



Universidad de Oviedo

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

**DESARROLLO DE
PROCESOS QUIMIOENZIMÁTICOS
SELECTIVOS. APLICACIONES DE
PROCESOS MULTIENZIMÁTICOS
EN CASCADA**

Tesis Doctoral

Daniel González Martínez



Universidad de Oviedo

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

**DESARROLLO DE
PROCESOS QUIMIOENZIMÁTICOS
SELECTIVOS. APLICACIONES DE
PROCESOS MULTIENZIMÁTICOS
EN CASCADA**

**Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Química por
Daniel González Martínez**



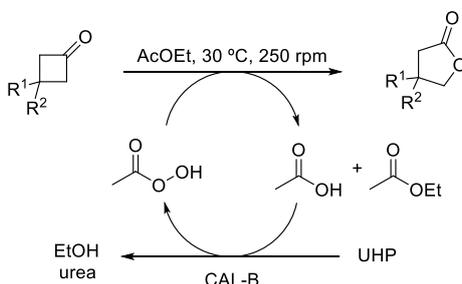
RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Desarrollo de procesos quimioenzimáticos selectivos. Aplicaciones de procesos multienzimáticos en cascada.	Inglés: Development of selective chemoenzymatic processes. Applications in multienzymatic cascade reactions.
2.- Autor	
Nombre: Daniel González Martínez	DNI/Pasaporte/NIE: -G
Programa de Doctorado: Síntesis y Reactividad Química	
Órgano responsable: Departamento de Química Orgánica e Inorgánica	

RESUMEN (en español)

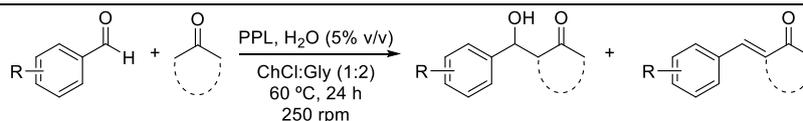
La Biotatálisis se ha consolidado como una de las herramientas sintéticas de mayor relevancia para la producción de compuestos orgánicos de forma acorde a los principios de la Química Sostenible, tanto desde un punto de vista académico como industrial. Las principales ventajas de las transformaciones sintéticas catalizadas por enzimas se hallan en su elevada selectividad y eficiencia, así como en las condiciones suaves de reacción en las que operan. En los últimos años, los avances en biología molecular y biotecnología han permitido, por medio de la evolución dirigida y el diseño racional de proteínas, el descubrimiento de nuevas actividades catalíticas y el diseño de biocatalizadores más eficaces. En esta Tesis Doctoral se han empleado tres de las clases de enzimas con mayor implementación en síntesis orgánica, como son las lipasas, alcohol deshidrogenasas y transaminasas, en diferentes procesos quimioenzimáticos que se han estructurado en dos bloques bien diferenciados.

En el **Bloque I** se estudia la capacidad de las hidrolasas, y concretamente de las lipasas, para catalizar procesos no convencionales donde la enzima muestra una reactividad que difiere a la de su función natural. Así, en el **Capítulo 1** se ha estudiado la oxidación de Baeyer-Villiger de cetonas cíclicas a través de una estrategia quimioenzimática mediada por la lipasa de *Candida antarctica* B (CAL-B). De esta manera, la enzima en combinación con el complejo urea-peróxido de hidrógeno (*urea-hydrogen peroxide*, UHP) cataliza la perhidrólisis del acetato de etilo, empleado como disolvente, generando el perácido intermedio (ácido peracético) en el medio de reacción que, posteriormente, es el responsable químico de llevar a cabo con éxito la formación de las correspondientes lactonas.



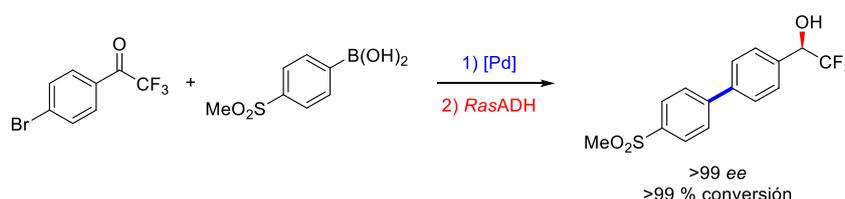
Esquema 1. Oxidación de derivados de ciclobutanona en γ -butirolactonas mediante la formación del ácido peracético como intermedio de reacción.

