril-1,5-pentanodioles empleando acetato de vinilo y la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens*

⁶⁵ (a) R. Chênevert, G. Courchesne, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 7971; (b) K. Shimada, Y. Kauragi, T. Fukuyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 4048. (c) J.-Y. Zheng, S.-F. Wang, Y.-J. Zhang, X.-X. Ying, Y.-g. Wang, Z. Wang, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, 98, 37.

⁶⁶ (a) M. Hammel, J. Deska, *Synthesis* **2012**, 44, 3789; (b) C. M. Sapu, J.-E. Bäckvall, J. Deska, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 9731.

obteniendo los (*S*)-monoacetatos en forma enantiopura y moderados rendimientos⁶⁷. Alternativamente, las hidrólisis de los correspondientes diacetatos permitió el acceso a los (*R*)-monoacetatos complementarios de manera selectiva (Esquema II.4).



Esquema II.4. Desimetrización enzimática de dioles o diésteres utilizando la lipasa AK como catalizador.

II.1.3. Desimetrización enzimática de diaminas

Si bien la resolución enzimática de aminas racémicas ha sido ampliamente estudiada en la literatura,⁶⁸ los ejemplos existentes en la bibliografía sobre las desimetrizaciones de diaminas tanto proquirales como en sus formas *meso* son muy escasos.

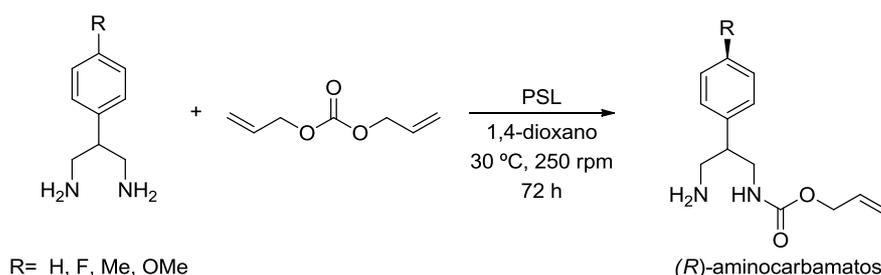
Nuestro grupo de investigación ha trabajado activamente en este campo,⁶⁹ habiendo descrito por primera vez la desimetrización de diaminas en un medio completamente anhidro, siendo la PSL un biocatalizador muy efectivo. Así, tras reacción con el carbonato de dialilo en 1,4-dioxano, se obtuvieron, una serie de monocarbamatos de alilo derivados de 2-aril-1,3-

⁶⁷ N. Ríos-Lombardía, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 811.

⁶⁸ (a) V. Gotor-Fernández, F. Rebolledo, V. Gotor, "Preparation of Chiral Pharmaceuticals through Enzymatic Acylation of Alcohols and Amines" en *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*. Ed. R. M. Patel. Capítulo 7, 203-248. Taylor and Francis. New York (USA). **2007**; (b) V. Gotor, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2189.

⁶⁹ (a) N. Ríos-Lombardía, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 484; (b) N. Ríos-Lombardía, E. Busto, E. Gracia-Urdiales, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2571; (c) E. Busto, V. Gotor-Fernández, J. Montejó-Bernardo, S. García-Granda, V. Gotor, *Tetrahedron* **2009**, 8393; (d) E. García-Urdiales, E. Busto, N. Ríos-Lombardía, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2875.

propanodiaminas con buenos rendimientos y excesos enantioméricos entre altos y excelentes (Esquema II.5).⁷⁰



Esquema II.5. Desimetrización de 1,3-propanodiaminas en medio orgánico usando PSL como biocatalizador y carbonato de dialilo como agente alcoxycarbonilante.

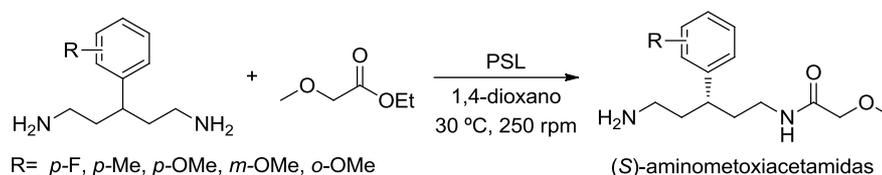
Años más tarde se llevó a cabo la desimetrización enzimática de 3-aryl-1,5-pentanodiaminas con buenas selectividades catalizada por la PSL, donde en este caso las mejores selectividades se encontraron para la formación de las correspondientes (S)-metoxiacetamidas en lugar de monocarbamatos de alilo, empleando para ello el metoxiacetato de etilo como agente acilante y 1,4-dioxano como disolvente (Esquema II.6).⁷¹ Estos derivados de la cadaverina poseen importancia al presentar actividad anticancerígena, además de tener gran relevancia como sintones de un elevado número de polímeros, semiconductores o productos naturales.⁷²

⁷⁰ E. Busto, V. Gotor-Fernández, J. Montejo-Bernardo, S. García-Granda, V. Gotor, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4203.

⁷¹ N. Ríos-Lombardía, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5709.

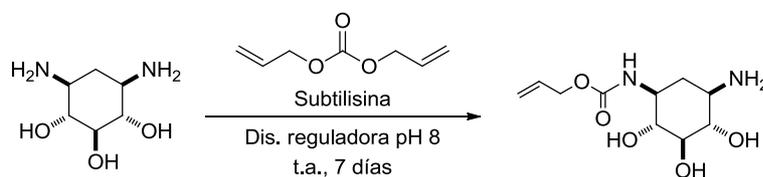
⁷² (a) C. Bazzicalupi, A. Bencini, V. Lippolis, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3709; (b) X. Huang, M. Roushan, T. J. Emge, W. Bi, S. Thiagarajan, J.-H. Cheng, R. Yang, J. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7871.

Capítulo II: Desimetrización enzimática de *meso*-1,2-diaril-1,2-diaminoetanos



Esquema II.6. Desimetrización enzimática de 3-aril-1,5-pentanodiaminas mediante procesos de acilación con metoxiacetato de etilo y catalizados por la PSL.

Por otro lado, la asimetrización de *meso*-diaminas ha sido menos estudiada en comparación con la modificación selectiva de diaminas proquirales. Wong y colaboradores describieron por primera vez la desimetrización enzimática de una diamina, usando una proteasa como es la subtilisina para catalizar de forma mono- y estereoselectiva la reacción de alcoxicarbonilación de la diamina con el carbonato de dialilo, empleando una disolución reguladora como medio de reacción (Esquema II.7).⁷³



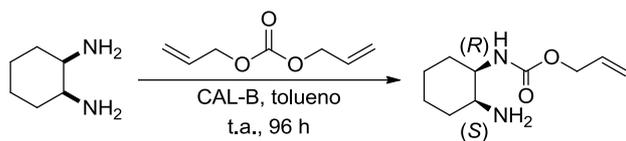
Esquema II.7. Desimetrización de una diamina en medio acuoso empleando carbonato de dialilo y la subtilisina en medio acuoso.

Berkessel y colaboradores han descrito la desimetrización de *meso*-1,2-ciclohexanodiamina, en un medio completamente orgánico, usando carbonato de dialilo como agente alcoxicarbonilante y CAL-B como biocatalizador en tolueno como disolvente (Esquema II.8).⁷⁴

⁷³ B. Orsat, P. B. Alper, W. Moree, C. Mak, C. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 712.

⁷⁴ A. Berkessel, M.-C. Ong, J.-M. Neudörfl, *ChemCatChem.* **2010**, *2*, 1215.

Capítulo II: Desimetrización enzimática de *meso*-1,2-diaril-1,2-diaminoetanos



Esquema II.8. Desimetrización de *meso*-1,2-ciclohexanodiamina catalizada por la CAL-B en tolueno.

Objetivos

Aprovechando el potencial de las lipasas para llevar a cabo procesos asimétricos sobre aminas, nos hemos planteado el desarrollo de una metodología enzimática sencilla para llevar a cabo la desimetrización enzimática de *meso*-1,2-diaminas, procesos escasamente descritos en la bibliografía como ha quedado de manifiesto en los antecedentes de este capítulo.

Para ello se sintetizará una familia de *meso*-1,2-diaril-1,2-diaminoetanos empleando métodos químicos convencionales.

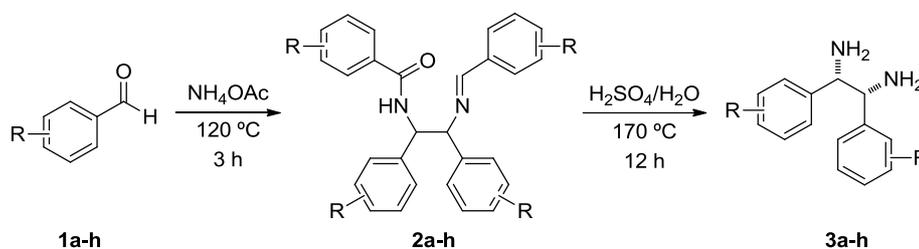
Se llevará a cabo una optimización de parámetros que afectan a la catálisis enzimática como puedan ser la temperatura, carga de enzima o el tiempo de reacción, con el fin de obtener selectivamente aminocarbamatos con buen rendimiento y elevada pureza óptica.

Finalmente se determinará la configuración absoluta de los monocarbamatos obtenidos mediante análisis de difracción de rayos X y dicroísmo circular.

Resultados y discusión

II.3.1 Síntesis de las diaminas racémicas

Adaptando procesos descritos en la bibliografía, se ha llevado a cabo la síntesis de una familia de *meso*-1,2-diaminas,⁷⁵ por reacción entre benzaldehídos con distintas sustituciones en el anillo aromático (**1a-h**) y acetato amónico (NH₄OAc) a 120 °C, seguido por una posterior hidrólisis ácida a 170 °C del correspondiente intermedio **2a-h**. (Esquema II.9).



Esquema II.9. Ruta general para la síntesis de diferentes *meso*-1,2-diaril-1,2-diaminoetanos.

De esta manera ha sido posible la preparación de ocho *meso*-1,2-diaril-1,2-diaminoetanos, los cuales se diferencian en la sustitución presente en el anillo aromático, siendo esta un átomo de halógeno (flúor, cloro o bromo) o bien un grupo metilo. Los rendimientos obtenidos tras purificación por columna en gel de sílice fueron de moderados a excelentes (40-96%), como se muestra en la Tabla II.1.

⁷⁵ M. V. Proskurnina, N. A. Lozinskaya, S. E. Tkachenko, N. S. Zefirov, *Russ. J. Org. Chem.* **2002**, *38*, 1149.

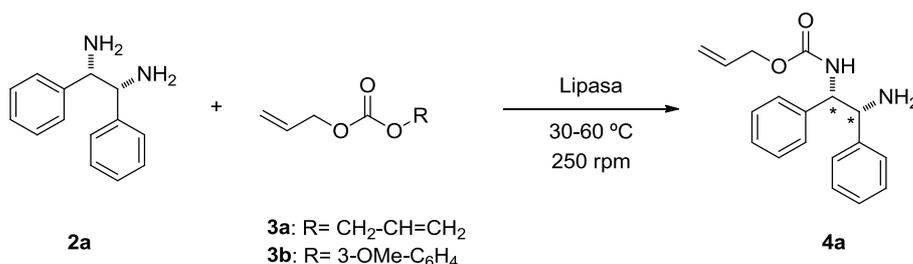
Tabla II.1. Rendimientos obtenidos en la síntesis de las diferentes meso-1,2-etanodiaminas.

Entrada	Aldehído	R	Diamina 2a-h (%) ^a
1	1a	H	71
2	1b	4-F	90
3	1c	4-Cl	98
4	1d	4-Br	40
5	1e	4-Me	70
6	1f	3-Me	78
7	1g	3-Br	96
8	1h	2-Br	60

^a Rendimiento aislado tras cromatografía de columna

II.3.2. Optimización de las condiciones de reacción para el sustrato modelo

Inicialmente se procedió a estudiar la desimetrización enzimática del sustrato modelo meso-1,2-difeniletanodiamina (**2a**), elegido debido a su accesibilidad comercial (Esquema II.10).



Esquema II.10. Desimetrización enzimática para el sustrato modelo **2a**.

Tomando como base las condiciones óptimas obtenidas en nuestro grupo de investigación para la alcoxicarbonilación enzimática de la diamina proquiral 2-fenil-1,3-propanodiamina,⁷⁰ es decir, un equivalente de carbonato de dialilo y 1,4-dioxano como disolvente para una concentración total de la diamina de 0.1 M, no se observó la formación del carbamato deseado con ninguna de las lipasas probadas (CAL-A, CAL-B, CRL, PPL, PSL-IM, PSL-C I, AK y RML).

Vista la nula reactividad presentada por esta diamina **2a** en la reacción de alcoxicarbonilación con el carbonato de dialilo, se decidió emplear un carbonato más reactivo como es el carbonato mixto de alilo y 3-metoxifenilo (**3b**), el cual ha permitido alcanzar excelentes conversiones en el caso de la resolución cinética clásica de aminas secundarias cíclicas.⁷⁶ Así, empleando un exceso del carbonato (2.5 equivalentes), se estudió el comportamiento de todas las lipasas probadas anteriormente, encontrando tras 38 h únicamente una pequeña conversión cuando se empleó la CAL-A, aislando el monocarbamato **4a** con un 13% de rendimiento y un exceso enantiomérico del 52%.

A este punto y para aumentar la conversión del proceso se decidió emplear el propio agente alcoxicarbonilante como disolvente de la reacción, para ello inicialmente se eligió el carbonato de dialilo por su accesibilidad comercial, los resultados más significativos se recogen en la Tabla II.2.

Tabla II.2. Resultados obtenidos en la reacción de desimetrización enzimática del sustrato modelo, utilizando carbonato de dialilo como disolvente a 250 rpm.

Entrada	Enzima	Relación ^a	T (°C)	t (h)	c (%) ^b	ee (%) ^c
1	CAL-A	1:1	30	63	56	86
2	CAL-A	1:1	45	63	91	88
3	CAL-A	1:1	60	14	70	78
4	CAL-A	2:1	45	62	>97 (82)	88
5	RM	1:1	30	62	5	82
6	RM	1:1	60	38	11	51

^a Relación en peso de enzima:diamina **4a**.

^b Conversiones medidas por ¹H-RMN del crudo de la reacción enzimática. Rendimientos aislados de **4a** tras cromatografía de columna.

^c Exceso enantiomérico de **4a** determinado por HPLC.

⁷⁶ (a) G. F. Breen, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1427; (b) V. Gotor-Fernández, P. Fernández-Torres, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2558.

Capítulo II: Desimetrización enzimática de meso-1,2-diaril-1,2-diaminoetanos

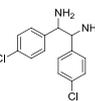
En el caso de la CAL-A se observó que un aumento de la temperatura hasta 45 °C permite aumentar de manera significativa la conversión (56 a 91% tras 63 h), manteniéndose la selectividad de los procesos (88% *ee*, entrada 2). Sin embargo a 60 °C se observa un descenso destacado de la pureza óptica del producto tras 14 h de reacción (78% *ee*, entrada 3). Un aumento de la cantidad de enzima permitió acceder al aminocarbamato **4a** como único producto de reacción y con un 88% *ee* (entrada 4). En el caso de la RML, un aumento drástico de la temperatura llevó a un descenso de la selectividad del proceso, aumentando hasta un 11% la conversión tras 38 h de reacción (entradas 5 y 6).

II.3.3. Extensión de la metodología

Vistos los buenos resultados obtenidos para el sustrato modelo **2a**, se decidió extender el estudio de desimetrización enzimática a otras meso-1,2-diaminas **2b-h**, tomando como partida las mejores condiciones de reacción encontradas, es decir, una relación CAL-A: diamina (2:1), carbonato de dialilo como disolvente (0.1 M) y 45 °C (Tabla II.3). En todos los casos se observaron menores conversiones que en el caso de la diamina **2a**, detectando exclusivamente la formación del correspondiente monocarbamato **4b-g** como producto final de la reacción, excepto el derivado con el bromo en posición *orto* del anillo aromático.

Así, mientras que en el caso de los compuestos con sustituciones en posición 4 del anillo aromático (entradas 2-5), las conversiones fueron entre moderadas y altas (44-88%), siendo esta especialmente elevada para el derivado fluorado (**4b**), bajas conversiones fueron obtenidas para los compuestos con sustituciones en la posición 3 (**4f** y **4g** entradas 6 y 7).

Tabla II.3. Desimetrización de diaminas usando diferentes lipasas (relación 2:1 en peso), carbonato de dialilo como disolvente a 45 °C y 250 rpm.

Entrada	Diamina	Estructura	Enzima	t (h)	c (%) ^a	ee (%) ^b
1	2a		CAL-A	62	>97 (82)	88
2	2b		CAL-A	62	88 (70)	70
3	2c		CAL-A	62	58 (42)	8
4	2d		CAL-A	62	56 (38)	<3
5	2e		CAL-A	62	44 (34)	80
6	2f		CAL-A	62	29 (16)	18
7	2g		CAL-A	86	34 (31)	14
8	2h		CAL-A	62	-----	----
9	2c		CAL-B	62	18 (14)	91
10	2d		CAL-B	62	17 (15)	88

^a Conversiones medidas por ¹H-RMN del crudo de reacción.

^b Excesos enantioméricos de los monocarbamatos **4a-h** determinados por HPLC.

Respecto a las selectividades alcanzadas, cabe destacar su variabilidad en función del sustrato de partida, así los mejores resultados se alcanzaron con los derivados *para*-fluoro y *para*-metilo (**4b** y **4e** entradas 2 y 5), cuyos monocarbamatos de alilo fueron aislados con excesos enantioméricos buenos entre el 70 y el 80%. Sin embargo, los procesos se mostraron mucho

menos selectivos cuando se llevaron a cabo con sustituyentes como bromo o cloro, o bien sustituidos en la posición *meta* del anillo aromático (<20% *ee*, **4c**, **4d**, **4f** y **4g** entradas 3, 4 6 y 7).

Con el fin de encontrar mejores condiciones de reacción para las diaminas que presentan valores más bajos de conversión y de exceso enantiomérico, se decidió estudiar de nuevo el comportamiento de una serie de enzimas en las reacciones de alcoxicarbonilación. En concreto para el caso de la diamina con átomos de bromo en la posición 4 del anillo aromático **2d**, y que había presentado una nula estereoselectividad en la reacción catalizada con la CAL-A (entrada 4 de la Tabla II.), se llevaron a cabo las reacciones en presencia de CRL, PPL, RML y CAL-B observándose buenas conversiones para la formación del aminocarbamato **4d** en el caso de la CAL-A (56%, entrada 4), bajas para el caso de la CAL-B (18%, entrada 10), mientras que para el resto de lipasas las conversiones fueron inferiores al 7%. Sin embargo, la reacción catalizada por la CAL-B (entrada 9), permitió obtener el aminocarbamato de alilo con un 91% *ee*.

A la vista de las buenas selectividades mostradas por la CAL-B para este sustrato y con la idea de mejorar los excesos enantioméricos alcanzados en las reacciones catalizadas por la CAL-A, se decidió realizar un nuevo estudio enzimático con todas las diaminas empleando una relación CAL-B: sustrato 1:1 en peso, carbonato de dialilo como disolvente (0.1 M) y 45 °C de temperatura. Sin embargo, bajo estas condiciones, solo se observó reactividad con la diamina con dos átomos de cloro **4c** en las posiciones 4 de los anillos aromáticos, que permitió acceder al aminocarbamato con un 17% de conversión y un 88% *ee*.

II.3.4. Determinación de la configuración absoluta

Para determinar la configuración absoluta de los centros estereogénicos de los monocarbamatos ópticamente activos, se realizaron diferentes intentos hasta obtener un cristal que pudiese ser medido por análisis de difracción de rayos X. Se seleccionó para este propósito el monocarbamato derivado de bromo sustituido en la posición *para* (**4d**) con

un 91% *ee*, puesto que tiene dos átomos pesados en la molécula que exhiben una dispersión anómala importante y permiten determinar la configuración absoluta de la molécula de manera inequívoca. Una vez los fueron obtenidos los cristales tras una recristalización en acetonitrilo, se procedió a realizar las mediciones de difracción de rayos X que concluyeron que la configuración absoluta del monocarbamato es (1*S*, 2*R*) como se muestra en la Figura II.3.



Figura II.3. Estructura del aminocarbamato (1*S*,2*R*)-**4d** obtenido por desimetrización enzimática usando la CAL-B.

Una vez asignada la configuración absoluta del monocarbamato **4d** obtenido en la reacción de desimetrización catalizada por la CAL-B, se procedió a hacer experimentos de dicroísmo circular de todos los carbamatos que se obtuvieron con buenos excesos enantioméricos, comparando sus espectros con los que presentan los monocarbamatos desimetrizados utilizando CAL-B como catalizador, los cuales ya tienen la configuración absoluta asignada. Basándonos en la intensidad positiva obtenida para todas las moléculas, además de su similitud electrónica, se puede concluir que los monocarbamatos obtenidos por vía enzimática poseen también la misma configuración absoluta, es decir, (1*S*, 2*R*).

Conclusiones

Se ha conseguido desarrollar una metodología simple para acceder a una familia de monocarbamatos de alilo derivados de 1,2-diaril-diaminoetanos, los cuales poseen diferentes sustituciones en los anillos aromáticos.

Se ha realizado un estudio en profundidad del proceso de desimetrización enzimática para el sustrato modelo **2a**, mostrándose la CAL-A como la mejor enzima para realizar esta reacción, cuando se trabaja a 45 °C se utiliza carbonato de dialilo como disolvente. De este modo, se han obtenido unos excelentes resultados en términos de conversión y muy buenos excesos enantioméricos.

También se consiguió realizar de forma exitosa la extensión de esta metodología a una familia de 1,2-diaril-etanodiaminas con diferentes patrones de sustitución en el anillo aromático.

Por otro lado, se estudió la posibilidad de utilizar la CAL-B como una alternativa para este tipo de procesos, mostrándose como la mejor enzima en cuanto a valores de excesos enantioméricos para las diaminas **2c** y **2d**.

Los resultados de este trabajo de investigación se encuentran recogidos en el artículo titulado “*Lipase-catalyzed desymmetrization of meso-diaryl-1,2-diaminoethanes*” de D. Méndez-Sánchez, N. Ríos-Lombardía, S. García-Granda, J. Montejo-Bernardo, A. Fernández-González, V. Gotor y V. Gotor-Fernández, que ha sido publicado en *Tetrahedron: Asymmetry* **2014**, 25, 381.

Parte experimental

II.5.1. Información general

Las técnicas de análisis y biocatalizadores utilizados en este capítulo, salvo indicación contraria han sido detallados en la parte experimental del primer capítulo de esta Tesis Doctoral. Todos los reactivos empleados en este capítulo han sido adquiridos a Aldrich, Fluka, Lancaster o Prolabo.

Además se han utilizado algunas técnicas específicas para este capítulo que se describen a continuación.

II.5.1.1. Difracción de rayos X

La recopilación de datos fue realizada utilizando el programa CrysAlispro (Agilent Technologies). La estructura cristalina se resolvió utilizando el programa Superflip. El refinamiento anisotrópico por mínimos cuadrados se llevó a cabo con SHELXL-97. Los datos cristalográficos fueron depositados con el número del centro de datos cristalográficos de Cambridge CCDC 980770. Copias de estos pueden obtenerse de www.ccdc.cam.ac.uk/cgi-bin/catreq.cgi.

II.5.1.2. Dicroísmo circular UV

Las medidas de dicroísmo circular se realizaron utilizando un espectrómetro Jasco J-815 CD. Todas las muestras fueron medidas en metanol (2×10^{-3} M) y en una cubeta prismática de 1 cm de longitud

II.5.2. Procedimiento general para la síntesis de las meso-diaminas **2a-h**

Una suspensión del correspondiente aldehído previamente destilado **1a-h** (50 mmol) y acetato amónico (150 mmol) se calienta a 130 °C, y se agita durante 3 h. Transcurrido este periodo se procede a enfriar la mezcla a temperatura ambiente, obteniendo un producto gomoso que se lava con hexano. El crudo resultante se alcaliniza con una disolución acuosa de NaOH 4 M hasta pH básico (>10) y se extrae con Et₂O (4×20 mL). Las fases orgánicas se combinan, se secan con Na₂SO₄, se filtran y finalmente se evapora el disolvente por destilación a presión reducida en el rotavapor.

Sin previa purificación, el producto intermedio anterior **2a-h**, se suspende en una disolución acuosa de H₂SO₄ al 50% (40 mL), y la mezcla se calienta con agitación a 170 °C durante toda una noche. Pasado este tiempo, la reacción se enfría en un baño de hielo y bajo agitación se le añade lentamente H₂O (20 mL, para diluir la elevada concentración de H₂SO₄). La disolución resultante se extrae con Et₂O (4×60 mL) y la capa acuosa es llevada a pH neutro con una disolución acuosa de amoníaco concentrado. Finalmente se extrae la fase acuosa con Et₂O (4×60 mL), se combinan las fases orgánica, se secan con Na₂SO₄, se filtran y se evapora el disolvente por destilación a presión reducida, obteniéndose la correspondientes meso-diamina **3a-h** como sólidos. (Tabla II.1).