En el **Capítulo 2** se ha examinado la promiscuidad catalítica de distintas hidrolasas para formar enlaces C-C o C-N utilizando mezclas eutécticas de bajo punto de fusión (*deep eutectic solvents*, DES) como medio de reacción. De entre diversas hidrolasas estudiadas, se ha escogido la lipasa de páncreas porcino (PPL) para examinar su actividad promiscua, optimizando una metodología sintética eficiente para catalizar la adición aldólica de distintas cetonas alifáticas simétricas a derivados de benzaldehído empleando DES formados por mezclas de cloruro de colina (ChCl) y glicerol (Gly) en distintas proporciones molares.



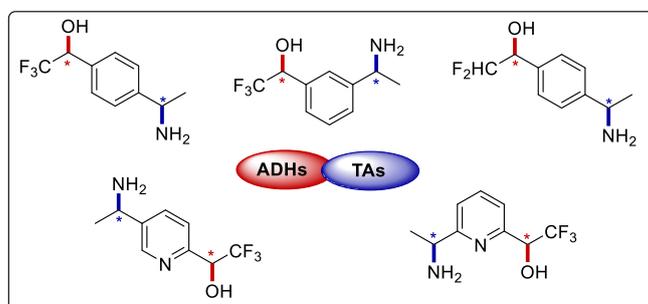
Esquema 2. Adición aldólica de cetonas simétricas a derivados de benzaldehído catalizada por la PPL en DES.

El **Bloque II** comprende tres ejemplos diferentes de cascadas biocatalíticas, bien en combinación con metales o bien involucrando sistemas multienzimáticos, para la síntesis asimétrica de alcoholes, empleando alcohol deshidrogenasas (ADHs), y/o aminas, con transaminasas (TAs). Así, en el **Capítulo 3** se ha descrito una cascada secuencial aplicada a la síntesis de un precursor quiral del fármaco odanacatib a través de una reacción de acoplamiento cruzado catalizada por paladio y seguida de una biorreducción catalizada por la alcohol deshidrogenasa de *Ralstonia* sp. (*RasADH*). Además, en vista de los excelentes resultados, se ha estudiado el comportamiento de diferentes ADHs para reducir derivados de trifluoroacetofenona, y acceder a los dos enantiómeros posibles, observando que actúan con una elevada actividad y excelente selectividad sobre estos sustratos.



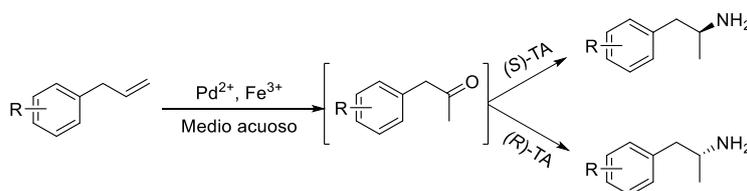
Esquema 3. Síntesis quimioenzimática de un precursor del fármaco odanacatib combinando un acoplamiento de Suzuki seguido de una biorreducción.

En el **Capítulo 4** se ha desarrollado una metodología diastereo- y enantioselectiva para sintetizar aminoalcoholes utilizando ADHs y TAs en una cascada que puede operar secuencial o concurrentemente. A partir de varias dicetonas (hetero)arílicas con los dos carbonilos diferenciados electrónicamente (generalmente una trifluorometilcetona y una metilcetona) se han podido obtener los cuatro posibles estereoisómeros con elevada selectividad empleando la combinación de ADH y TA adecuada con enantioselectividades complementarias.



Esquema 4. Aminoalcoholes sintetizados mediante la combinación en cascada de ADHs y TAs.

Por último, en el **Capítulo 5** se ha optimizado una cascada secuencial para la transformación de alilbencenos, algunos de ellos de origen natural, en las correspondientes 1-arylpropan-2-aminas, comúnmente conocidas como anfetaminas, aminas ópticamente activas que poseen muy variadas aplicaciones terapéuticas. De esta manera, se ha combinado una oxidación de Wacker-Tsuji catalizada por Pd(II) y utilizando sales de Fe(III) como oxidante terminal en medio acuoso para formar las correspondientes 1-arylpropan-2-onas intermedias que, sin requerir su aislamiento, se han transformado en las (*R*) o (*S*)-anfetaminas utilizando transaminasas con la adecuada selectividad.



Esquema 5. Cascada secuencial quimioenzimática por combinación de una oxidación de Wacker-Tsuji seguida de una biotransaminación para la síntesis asimétrica de anfetaminas.



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Algunos de estos resultados han sido publicados en lo siguientes artículos de investigación:

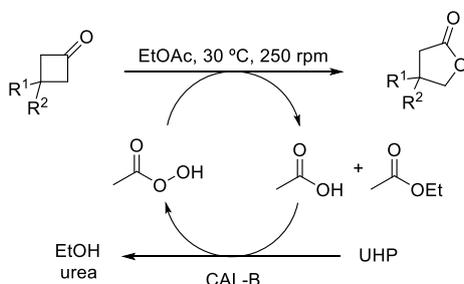
- “Lactonization reactions through hydrolase-catalyzed peracid formation. Use of lipases for chemoenzymatic Baeyer–Villiger oxidations of cyclobutanones”. D. González-Martínez, M. Rodríguez-Mata, D. Méndez-Sánchez, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, 114, 31-36.
- “Application of deep eutectic solvents in promiscuous lipase-catalysed aldol reactions”. D. González-Martínez, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 1513-1519.
- “Stereoselective synthesis of 1-arylpropan-2-amines from allylbenzenes through a Wacker-Tsuji oxidation-biotransamination sequential process”. D. González-Martínez, V. Gotor, V. Gotor-Fernández. *Adv. Synth. Catal.* **2019**, doi: 10.1002/adsc.201900179.



RESUMEN (en Inglés)

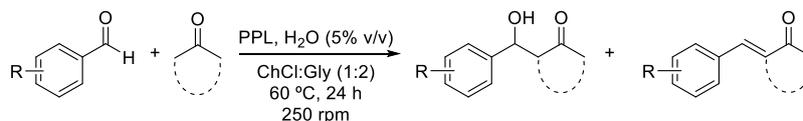
Biocatalysis have become one of the most useful and versatile synthetic tools for the production of organic compounds in an environmentally friendly manner in agreement with the Principles of the Green Chemistry, with potential application in the academia and industry. Among the advantages of the enzymes in synthetic transformations are the efficiency and selectivity of this catalysts and their ability to work under mild reaction conditions. In the last years, the advances in molecular biology and biotechnology have enabled the optimisation of existing enzymes and the discovery of new biocatalytic reactions through the engineering of proteins. In this PhD Thesis, three of the most relevant classes of enzymes in organic synthesis have been employed, such as lipases, alcohol dehydrogenases and transaminases, in different chemoenzymatic approaches, dividing the work in two independent sections.

In **Section I** the ability of hydrolases, and specifically lipases, to promote non conventional processes has been studied, where the enzyme displays a reactivity that differs from its natural function. In **Chapter 1** the Baeyer-Villiger chemoenzymatic oxidation of cyclic ketones is achieved in a lipase-mediated process using the lipase of *Candida antarctica* B (CAL-B). Thus, the enzyme in combination with the urea-hydrogen peroxide complex (UHP) catalyses the perhydrolysis of ethyl acetate employed as solvent, releasing peracetic acid in the reaction medium that subsequently promotes the chemical oxidation of several cyclic ketones to produce the corresponding lactones.