II.5.3. Procedimiento general para la síntesis de los correspondientes monocarbamatos racémicos **4a-h**

A una disolución de la correspondiente meso-diamina **2a-h** (0.47 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (4.72 mL, 0.1 M) se le añade DMAP (63.5 mg, 0.52 mmol) bajo atmosfera de nitrógeno. A continuación, se adiciona lentamente el cloroformiato de alilo (55 µL, 0.52 mmol) y se agita la disolución a temperatura ambiente hasta completa desaparición del producto de partida. Después se destila el disolvente bajo presión reducida, obteniéndose un crudo que finalmente es purificado por cromatografía de columna en gel de sílice (30-75% AcOEt/hexano), aislándose los

correspondientes monocarbamatos racémicos **4a-h** como sólidos blancos con rendimientos (29-75%).

II.5.4. Procedimiento general para la desimetrización enzimática de las meso-diaminas **2a-h con la lipasas utilizando carbonato de dialilo**

Una suspensión de la correspondiente diamina **2a-h** (0.20 mmol) y enzima (relación enzima:diamina 2:1 en peso) en carbonato de dialilo (2 mL, 0.1 M), se agita a 45 °C y 250 rpm bajo atmosfera de nitrógeno durante 62-86 horas. Transcurrido este tiempo se para la reacción por filtración de la enzima que se lava con MeOH (3×5 mL). El disolvente se destila bajo presión reducida y el crudo resultante se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (30-70% AcOEt/hexano), obteniéndose los correspondientes monocarbamatos (1*S*,2*R*)-**4a-h** con distintas purezas ópticas (Tablas II.2 y II.3).

Trabajo de investigación

Capítulo III: Desarrollo de procesos
quimioenzimáticos para la preparación de
epóxidos

Antecedentes

Los epóxidos también conocidos como oxaciclopropanos u oxiranos, son éteres cíclicos formados por 3 átomos. Están presentes en un gran número de moléculas de elevado interés biológico, dotándolas de rigidez estructural. A su vez son intermedios de productos de alto valor así como de rutas metabólicas complejas. En algunos casos, provocan citotoxicidad en las moléculas que los poseen, como pueden ser las feromonas que liberan algunos insectos.⁷⁷

La elevada tensión que posee su anillo, los hace susceptibles de ser atacados por todo tipo de nucleófilos, permitiendo así alcanzar una amplia gama de funcionalizaciones. Este hecho se ve reflejado en el amplio número de aplicaciones industriales, donde son intermedios en la síntesis de una gran cantidad de productos químicos, incluyendo, pinturas, anticorrosivos, aceites lubricantes, fármacos y productos naturales entre otros usos (Figura III.1).⁷⁸

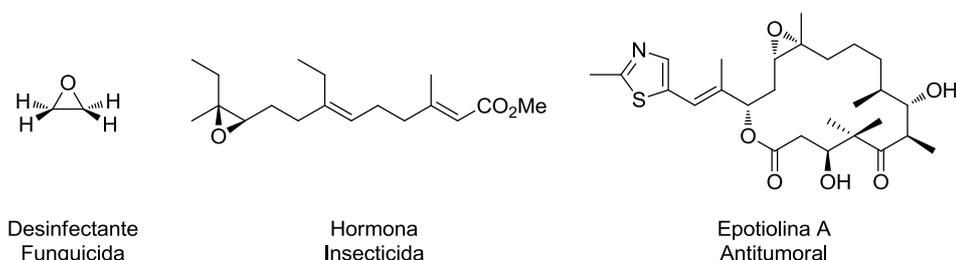


Figura III.1. Aplicaciones de algunos epóxidos de uso común en la industria.

El descubrimiento de métodos eficaces para la síntesis de este tipo de compuestos, ha recibido la atención de numerosos investigadores en los últimos años, postulándose los métodos biocatalíticos como una interesante alternativa sintética.

⁷⁷ Revisiones sobre síntesis y aplicaciones: (a) C. Aouf, E. Durand, J. Lecomte, M.-C. Figueroa-Espinoza, E. Dubreucq, H. Fulcranda, P. Villeneuve, *Green Chem.* **2014**, *16*, 1740; (b) S. Hwang, C. Y. Choi, E. Y. Lee, *J. Ind. Eng. Chem.* **2010**, *16*, 1; (c) Q.-H. Xia, H.-Q. Ge, C.-P. Ye, Z.-M. Liu, K.-X. Su, *Chem. Rev.* **2005**, 1603.

⁷⁸ (a) Y. Kita, K. Higuchi, Y. Yoshida, K. Iio, S. Kitagaki, S. Akai, H. Fujioka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 683; (b) L. N. Mander, M. M. McLachlan, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2400.

El incremento en la demanda de métodos de oxidación suaves ha provocado un rápido desarrollo de este campo en las últimas décadas.⁷⁹ De los métodos existentes para llevar a cabo procesos oxidativos, la Biocatálisis proporciona una interesante alternativa a los métodos tradicionales, los cuales producen cantidades más elevadas de residuos, en muchos casos contaminantes y peligrosos.⁸⁰

Las monooxigenasas⁸¹ son enzimas redox que utilizan oxígeno molecular como oxidante, mostrando unas regio- y estereoselectividades excelentes, permitiendo así, acceder a compuestos que no son fáciles de obtener por métodos químicos tradicionales.

El mayor inconveniente que presentan este tipo de enzimas es la imposibilidad de trabajar a elevadas concentraciones de sustrato y la necesidad de un cofactor para su correcto funcionamiento. Este hecho supone una gran limitación de cara a su aplicación en procesos industriales. Estos inconvenientes pueden ser superados cuando se trabaja con otro tipo de enzimas más versátiles como son las hidrolasas.

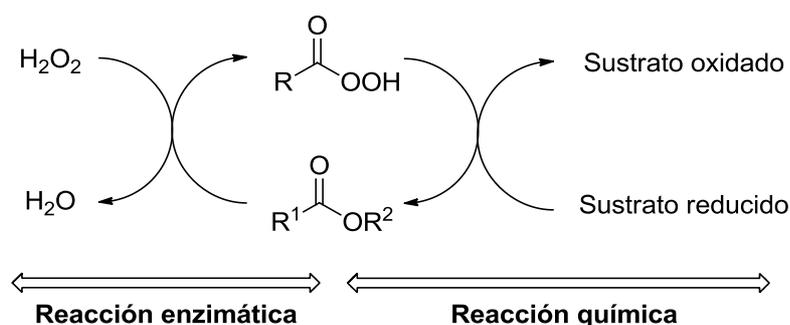
III.1.1. Oxidaciones mediadas por hidrolasas

Las hidrolasas son capaces de promover procesos oxidativos cuando se utilizan bajo determinadas condiciones de reacción, permitiendo transformar ácidos carboxílicos y ésteres, en los correspondientes perácidos. Para ello se emplea agua oxigenada como nucleófilo. Al utilizar este oxidante se consigue salvar el obstáculo de la activación del oxígeno molecular que presentan otros sistemas oxidativos.

⁷⁹ L. Jr. Que, W. B. Tolman, *Nature* **2008**, 455, 333

⁸⁰ R. A. Sheldon, *Catal. Today* **2015**, 247, 4.

⁸¹. (a) D. Holtmann, M. W. Fraaije, I. W. C. E. Arends, D. J. Opperman, F. Hollmann, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 13180; (b) M. Hofrichter, R. Ullrich, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, 19, 116; (c) S. Schulz, M. Girhard, V. B. Urlacher, *ChemCatChem*, **2012**, 4, 1889; (d) M. V. Donova, O. V. Egorova, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, 94, 1423; (e) D. E. T. Pazmiño, M. Winkler, A. Glieder, M. W. Fraaije, *J. Biotechnol.*, **2010**, 146, 9; (f) P. R. O. de Montellano, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 932.



Esquema III.1. Esquema general proceso oxidativo con hidrolasas.

Principalmente se han descrito tres clases de procesos oxidativos con lipasas: oxidación de alcoholes, oxidación de Baeyer-Villiger y epoxidación de alquenos, siendo este último el que más aplicabilidad puede tener a escala industrial.⁸²

Por ejemplo, esta metodología se presenta como una alternativa interesante en la epoxidación de aceite de soja a escala industrial (más de 200000 toneladas anuales), donde debido al uso de ácidos minerales fuertes se producen reacciones secundarias indeseadas que hacen disminuir la selectividad de este proceso hasta el 80%.⁸³ Además la presencia de estos ácidos provoca graves problemas medioambientales y de corrosión en los equipos, problemas que se podrían solucionar aplicando una metodología quimioenzimática.⁸⁴ Además, la formación *in situ* del perácido, permite evitar los riesgos que implican su manipulación y transporte, puesto que a elevadas concentraciones estos compuestos pueden resultar explosivos.

⁸² D. Gamenara, G. A. Seoane, P. Saenz-Méndez, P. Domínguez de María, *Redox Biocatalysis: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons: Hoboken, 2013.

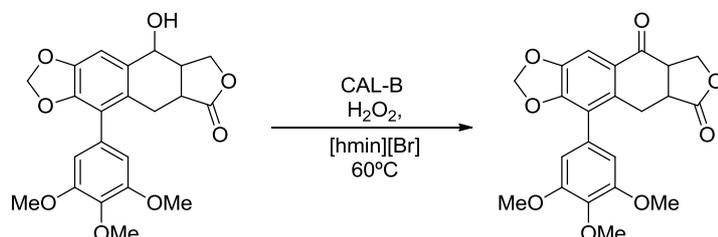
⁸³ (a) M. Rüscher, gen. Klaas, S. Warwel, *Ind. Crops Prod.*, **1999**, 9, 125; (b) B. Rangarajan, A. Havey, E. A. Grulke, P. D. Culnan, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1995**, 72, 1161.

⁸⁴ (a) I. Hilker, D. Bothe, J. Prüss, H.-J. Warnecke, *Chem. Eng. Sci.* **2001**, 56, 427; (b) T. Kudanga, E. N. Prasetyio, J. Sipilä, G. S. Nyahongo, G. M. Guebitz, *Process. Biochem.* **2010**, 45, 1557.

A continuación, se realiza una breve revisión de los artículos en los que aparece algún tipo de proceso oxidativo catalizado por estas enzimas hidrolíticas.

III.1.1.1. Reacción de oxidación de alcoholes mediada por lipasas

Este tipo de procesos suele ser realizado por oxidorreductasas, pero existe algún ejemplo en la bibliografía en que la oxidación de alcoholes se realiza por la acción combinada de una lipasa con H_2O_2 . Sinha y colaboradores han descrito la actuación de la CAL-B, en reacciones oxidativas de manera directa oxidando alcoholes primarios a aldehídos o secundarios a cetonas en líquidos iónicos, con rendimientos del 65-96%.⁸⁵ Esta metodología ha sido aplicada con éxito a la oxidación de la podolipotoxina con un 90% de rendimiento (Esquema III.2).



Esquema III.2. Reacción de oxidación de la podolipotoxina catalizada por CAL-B en líquido iónico.

III.1.2.2. Reacción de Baeyer-Villiger mediada por lipasas

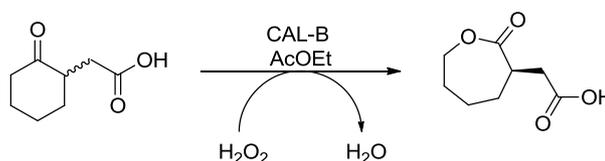
Este tipo de reacciones las catalizan de forma natural las Baeyer-Villiger monoxigenasas, enzimas dependientes de flavina, cuyas características se han comentado previamente en este capítulo.

Utilizando agua oxigenada y lipasas se puede observar una clara evolución en las reacciones de este tipo sobre la ciclohexanona y

⁸⁵ U. K. Sharma, N. Sharma, R. Kumar, A. K. Sinha, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4846.

ciclopentanona. Este progreso va desde las conversiones moderadas conseguidas por Lemoult y colaboradores en año 1995, hasta las muy buenas obtenidas por Chávez y colaboradores en el año 2013, mostrándose estas enzimas como una alternativa muy interesante para preparar esteres o lactonas a partir de cetonas. Destacar que en algunos casos, se observa cierta inducción quiral debido a la existencia de un proceso de resolución cinética en la formación del perácido.⁸⁶

Mediante el uso de UHP, CAL-B y acetato de etilo, que actúa como precursores del ácido peracético, se estudió la reacción de derivados de la ciclohexanona y la ciclopentanona con diversas sustituciones en 2 y 4, para formar las correspondientes ϵ -caprolactonas y δ -valerolactonas.⁸⁷ En estos trabajos de Ríos y colaboradores (Esquema III.3), se alcanzan buenas conversiones en la reacción de oxidación de la ciclohexanona, y moderadas en el caso de la ciclopentanona debido a que las δ -valerolactonas sufren reacciones posteriores de hidrólisis y transesterificación.



Esquema III.3. Ejemplo de oxidación de Baeyer-Villiger intramolecular mediada por CAL-B.

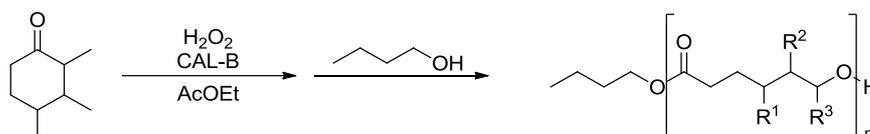
Buscando incrementar tanto la actividad del perácido, como la estabilidad de la enzima se han utilizado líquidos iónicos como disolventes, que pueden actuar como donores de hidrógeno.⁸⁸ Zhong y colaboradores desarrollaron procesos en cascada en los que se combina la reacción de

⁸⁶ (a) S. C. Lemoult, P. F. Richardson, S. M. Roberts, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1995**, *1*, 89; (b) B. K. Pchelka, M. Gelo-Pujic E. Guibe-Jampel, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1998**, *1*, 2625; (c) G. Chavez, R. Hatti-Kaul, R.A. Sheldon, G. Mamo, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *89*, 67.

⁸⁷ (a) M. Y. Rios, E. Salazar, H.F. Olivo, *Green Chem.* **2007**, *9*, 459; (b) M. Y. Rios, E. Salazar, H. F. Olivo, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *54*, 61.

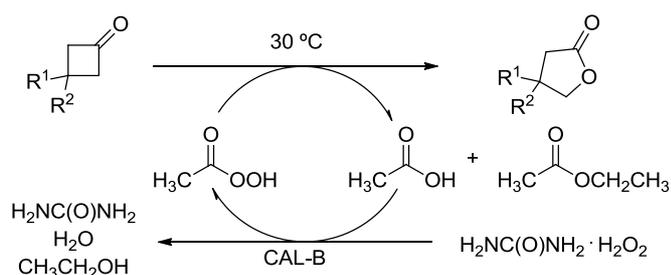
⁸⁸ A. J. Kotlewska, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, I. W. C. E. Arends, *Green Chem.* **2011**, *13*, 2154.

oxidación de Baeyer-Villiger, con un proceso de polimerización mediante apertura de anillo, permitiendo así la síntesis de poliésteres (Esquema III.4).⁸⁹



Esquema III.4. Reacción en cascada para la formación de polímeros.

Recientemente en nuestro grupo de investigación se ha descrito un método quimioenzimático eficiente para la síntesis de γ -butirolactonas a través de una reacción de Baeyer-Villiger, usando la CAL-B como biocatalizador.⁹⁰ Así, utilizando la ciclobutanona como sustrato modelo y realizando un profundo trabajo de optimización de los parámetros de reacción se obtuvieron once butirolactonas con diferentes sustituciones en la posición 3 del anillo, logrando conversiones completas en la mayoría de los casos. (Esquema III.5)



Esquema III.5. Oxidación de Baeyer Villiger quimioenzimática para la síntesis de γ -butirolactonas.

⁸⁹ J. Zhong, F. Xu, J. Wang, Y. Li, X. Lin, Q. Wu, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 8533.

⁹⁰ D. González-Martínez, M. Rodríguez-Mata, D. Méndez-Sánchez, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *J. Mol. Catal.B: Enzym.* **2015**, *114*, 31.

III.1.2.3 Reacción de epoxidación mediada por lipasas

En 1990 Björkling y colaboradores describieron por primera vez la capacidad de la CAL-B para llevar a cabo la transformación de diversos ácidos grasos (de 4 a 12 átomos de carbono) en sus correspondientes perácidos, empleando agua oxigenada como agente oxidante.⁹¹ Años más tarde, este mismo grupo de investigación extendió esta metodología para la formación de perácidos *in situ* en la epoxidación de olefinas.⁹²

Esta reacción ha sido estudiada en profundidad en los últimos años analizando ampliamente todos los parámetros que afectan a su catálisis. Uno de los factores que tiene una influencia importante en la reacción es la temperatura, observándose que el incremento de ésta tiene un efecto positivo en su cinética. Sin embargo, a temperaturas superiores a 50 °C se produce la descomposición del agua oxigenada y se observan problemas de desactivación de la enzima.

Otro factor a tener en cuenta es el disolvente porque cuando se utilizan medios orgánicos, sistemas bifásicos o líquidos iónicos, se produce un aumento en la estabilidad del enzima, además de favorecer la solubilidad del sustrato.⁹³

Pero sin duda, el factor más determinante es la concentración de agua oxigenada. Si bien es necesario un ligero exceso de equivalentes sobre el número de dobles enlaces a epoxidar,⁹⁴ un gran exceso de esta causa la acumulación de perácidos en el medio de reacción que terminan afectando

⁹¹ F. Björkling, H. Frykman, S. E. Godtfredsen O. Kirk, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 4587.

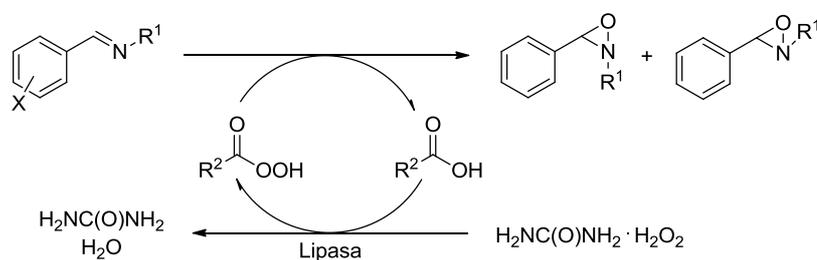
⁹² F. Björkling H. Frykman S. E. Godtfredsen O. Kirk, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1301; (b) O. Kirk, M. W. Christensen, T. Dambus, S. E. Godtfredsen, *Biocatalysis* **1994**, *11*, 65.

⁹³ (a) S. Warwel, M. Rüsche, gen. Klaas, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1995**, *1*, 49; (b) R. Madeira Lau, F. van Rantwijk, K. R. Seddon, R. A. Sheldon, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 4189; (c) M. A. Moreira, T. B. Bitencourt, M. da Graça Nascimento, *Synth. Commun.* **2005**, *35*, 2107.

⁹⁴ C. Orellana-Coca, S. Camocho, D. Adlercreutz, B. Mattiasson, R. Hatti-Kaul, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2005**, *107*, 864.

de forma negativa a la actividad de la enzima.⁹⁵ En estas reacciones una vez formado el perácido, se produce la epoxidación química de las olefinas en condiciones muy suaves de reacción, esta reacción es conocida como epoxidación de Prileschajew.⁹⁶

Para muchas aplicaciones, es conveniente disponer de un reactivo anhidro que, libere lentamente el peróxido de hidrógeno en el medio de reacción, logrando unas condiciones oxidantes aún más suaves. Esta posibilidad tiene una clara repercusión en la mayor estabilidad del enzima o de los productos.⁹⁷ Así es común la utilización del complejo urea-peróxido de hidrógeno (UHP), reactivo que ha sido empleado en la síntesis diastereoselectiva de *N*-alquiloxaziridinas mediante la oxidación de *N*-alquiliminas arílicas (Esquema III.6).⁹⁸



Esquema III.6. Ejemplo de epoxidación quimioenzimática de iminas utilizando UHP.

Otra aproximación útil para oxidar compuestos sensibles a los ácidos es el empleo de carbonatos de dialquilo, teniendo lugar la formación del monoéster del ácido carbónico que tras la perhidrólisis resulta ser inestable,

⁹⁵ G. D. Yadav, K. M. Devi, *Biochem. Eng. J.*, **2002**, *10*, 93; (b) U. Törnvall, P. Börjesson, L. M. Tufvesson, R. Hatti-Kaul, *Ind. Biotechnol.* **2009**, *5*, 184; (c) U. Törnvall, C. Orellana-Coca, R. Hatti-Kaul, D. Adlercreutz, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 447.

⁹⁶ (a) N. Prileschajew, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1909**, *42*, 4811; (b) J. March *Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure*, John Wiley & Sons: Hoboken, 1985.

⁹⁷ E. G. Ankudey, H. F. Olivo, T. L. Peeples, *Green Chem.* **2006**, *8*, 923.

⁹⁸ T. B. Bitencourt, M. da Graça Nascimento, *Green Chem.* **2009**, *11*, 209.

descomponiendo en dióxido de carbono y el correspondiente alcohol, dando la reacción de epoxidación en medio neutro.⁹⁹

En cuanto a las aplicaciones industriales de estas metodologías destacan su utilidad para llevar a cabo la reacción de autoepoxidación de ácidos grasos tanto en medios orgánicos⁹³ como en medios bifásicos.¹⁰⁰ También, se utilizan en la síntesis de derivados de productos naturales evitando el uso de sustancias nocivas como puede ser la epiclorhidrina (irritante y carcinógena)¹⁰¹ o el *m*-CPBA (peligroso a escala industrial).

Por otro lado, se han sintetizado un gran número de polímeros sintéticos y prepolímeros derivados fenoles,¹⁰² mostrando cierta regioselectividad en función de la conjugación y de la estereoquímica de los dobles enlaces. Asimismo se han aprovechado las ventajas derivadas del uso de condiciones suaves de reacción, para llevar a cabo procesos en cascada (Esquema III.7).¹⁰³

⁹⁹ M. R. gen. Klass, S. Warwel, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1025; (b) M. R. gen. Klaas, M. Kunz, S. J. Warwel, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, *7*, 283.

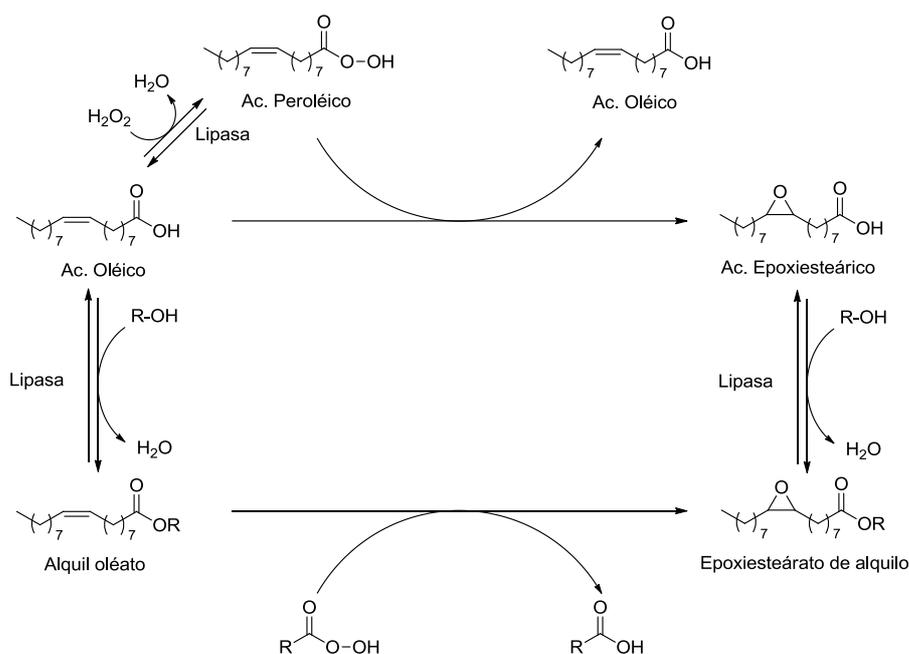
¹⁰⁰ (a) C. Orellana-Coca, U. Törnvall, D. Adlercreutz, B. Mattiasson, R. Hatti-Kaul, *Biocatal. Biotransform.* **2005**, *23*, 431; (b) F. A. Corrêa, F. K. Sutili, L. S. M. Miranda, S. G. F. Leite, R. O. M. A. de Souza, I. C. R. Leal, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *81*, 7.