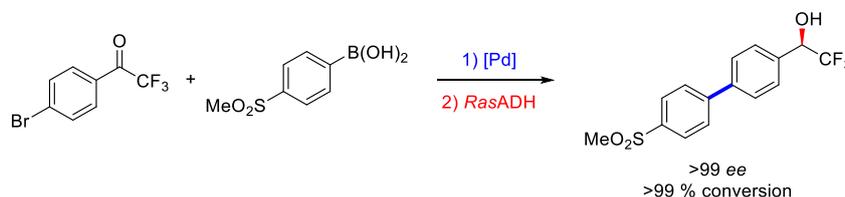
Scheme 1. Baeyer-Villiger oxidation of cyclobutanones using a lipase-mediated chemoenzymatic approach.

In **Chapter 2** the application of deep eutectic solvents (DES) has been investigated in promiscuous hydrolase-catalysed reactions that involve C-C or C-N bond formation. The porcine pancreatic lipase (PPL) was selected from a panel of hydrolases to study its promiscuous activity, optimising an efficient catalytic methodology for the aldol reaction between symmetric aliphatic ketones and aromatic aldehydes employing DES composed by mixtures of choline chloride (ChCl) and glycerol (Gly) in different molar ratios.



Scheme 2. PPL-catalysed aldolic reaction between symmetric ketones and benzaldehydes in DES.

In the **Section II** three different biocatalytic cascades have been developed for the asymmetric synthesis of alcohols, using alcohol dehydrogenases (ADHs), and/or amines, with transaminases (TAs), either in combination with metal catalysts or involving multienzymatic systems. In **Chapter 3** a sequential *one-pot* approach for the synthesis of a chiral precursor of the odanacatib drug is proposed by combination of a palladium-catalysed cross-coupling reaction with a subsequent bioreduction using the alcohol dehydrogenase from *Ralstonia* sp. (*RasADH*). Besides, the ADH-catalysed reduction of several trifluoroacetophenones has been studied, giving access to both enantiomers with excellent yields and selectivity.

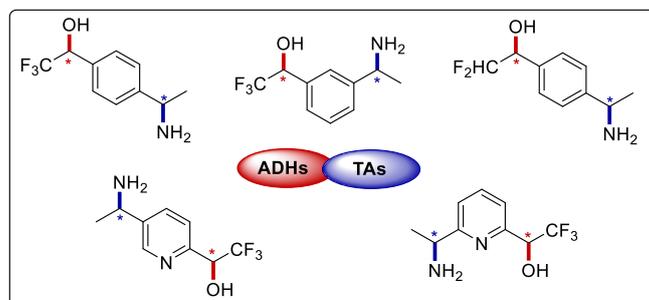


Scheme 3. Chemoenzymatic synthesis of an odanacatib precursor in a *one-pot* sequential process combining a



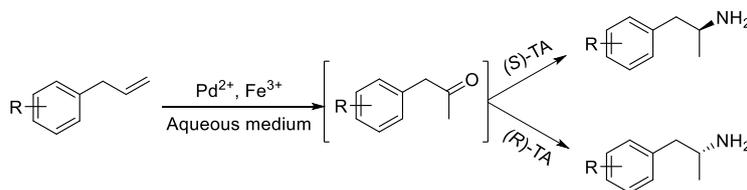
Suzuki reaction with an ADH-catalysed reduction.

In **Chapter 4** a diastereo- and enantioselective methodology for the production of amino alcohols has been designed based on a cascade reaction using ADHs and TAs, which can proceed both in a sequential or concurrent manner. Starting from different (hetero)arylic diketones with two electronically differentiated carbonyl groups (generally, a trifluoromethylketone and a methylketone), the four possible stereoisomers have been obtained with high selectivity employing the adequate combination of ADH and TA with complementary enantioselectivities.



Scheme 4. Aminoalcohols synthesised in a cascade reaction involving ADHs and TAs.