¹⁰¹ (a) H. Ito, N. Shiraishi, *Mokuzai Gakkaishi*, **1987**, *33*, 393 (b) L. Tomatis, C. Agthe, H. Bartsch, J. Huff, R. Montesano, R. Saracci, E. Walker, J. Wilbourn, *Cancer Res.* **1978**, *38*, 877.

¹⁰² (a) A. W. P. Jarvie, N. Overton, C. B. St. Pourçain, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1999**, *1*, 2171; (b) C. Aouf, J. Lecomte, P. Villeneuve, E. Dubreucq, H. Fulcrand, *Green Chem.* **2012**, *14*, 2328.

¹⁰³ (a) M. R. gen. Klass, S. Warwel, *Synth. Commun.* **1998**, *28*, 251; (b) C. Orellana-Coca, J. M. Billakanti, B. Mattiasson, R. Hatti-Kaul, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, *44*, 133.

Capítulo III: Desarrollo de procesos quimioenzimáticos para la preparación de epóxidos



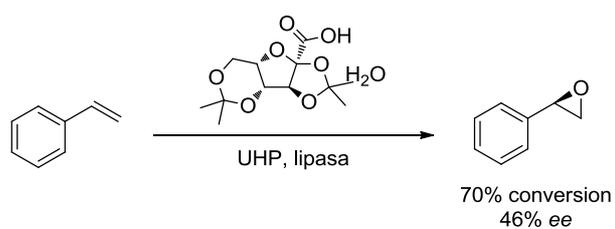
Esquema III.7. Ejemplo de epoxidación en cascada para formar compuestos de elevado interés en la industria de polímeros.

Las lipasas no inducen ningún tipo de quiralidad al actuar el perácido sobre el sustrato fuera del centro activo del enzima,¹⁰⁴ aun así, cuando se utilizan perácidos con elevada pureza óptica, esta si se traslada a los productos finales. Goswani y colaboradores la síntesis de epóxidos con excesos enantioméricos moderados, al emplear diferentes ácidos carboxílicos en combinación con la PSL o la CAL-B (Esquema III.8).¹⁰⁵

¹⁰⁴ M. A. Moreira, M. G: da Graça Nascimento, *Catal. Commun.* **2007**, 8, 2043.

¹⁰⁵ (a) K. Sarma, N. Bhati, N. Borthakur, A. Goswami, *Tetrahedron* **2007**, 63, 8735; (b) K. Sarma, A. Goswami, B. C. Goswami, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, 1295.

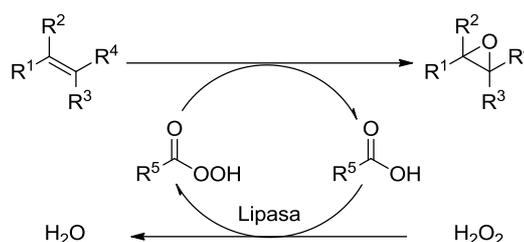
Capítulo III: Desarrollo de procesos quimioenzimáticos para la preparación de epóxidos



Esquema III.8. Ejemplo de epoxidación asimétrica llevada a cabo con lipasas y un ácido carboxílico quiral.

Objetivos

Como queda reflejado en los antecedentes de este capítulo, las reacciones de epoxidación de alquenos catalizadas por lipasas han sido ampliamente estudiadas con la CAL-B y la PSL, existiendo escasos ejemplos sobre el empleo de otras hidrolasas en este tipo de procesos.



Por ello, nos hemos planteado en este capítulo una serie de objetivos como son:

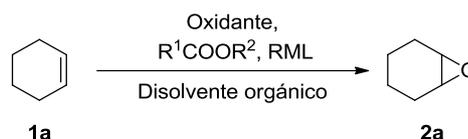
Hacer un estudio enzimático sobre el empleo de diversas hidrolasas en procesos de epoxidación de alquenos.

Optimizar las condiciones de reacción en términos de tiempo, disolvente, temperatura, concentración de ácido y de UHP, con las enzimas identificadas previamente.

Evaluar la posible regioselectividad del proceso empleando compuestos orgánicos con varios dobles enlaces presentes en la molécula.

Resultados y discusión

En este capítulo, se ha explorado la síntesis de epóxidos a través de una metodología quimioenzimática sencilla en dos pasos que ocurren en “one-pot”. En el primero de ellos se produce la reacción de perhidrólisis de un derivado de ácido carboxílico catalizada por hidrolasas, formándose un perácido que reacciona para catalizar la epoxidación química del sustrato a través de la reacción de Prileshajev.⁹⁶ Para ello, se eligió el ciclohexeno (**1a**) como sustrato modelo debido a su disponibilidad comercial y a la facilidad para monitorizar la reacción por cromatografía de gases, tanto en su desaparición como en la formación del óxido de ciclohexeno (**2a**).



Esquema III.9. Reacción modelo de epoxidación del ciclohexeno.

Inicialmente para realizar este tipo de procesos nos centramos en la RML debido a su aplicabilidad sintética.

III.3.1 Optimización de las condiciones de reacción, elección del agente oxidante, precursor del perácido y disolvente

En un primer momento se probó a utilizar 4 equivalentes de H₂O₂ como oxidante en presencia del ácido decanoico en una mezcla agua/diclorometano (1:1.2 v/v) observándose una rápida desactivación de la RML con una conversión del 4% de **2a** tras 24 horas de reacción a 30 °C. El uso de carbonato de dimetilo como precursor del perácido tampoco dio conversión alguna.

Para superar estos problemas de desactivación de la enzima a elevadas concentraciones de H₂O₂ se decidió emplear un agente oxidante más suave como el UHP, que libera lentamente H₂O₂ en el medio de reacción (Tabla III.1).

Primero se utilizó acetato de etilo como disolvente y precursor del ácido carboxílico, sin embargo solo se consiguió un 5% de conversión de **2a** tras 5 horas de reacción (entrada 1). Después, se probaron diferentes disolventes en combinación con el ácido decanoíco y UHP, observándose que mientras que el tetrahidrofurano da una conversión muy baja (entrada 2), el 2-metiltetrahidrofurano y el *tert*-butilmetiléter permiten obtener conversiones del 16% (entradas 3 y 4). Finalmente las mejores conversiones se alcanzaron cuando se utilizó acetonitrilo como disolvente (entrada 5) con el que se alcanzaron conversiones de 23%. Cabe destacar que también se realizaron pruebas en blanco siendo nula la conversión obtenida.

Tabla III.1. Epoxidación del ciclohexeno utilizando RML, UHP y diferentes ácidos carboxílicos a 30 °C y 250 rpm durante 5 horas.

Entrada	R ¹ COOR ²	Disolvente	c (%) ^a
1	AcOEt	AcOEt	5
2	Ácido decanoíco	THF	4
3	Ácido decanoíco	2-Me-THF	16
4	Ácido decanoíco	TBME	16
5	Ácido decanoíco	MeCN	23
6	Ácido acético	MeCN	<3
7	Ácido butanoíco	MeCN	<3
8	Ácido láurico	MeCN	31
9	Ácido esteárico	MeCN	20
10	Ácido benzoíco	MeCN	<3
11	Ácido fenilacético	MeCN	<3

^a Conversión medida por CG.

A continuación, se estudió el comportamiento de la reacción con diferentes perácidos observándose que los ácidos de cadena corta como el acético o el butírico (entradas 6 y 7) no son buenos precursores para la formación del perácido. El mejor resultado se obtuvo cuando se utilizó el ácido láurico (31%) el cual posee dos átomos de carbono más que el ácido decanoíco (entradas 5 y 8), por otro lado cuando se usan ácidos de cadena más larga como el esteárico (entrada 9) se observa un descenso en la conversión. Mientras que cuando se utilizan ácidos con restos aromáticos en su estructura no se observa actividad alguna (entradas 10 y 11).

III.3.2. Efecto de la temperatura y de las concentraciones de sustrato, UHP y ácido láurico

Siguiendo con la optimización del proceso y utilizando las mejores condiciones obtenidas hasta ahora para la epoxidación del ciclohexeno, es decir, 1.1 equivalentes de ácido láurico y UHP en acetonitrilo (Tabla III.2). Se evaluó el efecto de la temperatura observándose que un aumento de la temperatura llevaba asociado un descenso de la conversión en comparación a cuando la biotransformación se realiza a 30 °C (entradas 1-3).

Por otro lado, un aumento en la concentración del sustrato hasta 0.66 M llevó asociado un aumento de la conversión hasta el 64%, tras 5 horas de reacción, mientras que a las 24 horas se alcanzó un 85% de conversión (entradas 4 y 6). Sin embargo, se observó que a concentraciones más altas de sustrato los resultados son peores (entrada 7).

Tabla III.2. Epoxidación del ciclohexeno utilizando RML, UHP con ácido láurico a 30 °C y agitación orbital de 250 rpm.

Entrada	Temperatura (°C)	[1a] (M)	Tiempo (h)	Conversión (%) ^a
1	30	0.33	5	31
2	37	0.33	5	12
3	45	0.33	5	9
4	30	0.66	5	64
5	30	0.66	13	75
6	30	0.66	24	85
7	30	1	5	43

^a Conversión medida por CG.

Del efecto de la concentración de ácido láurico y UHP utilizando distintas cargas de enzima. Los resultados se muestran en la Tabla III.3. Inicialmente se observó una clara inhibición del enzima cuando se aumenta la concentración de UHP (entradas 1 y 2), resultado que está de acuerdo con los obtenidos cuando se utilizaba el propio H₂O₂ como oxidante.

Tabla III.3. Epoxidación del ciclohexeno utilizando RML, UHP con ácido láurico a 30 °C y agitación orbital de 250 rpm.

Entrada	RML (mg) ^a	UHP (eq)	Ácido láurico (eq)	[1a] (M)	t (h)	c (%) ^b
1	50	1.1	1.1	0.33	5	31
2	50	2	1.1	0.33	5	12
3	50	1.1	0.2	0.66	5	3
4	50	1.1	0.4	0.66	5	13
5	50	1.1	0.6	0.66	5	24
6	50	1.1	0.8	0.66	5	38
7	50	1.1	1.0	0.66	5	51
8	50	1.1	1.1	0.66	5	64
9	50	1.1	1.1	0.66	24	85
10	50	1.1	2	0.66	24	91
11	50	1.1	3	0.66	24	68
12	100	1.1	1.1	0.66	14	80
13	100	1.1	1.1	0.66	24	85

^a Cantidad de RML por mmol de ciclohexeno (**1a**).

^b Conversión medida por CG.

Buscando otra manera de aumentar las conversiones nos decidimos a estudiar el efecto de la concentración de ácido láurico (0.2-1.1 equivalentes) observando que la reacción de formación del epóxido **2a** funciona mejor a concentraciones elevadas (entradas 3-8), con la idea de mejorar estos resultados se probaron las reacciones con 1.1 y 2 equivalentes aumentando el tiempo de reacción a 24 horas obteniendo un 85 y un 91% respectivamente (entradas 9 y 10), cuando la prueba se puso con 3 equivalentes de ácido láurico las conversiones disminuyeron debido a problemas de solubilidad (68% de conversión, entrada 11). Por último, se demostró que un aumento en la carga de enzima no implica la obtención de mejores resultados como se refleja en las entradas 12 y 13.

III.3.3. Extensión de la metodología a diferentes sustratos

Una vez optimizados todos los parámetros de reacción se aplicó esta metodología a una serie de sustratos (Tabla III.4), consiguiéndose conversiones completas para los casos del 2-metilciclohexeno (**1b**) y

ciclohepteno (**1c**) tras 24 horas de reacción, mientras que en el caso de los derivados del dihidronaftaleno **2d,e** se obtuvieron los productos con una conversión del 82% y 83%(entradas 4 y 5), observándose la formación del diol en un 16% en el caso del sustrato **1e** debido a la apertura del epóxido. Resultados similares se obtuvieron en el caso del 4-octeno donde se logró el epóxido **2f** con un 80% de conversión (entrada 6).

Posteriormente, se estudió la reacción de epoxidación del estireno (54%, entrada 7) y la de diferentes bromo estirenos que difieren entre sí en el patrón de sustitución en el anillo, obteniendo conversiones bajas para los sustituidos en *orto*- y *meta*- (entradas 8 y 9) 25% y 27% respectivamente, mientras que para el *para*- sustituido los resultados fueron algo mejores (40%, entrada 10).

Tabla III.4. Epoxidación de alquenos **1a-j** (0.66 M) usando RML (50 mg/mol), ácido láurico (2 eq) y UHP (1.1 eq) en MeCN a 30 °C 250 rpm durante 24 horas.

Entrada	Sustrato	2a-j (%) ^a
1	Ciclohexeno (1a)	91
2	2-Metilciclohexeno (1b)	>99
3	Ciclohepteno (1c)	>99
4	1,4-Dihidronaftaleno (1d)	82
5	1,2-Dihidronaftaleno (1e)	83
6	4-Octeno (1f)	80
7	Estireno (1g)	54
8	2-Bromoestireno (1h)	25
9	3-Bromoestireno (1i)	27
10	4-Bromoestireno (1j)	40

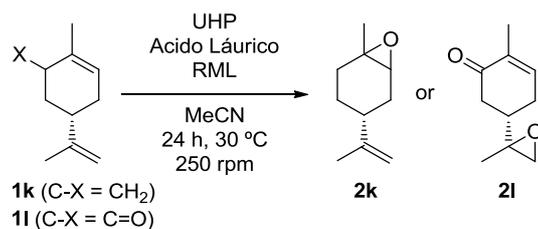
^a Porcentaje de epóxido **2a-j** obtenido a partir del correspondiente alqueno. Medido por CG.

Con el fin de evaluar la aplicabilidad sintética de nuestro sistema se estudió el reciclaje del enzima con el sustrato 1,4-dihidronaftaleno (**1d**) y a diferencia de lo que sucede con la CAL-B, tras dos ciclos de reacción se observa una pérdida total de la actividad enzimática.

Por otro lado, se realizó de forma satisfactoria de la reacción a escala de gramo con el sustrato modelo **1a** utilizando agitación magnética debido a

que con agitación orbital no se conseguían una buena disolución del ácido láurico.

También se exploró la posibilidad de realizar un proceso de epoxidación regioselectiva (Esquema III.10), para ello se eligieron dos moléculas de elvado interés como son la carvona (**1l**) y el limoneno (**1k**), observándose una conversión del 78% hacia la formación del epóxido en el doble enlace exocíclico en el caso de la carvona, mientras que con el limoneno la conversión fue del 18% hacia la formación del epóxido en el doble enlace interno.



Esquema III.10. Epoxidación quimioenzimática del limoneno y la carvona empleando la RML.

Conclusiones

Capítulo III: Desarrollo de procesos quimioenzimáticos para la preparación de epóxidos

Se ha desarrollado una metodología general para la síntesis de epóxidos, habiendo identificado la lipasa de *Rhizomucor miehei* como un catalizador eficiente para mediar este tipo de procesos de oxidación de alquenos.

Se han estudiado en profundidad todos los parámetros que afectan a este tipo de reacciones, es decir, temperatura, tiempo de reacción, carga de enzima, y las concentraciones de precursor del perácido y de oxidante.

Se ha conseguido extender este tipo de reacciones a la síntesis de epóxidos partiendo de alquenos tanto cíclicos como lineales, alcanzando conversiones bajas cuando esta reacción se hace sobre derivados del estireno.

Se investigó la regioselectividad del proceso de epoxidación para dos productos naturales de gran interés como son la carvona y el limoneno, consiguiendo una regioselectividad hacia el doble enlace *exo* en el caso de la carvona, y *endo* en el caso del limoneno.

Por último se realizaron algunos escalados de las reacciones, demostrando así la validez de esta metodología quimioenzimática para realizar epoxidaciones al menos a escala de gramo

Los resultados de este capítulo de la tesis doctoral se encuentran recogidos en el artículo “*Chemoenzymatic epoxidation of alkenes based on peracid formation by a Rhizomucor miehei lipase-catalyzed perhydrolysis reaction*” de D. Méndez-Sánchez, N. Ríos-Lombardía, V. Gotor y V. Gotor-Fernández, que ha sido publicado en *Tetrahedron* **2014**, 70, 1144.

Parte experimental

III.5.1. Información general

Todos los reactivos químicos fueron adquiridos a Aldrich, Fluka o Alfa Aesar y se usaron previa purificación. En todos los casos se utilizaron disolventes con alto grado de pureza y en los casos necesarios fueron secados con sodio o hidruro de cálcico y almacenados bajo nitrógeno.

III.5.1.1. Cromatografía

Para los análisis de cromatografía de gases se utilizó un Hewlett Packard 6890 Series II usando como columnas: las columnas aquirales HP-1 (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm), HP-5 (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm) y las columnas quirales CP-Chirasil-DEX-CB (25 m × 0.25 mm × 0.25 μm) y Rt-β-dexe (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm).

El resto de técnicas analíticas y enzimas utilizadas se encuentran recogidas en el capítulo 1 de esta Tesis Doctoral.

III.5.2 Procedimiento general para la síntesis enzimática de los epóxidos 2a-j a pequeña escala

Sobre una disolución del correspondiente alqueno **1a-l** (1 mmol, 0.66 M) en acetonitrilo (1.5mL) se añaden ácido láurico (2 mmol, 400 mg) y UHP (1.1 mmol, 104 mg). La suspensión resultante se agita a 250 rpm durante 24 h a 30 °C, transcurrido este tiempo la reacción se para mediante la adición de H₂O (1.5 mL) y la mezcla se extrae con AcOEt (3×1.5 mL). Una alícuota de esta disolución se pincha en el cromatógrafo de gases para medir los valores de conversión. (Tabla III.4).

III.5.3. Procedimiento para la síntesis enzimática del epóxido 2d a gran escala

Sobre una disolución del alqueno **1d** (10 mmol, 0.66 M) en acetonitrilo (15 mL) se añaden ácido láurico (20 mmol, 4.0 g) y UHP (1.1 mmol, 1.04 g). La suspensión resultante se agita durante 24h a 30 °C, transcurrido este tiempo la reacción se para mediante la adición de H₂O (15 mL) y la mezcla se extrae con AcOEt (3×15 mL).

Trabajo de investigación

Capítulo IV: Desarrollo de procesos de
desracemización de alcoholes secundarios
empleando métodos quimioenzimáticos

Antecedentes

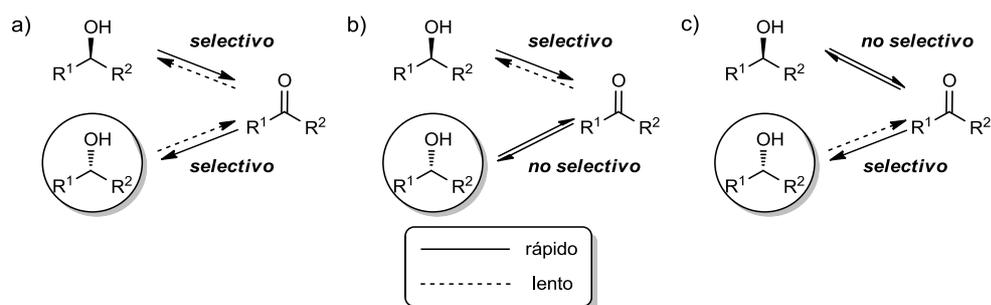
Los alcoholes enantioenriquecidos son ampliamente utilizados en muchos sectores industriales incluyendo el agroquímico y farmacéutico. También, se utilizan como saborizantes fragancias y aditivos alimentarios, no menos destacable es su importancia en campos científicos, donde por ejemplo son utilizados como disolventes en muchos procesos.

Como ya hemos indicado en la introducción general, los procesos en cascada han adquirido una gran relevancia en los últimos años puesto que al acortar pasos de reacción, llevan asociado un aumento del rendimiento, además se eliminan pasos de purificación, consiguiéndose una reducción considerable de costes.

A pesar de poseer grandes ventajas este tipo de procesos supone grandes retos debido a la dificultad de compatibilizar varios sistemas catalíticos, así como la necesidad de que los pasos de reacción transcurran con muy buenas conversiones de manera independiente, ya que de no ser así la purificación del producto final sería muy complicada.

A lo largo de estos años se han desarrollado numerosos procesos de este tipo para una amplia variedad de sustratos,¹⁰⁶ aminas, nitrilos, pero sin duda los procesos más estudiados han sido la resolución de alcoholes. Para estos sustratos se han seguido principalmente tres rutas diferentes para conseguir su desracemización (Esquema IV.1).

¹⁰⁶ (a) A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor, *Curr. Green Chem.* **2015**, *2*, 192; (b) N. J. Turner, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4073.



Esquema IV.1. Esquema de los diferentes tipos de desracemizaciones existentes combinando: a) dos pasos estereoselectivos; b) una oxidación selectiva y una reducción no selectiva; c) una oxidación no selectiva y una reducción selectiva.

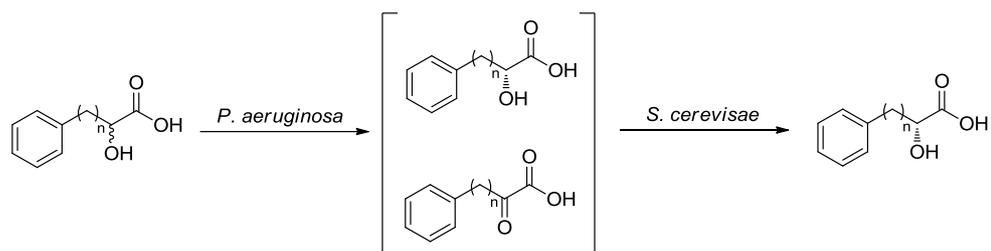
IV.1.1. Desracemización mediante estereoinversión

Esta forma de desracemizar es la más común y se han aplicado a todo tipo de sustratos, nosotros nos centraremos en los alcoholes. En este tipo de sistemas se produce la oxidación selectiva de uno de los enantiómeros del alcohol dejando el otro enantiómero inalterado, después en un segundo paso se realiza la reducción estereoselectiva con preferencia contraria obteniendo de esta forma, el alcohol enantiopuro deseado con un rendimiento teórico del 100%.

Se han descrito desracemizaciones mediante estereoinversión utilizando combinaciones de todo tipo de catalizadores, pero los que destacan sobre todos los demás son en las que se combinan dos pasos enzimáticos. Este es el caso del trabajo realizado por Shen y colaboradores¹⁰⁷ en el que realizan la desracemización de 2-hidroxiácidos obteniendo los productos de configuración *R*, estos resultados los consiguieron desarrollando un procedimiento en el que usaban células de *Pseudomonas aeruginosa* para realizar la oxidación selectiva del enantiómero *S*, efectuando su posterior reducción en “one-pot” con células

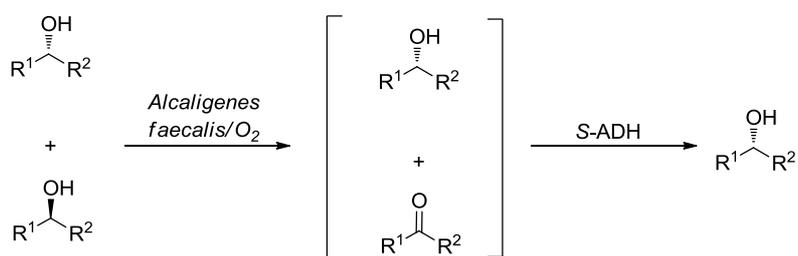
¹⁰⁷ Y.-P. Xue, Y.-G. Zheng, Y.-Q. Zhang, J.-L. Sun, Z.-Q. Liu, Y.-C. Shen, *Chem. Commun.*, **2013**, 49, 10706.

de *Saccharomyces cerevisiae* obteniendo excelentes conversiones y excesos enantioméricos superiores al 99% (Esquema IV.2).



Esquema IV.2. Desracemización enzimática de alcoholes mediante un proceso multienzimático “one-pot.”

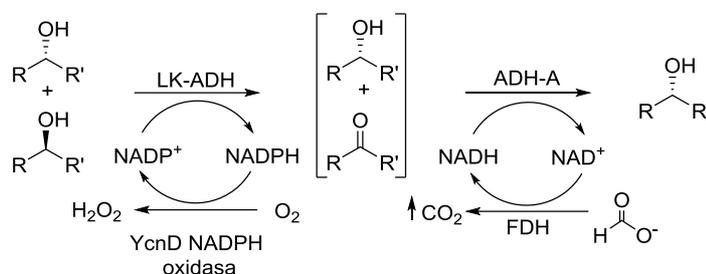
Otro grupo que ha trabajado intensamente en este campo es el de Kroutil desarrollando interesantes aportaciones en este campo. En el primero de ellos¹⁰⁸ (Esquema IV.3), partiendo de un alcohol racémico y utilizando *Alcaligenes faecalis*, una oxidasa (*R*)-selectiva que forma la cetona solo con el alcohol de configuración *R*. Para posteriormente obtener el alcohol de configuración deseada (*S*) tras una reducción con una ADH (*S*)-selectiva obteniendo así una serie de sustratos, en todos los casos rendimientos >99% y productos enantiopuros.



Esquema IV.3. Desracemización de alcoholes mediante inversión estereoisómera combinando dos oxidoreductasas.

¹⁰⁸ C. V. Voss, C. C. Gruber, K. Faber, T. Knaus, P. Macheroux, W. Kroutil, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13969.

Este mismo grupo de investigación, desarrolló un proceso de desracemización de alcoholes secundarios en el que se combinan dos ADHs de estereoselectividad opuesta, la de *Lactobacillus kefir* (LK-ADH) y la ADH-A de *Rhodococcus ruber* (Esquema IV.4).¹⁰⁹ Así, partiendo de una mezcla racémica, se consigue obtener el correspondiente alcohol con rendimientos cuantitativos y excesos enantioméricos excelentes (>99%).

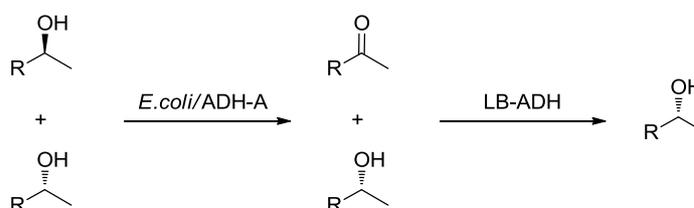


Esquema IV.4. Desracemización de alcoholes secundarios combinando dos ADHs de estereoselectividad opuesta.

Otro ejemplo de este tipo de procesos fue el realizado recientemente en nuestro grupo de investigación, combinando dos ADH de estereopreferencia opuesta como son la ADH-A de *Rhodococcus ruber* y la LB-ADH (Esquema IV.5), las cuales permitieron la desracemización de una amplia variedad de alcoholes secundarios tanto bencílicos, como alifáticos si bien para estos últimos los resultados son ligeramente peores debido a problemas en la primera etapa de oxidación.¹¹⁰

¹⁰⁹ C. V. Voss, C. C. Gruber, W. Kroutil, *Synlett* **2010**, 991.

¹¹⁰ C. E. Paul, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, W. Kroutil, V. Gotor, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 3875.



Esquema IV.5. Desracemización de alcoholes en la que se utilizan dos enzimas con estereoselectividades diferentes para realizar el proceso.

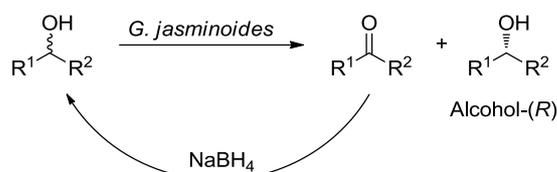
IV.1.2. Desracemización cíclica de alcoholes

La principal dificultad para realizar desracemizaciones mediante estereoinversión reside en la necesidad de acoplar perfectamente los pasos de reducción y oxidación utilizando catalizadores de preferencias opuestas. En este sentido las desracemizaciones cíclicas surgen como una interesante alternativa, al hacer uno de los dos pasos de forma no selectiva. Existen dos tipos de variantes de estos sistemas.¹¹¹

En el primero de ellos (Esquema IV.1b, pag 174) se realiza el paso de oxidación de manera selectiva mientras que el paso de reducción se realiza de forma no selectiva. Un ejemplo de este tipo de sistemas es el desarrollado recientemente por Magallanes-Noguera y colaboradores,¹¹² donde células vegetales de *Gardenia Jaminoides* se emplearon para desracemizar alcoholes secundarios. Estas células realizan de forma selectiva la oxidación del enantiómero (*S*) del alcohol dejando el otro inalterado. Posteriormente, se realiza una reducción no selectiva con NaBH₄ de la cetona formada, obteniendo de esta forma los correspondientes alcoholes de configuración *R* con rendimientos superiores al 82% y excesos enantioméricos que oscilan entre el 71 y el 97% (Esquema IV.6).

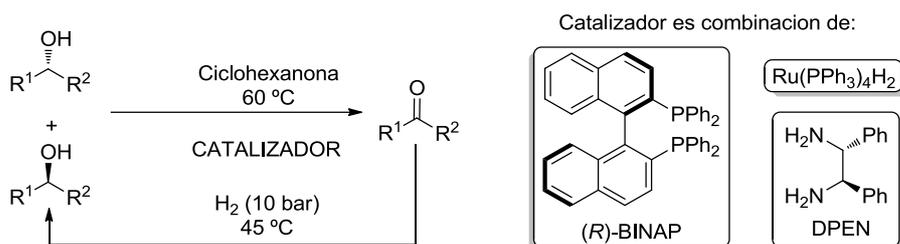
¹¹¹ N. J. Turner, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4073.

¹¹² C. Magallanes-Noguera; M. M. Ferrari, M. Kurina-Sanz, A. A. Orden. *J. Biotechnol.* **2012**, *160*, 189.



Esquema IV.6. Desracemización de alcoholes utilizando una oxidación enzimática acoplada a una reducción química no selectiva.

El segundo tipo de desracemizaciones cíclicas (Esquema IV.1c) son aquellas que combinan un paso de oxidación no selectiva con un proceso de reducción selectivo. Este tipo de desracemizaciones cíclicas han sido las más desarrolladas, como así se refleja en la bibliografía existente donde se pueden encontrar ejemplos en los que se combinan todo tipo de catalizadores. Así, Williams y colaboradores han conseguido emplear catalizadores metálicos para procesos redox complementarios,¹¹³ donde utilizando un catalizador del tipo Ru-BINAP-DPEN se lleva a cabo la hidrogenación de cetonas con una elevada selectividad, mientras que cambiando las condiciones de reacción el complejo es capaz de catalizar la oxidación de alcoholes de forma no selectiva (Esquema IV.7).

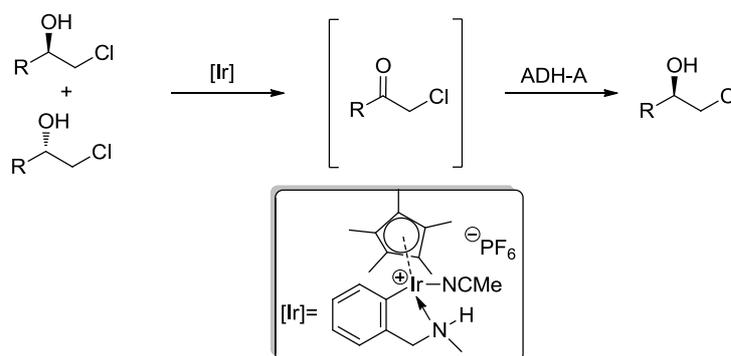


Esquema IV.7. Desracemización de alcoholes secundarios utilizando un catalizador metálico para realizar ambos pasos.

También existen otros procesos en los que se combina la acción de un metal y una enzima, como han descrito Kroutil y colaboradores, acoplando

¹¹³ G. R. A. Adair, J. M. J. Williams, *Chem. Commun.* **2005**, *44*, 5578

una oxidación no selectiva utilizando como catalizador un complejo de iridio acoplado a un proceso de biorreducción utilizando la ADH-A de *Rhodococcus ruber* (Esquema IV.8).¹¹⁴

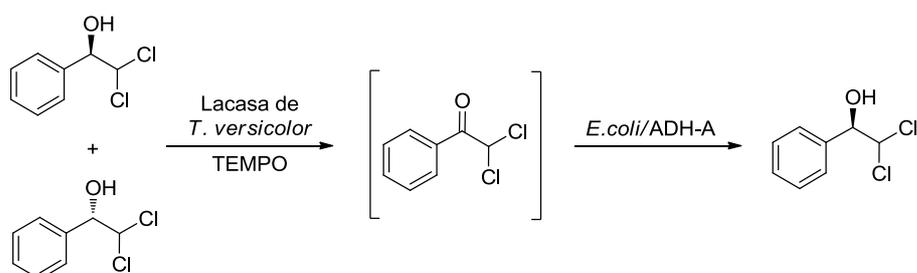


Esquema IV.8. Desracemización de halohidrinás siguiendo una estrategia quimioenzimática.

Por otro lado, en nuestro grupo de investigación se han desarrollado recientemente interesantes procesos de desracemización de alcoholes secundarios utilizando este tipo de sistemas. En uno de ellos se realiza la oxidación no selectiva con el sistema lacasa de *Trametes versicolor*/TEMPO, para posteriormente realizar la biorreducción de la cetona obtenida con la ADH-A de *Rhodococcus ruber* sobreexpresada en *E. coli* (Esquema IV.9), obteniéndose el alcohol de configuración (R) con conversiones completas y excesos enantioméricos del 97%.¹¹⁵

¹¹⁴ F. G. Mutti, A. Orthaber, J. H. Schrittwieser, J. G. de Vries, R. Pietschnig, W. Kroutil, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 8046.

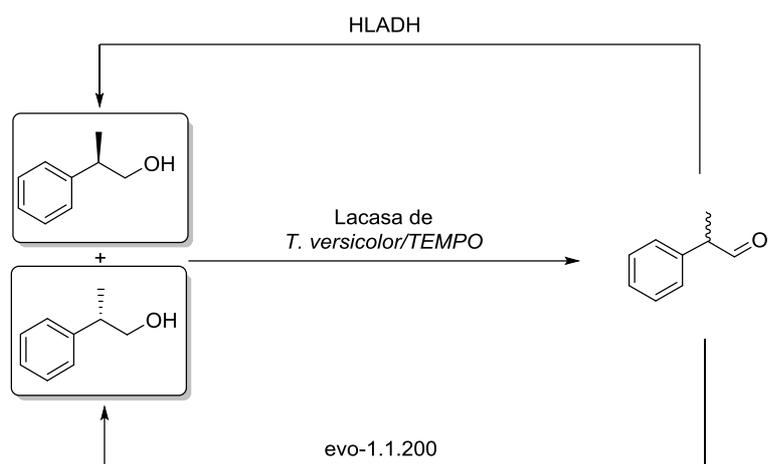
¹¹⁵ K. Kędzidora, A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Green Chem.* **2014**, 16, 2448.



Esquema IV.9. Desracemización de alcoholes utilizando el sistema lacasa/TEMPO y la ADH-A de *Rhodococcus ruber*.

Otro ejemplo reciente es la desracemización de una serie de profenos combinando una oxidación no selectiva mediada por la lacasa de *Trametes versicolor* y TEMPO en un primer paso, con un segundo donde se realiza una resolución cinética dinámica reductiva del aldehído formado, utilizando para este fin la ADH comercial evo-1.1.200 o la ADH de hígado de caballo (HLADH).¹¹⁶ De esta manera fue posible obtener ambos enantiómeros de forma completamente selectiva (Esquema IV.10).

¹¹⁶ A. Díaz-Rodríguez, N. Ríos-Lombardía, J. H. Sattler, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, W. Kroutil, V. Gotor, *Catal. Sci. Technol.*, **2015**, *5*, 1443.



Esquema IV.10. Desracemización de profenos combinando una oxidación mediada por la lacasa de *Trametes versicolor* y una biorreducción catalizada por ADHs complementarias.

Objetivos

En este capítulo nos hemos planteado el desarrollo de un procedimiento general para desracemizar alcoholes secundarios. Así, se pondrá a punto una metodología quimioenzimática basada en un proceso de oxidación química y una posterior biorreducción de la cetona intermedia

Para ello en un primer momento, se estudiará el comportamiento de un amplio número sistemas oxidativos capaces de oxidar alcoholes a cetonas en medios acuosos.

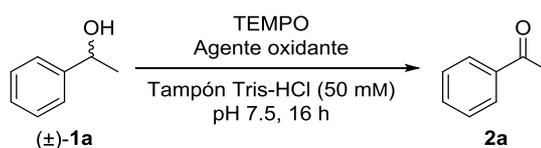
Se evaluará posteriormente el comportamiento de diversas alcohol deshidrogenasas en la biorreducción de las cetonas, estudiando finalmente la compatibilidad de ambos sistemas en “one-pot.”

Resultados y discusión

IV.3.1. Conversión del 1-feniletanol en acetofenona utilizando diferentes oxidantes químicos.

Para llevar a cabo la oxidación de alcoholes se han descrito numerosas estrategias utilizando diferentes oxidantes químicos que involucran el uso de metales u oxidantes orgánicos, como por ejemplo sales de cromo, manganeso o ioduros hipervalentes. Buscando un proceso sostenible, que involucre cantidades catalíticas de TEMPO en combinación con otros agentes oxidantes, se decidió estudiar la oxidación del 1-feniletanol con varios de ellos, partiendo como premisa de que la reacción debe de ser realizada en medio acuoso, hecho que nos permitirá acoplar el posterior paso de biorreducción con una ADH para completar el proceso de desracemización.

Así, en primer lugar y empleando el 1-feniletanol como producto de partida, se evaluaron una serie de oxidantes como el hipoclorito sódico (NaOCl), diacetato de iodofenilo (PIDA), *N*-clorosuccinimida (NCS) y iodo, encontrando en general buenas conversiones hacia la formación de la acetofenona (**2a**, Esquema IV.11).

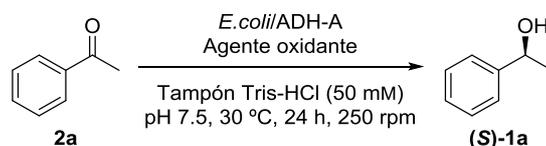


Esquema IV.11. Oxidación del 1-feniletanol a acetofenona utilizando TEMPO en medio acuoso.

Una vez estudiado el proceso de oxidación nos centramos en el paso de biorreducción de **2a** utilizando una ADH de tipo *Prelog* como es la de *Rhodococcus ruber* (ADH-A), debido a la necesidad de identificar unas condiciones compatibles con el sistema de oxidación, el proceso de biorreducción se estudió en presencia de los oxidantes químicos estudiados previamente (Tabla IV.1). El exceso enantiomérico no se vio afectado por la presencia de los agentes oxidantes, pero lo que si se observó fue un

descenso acusado en los valores de conversión cuando TEMPO, PIDA y especialmente NCS se encontraban presentes en el medio de forma individual o combinada (entradas 2-5). En la búsqueda de unas condiciones compatibles para el proceso de desracemización, se decidió estudiar el sistema de iodo y parar la reacción mediante la adición de tiosulfato de sodio, que convierte el exceso de iodo que es nocivo para el enzima en iones yoduro (entradas 6 y 7). Con esta combinación, la actividad de la ADH-A permaneció inalterada para la reducción de la acetofenona y se consiguió una total conversión en el paso de biorreducción (entrada 7).

Tabla IV.1. Estudio de la biorreducción de la acetofenona (**2a**) en una disolución tampón pH 7.5 usando ADH-A en presencia de diferentes oxidantes a 30 °C durante 24 h a 250 rpm.



Entrada	Oxidante ^a	<i>c</i> (%) ^b	<i>ee</i> (%) ^b
1	----	99	99
2	TEMPO (0.1eq)	85	96
3	PIDA (2eq)	91	>99
4	TEMPO/PIDA (2eq)	73	>99
5	TEMPO/NCS (1.5eq)	2	56
6	TEMPO/PIDA (0.1/1.5eq) ^c	85	99
7	TEMPO/I ₂ (0.1/2eq) ^c	>99	>99

^a Equivalentes de oxidante entre paréntesis.

^b Conversiones medidas mediante cromatografía de gases.

^c Se añaden 200 μL de una disolución saturada de Na₂S₂O₃.

Tabla IV.2. Oxidación del 1-feniletanol en acetofenona catalizada por iodo y TEMPO en una buffer Tris-HCl (50 mM).



Entrada	TEMPO (eq)	I ₂ (eq)	1a (mM)	pH	T (°C)	t (h)	c (%) ^a
1	0.1	1.5	40	7.5	30	16	16
2	0.2	1.5	40	7.5	30	16	23
3	0.1	2	40	7.5	30	16	18
4 ^b	0.1	1.5	40	7.5	30	16	14
5	0.1	1.5	40	9	30	16	48
6	0.2	1.5	40	9	30	16	54
7	0.2	1.5	80	9	30	16	30
8	0.2	1.5	160	9	30	16	22
9	0.2	1.5	20	9	30	16	49
10	0.2	1.5	40	9	60	16	52
11	0.2	1.5	20	9	60	16	57
12	0.2	1.5	20	10	30	16	52
13	0.2	1.5	20	10	60	16	60
14 ^c	0.2	1.5	20	10	40	1	98

^a Conversión medida por cromatografía de gases.

^b 10% de hexano como cosolvente.

^c Reacción sonicada durante 1 h.

En este punto, nos decidimos a utilizar el iodo como oxidante suave por dos razones. Por un lado, este permite la reoxidación del TEMPO en medio acuoso y condiciones suaves de reacción. Por otro lado, la destrucción del exceso de iodo se puede realizar en “one-pot” sin detrimento

de la actividad de la enzima, hecho que contrasta con la inhibición enzimática o reacciones laterales mostradas cuando se utilizan los otros oxidantes probados en este estudio.

Una vez encontrado un sistema de oxidación compatible, se realizó un exhaustivo estudio de optimización buscando unas condiciones reproducibles para la completa oxidación del 1-feniletanol (Tabla IV.2). Así, se estudiaron la influencia tanto de la carga de TEMPO, equivalentes de iodo, concentración de sustrato, pH y temperatura.

Los primeros intentos de oxidar el alcohol **1a** fueron realizados utilizando tampón Tris-HCl a pH 7.5 y cantidades catalíticas de TEMPO (10-20 mol%) y un exceso de I₂ (1.5-2 eq) obteniendo bajas conversiones en todos los casos (entradas 1-3), incluso la presencia de cosolventes hidrofóbicos como hexano no llevan a una mejora en las conversiones (entrada 4). Este incremento si se consigue al realizar la reacción utilizando un tampón Tris-HCl a pH 9 (entrada 5), incrementando la cantidad de TEMPO hasta un 20 mol% se consigue llegar hasta el 54% de conversión (entrada 6). Por otro lado, cuando se aumenta la concentración del sustrato, se observa un acusado descenso en la conversión (entradas 7 y 8), sin verse esta afectada al disminuir la concentración del alcohol o aumentar la temperatura (entradas 9-11), al variar el pH se observaron resultados similares a los previos (entradas 12 y 13). Sin embargo, cuando la reacción se sónica durante 1 h, a 30 °C se consigue obtener una conversión completa (entrada 14).

Una vez optimizada la reacción de oxidación con el sustrato modelo **1a**, se intentó extender esta metodología a una serie de alcoholes racémicos tanto aromáticos como alifáticos (Tabla IV.3). Se estudiaron diferentes patrones de sustitución en la posición *meta* del anillo aromático (metoxi, cloruro y nitro, entradas 2-4), evaluando también el efecto de uno de ellos en diferentes posiciones del resto fenilo (cloro, entradas 3,5 y 6), un alcohol más impedido (entrada 7) y dos alcoholes alifáticos (entradas 8 y 9), que nos darán una idea del potencial de nuestro sistema de oxidación.

Centrándonos en los sustratos *meta*-sustituídos, se alcanzaron conversiones completas cuando se tiene un grupo activante (entrada 2) o un resto desactivado (entrada 4), sin embargo cuando el sustrato es electrón atractor como el grupo nitro, solo se consigue llegar a un 39% de conversión (entrada 3). Atendiendo a la posición del cloro en el anillo aromático, nuestro sistema de oxidación demuestra no verse afectado en ningún caso consiguiendo conversiones completas en todos ellos (entradas 4, 5 y 6), mientras que cuando se introducen dos átomos de cloro en la molécula la oxidación no tiene lugar (entrada 7).

Tabla IV.3. Oxidación catalizada por el sistema iodo/TEMPO de los alcoholes racémicos **1a-i** usando una disolución tampón Tris-HCl (50 mM) pH 10 durante una hora.



Entrada	R ¹	R ²	c (%) ^a
1	C ₆ H ₅ (1a)	CH ₃	>99
2	3-OMe-C ₆ H ₄ (1b)	CH ₃	>99
3	3-NO ₂ -C ₆ H ₄ (1c)	CH ₃	39
4	3-Cl-C ₆ H ₄ (1d)	CH ₃	>99
5	4-Cl-C ₆ H ₄ (1e)	CH ₃	>99
6	2-Cl-C ₆ H ₄ (1f)	CH ₃	>99
7	2,4-Cl ₂ -C ₆ H ₃ (1g)	CH ₂ Cl	<1
8	Ciclohexil (1h)	CH ₃	>99
9	n-Hexil (1i)	CH ₃	>99

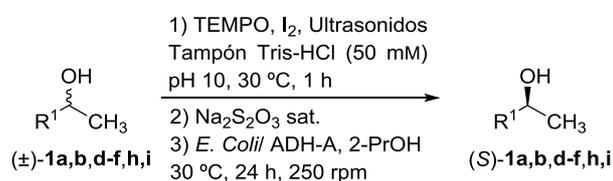
^a Conversión medida por CG.

Finalmente, fue posible la oxidación satisfactoria de alcoholes alifáticos tanto cíclicos (**1h**) como lineales (**1i**), consiguiendo obtener una conversión completa en ambos casos (entradas 8 y 9).

IV.3.2. Desracemización de alcoholes secundarios

Una vez que el sistema de oxidación Iodo/TEMPO demostró ser eficiente en la oxidación de alcoholes secundarios (Tabla IV.3), se eligió la ADH-A para reducir las correspondientes cetonas debido a las excelentes actividades mostradas por este enzima en las condiciones de trabajo de nuestro sistema oxidativo. Satisfactoriamente, todos los alcoholes de configuración (*S*) se obtuvieron de forma enantiopura, con conversiones por encima del 95% partiendo de sus formas racémicas (Tabla IV.4).

Tabla IV.4. Desracemización de alcoholes etílicos **1a,b,d-f,h-i** (20 mM) con TEMPO (0.2 eq), iodo (2 eq) y ADH-A en un tampón Tris-HCl pH 10.



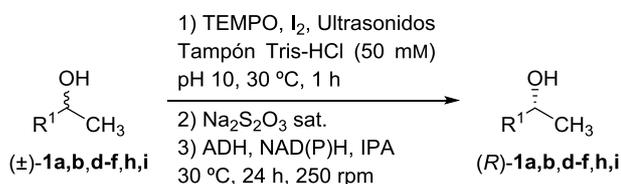
Entrada	R ¹	c (%) ^a	ee (%) ^b
1	C ₆ H ₅ (1a)	96	>99
2	3-OMe-C ₆ H ₄ (1b)	96	>99
3	3-Cl-C ₆ H ₄ (1d)	99	>99
4	4-Cl-C ₆ H ₄ (1e)	99	>99
5	2-Cl-C ₆ H ₄ (1f)	99	>99
6	Ciclohexil (1h)	98	>99
7	n-Hexil (1i)	96	>99

^a Conversiones medidas por CG.

^b Excesos enantioméricos medidos por CG.

Buscando obtener los alcoholes con la configuración opuesta, se probaron enzimas de tipo *anti-Prelog* en el paso de biorreducción de nuestro proceso de desracemización (Tabla IV.5). Para ello se eligieron dos enzimas, una dependiente NADPH de *Lactobacillus brevis* (LB-ADH) y otra dependiente de NADH, comercialmente disponible bajo el nombre evo-1.1.200. De modo análogo a lo que sucedía con la ADH-A ambas enzimas reconocieron todos los sustratos y después de la oxidación química y posterior tratamiento con una disolución de Na₂S₂O₃ de la reacción, realizaron la biorreducción de todas las cetonas dando lugar a los alcoholes de configuración (*R*) con conversiones superiores al 90%.

Tabla IV.5. Desracemización de alcoholes secundarios **1a,b,d-f,h-i** (20 mM) con TEMPO (0.2 eq), iodo (2 eq) y ADHs *anti-Prelog* usando un tampón de Tris-HCl a pH 10.



Entrada	R ¹	ADH	c (%) ^a	ee (%) ^b
1	C ₆ H ₅ (1a)	LB	91	99
2	C ₆ H ₅ (1a)	evo-1.1-200	91	99
3	3-OMe-C ₆ H ₄ (1b)	LB	99	>99
4	3-OMe-C ₆ H ₄ (1b)	evo-1.1-200	99	>99
5	3-Cl-C ₆ H ₄ (1c)	LB	92	>99
6	3-Cl-C ₆ H ₄ (1c)	evo-1.1-200	95	>99
7	4-Cl-C ₆ H ₄ (1e)	LB	99	>99
8	4-Cl-C ₆ H ₄ (1e)	evo-1.1-200	99	>99
9	2-Cl-C ₆ H ₄ (1f)	LB	99	>99
10	2-Cl-C ₆ H ₄ (1f)	evo-1.1-200	99	>99
11	Ciclohexil (1h)	LB	98	>99
12	Ciclohexil (1h)	evo-1.1-200	98	>99
13	n-Hexil (1i)	LB	95	>99
14	n-Hexil (1i)	evo-1.1-200	94	>99

^a Conversiones medidas por CG.