Finally, in **Chapter 5** a sequential cascade has been developed for the stereoselective transformation of allylbenzenes into the corresponding 1-arylpropan-2-amines, also known as amphetamines, many of them with relevant therapeutic properties. A palladium(II)-catalysed Wacker-Tsuji oxidation with iron(III) salts as final oxidant in aqueous medium was combined with a biotransamination step, in which the corresponding 1-arylpropan-2-one intermediate was transformed into the (*R*)- or (*S*)-amphetamine using transaminases with the adequate enantioselectivity.



Scheme 5. Sequential chemoenzymatic cascade for the production of chiral amphetamines coupling a Wacker-Tsuji oxidation followed by a biotransamination.

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

- "Lactonization reactions through hydrolase-catalyzed peracid formation. Use of lipases for chemoenzymatic Baeyer-Villiger oxidations of cyclobutanones". D. González-Martínez, M. Rodríguez-Mata, D. Méndez-Sánchez, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, *114*, 31-36.
- "Application of deep eutectic solvents in promiscuous lipase-catalysed aldol reactions". D. González-Martínez, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 1513-1519.
- "Stereoselective synthesis of 1-arylpropan-2-amines from allylbenzenes through a Wacker-Tsuji oxidation-biotransamination sequential process". D. González-Martínez, V. Gotor, V. Gotor-Fernández. *Adv. Synth. Catal.* **2019**, doi: 10.1002/adsc.201900179.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN _____

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

[O]	Oxidación
α	Rotación óptica específica
δ	Desplazamiento químico
μL	Microlitro
ν	Frecuencia
Ac	Acetilo
AcOEt	Acetato de etilo
Ac₂O	Anhídrido acético
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADH-A	Alcohol deshidrogenasa de <i>Rhodococcus ruber</i>
ADH-T	Alcohol deshidrogenasa de <i>Thermoanaerobacter</i> sp.
AdRedAm	Aminasa reductiva de <i>Ajellomyces dermatitidis</i>
AK	Lipasa de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
Ala	Alanina
AlaDH	Alanina deshidrogenasa
AlkJ	Alcohol deshidrogenasa de <i>Pseudomonas putida</i> GPO1
AmDH	Amino deshidrogenasa
Ar	Arilo
ArRTA	Transaminasa de <i>Arthrobacter</i> sp.
ArRmut11	Variante de la transaminasa de <i>Arthrobacter</i> sp. (11 ciclos evolutivos)
ArSTA	Transaminasa de <i>Arthrobacter citreus</i>
AS	<i>Aspergillus niger</i>
Asp	Aspartato
AspRedAm	Aminasa reductiva de <i>Aspergillus oryzae</i>

Abreviaturas y Acrónimos

ATA	Amino transaminasa
AtTA	Transaminasa de <i>Aspergillus terreus</i>
atm	Atmósfera
AZADO	2-azaadamantano- <i>N</i> -oxilo
Bn	Bencilo
Boc	<i>tert</i> -Butiloxicarbonilo
Bu	Butilo
BVMO	Baeyer-Villiger monooxigenasa
°C	Grado Celsius
<i>c</i>	Conversión
CAL-A	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> de tipo A
CAL-B	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> de tipo B
CAR	Ácido carboxílico reductasa
Cbz	Benciloxicarbonilo
CDMO	Ciclododecanona monooxigenasa de <i>Rhodococcus ruber</i> SC1
CG	Cromatografía de gases
ChCl	Cloruro de colina
<i>ci</i>	Contenido isomérico
CIP	Reglas de Cahn-Ingold-Prelog
CLEA	Agregados de enzimas por entrecruzamiento (del inglés, <i>cross-linked enzyme aggregates</i>)
COPD	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
CPMO	Ciclopentanona monooxigenasa de <i>Comamonas</i> sp.
CRL	Lipasa de <i>Candida rugosa</i>
CvTA	Transaminasa de <i>Chromobacterium violaceum</i>