^b Excesos enantioméricos medidos por CG.

Conclusiones

Por un lado se ha evaluado el comportamiento de diferentes sistemas oxidativos empleando 1-feniletanol como sustrato modelo. El sistema formado por iodo y TEMPO en combinación con el uso de ultrasonidos ha permitido el desarrollo de una oxidación rápida en medios acuosos.

Por otro lado se ha estudiado la biorreducción en condiciones de reacción análogas, permitiendo el acceso a los correspondientes alcoholes en forma enantiopura, identificando la ADH-A como un catalizador eficiente para la formación de los (*S*)-alcoholes, mientras que la evo-1.1.200 y la LB-ADH condujeron a los (*R*)-alcoholes.

Identificando el uso de una disolución acuosa saturada de Na₂S₂O₃ para destruir el exceso de yoduros, se ha puesto a punto una metodología quimioenzimática para obtener una amplia familia de alcoholes secundarios tanto aromáticos como alifáticos y lineales con conversiones superiores al 90% y en forma enantioméricamente pura.

Los resultados de este trabajo de investigación se encuentran recogidos en el artículo titulado “*Chemoenzymatic Deracemization of Secondary Alcohols Using a TEMPO-Iodine-Alcohol Dehydrogenase System*” de D. Méndez-Sánchez, J. Mangas-Sánchez, I. Lavandera, V. Gotor y V. Gotor-Fernández, que se encuentra aceptado para su publicación a la revista *ChemCatChem*, manuscrito número cctc.201500816.

Parte experimental

IV.5.1. Información general

Las técnicas experimentales utilizadas en este capítulo se encuentran descritas en los capítulos previos de esta memoria.

La alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus brevis* (LBADH, 300 U/mL), fue obtenida a través de Codexis Inc. La ADH EVO-1.1.200 (0.42 U/mg) fue adquirida a EVO-catal. La ADH-A, sobreexpresadas en células de *E. coli* BL21 fueron donadas por el Prof. Wolfgang Kroutil de la Universidad de Graz. Las células se crecieron en un medio LB con ampicilina como antibiótico (1 L, 100 mg/L) a 30 °C y 150 rpm durante 24 h. A continuación se añadió ampicilina adicional [50 mg/L y ZnCl₂ (100 mg/L) en el caso de la ADH-A] e isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, 450 mg/L) y se dejó agitando 24 h a 20 °C. Las células se centrifugaron, se lavaron y se resuspendieron en una disolución tampón de fosfato (pH 7.5, 50 mM), se congelaron con nitrógeno líquido y se liofilizaron. Las células obtenidas se guardaron a 4 °C.

El resto de reactivos se compraron a Aldrich, Fluka o Alfa Aesar y se usaron sin modificación alguna. En todos los casos se utilizaron disolventes con alto grado de pureza y en los casos necesarios fueron secados con sodio o hidruro de calcio y almacenados bajo nitrógeno.

IV.5.2. Protocolo general para la oxidación del alcohol **1a-i utilizando el sistema I₂/TEMPO bajo sonicación**

Sobre una disolución del correspondiente alcohol **1a-i** (0.08 mmol) en una disolución tampón Tris-HCl 50 mM a pH 10 (4 mL, 20 mM), se añaden iodo (1.5 eq, 30 mg) y TEMPO (0.1-0.2 eq, 2.5-5 mg). La reacción se sónica durante 1 h y se miden las conversiones por análisis de CG.

IV.5.3. Protocolo general para la biorreducción de las cetonas **2a-i con ADH-A sobreexpresada en *E. coli***

En un eppendorf que contiene la correspondiente cetona **2a-i** (0.08 mmol) disuelta en una disolución tampón 50 mM Tris-HCl a pH 10 (468 μ L), se añaden ADH-A sobreexpresada en *E. coli* (15 mg) y 2-propanol (32 μ L). La reacción se agita a 250 rpm y 30 °C durante 24 h. A continuación, se extrae con AcOEt (2 \times 500 μ L), se centrifuga (13000 rpm, 90 s) y se seca con Na₂SO₄. Las conversiones y excesos enantioméricos de los correspondientes alcoholes **1a-i** se midieron por análisis de CG.

IV.5.4. Protocolo general para la biorreducción de las cetonas **2a-i con LB-ADH**

En un eppendorf que contiene la correspondiente cetona **2a-i** (0.08 mmol) en 468 μ L de un tampón 50 mM Tris-HCl a pH 10, se añaden LB-ADH (10 μ L, 3 U), 1 mM de MgCl₂ (60 μ L, de una disolución de stock 10 mM), 1 mM de NADPH (60 μ L, de una disolución de stock 10 mM) y 2-propanol (32 μ L). La reacción se agita a 250 rpm y 30 °C durante 24 h. A continuación, se extrae con AcOEt (2 \times 500 μ L), se centrifuga (13000 rpm, 90 s) y se seca con Na₂SO₄. Las conversiones y excesos enantioméricos de los correspondientes alcoholes **1a-i** se midieron por análisis de CG.

IV.5.5. Protocolo general para la biorreducción de las cetonas **2a-i con evo-1.1.200**

En un eppendorf que contiene la correspondiente cetona **2a-i** (0.08 mmol) disuelta en una disolución tampón 50 mM Tris-HCl a pH 10 (468 μ L), se añaden evo-1.1.200 (50 μ L, 3 U), 1 mM de MgCl₂ (50 μ L, de una disolución de stock 10 mM), 1 mM de NADPH (50 μ L), de una disolución de stock 10 mM) y 2-propanol (25 μ L). La reacción se agita a 250 rpm y 30 °C durante 24 h. A continuación, se extrae con AcOEt (2 \times 500 μ L), se centrifuga (13000 rpm, 90 s) y se seca con Na₂SO₄. Las conversiones y excesos enantioméricos de los correspondientes alcoholes **1a-i** se midieron por análisis de CG.

IV.5.6. Protocolo general para la desracemización de alcoholes **1a-i one-pot con ADH-A**

En un tubo falcon con capacidad para 15 mL sobre una disolución del correspondiente alcohol racémico **1a-i** (0.08 mmol) en una disolución tampón Tris-HCl 50 mM a pH 10 (4 mL, 20 mM), se añaden iodo (1.5 eq, 30 mg) y TEMPO (0.1 eq, 2.5 mg). Esta mezcla se sónica durante 1 h a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se para la reacción mediante la adición de una disolución acuosa saturada de Na₂S₂O₃ (300 µL). Entonces se toma una alícuota de 500 µL en un eppendorf y se adicionan ADH-A sobreexpresada en *E. coli* (15 mg) y 2-propanol (32 µL). La reacción se agita a 250 rpm y 30 °C durante 24 h. A continuación, se extrae con AcOEt (2×500 µL), se centrifuga (13000 rpm, 90 s) y se seca con Na₂SO₄. Las conversiones y excesos enantioméricos de los correspondientes alcoholes **1a-i** se midieron por análisis de CG.

IV.5.7. Protocolo general para la desracemización de alcoholes **1a-i one-pot con LB-ADH**

En un tubo falcon con capacidad para 15 mL sobre una disolución del correspondiente alcohol racémico **1a-i** (0.08 mmol) en una disolución tampón Tris-HCl 50 mM a pH 10 (4 mL, 20 mM), se añaden iodo (1.5 eq, 30 mg) y TEMPO (0.1 eq, 2.5 mg). Esta mezcla se sónica durante 1 h a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se para la reacción mediante la adición de una disolución acuosa saturada de Na₂S₂O₃ (300 µL). Entonces se toma una alícuota de 500 µL en un eppendorf y se adicionan LB-ADH (10 µL, 3 U), 1 mM de MgCl₂ (60 µL de una disolución de stock 10 mM), 1 mM de NADPH (60 µL de una disolución de stock 10 mM) y 2-propanol (32 µL). La reacción se agita a 250 rpm y 30 °C durante 24 h. A continuación, se extrae con AcOEt (2×500 µL), se centrifuga (13000 rpm, 90 s) y se seca con Na₂SO₄. Las conversiones y excesos enantioméricos de los correspondientes alcoholes **1a-i** se midieron por análisis de CG.

IV.5.8. Protocolo general para la desracemización de alcoholes **1a-i** one-pot con la ADH evo-1.1.200

En un tubo falcon con capacidad para 15 mL sobre una disolución del correspondiente alcohol racémico **1a-i** (0.08 mmol) en una disolución tampón Tris-HCl 50 mM a pH 10 (4 mL, 20 mM), se añaden iodo (1.5 eq, 30 mg) y TEMPO (0.1 eq, 2.5 mg). Esta mezcla se sonica durante 1 h a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo se para la reacción mediante la adición de una disolución acuosa saturada de Na₂S₂O₃ (300 µL). Entonces se toma una alícuota de 500 µL y se le adicionan evo-1.1.200 (50 µL, 3 U), 1 mM de MgCl₂ (50 µL de una disolución de stock 10 mM), 1 mM de NADPH (50 µL de una disolución de stock 10 mM) y 2-propanol (25 µL). La reacción se agita a 250 rpm y 30 °C durante 24 h. A continuación, se extrae con AcOEt (2×500 µL), se centrifuga (13000 rpm, 90 s) y se seca con Na₂SO₄. Las conversiones y excesos enantioméricos de los correspondientes alcoholes **1a-i** se midieron por análisis de CG.

Trabajo de investigación

Capítulo V: Procesos de resolución
cinética dinámica reductiva de cetonas
bencílicas racémicas empleando alcohol
deshidrogenasas y resinas de intercambio
aniónico

Antecedentes

Como ya se ha indicado en la introducción general de esta Tesis Doctoral los procesos de resolución cinética dinámica han surgido en estos últimos años como una interesante alternativa a los procesos de resolución cinética clásica, la principal ventaja que poseen es la capacidad de poder alcanzar el 100% de rendimiento teórico en un producto enantiopuro cuando se consigue una racemización efectiva del sustrato de partida.

V.1.1. Procesos de tipo dinámico

Para conseguir una buena racemización se han utilizado diversas metodologías principalmente mediante el uso de compuestos metálicos, que si bien han sido las más utilizadas en los primeros años se han ido viendo desplazadas por otro tipo de métodos en función de la diversidad estructural de los sustratos de partida. Así por ejemplo, dependiendo de la presencia o no de hidrógenos ácidos en una molécula, se han utilizado pHs básicos o resinas de intercambio aniónico para llevar a cabo la racemización. Otros métodos muy utilizados han sido los radicalarios, donde la formación de un radical en la molécula provoca la racemización de la misma. Por último y no menos importantes, existen algunos ejemplos donde la racemización es realizada por otras enzimas como puedan ser las racemasas, si bien estas se encuentran en un estadio muy prematuro para su aplicación en síntesis química.

En cuanto al tipo de biocatalizadores que realizan estos procesos existen algunos ejemplos donde las enzimas que los catalizan son BVMO o proteasas, pero la mayor parte de estudios existentes han sido desarrollados con lipasas y en menor medida con alcohol deshidrogenasas. En este punto, se realiza un breve resumen de procesos dinámicos empleando tanto lipasas como alcohol deshidrogenasas, que muestran excelente aplicabilidad en síntesis orgánica.

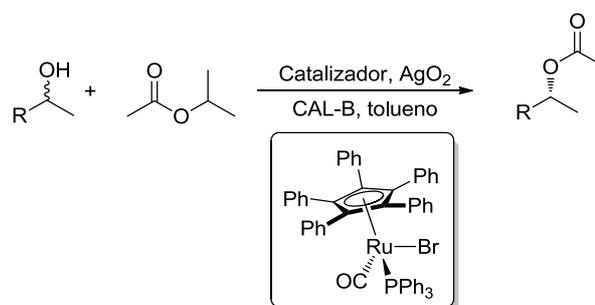
V.1.1.1. Procesos de tipo dinámico catalizados por lipasas

Este tipo de resoluciones han sido ampliamente estudiadas utilizando tanto catalizadores metálicos como el propio medio de reacción para inducir la racemización en una gran variedad de sustratos.¹¹⁷ Así, Williams y colaboradores¹¹⁸ fueron pioneros en el desarrollo de la resolución cinética de alcoholes alílicos empleando una reacción de acilación donde un complejo de paladio (II) era el responsable de llevar a cabo la racemización del enantiomero remanente. Años más tarde, Bäckvall y colaboradores describieron la resolución de una amplia familia de alcoholes secundarios utilizando diferentes catalizadores de rutenio, aislándose los ésteres desados con excelentes conversiones y selectividades¹¹⁹. Este grupo de investigación, ha explorado ampliamente el campo de las DKR catalizadas por lipasas, habiendo sido posible la mejora de los resultados empleando diversos catalizadores metálicos que permiten desarrollar la racemización a temperatura ambiente en lugar de a 60 °C, consiguiendo mantener la actividad de la enzima a más tiempos prolongados, y alcanzándose conversiones completas en acetatos enantiopuros (Esquema V.1).

¹¹⁷ (a) K. Han, C. Kim, J. Park, M. J. Kim, *J. Org. Chem.* **2010**, 75,3105; (b) M. J. Kim, Y. K. Choi, S. Kim, D. Kim, K. Han, S. B. Ko, J. Park, *Org. Lett.* **2008**, 10, 1295; (c) A. Berkessel, M. L. Sebastian-Ibarz, T. N. Müller, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 6717; (d) A. Berkessel, M. L. Sebastian-Ibarz, T. N. Müller *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 6567. (e) J. H. Choi, Y. H. Kim, S. H. Nam, S. T. Shin, M. J. Kim, J. Park, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 2373

¹¹⁸ P. M. Dinh, J. A. Howarth, A. R. Hudnott, J. M. J. Williams, W. Harris. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 7623.

¹¹⁹ (a) K. Bogár, P.H. Vidal, A.R. Alcántara-León, J.-E. Bäckvall, *Org. Lett.* **2007**, 9, 3401; (b) B. Martín-Matute, M. Edin, K. Bogár, J.-E Bäckvall *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6535; (c) B. Martín-Matute, M. Edin, K. Bogár, J.-E Bäckvall, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 6697; (d) B. A. Persson, A. L. E. Larsson, M. Le Ray, J.-E. Bäckvall. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1645; (e) A. L. E. Larsson, B. A. Persson, J.-E. Bäckvall. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, 36, 1211.



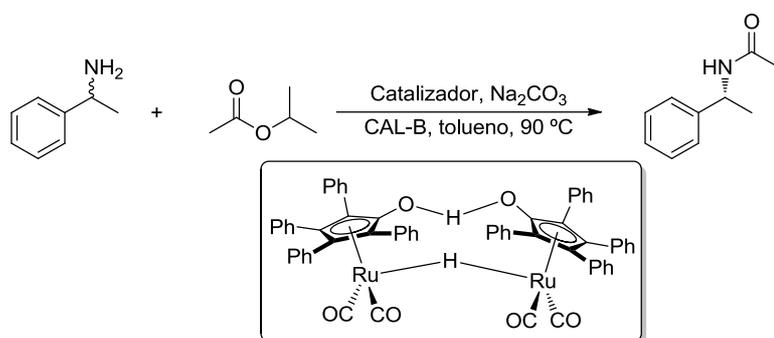
Esquema V.1. Resolución cinética dinámica de alcoholes secundarios utilizando un catalizador de rutenio a temperatura ambiente.

También se han descrito ejemplos de resolución cinética dinámica de aminas,¹²⁰ si bien estos son más escasos en la bibliografía debido a la dificultad para obtener una racemización efectiva de éstas al pH que trabajan las lipasas. Este tipo de procesos fue desarrollado por primera vez por Reetz y Schimossek, los cuales emplearon paladio inmovilizado sobre carbono para conseguir racemizar el enantiómero de la amina remanente¹²¹ Años más tarde, Bäckvall y colaboradores desarrollaron procesos de DKR sobre aminas primarias utilizando el catalizador de Shvo (Esquema V.2), obteniendo la α -metilbencilamina con un 70% de rendimiento y un exceso enantiomérico del 99%.¹²²

¹²⁰ (a) J. Kim, W.-H. Kim, K. Han, Y. K. Choi, J. Park, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1157; (b) S. Gastaldi, S. Escoubet, N. Vanthuyne, G. Gil, M. P. Bertrand, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 837; (c) A. Parvulescu, D. De Vos, P. Jacobs, *Chem. Commun.* **2005**, 5207.

¹²¹ M. T. Reetz, K. Schimossek, *Chimia* **1996**, *50*, 668.

¹²² (a) L. K. Tahlén, D. Zhao, J.-B. Sortais, J. Paetzold, C. Hoben, J.-E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3403; (b) C. E. Hoben, L. Kanupp, J.-E. Bäckvall, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 977; (c) J. Paetzold, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17620.



Esquema V.2. Resolución cinética dinámica de α -metilbencilamina utilizando el catalizador de Shvo.

V.1.1.2. Procesos de tipo dinámico emplando alcohol deshidrogenasas

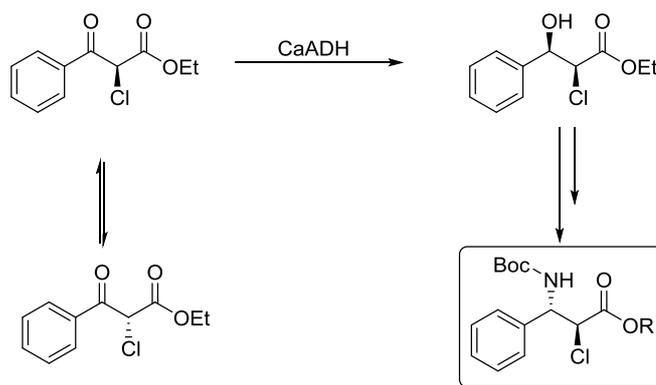
El primer ejemplo existente en la bibliografía de este tipo de procesos con ADHs data, del año 1976 cuando Deol y colaboradores¹²³ emplearon la levadura de panadería (Baker's yeast, BYADH) para llevar a cabo la reducción de cetonas, sirviendo como estrategia alternativa a los procesos de hidrogenación asimétrica catalizada por metales. Durante los siguientes años, los procesos de resolución cinética dinámica reductiva (DYRKR) fueron siempre realizados utilizando células enteras, que si bien permitían alcanzar elevados excesos enantioméricos, estaban muy limitados por la necesidad de utilizar varias enzimas que en muchos casos disminuía la eficacia y rentabilidad del proceso. No fue hasta finales de la pasada década cuando gracias a los avances en biología molecular, sistemas de regeneración del cofactor y aislamiento de este tipo de enzimas se consiguió superar estas limitaciones.

Este tipo de procesos han sido ampliamente estudiados con ceto-fosfonatos, ceto-sulfonas, α -cianocetonas y β -cetoésteres, siendo estos últimos los que mejores resultados han mostrado, logrando desarrollar importantes procesos para la síntesis de precursores de fármacos. En este

¹²³ B. S. Deol, D. Ridley, G. Simpson, *Aust. J. Chem.* **1976**, 29, 2459.

campo cabe destacar la excelente revisión bibliografía recientemente publicada por Applegate y Berkowitz¹²⁴

Un ejemplo con gran aplicabilidad sintética es el desarrollado por el grupo de investigación del propio Berkowitz, donde se consiguió realizar la DYRKR de un β -cetoéster para obtener el Taxotere, un importante intermedio en la síntesis del Taxol (Esquema V.3).¹²⁵ Así, utilizando una ADH de *Clostridium acetobutylicum* (CaADH) y como sistema de regeneración del cofactor el sistema glucosa/GDH, se obtuvo este producto a escala de gramos, con en forma enantiopura y con un excesos diastereiomérico del 95%.



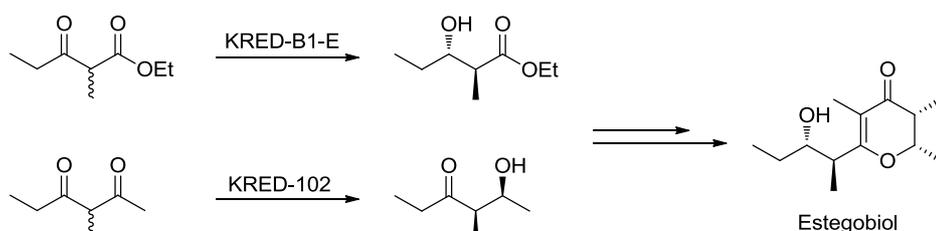
Esquema V.3. Síntesis quimioenzimática de Taxotere a través de un proceso de DYRKR promovido por una alcohol deshidrogenasa.

Unos años más tarde, Kalaitzakis y colaboradores llevaron a cabo la reducción selectiva de uno de los grupos carbonilos de una 1,3-dicetona, y de un β -cetoéster, al combinar ambos productos les permite obtener dos feromonas, estegobiol y estebiona tras varios pasos de reacción (Esquema V.4).¹²⁶

¹²⁴ G. A. Applegate, D. B. Berkowitz, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, 357, 1619.

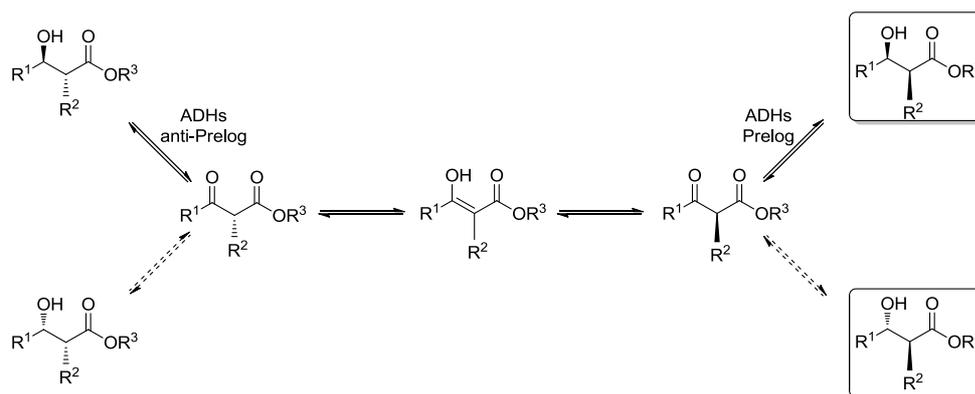
¹²⁵ G. A. Applegate, R. W. Cheloha, D. L. Nelson, D. B. Berkowitz, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 2420.

¹²⁶ (a) D. Kalaitzakis, I. Smonou *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 43; (b) D. Kalaitzakis, S. Kambourakis, D. J. Rozzell, I. Smonou, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, 18, 2418.



Esquema V.4. Síntesis del estegobiol mediante combinación de dos procesos de DYRKR con alcohol deshidrogenasas.

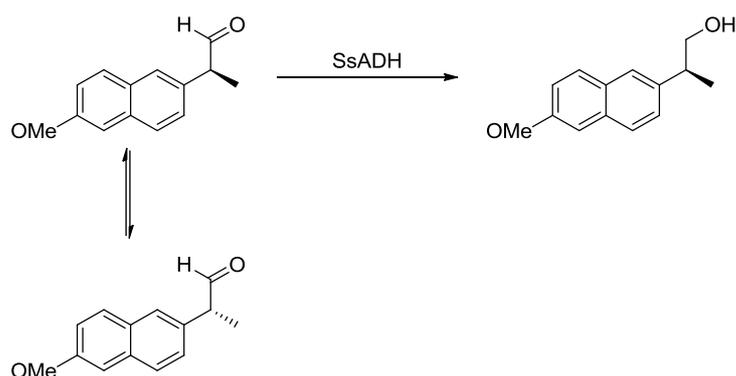
Por otro lado en nuestro grupo de investigación se han desarrollado procesos de DYRKR para una serie de β -cetoésteres (Esquema V.5) donde la racemización ocurre forzada por las condiciones de pH del propio medio de reacción, consiguiendo obtener una familia de β -hidroxiésteres enantiopuros con buenos excesos diastereoméricos en la mayoría de los casos.¹²⁷ Además, mediante la combinación de ADHs de tipo *Prelog* y *anti-Prelog* se consigue acceder a productos con la configuración absoluta deseada en cada uno de los casos.



Esquema V.5. Resolución cinética dinámica de β -cetoésteres catalizada por ADHs.

¹²⁷ A. Cuetos, A. Rioz-Martínez, F. R. Bisogno, B. Grischek, I. Lavandera, G. de Gonzalo, W. Kroutil, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, 354, 1743.

Mucho menos investigadas que las DYRKR de β -cetoésteres, han sido las de aldehídos y cetonas. El grupo de investigación de Berkowitz ha descrito recientemente un proceso donde una ADH hipertermófila de *Sulfolobus solfataricus* (SsADH), consigue realizar la DYRKR de una serie de aldehídos obteniendo los correspondientes (*S*)-profenos a escala de gramos, con elevadas conversiones y excesos enantioméricos (Esquema V.6).¹²⁸ En este caso, la racemización se consigue gracias a las condiciones drásticas de reacción (pH= 9 y 80 °C) que favorecen la racemización de los aldehídos de partida.