d	Doblete
dd	Doble doblete
ddd	Doble doblete de dobletes
ddt	Doble doblete de tripletes
DBR	Reductasa de dobles enlaces
DES	Disolventes eutécticos de bajo punto de fusión (del inglés, <i>deep eutectic solvents</i>)
DEPT	Incremento sin distorsión por transferencia de polarización (del inglés, <i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>)
DKR	Resolución cinética dinámica (del inglés, <i>dynamic kinetic resolution</i>)
DMA	<i>N,N</i> -dimetilnilina
DMAP	4-(<i>N,N</i> -dimetilamino)piridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMP	Peryodinano de Dess-Martin
DMSO	Dimetilsulfóxido
dq	Doble cuatruplete
dt	Doble triplete
DYRKR	Resolución cinética dinámica reductiva (del inglés, <i>dynamic reductive kinetic resolution</i>)
E	Enzima
<i>E</i>	Enantioselectividad o razón enantiomérica
EC	Comisión enzimática
<i>Ec</i>AHAS-I	Ácido acetohidroxi sintasa I de <i>Escherichia coli</i>
<i>ed</i>	Exceso diastereomérico
<i>ee</i>	Exceso enantiomérico

Abreviaturas y Acrónimos

<i>ee_s</i>	Exceso enantiomérico del sustrato
<i>ee_p</i>	Exceso enantiomérico del producto
EM	Espectrometría de masas
Eq	Equivalente
ERED	Eno-reductasa
ESI	Ionización por electrospray
Et	Etilo
FAD	Ácido ferúlico descarboxilasa
FDH	Formiato deshidrogenasa
g	Gramo
GDH	Glucosa deshidrogenasa
Gly	Glicerol
h	Hora
hex	Hexaplete
HicDH	Isocaproato reductasa
His	Histidina
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	Hertzio
<i>i</i>	Iso
IM	Inmovilizada
IRED	Imino reductasa
IR	Espectrometría infrarroja

IT	Intermedio tetraédrico
J	Constante de acoplamiento
KPi	Disolución reguladora de fosfatos de potasio
KRED	Cetorreductasa (del inglés, <i>ketoreductase</i>)
L-AAD	L-Aminoácido deaminasa
LbADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Lactobacillus brevis</i>
LDH	Lactato deshidrogenasa
Leu	Leucina
LkADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Lactobacillus kefir</i>
L_{Tv}	Lacasa de <i>Trametes versicolor</i>
M	Molar
m	Multiplete
MCPBA	Ácido <i>meta</i> -cloroperbenzoico
MDMA	3,4-Metilendioximetanfetamina
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo
mg	Miligramo
MHz	Megahertzio
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
mol	Mol
mol/mol	Relación molar

Abreviaturas y Acrónimos

MW	Microondas (del inglés, <i>microwave</i>)
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida adenina en su forma oxidada
NADES	Disolventes eutécticos de bajo punto de fusión naturales
NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina en su forma reducida
NADP⁺	Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato en su forma oxidada
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato en su forma reducida
NCS	Norclaurina sintasa
n.d.	No determinado
n.m.	No medido
<i>np</i>	Nanopartículas
NTA	Ácido nitrilotriacético
Nu	Nucleófilo
p/p	Relación en peso
P450	Citocromo P450
Pf	Punto de fusión
Ph	Fenilo
PLE	Esterasa de hígado de cerdo (del inglés, <i>pig liver esterase</i>)
PLP	Piridoxal-5'-fosfato
PMP	Piridoxamina-5'-fosfato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPL	Lipasa de páncreas porcino
Pr	Propilo
Pro	Prolina

PSL	Lipasa de <i>Burkholderia cepacia</i> o <i>Pseudomonas cepacia</i>
PyrH	Triptófano 5-halogenasa
q	Cuadruplete
qd	Cuádruple doblete
RasADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Ralstonia</i> sp.
Rdto	Rendimiento
RedAm	Aminasa reductiva
R_f	Factor de retención
RML	Lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Singulete
sa	Singulete ancho
SD	Soportada en diatomita
Ser	Serina
SET	Mecanismo de transferencia de un solo electrón (del inglés, <i>single electron transfer</i>)
SMO	Monooxigenasa de <i>Pseudomonas</i> sp. VLB120
sp.	Species
SpEH	Epóxido hidrolasa de <i>Sphingomonas</i> sp. HXN-200
SttH	Triptófano 6-halogenasa
SyADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Sphingobium yanoikuyae</i>
t	Triplete
t	<i>tert</i>
t.a.	Temperatura ambiente
TA	Transaminasa