Esquema V.6. Síntesis de una familia (*S*)-profenos mediante un proceso de DYRKR catalizado por una alcohol deshidrogenasa.

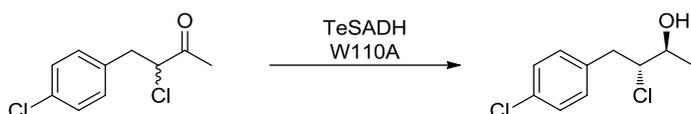
Existen también ejemplos de la resolución de α,α -dihaloacetofenonas¹²⁹ y α -clorocetonas¹³⁰ siendo este último tipo de sustratos los que mejores resultados han mostrado. Así, Musa y Philips realizaron de forma satisfactoria la resolución de este tipo de cetonas utilizando técnicas de evolución dirigida sobre la enzima

¹²⁸ J. A. Friest, Y. Maezato, S. Broussy, P. Blum, D. B. Berkowitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5930

¹²⁹ K. Kędziora, F. R. Bisogno, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, J. Montejo-Bernardo, S. García-Granda, W. Kroutil, V. Gotor, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 1066.

¹³⁰ M. M. Musa, K. I. Ziegelmann-Fjeld, C. Vieille, J. G. Zeikus R. S. Philips, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 30.

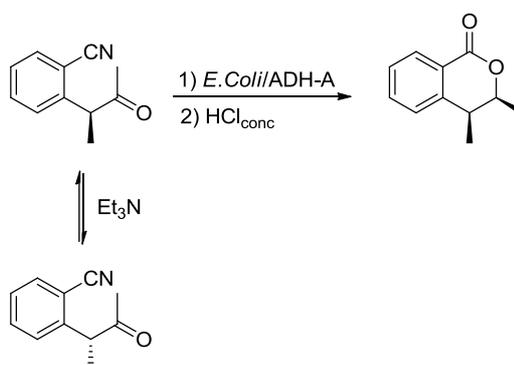
Thermoanaerobacter ethanolicus (TeSADH), consiguiendo excesos enantioméricos del 99% y conversiones del 84% (Esquema V.7).



Esquema V.7. Proceso de DYRKR para la resolución de α -clorocetonas.

Recientemente nuestro grupo de investigación aplicó este tipo de procesos a la resolución de cetonas racémicas utilizando la enzima ADH-A de *Rhodococcus ruber* (ADH-A) sobreexpresada en *E. coli*. (Esquema V.8).¹³¹ Después de una optimización de los parámetros de reacción, evaluándose diversos métodos de racemización, se consiguieron los mejores resultados con Et_3N o con la resina de intercambio aniónico DOWEX-MWA-1. Los alcoholes obtenidos fueron precursores versátiles e inmediatos de una serie de 4-alkil-3-metil-3,4-dihidroiscumarinas, tras un proceso “one-pot” utilizando Et_3N como agente de racemización y ciclación con ácido clorhídrico a elevada temperatura. Este trabajo servirá como base para la realización del capítulo final de esta Tesis Doctoral, estudiando la diferente reactividad de las cetonas racémicas cuando en la posición C-2 se encuentra un átomo de hidrógeno, en lugar de un grupo ciano, lo que dará a su vez una interesante aplicabilidad sintética en la síntesis de una nueva familia de heterociclos oxigenados como son los isocromanos, y cuyas características principales se discuten a continuación.

¹³¹ J. Mangas-Sánchez, E. Busto, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Org. Lett.* **2013**, 3872



Esquema V.8. Síntesis “one-pot” de 3,4-dihidroisocumarinas a través de un mecanismo de DYRKR.

V.1.2. Importancia de los isocromanos

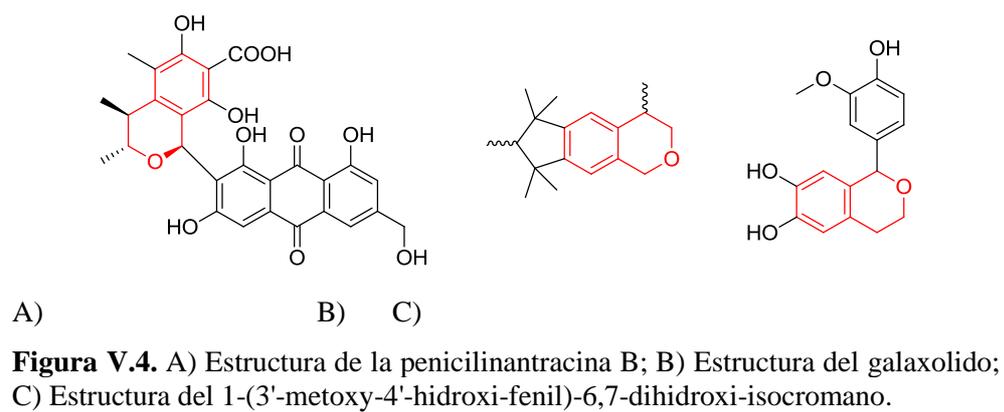
Los alcoholes bencílicos cuya síntesis se persigue en este capítulo son precursores de numerosos productos de elevado interés. Así, pueden ser precursores de isocromanos, heterociclos que se encuentran presentes en diversos productos naturales y sintéticos, y que presentan una importante actividad biológica, formando parte de la estructura de un gran número de fármacos con actividad antitumoral, antibiótica, y antiinflamatoria.

Un ejemplo de este tipo de compuestos es el de la penicilinantracina B (Figura V.1a) que posee actividad antibiótica.¹³² Por otro lado, también poseen otras aplicaciones comerciales, al encontrarse en el esqueleto de numerosos perfumes como es el caso del galaxolido (Figura V.1b).¹³³ También se han encontrado esta clase compuestos en el aceite de oliva,

¹³² (a) N. Khamthong, V. Rukachaisirikul, S. Phongpaichit, S. Preedanon, J. Sakayaroj, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 8245; (b) D. Fishlock, R. M. Williams, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3299; (c) A. K. Machocho, J. Bastida, C. Codina, F. Vildomat, R. Brun, S. C. Chabra, *Phytochemistry* **2004**, *65*, 3143; (d) R. Grigg, V. Savic, V. Sridharan, C. Terrier, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8613; (e) D. L. J. Clive, M. Sannigrahi, S. Hisaindee, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 954; (f) W. H. Pearson, F. E. Lovering, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12336; (g) S. E. Denmark, M. E. Schnute, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1013.

¹³³ (a) M. A. Specker, E. T. Theimer, US Patent, 4162256, **1979**, *Chem. Abstr.* **1980**, *92*, 41765; (b) G. Fréter, U. Müller, P. Kraft, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1656.

donde la presencia del 1-(3'-metoxy-4'-hidroxi-fenil)-6,7-dihidroxi-isocromano le confiere a este producto propiedades antioxidantes (Figura V.1c).¹³⁴



¹³⁴ P. Lorenz, M. Zeh, J. M. Lobenhoffer, H. Schmidt, G. Wolf, T. F. W. Horn. *Free Radic. Res.* **2005**, 39, 535.

Objetivos

Como hemos visto en los antecedentes existen varios ejemplos de procesos de DYRKR de α -cianocetonas, ceto-fosfonatos y β -cetoesteres, mientras que son muy escasos este tipo de ejemplos sobre cetonas racémicas. Por ello nos hemos planteado en este capítulo, una serie de objetivos como son:

La síntesis química de una serie de bencilcetonas racémicas, así como de sus correspondientes alcoholes que nos permitirán desarrollar métodos analíticos para el seguimiento de las reacciones enzimáticas.

El desarrollo de una metodología quimioenzimática para obtener alcoholes secundarios a través de un proceso DYRKR, para lo cual empleando como sustrato modelo la 3-fenilbutan-2-ona se optimizarán los parámetros que afectan a la biorreducción en términos de tiempo, temperatura, pH y carga de enzima, así como la racemización del enantiómero remanente.

Extender esta metodología quimioenzimática a una serie de bencilcetonas utilizando ADHs tanto de tipo *Pelog* como *anti-Prelog*.

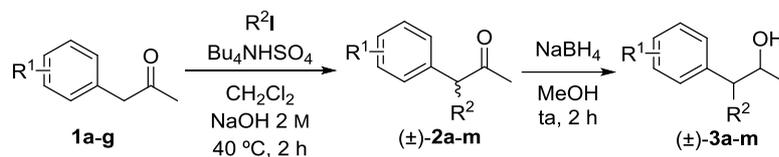
Demostrar la aplicabilidad de esta metodología, empleando el alcohol 3-fenilbutan-2-ol obtenido en la síntesis de un representante de la familia de los isocromanos como es el 3,4-dimetilisocromano con alta selectividad.

Resultados y discusión

V.3.1. Síntesis de las cetonas **2a-m** a través de un reacción de alquilación

En un primer lugar se llevó a cabo la síntesis de una familia de cetonas racémicas **2a-m** mediante la reacción de cetonas proquirales bencílicas **1a-g** con una serie de yoduros de alquilo en presencia de cantidades estequiométricas de bisulfato de tetrabutilamonio (Tabla V.1). Basándonos en la disponibilidad comercial de las cetonas proquirales, se eligieron aquellas con diferentes patrones de sustitución en el anillo aromático, incluyendo sustituyentes metoxilo, hidroxilo, nitro o fluoro en las posiciones *orto* o *para* del anillo aromático (entradas 1-7), por otro lado también se seleccionaron yoduros de alquilo con restos de cadena lineal (metilo, etilo, propilo, alilo y butilo, entradas 1-7, 8, 9, 10 y 11), ciclohexilo (entrada 12) y bencilo (entrada 13).

Tabla V.1. Síntesis de las cetonas **2a-m** a través de una reacción de alquilación de **1a-g** con el correspondiente yoduro de alquilo y posterior reducción química para obtener los alcoholes **3a-m**.



Entrada	3	R ¹	R ²	2a-m (%) ^a	3a-m (%) ^{a,b}
1	3a	H	Me	67	93 (20:80)
2	3b	4-OMe	Me	60	96 (16:84)
3	3c	4-OH	Me	45	93 (14:86)
4	3d	4-NO ₂	Me	67	96 (23:77)
5	3e	2-OMe	Me	55	99 (13:87)
6	3f	2-Me	Me	55	90 (13:87)
7	3g	2-F	Me	84	97 (16:84)
8	3h	H	Et	56	97 (19:81)
9	3i	H	<i>n</i> -Pr	49	98 (15:85)
10	3j	H	Alil	54	98 (21:79)
11	3k	H	<i>n</i> -Bu	60	95 (14:86)
12	3l	H	Cy	30	90
13	3m	H	Bn	40	96

^a Rendimientos aislados tras cromatografía de columna en gel de sílice.

^b Relaciones diastereoméricas (*dr*) syn:anti medidas por HPLC.

De este modo tras 2 h de reacción a 40 °C se obtuvieron las correspondientes cetonas **2a-m** alquiladas en posición α , aislándose con rendimientos que van desde moderados a altos (30-84%) tras un paso de extracción y otro de purificación por cromatografía de columna.

A continuación, para poder desarrollar métodos analíticos, que permitiesen la medida de las conversiones y excesos tanto enantioméricos como diastereoméricos de los productos resultantes del proceso de bioreducción, se llevó a cabo la reducción química de las cetonas previamente obtenidas empleando borohidruro de sodio en metanol, aislándose los correspondientes alcoholes **3a-m** con elevados rendimientos (90-98%). La configuración anti fue la obtenida mayoritariamente en todos los casos con un reacción syn:anti de hasta el 13:87.

V.3.2. Optimización de los parámetros de reacción utilizando como sustrato modelo 3-fenilbutan-2-ona (**2a**)

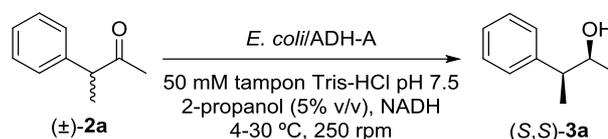
Para la optimización de las condiciones de reacción se eligió como sustrato modelo la 3-fenilbutan-2-ona (**2a**), cetona más simple de la serie al no tener ningún sustituyente en el anillo aromático. Inicialmente se estudió la KR y la racemización, buscando así unas condiciones óptimas de reacción que permitiesen combinar ambos procesos dando lugar a un proceso global de DYRKR.

Para poder comparar los resultados obtenidos con los descritos previamente en nuestro grupo de investigación,¹³¹ se eligió la ADH de *Rhodococcus ruber* DSM 44541 sobreexpresada en *Escherichia coli* (*E.coli*/ADH-A)¹³⁵ como biocatalizador (Tabla V.2). Sorprendentemente, se encontraron conversiones elevadas y bajos valores de diastereoselectividad tras 24 h de reacción a 30 °C usando tanto 5 como 15 mg de enzima

¹³⁵ (a) W. Stampfer, B. Kosjek, C. Moitzi, W. Kroutil, K. Faber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1014; (b) K. Edegger, C. C. Gruber, T. M. Poessl, S. R. Wallner, I. Lavandera, K. Faber, F. Niehaus, J. Eck, R. Oehrlin, A. Hafner, W. Kroutil, *Chem. Commun.* **2006**, 2402; (c) C. E. Paul, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, W. Kroutil, V. Gotor, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 3875.

(entradas 1 y 2), hecho que contrasta con las conversiones moderadas y excelentes enantio- y diastereoselectividades observadas para el 2-(3-oxobutan-2-il)benzocitrilo (41% de conversión, >99:1 *dr*).¹³¹

Tabla V.2. Bio-reducción de la cetona **2a** utilizando *E. coli*/ADH-A en una disolución reguladora 50 mM Tris-HCl pH 7.5 a 30 °C, 24 h y 250 rpm.



Entrada	T (°C)	t	ADH-A (mg)	c (%) ^a	<i>dr</i> ^b
1	30	24 h	15	96	53:47
2	30	24 h	5	98	53:47
3	30	5 min	15	19	91:9
4	30	10 min	15	41	87:13
5	30	20 min	15	52	82:18
6	30	40 min	15	70	70:30
7	30	1 h	15	75	63:37
8	30	2 h	15	88	54:46
9	30	5 min	5	12	93:7
10	30	10 min	5	21	91:9
11	30	20 min	5	30	89:11
12	30	40 min	5	49	82:18
13	4	5 min	5	8	90:10
14	4	10 min	5	12	90:10
15	4	20 min	5	16	90:10
16	4	40 min	5	20	90:10
17	4	1 h	5	26	90:10
18	4	2 h	5	41	89:11
19	4	4 h	5	53	83:17
20	4	6 h	5	64	76:24

^a Conversiones medidas por CG.

^b Relaciones diastereoméricas (*dr*) syn:anti medidas por HPLC.

A continuación, se realizaron una serie de experimentos encaminados a comprender mejor estos resultados, considerando que tiempos más cortos de reacción pudieran conducir a un aumento en la selectividad del proceso. Los resultados obtenidos cuando se usaron 15 mg (entradas 3-8) o 5 mg (entradas 9-12) a 4 o 30 °C (entradas 13-20), vienen a confirmar que a tiempos más cortos de reacción se obtiene una mejor selectividad (por

encima de 83:17) para valores de conversión cercanos al 50% (entradas 5, 12 y 19). Este hecho nos indica que se puede conseguir una buena DYRKR siempre y cuando se consiga una racemización eficiente del enantiómero de la cetona que reacciona más lentamente.

Cabe destacar que a diferencia de lo que ocurría en la reducción química de la cetona **2a** con borohidruro de sodio, donde el diastereoisómero mayoritario era el anti-, la bioreducción con la *E. coli*/ADH-A conduce mayoritariamente en todos los casos al alcohol **3a** de configuración (*S,S*), hecho que está en concordancia con la adición del hidruro al carbonilo por la cara menos impedida del sustrato (Regla de *Prelog*, Figura 0.10).

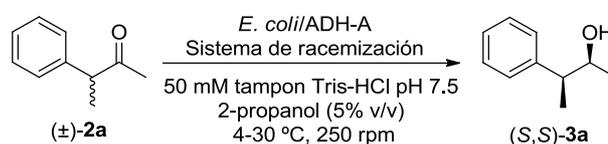
Posteriormente, nos decidimos a evaluar el proceso en condiciones de DYRKR aprovechándonos de la presencia de un hidrogeno ácido en posición α al grupo carbonilo. Por un lado se evaluó la influencia de la adición de un cosolvente hidrofóbico como hexano al medio de reacción en presencia de trietilamina (Et_3N) como catalizador básico para realizar la racemización. El disolvente orgánico actúa como reservorio tanto de producto como de sustrato, reduciendo su presencia en la fase acuosa mientras ocurre la reacción de bioreducción. De esta manera se favorece la disolución del sustrato, evitando a su vez la inhibición de la enzima causada a altas concentraciones de éste. Por otro lado, se consideró el uso de una resina de intercambio aniónico como un buen método para conseguir una racemización efectiva a la vista de los resultados mostrados por estas en la oxidación dinámica de Baeyer Villiger de bencil cetonas racémicas, catalizadas por Baeyer-Villiger monooxigenasas (BVMOs).¹³⁶

En las condiciones mencionadas, se obtuvieron idénticos resultados emplando la resina DOWEX-MWA-1 y la resina Amberlite IRA-440C en comparación a los obtenidos previamente en las KR anteriores (Tabla V.2). Buscando obtener una racemización más efectiva se optó por estudiar la

¹³⁶ C. Rodríguez, G. de Gonzalo, A. Rioz-Martínez, D. E. Torres-Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 1121.

reacción a pHs más elevados, observándose que a pH 9 la racemización mejora ligeramente, mientras que a pH 10 este efecto es más notorio. Por ello, se decidió estudiar en profundidad el proceso a pH 10 (Tabla V.3).

Tabla V.3. DYRKR de la cetona **2a** utilizando *E. coli*/ADH-A en una disolución reguladora 50 mM Tris-HCl pH 10 a 250 rpm y subsiguiente ciclación intramolecular catalizada por ZnCl₂ anhidro.



Entrada	ADH-A (mg)	Sistema de racemización	T (°C)	c (%) ^a	ee 2a (%) ^a	dr 3a ^b
1	5	-----	4	63	86	80:20
2	5	Et ₃ N/Hexano	4	59	60	85:15
3	5	DOWEX-MWA-1	4	58	72	83:17
4	5	IRA-440C	4	11	6	95:5
5	15	IRA-440C	4	15	10	94:6
6	15	IRA-440C	30	43	6	88:12
7	5+5+5 ^c	IRA-440C	4	27	22	95:5
8	5+5+5 ^c	IRA-440C	30	84	23	88:12

^a Conversiones medidas por CG.

^b Excesos enantioméricos y relaciones diastereoméricas syn:anti medidos por HPLC.

^c 5 mg de ADH-A cada 24 h para un total de 72 h de reacción.

En estas condiciones se observó una racemización parcial de la cetona de partida cuando se utilizan mezclas de Et₃N y hexano, así como la resina DOWEX a 4 °C (entradas 1-3), mientras que cuando se utiliza la resina IRA-440C la racemización es casi completa (entrada 4). Desafortunadamente esta resina produce una rápida desactivación de la enzima en estas condiciones, incluso con cargas de enzima más elevadas (entrada 5). Por este motivo, se intentó mejorar la reactividad enzimática siguiendo dos estrategias: adicionando el enzima por partes (entradas 7 y 8) o elevando la temperatura a 30 °C (entradas 6 y 8), consiguiéndose así una conversión del 27% a 4°C (entrada 7) y un 84% a 30 °C (entrada 8) con buenas selectividades tras 3 días de reacción.

V.3.2. Extensión de la metodología a una serie de bencilcetonas **2b-m**

En este punto y conociendo las condiciones óptimas para la DYRKR del sustrato modelo **2a**, se decidió extender esta metodología a una serie de bencilcetonas racémicas **2b-m**. Las reacciones de bio-reducción se realizaron a 30 °C en una disolución tampón 50 mM Tris-HCl a pH 10 usando las resinas IRA-440C o DOWEX-MWA-1, y adicionando en todos casos la ADH-A en porciones durante 3 o 4 días. Del mismo modo que ocurría con la formación del alcohol **3a** se observó que en todos los casos se obtienen en forma enantiopura los diastereoisómeros syn-(*S,S*)-**3b-m** (Tabla V.4). Las resinas y la ADH fueron compatibles con todos los sustratos, observándose solamente reacciones secundarias para la 3-(4-nitrofenil)butan-2-ona (**2d**) y la resina IRA-440C, afectando este hecho de forma negativa al exceso enantiomérico del alcohol resultante (entrada 8).

Se observaron excelentes enantio- y diastereoselectividades para las 3-arilbutan-2-onas sustituidas en posición C-2 (**2e-g**, entradas 9-14). El uso de cadenas alquílicas más largas (R^2 diferente de Me), condujo a una disminución de la reactividad siendo necesaria la adición de cargas superiores de enzima y tiempos de reacción superiores (entradas 15-25), mientras que la presencia del grupo ciclohexilo o bencilo produjo un acusado descenso en la actividad enzimática (entradas 26 y 27).

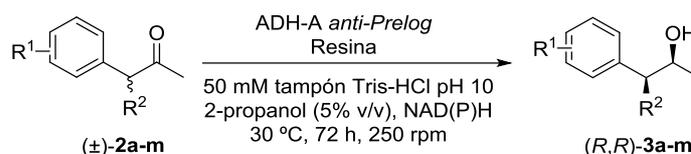
V.3.3. Extensión de la metodología a enzimas de tipo *anti-Prelog*

A la vista de las excelentes selectividades obtenidas con la ADH-A, nos decidimos a estudiar el comportamiento de otras ADH comerciales disponibles en el laboratorio, así se eligieron las de *Lactobacillus brevis* (LBADH) y evo-1.1.200, que por otro lado actúan con una selectividad opuesta de tipo *anti-Prelog* y podrán permitirnos el acceso a los enantiómeros opuestos.

En primer lugar, se evaluó la compatibilidad de estas ADHs con los sistemas de racemización utilizados previamente (resinas de intercambio aniónico Amberlite IRA-440C y DOWEX-MWA-1) para desarrollar así procesos de DYRKRs eficientes (Tabla V.5).

En un primer momento se realizaron los experimentos de control en ausencia de resina y se estudió el comportamiento de la LBADH y evo-1.1.200 en la reacción de bioreducción de la 3-fenil-butan-2-ona (**2a**) y se exploró la compatibilidad de estas dos ADHs con ambas resinas de intercambio aniónico (entradas 1-6), observándose que cuando se utiliza la resina IRA-440C se produce una elevada inhibición de ambas enzimas, mientras que cuando se combina la resina DOWEX-MWA-1 con la evo-1.1.200 se obtiene una conversión del 72% hacia la formación del alcohol (*R,R*)-**3a** con excelente enantioselectividad y buena diastereoselectividad (entrada 6). Posteriormente, se realizó la extensión a la misma serie de bencilcetonas **2b-m** utilizadas en el apartado anterior con el mismo sistema catalítico y obteniendo en todos los casos los correspondientes alcoholes (*R,R*)-**3b-m** con conversiones de moderadas a buenas y altas selectividades en la mayoría de los casos (entradas 7-18)

Tabla V.5. DYRKR de las cetonas **2a-m** utilizando ADH de tipo *anti-Prelog* en una disolución reguladora 50 mM Tris-HCl pH 10 tras 72 h de reacción a 30 °C y 250 rpm.



Ent.	2a-m	R ¹	R ²	ADH ^a	Resina	<i>c</i> (%) ^b	<i>ee</i> 2a-m (%) ^c	<i>dr</i> 3a-m ^c
1	2a	H	Me	LBADH	----	47	>99	95:5
2	2a	H	Me	LBADH	IRA-440C	2	>99	n.d.
3	2a	H	Me	LBADH	DOWEX	14	>99	97:3
4	2a	H	Me	evo-1.1.200	----	59	>99	80:20
5	2a	H	Me	evo-1.1.200	IRA-440C	14	>99	97:3
6	2a	H	Me	evo-1.1.200	DOWEX	72	>99	80:20
7	2b	4-OMe	Me	evo-1.1.200	DOWEX	85	>99	85:15
8	2c	4-OH	Me	evo-1.1.200	DOWEX	30	>99	87:13
9	2d	4-NO ₂	Me	evo-1.1.200	DOWEX	96	>99	>99:1
10	2e	2-OMe	Me	evo-1.1.200	DOWEX	22	>99	>99:1
11	2f	2-Me	Me	evo-1.1.200	DOWEX	16	>99	>99:1
12	2g	2-F	Me	evo-1.1.200	DOWEX	78	>99	>99:1
13	2h	H	Et	evo-1.1.200	DOWEX	71	>99	96:4
14	2i	H	Pr	evo-1.1.200	DOWEX	65	>99	97:3
15	2j	H	Alil	evo-1.1.200	DOWEX	21	>99	91:9
16	2k	H	Bu	evo-1.1.200	DOWEX	82	>99	98:2
17	2l	H	Cy	evo-1.1.200	DOWEX	<3	n.d.	n.d.
18	2m	H	Bn	evo-1.1.200	DOWEX	27	n.d.	n.d.

^a 3 U de enzima añadidas al inicio de la reacción y cada 24 h (9 U en total).

^b Conversiones medidas por CG.

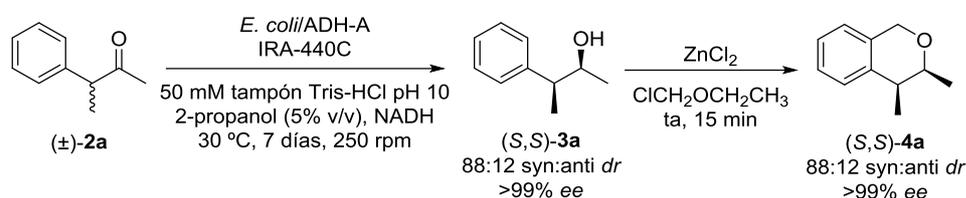
^c Excesos enantioméricos y relaciones diastereoméricas syn:anti medidos por HPLC. n.d.: no determinado.

V.3.4. Escalado de la biorreducción con **2a** y síntesis del isocromano **4a**

Finalmente, se aplicó esta estrategia quimioenzimática a la síntesis del 3,4-dimetilisocromano, representante más simple de la familia de los isocromanos con dos centro estereogénicos en su estructura.

La biorreducción de la cetona racémica **2a** fue escalada de un tubo eppendorf a un mmol de sustrato (Esquema V.9). Así se adicionaron 100 mg de enzima cada 24 h a 30 °C, siendo necesarios 7 días de reacción para

obtener el alcohol (*S,S*)-**3a** con una conversión del 77% (55% de rendimiento aislado) y un relación diastereomérica syn:anti 88:12. Posteriormente, se realizó la ciclación intramolecular catalizada por el cloruro de zinc anhidro en cloruro de metoximetilo, obteniéndose así el isocromano deseado (*S,S*)-**4a** con un 42% de rendimiento aislado sin pérdida alguna de pureza óptica tras 15 minutos de reacción.



Esquema V.9. Estrategia quimioenzimática para la síntesis del (*S,S*)-3,4-dimetilisocromano.

El desarrollo de esta ruta quimioenzimática en dos pasos demuestra las ventajas del empleo de enzimas para introducir quiralidad en una molécula racémica como es la cetona **2a**, ya que es posible la creación de dos centros quirales en un solo paso de reacción con un total estereocontrol, siendo el alcohol (*S,S*)-**3a** un adecuado precursor para la síntesis de heterociclos oxigenados, como son los isocromanos.

Conclusiones

Se ha llevado a cabo la síntesis de una serie de cetonas por reacción de bencilcetonas racémicas con yoduros de alquilo. Así, todas ellas han sido obtenidas con rendimientos que van de moderados a buenos (30-84%).

Con el fin de desarrollar métodos adecuados de HPLC para el seguimiento de las reacciones enzimáticas, se realizó la reducción química de las cetonas racémicas previamente obtenidas, aislando los alcoholes racémicos con rendimientos muy elevados (90-98%) y observándose la formación mayoritaria de los diastereoisómeros anti.

Tomando como sustrato modelo la 3-fenil-butan-2-ona, se han evaluado diversos métodos de racemización identificando las resinas de intercambio aniónico Amberlite IRA-440C y DOWEX-MWA-1 como las más eficientes, siendo éstas compatibles con el uso de ADHs en determinadas condiciones.

Se ha estudiado en profundidad la bio-reducción de una serie de cetonas bencílicas en condiciones de DYRKR empujado ADHS de tipo tanto *Prelog* (*E. coli*/ADH-A) como *anti-Prelog* (evo-1.1.200), habiendo sintetizado respectivamente alcoholes de configuración (*S,S*) o (*R,R*) en forma enantiopura y con buenos excesos diastereoméricos, favoreciéndose en todos los casos la formación de los diastereoisómeros *syn*.

Se ha diseñado una secuencia de DYRKR y ciclación intramolecular con el (S,S)-3-fenil-butan-2-ol, obteniéndose el (S,S)-3,4-dimetilisocromano como miembro representativo de este grupo de heterociclos.

Los resultados de este trabajo de investigación se encuentran recogidos en el artículo titulado "*Dynamic reductive kinetic resolution of benzyl ketones using alcohol dehydrogenases and anion exchange resins*" de D. Méndez-Sánchez, J. Mangas-Sánchez, E. Busto, V. Gotor y V. Gotor-Fernández, que se encuentra enviado para su publicación a la revista *Advanced Synthesis & Catalysis*, adsc.201500801

Parte experimental

V.5.1. Información general

Las técnicas experimentales y enzimas utilizadas en este capítulo se encuentran descritas en los capítulos previos de esta memoria.

Los reactivos necesarios se compraron a Aldrich, Fluka o Alfa Aesar y se usaron sin modificación alguna. En todos los casos se utilizaron disolventes con alto grado de pureza y en el caso del metanol para las reacciones de reducción química, se destiló previamente con hidruro de cálcico bajo nitrógeno.

V.5.2. Procedimiento general para la síntesis de las cetonas racémicas

A una disolución de la correspondiente cetona **1a-g** (1 mmol) en una mezcla bifásica de CH₂Cl₂ (500 µL) y una disolución acuosa de NaOH 2 M (500 µL), se le añaden bisulfato de tetrabutilamonio (340 mg, 1 mmol) y el correspondiente halogenuro de alquilo (1.2 mmol). La reacción se agita a 40 °C durante 2 h hasta la completa desaparición del producto de partida. A continuación, la mezcla se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL), se combinan las fases orgánicas, se secan sobre Na₂SO₄, se filtra y el disolvente es evaporado bajo presión reducida. El crudo de reacción resultante se purificó por cromatografía de columna en gel de sílice (20-50 % Et₂O/Hexano), obteniéndose las correspondientes bencilcetonas racémicas **2a-m** con rendimientos de moderados a buenos (30-84%)¹³⁷

V.5.3. Procedimiento general para la síntesis de los alcoholes racémicos

A una disolución de las cetonas racémicas **2a-m** (1 mmol, 0.1 M) en MeOH seco (10 mL) se le añade borohidruro de sodio (38 mg, 1 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agita durante 2 h hasta que se observa la desaparición completa del producto de partida por análisis de TLC (50% Et₂O/Hexano). La reacción se para mediante la adición de H₂O (10 mL) y se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL), se combinan las fases orgánicas, se secan

¹³⁷ A. J. Fry, J. P. Bajanauskas, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3157.

sobre Na₂SO₄, se filtra y el disolvente se evapora bajo presión reducida. El crudo de reacción resultante se purifica por columna cromatográfica en gel de sílice (50% Et₂O/Hexano), obteniéndose el correspondiente alcohol racémico **3a-m** (90-99%).

V.5.4. Resolución cinética de la cetonas racémicas 2a-m con ADH-A sobreexpresada en E. coli

En un eppendorf, las células de *E. coli*/ADH-A (15 mg) son rehidratadas en una buffer 50 mM de Tris-HCl (500 µL) a diferentes pHs. La mezcla se agita a 250 rpm durante 30 min. A continuación, se añade la correspondiente cetona **2a-m** (0.01 mmol), 2-propanol (25 µL) y una disolución 10 mM de NADH en el correspondiente tampón Tris-HCl (50 µL). La reacción se agita a 250 rpm a 4 o 30 °C, midiéndose las conversiones en los correspondientes alcoholes (*S,S*)-**3a-m** por CG.

V.5.5. Resolución cinética dinámica de las cetonas racémica 2a-m con ADH-A sobreexpresada en E. coli

En un eppendorf, sobre una disolución de la cetona correspondiente (0.01 mmol) en una buffer 50 mM de Tris-HCl (500 µL) a diferentes pHs, se añade 2-propanol (25 µL), Amberlite IRA-440C (12 mg) o DOWEX-MWA-1 (12 mg), y *E. coli*/ADH-A (5 mg cada 24 h). La reacción se agita durante 72 h a 250 rpm y 30 °C. Transcurrido este tiempo, la reacción se extrae con AcOEt (3 x 0.5 mL), se combinan las fases orgánicas, se secan sobre Na₂SO₄ y se filtran. La conversión en los correspondientes alcoholes (*S,S*)-**3a-m** se determina por CG y sus pureza óptica por HPLC.

V.5.6. Escalado de la resolución cinética dinámica de la cetona racémica 2a con ADH-A sobreexpresada en E. coli

Sobre una disolución de células de *E. coli*/ADH-A rehidratadas (100 mg/mmol, 100 mg) en una buffer 50 mM de Tris-HCl (0.05 M, 19 mL) se añade, isopropanol (5% v/v, 1 mL), Amberlite IRA-440C (100mg), NADH (1 mM, 14 mg) y la cetona **2a** (1 mmol). La reacción se agita durante 24

horas a 250 rpm. Transcurrido ese tiempo, adicional *E. coli*/ADH-A (100 mg) se añade cada 24 h durante 7 días (700 mg *E. coli*/ADH-A en total). El proceso se monitoriza por CG. Tras 7 días la mezcla de reacción se centrifuga y se extrae con AcOEt (3 x15 mL), se combinan las fases orgánicas, se secan sobre Na₂SO₄, se filtra y el disolvente se evapora bajo presión reducida. El crudo de reacción resultante se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (50% Et₂O/Hexano) para obtener el correspondiente alcohol (*S,S*)-**3a** (55% rendimiento aislado para un 77% de conversión), >99% *ee* y una relación diastereomérica syn:anti 88:12.

V.5.7. Resolución cinética dinámica de las cetonas racémicas 2a-m con la ADH evo-1.1.200

En un eppendorf, sobre una disolución de la cetona correspondiente (0.01 mmol) en una buffer 50 mM de Tris-HCl (325 µL) a pH 10, se le añaden 2-propanol (25 µL), Amberlite IRA-440C (12 mg) o DOWEX-MWA-1 (12 mg), 50 µL MgCl₂ (10 mM), 50 µL de una disolución 10 mM de NADH y una disolución stock de evo-1.1.200 (3 U cada 24 h). La reacción se agita durante 72 h a 250 rpm y 30 °C. Transcurrido este tiempo, se extrae la reacción con AcOEt (3 x 0.5 mL), se combinan las fases orgánicas se secan sobre Na₂SO₄ y se filtra. La conversión en los correspondientes alcoholes (*R,R*)-**3a-m** se determina por CG y su pureza óptica se mide por HPLC.

V.5.8. Resolución cinética dinámica de las cetonas racémicas 2a-m con LBADH

En un eppendorf, sobre una disolución de la cetona correspondiente (0.01 mmol) en una buffer 50 mM de Tris-HCl (336 µL) a pH 10, se añaden 2-propanol (32 µL), Amberlite IRA-440C (12 mg) o DOWEX-MWA-1 (12 mg), 50 µL MgCl₂ (10 mM), 60 µL de una disolución 10 mM de NADPH y una disolución stock de LBADH (3 U cada 24 h). La reacción se agita durante 72 h a 250 rpm y 30 °C. Transcurrido este tiempo, la reacción se extrae con AcOEt (3 x 0.5 mL), se combinan las fases orgánicas, se secan

sobre Na₂SO₄. Y se filtra. La conversión en los correspondientes alcoholes (*R,R*)-**3a-m** se determina por CG y su pureza óptica se mide por HPLC.

V.5.9. Procedimiento general para la ciclación del alcohol **3a**

Sobre una disolución del correspondiente alcohol racémico o en forma enantioméricamente pura (*S,S*)-**3a** (100 mg, 0.74 mmol) en cloruro de metoximetilo (1.64 mL, 19 mmol) se le añade ZnCl₂ anhidro (43 mg, 0.32 mmol) a temperatura ambiente bajo atmosfera de nitrógeno. La mezcla se agita durante 15 minutos hasta que no se observa producto de partida por TLC (50% Et₂O/Hexano). La reacción se para mediante la adición de H₂O (10 mL) a 0 °C, y se extrae con Et₂O (3 x 10 mL). Se combinan las fases orgánicas, se secan sobre Na₂SO₄, se filtra y el disolvente se evapora bajo presión reducida. El crudo de reacción resultante se purifica por columna cromatográfica en gel de sílice (5% Et₂O/Hexano), obteniéndose el 3,4-dimetilisocromano **4a** como un aceite incoloro (53 mg, 44% de rendimiento).

Trabajo de investigación

Conclusiones generales

Como conclusiones generales a esta Tesis Doctoral se puede decir que se han desarrollado diferentes metodologías para la preparación asimétrica de derivados de alcoholes, aminas, epóxidos y aminoalcoholes, empleando para ello métodos biocatalíticos.

En el primer capítulo de esta Tesis Doctoral se aborda la síntesis y posterior resolución cinética clásica de una serie de aminoalcoholes empleando lipasas. Alguno de los aminoalcoholes estudiado destaca por su elevada eficacia en el tratamiento de enfermedades tales como la leishmaniosis, por lo que el diseño de una aproximación asimétrica parece de alto interés.

En el segundo capítulo, se lleva a cabo la síntesis de una familia de *meso*-1,2-diaminas para su posterior desimetrización enantioselectiva empleando lipasas, obteniéndose los correspondientes aminocarbamatos ópticamente activos a través de reacciones de alcoxicarbonilación.

En el tercer capítulo de esta Tesis Doctoral se realiza la síntesis de una familia de epóxidos a partir de olefinas, a través de un proceso en cascada poco convencional en el que la lipasa de *Rhizomucor miehei* cataliza la formación de un perácido intermedio, responsable directo de la reacción de oxidación global.

El cuarto capítulo desglosa el desarrollo de un proceso de desracemización de una serie de alcoholes secundarios, acoplado a un sistema de oxidación mediado por yodo y TEMPO con una posterior biorreducción utilizando alcohol deshidrogenasas con diversas estereopreferencias. Este nuevo proceso en cascada se ha optimizado con el fin de obtener los alcoholes en forma enantioméricamente pura y con excelentes rendimientos.

En el quinto y último capítulo se han sintetizado una familia de cetonas racémicas, cuya biorreducción ha sido estudiada empleando diversas alcohol deshidrogenasas. Para la racemización de los enantiómeros remanentes se han utilizado diversas resinas de intercambio iónico en el mismo medio de reacción, dando lugar a procesos de resolución reductiva dinámica cinética. Así, se han obtenido una serie de alcoholes con elevados excesos diastereoméricos de forma enantiopura, precursores de compuestos de gran interés como son los isocromanos.

Referencias

- ¹ C. M. Clouthier, J. N. Pelletier, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585.
- ² L. Pasteur, C. R. Seances, *Acad. Sci.* **1858**, *46*, 615
- ³ E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, *27*, 2985.
- ⁴ E. Buchner, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1897**, *36*, 117.
- ⁵ (a) G. Kirchner, M. P. Scollar, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7072; (b) A. Zaks, A. M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, *82*, 3192.
- ⁶ U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185.
- ⁷ M. T. Reetz, M. Bocola, J. D. Carballeira, D. Zha, A. Vogel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4192.
- ⁸ (a) S. Wenda, S. Illner, A. Mell, U. Kragl, *Green Chem.* **2011**, *130*, 3007; (b) N. Ran, L. Zhao, Z. Chen, J. Tao, *Green Chem.* **2008**, *10*, 361.
- ⁹ (a) G. Zheng, J. Xu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *22*, 784; (b) N. Asfaw, Y. Chebude, A. Ejigu, B. B. Hurisso, P. Licence, R. L. Smith, S. L. Y. Tang, M. Poliakov, *Green Chem.* **2011**, *13*, 1059.
- ¹⁰ (a) D. Dascier, S. Kambourakis, L. Hua, J. D. Rozzell, J. D. Stewart, *Org. Process. Res. Dev.* **2014**, *18*, 793; (b) R. C. Rodrigues, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernández-Lafuente, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6290; (c) M. Hartmann, X. Krostov, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6277; (d) F. Secundo, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6250; (e) R. A. Sheldon, S. Van Pelt, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6223; (f) O. Barbosa, R. Torres, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. C. Rodrigues, R. Fernandez-Lafuente, *Biomacromolecules*, **2013**, *14*, 2433; (g) K. Hernández, R. Fernández-Lafuente, *Enzym. Microb. Technol.* **2011**, *8*, 107; (h) R. C. Rodrigues, Á. Berenguer-Murcia, R. Fernández-Lafuente, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2216; (i) C. Garcia-Galan, Á. Berenguer-Murcia, R. Fernández-Lafuente, R. C. Rodrigues, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2885; (j) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, K. Buehler, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 762.
- ¹¹ (a) T. Quinto, V. Köller, T. R. Ward, *Top Catal* **2014**, *57*, 321; (b) C. E. Paul, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 788; (c) U. T. Bornscheuer, *Synlett* **2013**, *24*, 150; (d) A. S. Bommarius, J. K. Blum, M. J. Abrahamson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 194; (e) M. T. Reetz, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7530; (f) M. Wang, T. Si, H. Zhao, *Bioresour. Technol.* **2012**, *115*, 117.
- ¹² K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*. 6^a Ed.; Springer, Berlín (Alemania), **2011**.
- ¹³ D. J. Ericsson, A. Kasrayan, P. Johansson, T. Bergfors, A. G. Sandström, J.-E. Bäckvall, S. L. Mowbray, *J. Mol. Biol.* **2008**, *376*, 109.

- ¹⁴ P. Domínguez de María, C. Carboni-Oerlemans, B. Tuin, G. Bargeman, A. van der Meer, R. van Gemert, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2005**, *37*, 36.
- ¹⁵ (a) J. Uppenberg, N. Öhmer, M. Norin, K. Hult, G. J. Kleywegt, S. Patkar, V. Waagen, T. Anthonsen, T. A. Jones, *Biochemistry* **1995**, *34*, 16838; (b) J. Uppenberg, S. Patkar, T. Bergfors, T. A. Jones, *J. Mol. Biol.* **1994**, *235*, 790; (c) J. Uppenberg, M. T. Hansen, S. Patkar, T. A. Jones, *Structure* **1994**, *2*, 293.
- ¹⁶ V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 797.
- ¹⁷ (a) A. Kirschner, P. Langer, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2871; (b) M. Bucciarelli, P. Davoli, A. Forni, I. Moretti, F. Prati, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999**, 2489; (c) A. Kamal, M. Sandbhor, K.V. Ramana, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 815.
- ¹⁸ A. Liljeblad, L. T. Kanerva, *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 5831.
- ¹⁹ R. C. Rodrigues, R. Fernández-Lafuente, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *64*, 1.
- ²⁰ H. Wu, C. Tian, X. Song, C. Liu, D. Yang, Z. Jiang, *Green Chem.* **2013**, *15*, 1773.
- ²¹ *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Eds. P. A. Frey, A. D. Hegeman, Oxford University Press, Nueva York, **2007**.
- ²² (a) B. Kosjek, W. Stampfer, M. Pogorevc, W. Goessler, K. Faber, W. Kroutil, *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *86*, 55; (b) O. Danielsson, S. Atrian, T. Luque, L. Hjelmquist, R. González-Duarte, H. Jörnvall, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 4980.
- ²³ (a) B. Kosjek, W. Stampfer, M. Pogorevc, W. Goessler, K. Faber, W. Kroutil, *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *86*, 55; (b) W. Stampfer, B. Kosjek, W. Kroutil, K. Faber, *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, *81*, 865; (c) W. Stampfer, B. Kosjek, K. Faber, W. Kroutil, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 275; (d) W. Stampfer, B. Kosjek, K. Faber, W. Kroutil, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 402.
- ²⁴ V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*, 119.
- ²⁵ (a) M. Karabec, A. Łyskowski, K. C. Tauber, G. Steinkellner, W. Kroutil, G. Grogan, K. Gruber, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 6314; (b) K. Edegger, C. C. Gruber, T. M. Poessl, S. R. Wallner, I. Lavandera, K. Faber, F. Niehaus, J. Eck, R. Oehrlein, A. Hafner, W. Kroutil, *Chem. Commun.* **2006**, 2402.
- ²⁶ (a) S. Leuchs, L. Greiner, *Chem. Biochem. Eng. Q.* **2011**, *25*, 267; (b) W. Hummel, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **1997**, *58*, 145.
- ²⁷ (a) A. Díaz-Rodríguez, N. Ríos-Lombardía, J. H. Sattler, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, W. Kroutil, V. Gotor, *Catal. Sci. Technol.* **2015**, *5*, 1443; (b) R. Zuhse, C. Leggewie, F. Hollmann, S. Kara, *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 369; (c) R. C. Simon, E. Busto, N. Richter, F. Belaj, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**,

- 111; (d) S. Kara, D. Spickermann, A. Weckbecker, C. Leggewie, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *ChemCatChem*, **2014**, *6*, 973.
- ²⁸ M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stüner, T. Zelinski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788.
- ²⁹ C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294.
- ³⁰ A. J. J. Straathof, J. A. Jongejan, *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *21*, 559.
- ³¹ C. Rodríguez, G. de Gonzalo, A. Rioz-Martínez, D. E. Torres-Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1121.
- ³² (a) L. El Blidi, M. Nechab, N. Vanthuyme, S. Gastaldi, P.M. Bertrand, G. Gil, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2901; (b) S. Gastaldi, S. Escoubet, N. Vanthuyme, G. Gil, M. P. Bertrand. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 837.
- ³³ (a) O. Verho, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3996; (b) P. Hoyos, V. Pace, A. R. Alcántara, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 2585; (c) M. Ahmed, T. Kelly, A. Ghanem, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 6781; (c) Y. Kim, J. Park, M.-J. Kim, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 271; (d) H. Pellisier, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3769; (e) H. Pellisier, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 659; (f) N. J. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 115, (g) J. H. Lee, K. Han, M.-J. Kim, J. Park, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 999; (h) M.-J. Kim, J. Park, Y. K. Choi, en *Multi-Step Enzyme Catalysis*, Ed. E. García-Junceda, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, pp. 1; (i) B. Martín-Matute, J.-E. Bäckvall, en *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, Eds. V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**, pp. 89.
- ³⁴ E. Schoffers, A. Golbiowski, C. R. Johnson, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 3769.
- ³⁵ E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, PR110 (Update de *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 313).
- ³⁶ G. A. Applegate, D. B. Berkowitz, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1619.
- ³⁷ (a) J. A. Friest, Y. Maezato, S. Broussy, P. Blum, D. B. Berkowitz. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5930; (b) D. Giacomini, P. Galletti, A. Quintavalla, G. Gucciardo, F. Paradisi. *Chem. Comm.* **2007**, *43*, 4038.
- ³⁸ (a) A. Cuetos, A. Rioz-Martínez, F. R. Bisogno, B. Grischek, I. Lavandera, G. de Gonzalo, W. Kroutil, V. Gotor. *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 1743; (b) D. Kalaitzakis, S. Kambourakis, J. D. Rozzell, I. Smonou. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, *18*, 2418; (c) S. K. Padhi, I. A. Kaluzna, D. Buisson, R. Azerad, J. D. Stewart. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2133; (d) D. Zhu, C. Mukherjee, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, L. Hua. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 901; (e) D. Kalaitzakis, J. D. Rozzell, S. Kambourakis, I. Smonou. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4799; (f) I. A. Kaluzna, T. Matsuda, A. K. Sewell, J. D. Stewart. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12827; (g) K. Nakamura, Y. Kawai, T. Miyai, S. Honda, N. Nakayima, A. Ohno. *Bull. Chem.*

- Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 1467; (h) N. Nakamura, T. Miyai, K. Ushio, S. Oka, A. Ohno. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*, 2089.
- ³⁹ E. García-Junceda, I. Lavandera, D. Rother, J. H. Schrittwieser, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, *114*, 1.
- ⁴⁰ S. E. Denmark, A. Thorarensen, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 137.
- ⁴¹ T. Hudlicky, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 3.
- ⁴² K. Baer, M. Kraußer, W. Hummel, A. Berkessel, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *49*, 9355.
- ⁴³ (a) L. E. Overman, L. T. Mendelson, E. J. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 6629; (b) A. Pecunioso, M. Maffei, C. Marchioro, L. Rossi, B. Tamburini, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 775; (c) D. Gala, D. DiBenedetto, G. Gloor, J. Jenkins, M. Kugelman, D. Maloney, A. Miller, *Org. Process Res. Dev.* **2004**, *8*, 396.
- ⁴⁴ A. Luna, A. Maestro, C. Astorga, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 1969.
- ⁴⁵ A. Luna, C. Astorga, F. Fülöp, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 4483.
- ⁴⁶ J. González-Sabín, V. Gotor, F. Rebolledo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1335.
- ⁴⁷ (a) M. Barz, H. Glas, W. R. Thiel, *Synthesis* **1998**, 1269; (b) M. Barz, E. Herdtweck, W. R. Thiel, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 1717.
- ⁴⁸ E. Busto, V. Gotor-Fernández, N. Ríos-Lombardía, E. García-Verdugo, I. Alfonso, S. García-Granda, A. Menéndez-Velázquez, M. I. Burguete, S. V. Luis, V. Gotor. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5251.
- ⁴⁹ N. Ríos-Lombardía, R. Porcar, E. Busto, I. Alfonso, J. Montejo-Bernardo, S. García-Granda, V. Gotor, S. V. Luis, E. García-Verdugo, V. Gotor-Fernández, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 1921.
- ⁵⁰ R. Porcar, N. Ríos-Lombardía, E. Busto, V. Gotor-Fernández, J. Montejo-Bernardo, S. García-Granda, S. V. Luis, V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Verdugo, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 892.
- ⁵¹ V. K. Marrapu, N. Srinivas, M. Mittal, N. Shakya, S. Gupta, K. Bhandari, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1407.
- ⁵² M. D. Perez, C. Borek, S. R. Forrest, M. E. Thompson, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9281.
- ⁵³ L. F. Tietze, A. Heins, M. Soleiman-Beigi, C. Raith, *Heterocycles* **2009**, *77*, 1123.
- ⁵⁴ C. S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *102*, 7294.