Abreviaturas y Acrónimos

TAL	Tirosina amonio liasa
TBME	Éter metil <i>tert</i> -butílico
td	Triple doblete
TeSADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Thermoanaerobacter pseudoethanolicus</i>
TFA	Trifluoroacetato
TjNCS	Norcoclorina sintasa de <i>Thalictrum flavum</i>
THDA	Trastorno hiperactivo del déficit de atención
THF	Tetrahidrofurano
TK	Transcetolasa (del inglés, <i>transketolase</i>)
TL	Lipasa de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
TLC	Cromatografía de capa fina (del inglés, <i>thin layer chromatography</i>)
TMS	Tetrametilsilano
<i>t</i>_R	Tiempo de retención
Tris·HCl	Disolución reguladora de tris(hidroximetil)aminometano
Ts	<i>para</i> -Toluenosulfonilo
TPL	Tirosina fenil liasa
U	Urea
UHP	Complejo urea-peróxido de hidrógeno
uma	Unidad de masa atómica
UV	Ultravioleta
v/v	Relación de volúmenes
VfTA	Transaminasa de <i>Vibrio fluvialis</i>

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
0.1. Desarrollo sostenible, Química Verde y Biocatálisis	3
0.2. Los biocatalizadores en síntesis orgánica	5
0.2.1. Tipos de biocatalizadores	6
0.3. Lipasas	7
0.4. Alcohol deshidrogenasas	14
0.5. Transaminasas	17
OBJETIVOS GENERALES	25
BLOQUE I. PROCESOS NO CONVENCIONALES CATALIZADOS POR HIDROLASAS	29
INTRODUCCIÓN	31
I.1. Promiscuidad catalítica	33
I.1.1. Actividad catalítica promiscua de hidrolasas	37
CAPÍTULO 1. REACCIONES DE PERHIDRÓLISIS CATALIZADAS POR LIPASAS PARA LA OXIDACIÓN DE CETONAS CÍCLICAS	43
ANTECEDENTES	45
1.1. Actividad perhidrolítica de las hidrolasas.....	47
1.1.1. Aplicaciones en síntesis orgánica	50
OBJETIVOS	57
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
1.2. Oxidación de Baeyer-Villiger de la ciclobutanona	64
1.3. Síntesis de ciclobutanonas 3-sustituidas.....	67
1.4. Oxidación mediada por CAL-B de las ciclobutanonas 1b-1	69
1.5. Oxidación de derivados de ciclopentanona y ciclohexanona	71

Índice

<i>CONCLUSIONES</i>	73
<i>PARTE EXPERIMENTAL</i>	77
1.6. General.....	79
1.7. Técnicas de análisis	79
1.7.1. Cromatografía en gel de sílice	79
1.7.2. Resonancia magnética nuclear (RMN).....	80
1.7.3. Espectroscopía infrarroja (IR)	80
1.7.4. Puntos de fusión	80
1.7.5. Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)	80
1.7.6. Cromatografía de gases (CG).....	81
1.8. Procedimientos sintéticos.....	82
1.8.1. Procedimiento general para la síntesis quimioenzimática de lactonas utilizando ácido láurico y la lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i>	82
1.8.2. Síntesis de la 3-fenil-3-metilciclobutanona (1b).....	83
1.8.3. Síntesis de las ciclobutanonas 1c-g	84
1.8.4. Síntesis del 3-oxociclobutanocarboxilato de etilo (1h)	85
1.8.5. Síntesis del 3-oxociclobutanocarboxilato de bencilo (1i)	85
1.8.6. Síntesis química de las lactonas 2b-1	85
1.8.7. Procedimiento general para la síntesis quimioenzimática de lactonas empleando CAL-B en AcOEt.....	86
1.9. Datos experimentales	87
 <i>CAPÍTULO 2. PROMISCUIDAD CATALÍTICA DE HIDROLASAS EN DISOLVENTES EUTÉCTICOS</i>	99
<i>ANTECEDENTES</i>	101
2.1. DES.....	103
2.1.1. Aplicación en síntesis orgánica	105