- ⁵⁵ V. K. Marrapu, N. Srinivas, M. Mittal, N. Shakya, S. Gupta, K. Bhandari, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1407.
- ⁵⁶ (a) S. R. S. S. Kotti, C. Timmons, G. Li, *Chem. Biol. Drug Des.* **2006**, *67*, 101; (b) G. F. Busscher, F. P. J. T. Rutjes, F. L. van Delft, *Chem. Rev.* **2005**, *105*.
- ⁵⁷ R. A. Casero Jr., P. M. Woster, *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 4551.
- ⁵⁸ X. Huang, M. Roushan, T. J. Emge, W. Bi, S. Thiagarajan, J. Cheng, R. Yang, J. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7871.
- ⁵⁹ (a) D. S. Surry, S. L. Buchwald, *Chem. Sci.* **2010**, *1*, 13; (b) C. Anaya de Parodi, E. Juaristi, *Synlett* **2006**, 2699; (b) J. González-Sabín, F. Rebolledo, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 1916; (d) F. Cardona, A. Goti, *Nat. Chem.* **2009**, *1*, 269; (e) J.-C. Kizirian, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 140.
- ⁶⁰ I. Alfonso, *Mini-Rev. Org. Chem.* **2008**, *5*, 33.
- ⁶¹ I. Alfonso, *Curr. Org. Synth.* **2010**, *7*, 1.
- ⁶² H. Fernández-Pérez, P. Etayo, J. R. Lao, J. L. Núñez-Rico, A. Vidal-Ferran, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 10666.
- ⁶³ A. Goswami, T. P. Kissick, *Org. Process Res. Dev.* **2009**, *13*, 483.
- ⁶⁴ (a) M. López-García, I. Alfonso, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 603; (b) V. M. Sánchez, F. Rebolledo, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1464.
- ⁶⁵ (a) R. Chênevert, G. Courchesne, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7971; (b) K. Shimada, Y. Kauragi, T. Fukuyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4048. (c) J.-Y. Zheng, S.-F. Wang, Y.-J. Zhang, X.-X. Ying, Y.-g. Wang, Z. Wang, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *98*, 37.
- ⁶⁶ (a) M. Hammel, J. Deska, *Synthesis* **2012**, *44*, 3789; (b) C. M. Sapu, J.-E. Bäckvall, J. Deska, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9731.
- ⁶⁷ N. Ríos-Lombardía, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 811.
- ⁶⁸ (a) V. Gotor-Fernández, F. Rebolledo, V. Gotor, "Preparation of Chiral Pharmaceuticals through Enzymatic Acylation of Alcohols and Amines" en *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*. Ed. R. M. Patel. Capítulo 7, 203-248. Taylor and Francis. New York (USA). **2007**; (b) V. Gotor, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2189.
- ⁶⁹ (a) N. Ríos-Lombardía, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 484; (b) N. Ríos-Lombardía, E. Busto, E. Gracia-Urdiales, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2571; (c) E. Busto, V. Gotor-Fernández, J. Montejo-Bernardo, S. García-Granda, V. Gotor, *Tetrahedron* **2009**, 8393; (d) E. García-Urdiales, E. Busto, N. Ríos-Lombardía, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2875.

- ⁷⁰ E. Busto, V. Gotor-Fernández, J. Montejo-Bernardo, S. García-Granda, V. Gotor, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4203.
- ⁷¹ N. Ríos-Lombardía, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5709.
- ⁷² (a) C. Bazzicalupi, A. Bencini, V. Lippolis, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3709; (b) X. Huang, M. Roushan, T. J. Emge, W. Bi, S. Thiagarajan, J.-H. Cheng, R. Yang, J. Li, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7871.
- ⁷³ B. Orsat, P. B. Alper, W. Moree, C. Mak, C. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 712.
- ⁷⁴ A. Berkessel, M.-C. Ong, J.-M. Neudörfl, *ChemCatChem.* **2010**, *2*, 1215.
- ⁷⁵ M. V. Proskurnina, N. A. Lozinskaya, S. E. Tkachenko, N. S. Zefirov, *Russ. J. Org. Chem.* **2002**, *38*, 1149.
- ⁷⁶ (a) G. F. Breen, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1427; (b) V. Gotor-Fernández, P. Fernández-Torres, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2558.
- ⁷⁷ Revisiones sobre síntesis y aplicaciones: (a) C. Aouf, E. Durand, J. Lecomte, M.-C. Figueroa-Espinoza, E. Dubreucq, H. Fulcranda, P. Villeneuve, *Green Chem.* **2014**, *16*, 1740; (b) S. Hwang, C. Y. Choi, E. Y. Lee, *J. Ind. Eng. Chem.* **2010**, *16*, 1; (c) Q.-H. Xia, H.-Q. Ge, C.-P. Ye, Z.-M. Liu, K.-X. Su, *Chem. Rev.* **2005**, 1603.
- ⁷⁸ (a) Y. Kita, K. Higuchi, Y. Yoshida, K. Iio, S. Kitagaki, S. Akai, H. Fujioka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 683; (b) L. N. Mander, M. M. McLachlan, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 2400.
- ⁷⁹ L. Jr. Que, W. B. Tolman, *Nature* **2008**, *455*, 333
- ⁸⁰ R. A. Sheldon, *Catal. Today* **2015**, *247*, 4.
- ⁸¹ (a) D. Holtmann, M. W. Fraaije, I. W. C. E. Arends, D. J. Opperman, F. Hollmann, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 13180; (b) M. Hofrichter, R. Ullrich, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 116; (c) S. Schulz, M. Girhard, V. B. Urlacher, *ChemCatChem*, **2012**, *4*, 1889; (d) M. V. Donova, O. V. Egorova, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *94*, 1423; (e) D. E. T. Pazmiño, M. Winkler, A. Glieder, M. W. Fraaije, *J. Biotechnol.*, **2010**, *146*, 9; (f) P. R. O. de Montellano, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 932.
- ⁸² D. Gamemara, G. A. Seoane, P. Saenz-Méndez, P. Domínguez de María, *Redox Biocatalysis: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons: Hoboken, 2013.
- ⁸³ (a) M. Rüsç, gen. Klaas, S. Warwel, *Ind. Crops Prod.*, **1999**, *9*, 125; (b) B. Rangarajan, A. Havey, E. A. Grulke, P. D. Culnan, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1995**, *72*, 1161.

- ⁸⁴ (a) I. Hilker, D. Bothe, J. Prüss, H.-J. Warnecke, *Chem. Eng. Sci.* **2001**, *56*, 427; (b) T. Kudanga, E. N. Prasetyio, J. Sipilä, G. S. Nyanhongo, G. M. Guebitz, *Process. Biochem.* **2010**, *45*, 1557.
- ⁸⁵ U. K. Sharma, N. Sharma, R. Kumar, A. K. Sinha, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4846.
- ⁸⁶ (a) S. C. Lemoult, P. F. Richardson, S. M. Roberts, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1995**, *1*, 89; (b) B. K. Pchelka, M. Gelo-Pujic E. Guibe-Jampel, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1998**, *1*, 2625; (c) G. Chavez, R. Hatti-Kaul, R.A. Sheldon, G. Mamo, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2013**, *89*, 67.
- ⁸⁷ (a) M. Y. Rios, E. Salazar, H.F. Olivo, *Green Chem.* **2007**, *9*, 459; (b) M. Y. Rios, E. Salazar, H. F. Olivo, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *54*, 61.
- ⁸⁸ A. J. Kotlewska, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, I. W. C. E. Arends, *Green Chem.* **2011**, *13*, 2154.
- ⁸⁹ J. Zhong, F. Xu, J. Wang, Y. Li, X. Lin, Q. Wu, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 8533.
- ⁹⁰ D. González-Martínez, M. Rodríguez-Mata, D. Méndez-Sánchez, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, *114*, 31.
- ⁹¹ F. Björkling, H. Frykman, S. E. Godtfredsen O. Kirk, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 4587.
- ⁹² F. Björkling H. Frykman S. E. Godtfredsen O. Kirk, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1301; (b) O. Kirk, M. W. Christensen, T. Dambus, S. E. Godtfredsen, *Biocatalysis* **1994**, *11*, 65.
- ⁹³ (a) S. Warwel, M. Rüsche, gen. Klaas, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1995**, *1*, 49; (b) R. Madeira Lau, F. van Rantwijk, K. R. Seddon, R. A. Sheldon, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 4189; (c) M. A. Moreira, T. B. Bitencourt, M. da Graça Nascimento, *Synth. Commun.* **2005**, *35*, 2107.
- ⁹⁴ C. Orellana-Coca, S. Camocho, D. Adlercreutz, B. Mattiasson, R. Hatti-Kaul, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2005**, *107*, 864.
- ⁹⁵ G. D. Yadav, K. M. Devi, *Biochem. Eng. J.*, **2002**, *10*, 93; (b) U. Törnvall, P. Börjesson, L. M. Tufvesson, R. Hatti-Kaul, *Ind. Biotechnol.* **2009**, *5*, 184; (c) U. Törnvall, C. Orellana-Coca, R. Hatti-Kaul, D. Adlercreutz, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 447.
- ⁹⁶ (a) N. Prileschajew, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1909**, *42*, 4811; (b) J. March *Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure*, John Wiley & Sons: Hoboken, 1985.
- ⁹⁷ E. G. Ankudey, H. F. Olivo, T. L. Peeples, *Green Chem.* **2006**, *8*, 923.
- ⁹⁸ T. B. Bitencourt, M. da Graça Nascimento, *Green Chem.* **2009**, *11*, 209.
- ⁹⁹ M. R. gen. Klass, S. Warwel, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1025; (b) M. R. gen. Klaas, M. Kunz, S. J. Warwel, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, *7*, 283.

- ¹⁰⁰ (a) C. Orellana-Coca, U. Törnvall, D. Adlercreutz, B. Mattiasson, R. Hatti-Kaul, *Biocatal. Biotransform.* **2005**, *23*, 431; (b) F. A. Corrêa, F. K. Sutili, L. S. M. Miranda, S. G. F. Leite, R. O. M. A. de Souza, I. C. R. Leal, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *81*, 7.
- ¹⁰¹ (a) H. Ito, N. Shiraishi, *Mokuzai Gakkaishi*, **1987**, *33*, 393 (b) L. Tomatis, C. Agthe, H. Bartsch, J. Huff, R. Montesano, R. Saracci, E. Walker, J. Wilbourn, *Cancer Res.* **1978**, *38*, 877.
- ¹⁰² (a) A. W. P. Jarvie, N. Overton, C. B. St. Pourçain, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1999**, *1*, 2171; (b) C. Aouf, J. Lecomte, P. Villeneuve, E. Dubreucq, H. Fulcrand, *Green Chem.* **2012**, *14*, 2328.
- ¹⁰³ (a) M. R. gen. Klass, S. Warwel, *Synth. Commun.* **1998**, *28*, 251; (b) C. Orellana-Coca, J. M. Billakanti, B. Mattiasson, R. Hatti-Kaul, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, *44*, 133.
- ¹⁰⁴ M. A. Moreira, M. G. da Graça Nascimento, *Catal. Commun.* **2007**, *8*, 2043.
- ¹⁰⁵ (a) K. Sarma, N. Bhati, N. Borthakur, A. Goswami, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 8735; (b) K. Sarma, A. Goswami, B. C. Goswami, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1295.
- ¹⁰⁶ (a) A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor, *Curr. Green Chem.* **2015**, *2*, 192; (b) N. J. Turner, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4073.
- ¹⁰⁷ Y.-P. Xue, Y.-G. Zheng, Y.-Q. Zhang, J.-L. Sun, Z.-Q. Liu, Y.-C. Shen, *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 10706.
- ¹⁰⁸ C. V. Voss, C. C. Gruber, K. Faber, T. Knaus, P. Macheroux, W. Kroutil, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13969.
- ¹⁰⁹ C. V. Voss, C. C. Gruber, W. Kroutil, *Synlett* **2010**, 991.
- ¹¹⁰ C. E. Paul, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, W. Kroutil, V. Gotor, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 3875.
- ¹¹¹ N. J. Turner, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4073.
- ¹¹² C. Magallanes-Noguera; M. M. Ferrari, M. Kurina-Sanz, A. A. Orden. *J. Biotechnol.* **2012**, *160*, 189.
- ¹¹³ G. R. A. Adair, J. M. J. Williams, *Chem. Commun.* **2005**, *44*, 5578
- ¹¹⁴ F. G. Mutti, A. Orthaber, J. H. Schrittwieser, J. G. de Vries, R. Pietschnig, W. Kroutil, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 8046.
- ¹¹⁵ K. Kędzidora, A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Green. Chem.* **2014**, *16*, 2448.
- ¹¹⁶ A. Díaz-Rodríguez, N. Ríos-Lombardía, J. H. Sattler, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, W. Kroutil, V. Gotor, *Catal. Sci. Technol.* **2015**, *5*, 1443.

- ¹¹⁷ (a) N. Khamthong, V. Rukachaisirikul, S. Phongpaichit, S. Preedanon, J. Sakayaroj, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 8245; (b) D. Fishlock, R. M. Williams, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3299; (c) A. K. Machocho, J. Bastida, C. Codina, F. Vildomat, R. Brun, S.C. Chabra, *Phytochemistry* **2004**, *65*, 3143; (e) R. Grigg, V. Savic, V. Sridharan, C. Terrier, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8613; (f) D. L.J. Clive, M. Sannigrahi, S. Hisaindee, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 954; (h) W. H. Pearson, F. E. Lovering, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12336; (i) S. E. Denmark, M. E. Schnute, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1013.
- ¹¹⁸ (a) M. A. Specker, E. T. Theimer, US Patent, 4162256, **1979**, *Chem. Abstr.* **1980**, *92*, 41765]; (b) G. Fréter, U. Müller, P. Kraft, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1656.
- ¹¹⁹ P. Lorenz, M. Zeh, J. M. Lobenhoffer, H. Schmidt, G. Wolf, T. F. W. Horn. *Free Radic. Res.* **2005**, *39*, 535.
- ¹²⁰ (a) K. Han, C. Kim, J. Park, M.J. Kim, *J. Org. Chem.*, **2010**, *75*,3105; (b) M.J. Kim, Y.K. Choi, S. Kim, D. Kim, K. Han, S.B. Ko., J. Park, *Org. Lett.*, **2008**, *10*, 1295; (c) A. Berkessel, M.L. Sebastian-Ibarz, T.N. Müller, *Angew. Chem.*, **2006**, *118*, 6717; (d) A. Berkessel, M.L. Sebastian-Ibarz, T.N. Müller *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2006**, *45*, 6567. (e) J.H. Choi, Y.H. Kim, S.H. Nam, S.T. Shin, M.J. Kim, J. Park, *Angew. Chem.*, **2002**, *114*, 2479; (f) J.H. Choi, Y.H. Kim, S.H. Nam, S.T. Shin, M.J. Kim, J. Park, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 2373
- ¹²¹ P. M. Dinh, J. A.Howarth, A. R. Hudnott, J. M. J. Williams, W. Harris. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7623.
- ¹²² (a) K. Bogár, P.H. Vidal, A.R. Alcántara-León, J.-E. Bäckvall, *Org. Lett.*, **2007**, *9*, 3401; (b) B. Martín-Matute, M. Edin, K. Bogár, J.-E Bäckvall *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 6535; (c). B. Martín-Matute, M. Edin, K. Bogár, J.-E Bäckvall, *Angew. Chem.*, **2004**, *116*, 6697; (d) B. A. Persson, A. L. E. Larsson, M. Le Ray, J.-E. Bäckvall. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 1645; (e) A. L.E. Larsson, B. A. Persson, J.-E. Bäckvall. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1211.
- ¹²³ (a) J. Kim, W.-H. Kim, K. Han, Y. K. Choi, J. Park, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1157; (b) S. Gastaldi, S. Escoubet, N. Vanthuyne, G. Gil, M. P. Bertrand, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 837; (c) A. Parvulescu, D. De Vos, P. Jacobs, *Chem. Commun.* **2005**, 5207.
- ¹²⁴ M. T. Reetz, K. Schimossek, *Chimia* **1996**, *50*, 668.
- ¹²⁵ (a) L. K. Tahlén, D. Zhao, J.-B. Sortais, J. Paetzold, C. Hoben, J.-E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3403; (b) C. E. Hoben, L. Kanupp, J-E Bäckvall, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 977; (c) J. Paetzold, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17620.
- ¹²⁶ B. S. Deol, D. Ridley, G. Simpson, *Aust. J. Chem.* **1976**, *29*, 2459.
- ¹²⁷ G. A. Applegate, D. B. Berkowitz, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1619.

- ¹²⁸ G. A. Applegate, R. W. Cheloha, D. L. Nelson, D. B. Berkowitz, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 2420.
- ¹²⁹ (a) D. Kalaitzakis, I. Smonou *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 43; (b) D. Kalaitzakis, S. Kambourakis, D. J. Rozzell, I. Smonou, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, 18, 2418
- ¹³⁰ A. Cuetos, A. Rioz-Martínez, F. R. Bisogno, B. Grischek, I. Lavandera, G. de Gonzalo, W. Kroutil, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, 354, 1743.
- ¹³¹ J. A. Friest, Y. Maezato, S. Broussy, P. Blum, D. B. Berkowitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 5930
- ¹³² K. Kędziora, F. R. Bisogno, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, J. Montejó-Bernardo, S. García-Granda, W. Kroutil, V. Gotor, *ChemCatChem* **2014**, 6, 1066.
- ¹³³ M. M. Musa, K. I. Ziegelmann-Fjeld, C. Vieille, J. G. Zeikus R. S. Philips, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 30.
- ¹³³ J. Mangas-Sánchez, E. Busto, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Org. Lett.* **2013**, 3872
- ¹³⁴ a) W. Stampfer, B. Kosjek, C. Moitzi, W. Kroutil, K. Faber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1014; b) K. Edegger, C. C. Gruber, T. M. Poessl, S. R. Wallner, I. Lavandera, K. Faber, F. Niehaus, J. Eck, R. Oehrlein, A. Hafner, W. Kroutil, *Chem. Commun.* **2006**, 2402; c) C. E. Paul, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, W. Kroutil, V. Gotor, *ChemCatChem* **2013**, 5, 3875.
- ¹³⁵ C. Rodríguez, G. de Gonzalo, A. Rioz-Martínez, D. E. Torres-Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 1121.
- ¹³⁶ A. J. Fry, J. P. Bajanauskas, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 3157.
- ¹³⁷ (a) K. Han, C. Kim, J. Park, M. J. Kim, *J. Org. Chem.* **2010**, 75,3105; (b) M. J. Kim, Y. K. Choi, S. Kim, D. Kim, K. Han, S. B. Ko, J. Park, *Org. Lett.* **2008**, 10, 1295; (c) A. Berkessel, M. L. Sebastian-Ibarz, T. N. Müller, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 6717; (d) A. Berkessel, M. L. Sebastian-Ibarz, T. N. Müller *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 6567. (e) J. H. Choi, Y. H. Kim, S. H. Nam, S. T. Shin, M. J. Kim, J. Park, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 2373
- ¹³⁸ P. M. Dinh, J. A. Howarth, A. R. Hudnott, J. M. J. Williams, W. Harris. *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 7623.
- ¹³⁹ (a) K. Bogár, P.H. Vidal, A.R. Alcántara-León, J.-E. Bäckvall, *Org. Lett.* **2007**, 9, 3401; (b) B. Martín-Matute, M. Edin, K. Bogár, J.-E Bäckvall *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6535; (c). B. Martín-Matute, M. Edin, K. Bogár, J.-E Bäckvall, *Angew. Chem.* **2004**, 116, 6697; (d) B. A. Persson, A. L. E. Larsson, M. Le Ray, J.-E. Bäckvall. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1645; (e) A. L. E. Larsson, B. A. Persson, J.-E. Bäckvall. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, 36, 1211.

- ¹⁴⁰ (a) J. Kim, W.-H. Kim, K. Han, Y. K. Choi, J. Park, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1157; (b) S. Gastaldi, S. Escoubet, N. Vanthuynne, G. Gil, M. P. Bertrand, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 837; (c) A. Parvulescu, D. De Vos, P. Jacobs, *Chem. Commun.* **2005**, 5207.
- ¹⁴¹ M. T. Reetz, K. Schimossek, *Chimia* **1996**, *50*, 668.
- ¹⁴² (a) L. K. Tahlén, D. Zhao, J.-B. Sortais, J. Paetzold, C. Hoben, J.-E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3403; (b) C. E. Hoben, L. Kanupp, J.-E. Bäckvall, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 977; (c) J. Paetzold, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17620.
- ¹⁴³ B. S. Deol, D. Ridley, G. Simpson, *Aust. J. Chem.* **1976**, *29*, 2459.
- ¹⁴⁴ G. A. Applegate, D. B. Berkowitz, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1619.
- ¹⁴⁵ G. A. Applegate, R. W. Cheloha, D. L. Nelson, D. B. Berkowitz, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 2420.
- ¹⁴⁶ (a) D. Kalaitzakis, I. Smonou *Eur. J. Org. Chem.* **2012**, 43; (b) D. Kalaitzakis, S. Kambourakis, D. J. Rozzell, I. Smonou, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2418.
- ¹⁴⁷ A. Cuetos, A. Rioz-Martínez, F. R. Bisogno, B. Grischek, I. Lavandera, G. de Gonzalo, W. Kroutil, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 1743.
- ¹⁴⁸ J. A. Friest, Y. Maezato, S. Broussy, P. Blum, D. B. Berkowitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 5930
- ¹⁴⁹ K. Kędziora, F. R. Bisogno, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, J. Montejo-Bernardo, S. García-Granda, W. Kroutil, V. Gotor, *ChemCatChem* **2014**, *6*, 1066.
- ¹⁵⁰ M. M. Musa, K. I. Ziegelmann-Fjeld, C. Vieille, J. G. Zeikus R. S. Philips, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 30.
- ¹⁵¹ J. Mangas-Sánchez, E. Busto, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Org. Lett.* **2013**, 3872
- ¹⁵² (a) N. Khamthong, V. Rukachaisirikul, S. Phongpaichit, S. Preedanon, J. Sakayaroj, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 8245; (b) D. Fishlock, R. M. Williams, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3299; (c) A. K. Machocho, J. Bastida, C. Codina, F. Vildomat, R. Brun, S. C. Chabra, *Phytochemistry* **2004**, *65*, 3143; (d) R. Grigg, V. Savic, V. Sridharan, C. Terrier, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8613; (e) D. L. J. Clive, M. Sannigrahi, S. Hisaindee, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 954; (f) W. H. Pearson, F. E. Lovering, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12336; (g) S. E. Denmark, M. E. Schnute, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1013.
- ¹⁵³ (a) M. A. Specker, E. T. Theimer, US Patent, 4162256, **1979**, *Chem. Abstr.* **1980**, *92*, 41765; (b) G. Fréter, U. Müller, P. Kraft, *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1656.

¹⁵⁴ P. Lorenz, M. Zeh, J. M. Lobenhoffer, H. Schmidt, G. Wolf, T. F. W. Horn. *Free Radic. Res.* **2005**, *39*, 535.

¹⁵⁵ (a) W. Stampfer, B. Kosjek, C. Moitzi, W. Kroutil, K. Faber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1014; (b) K. Edegger, C. C. Gruber, T. M. Poessl, S. R. Wallner, I. Lavandera, K. Faber, F. Niehaus, J. Eck, R. Oehrlein, A. Hafner, W. Kroutil, *Chem. Commun.* **2006**, 2402; (c) C. E. Paul, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, W. Kroutil, V. Gotor, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 3875.

¹⁵⁶ C. Rodríguez, G. de Gonzalo, A. Rioz-Martínez, D. E. Torres-Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1121.