2.1.2. DES en Biocatálisis	107
<i>OBJETIVOS</i>	113
<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	117
2.2. Reacción aza-Michael.....	120
2.3. Reacción aldólica	121
2.3.1. Optimización de la reacción aldólica modelo.....	122
2.3.2. Reacción aldólica entre derivados de benzaldehído y acetona. Influencia del electrófilo.....	127
2.3.3. Reacción aldólica entre derivados de benzaldehído y cetonas cíclicas alifáticas. Influencia del nucleófilo	128
2.3.4. Estudios de reciclaje	130
<i>CONCLUSIONES</i>	133
<i>PARTE EXPERIMENTAL</i>	137
2.4. General.....	139
2.5. Técnicas de análisis	139
2.6. Procedimientos sintéticos.....	139
2.6.1. Preparación de los DES.....	139
2.6.2. Adición aza-Michael de pirrolidina a acrilato de metilo en DES	140
2.6.3. Adición aza-Michael a acrilonitrilo en DES	140
2.6.4. Adición aza-Michael a crotonato de metilo en DES.....	140
2.6.5. Procedimiento general para la reacción aldólica entre 4- nitrobenzaldehído y acetona en DES	140
2.6.6. Procedimiento general para la reacción aldólica entre derivados de benzaldehídos y acetona en DES	141
2.6.7. Procedimiento general para la reacción aldólica entre derivados de benzaldehídos y cetonas cíclicas en DES	141

BLOQUE II. DESARROLLO DE PROCESOS ENZIMÁTICOS EN CASCADA	143
<i>INTRODUCCIÓN</i>	145
II.1. Reacciones en cascada de metales y enzimas.....	150
II.2. Cascadas multienzimáticas	157
CAPÍTULO 3. BIORREDUCCIÓN DE TRIFLUOROMETILCETONAS: SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE UN PRECURSOR DEL ODANACATIB	163
<i>ANTECEDENTES</i>	165
3.1. Odanacatib	168
<i>OBJETIVOS</i>	173
<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	177
3.2. Resolución con lipasas.....	180
3.3. Biorreducción con ADHs.....	182
3.3.1. Biorreducción de 4'-bromo-2,2,2-trifluoroacetofenona (26b).....	183
3.3.2. Biorreducción de 2,2,2-trifluoroacetofenona (25a).....	185
3.3.3. Biorreducción de la cetona 29 precursora del odanacatib.....	188
3.3.4. Extensión del estudio a otras trifluorocetonas	190
3.3.5. Escalados de los procesos de biorreducción para la síntesis asimétrica de los alcoholes (<i>R</i>)- y (<i>S</i>)- 26a-f	193
3.4. Reacción quimioenzimática <i>one-pot</i>	196
3.4.1. Acoplamiento cruzado en medio acuoso	196
3.4.2. Prueba de concepto del proceso secuencial	196
3.4.3. Optimización de las condiciones de reacción	197
3.4.4. Biorreducción a elevadas concentraciones de sustrato	199
3.4.5. Estudio del acoplamiento cruzado en medio acuoso	200

3.4.6. Proceso en cascada optimizado	201
<i>CONCLUSIONES</i>	203
<i>PARTE EXPERIMENTAL</i>	207
3.5. General.....	209
3.6. Técnicas de análisis	209
3.6.1. Cromatografía de gases (CG).....	209
3.6.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	211
3.6.3. Rotación óptica específica	211
3.7. Procedimientos sintéticos.....	211
3.7.1. Síntesis de 1-fenil-2,2,2-trifluoroetanol racémico (26a)	211
3.7.2. Síntesis de 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol racémico (26b)	212
3.7.3. Síntesis de los ésteres racémicos 27a-b	212
3.7.4. Procedimiento general para la resolución cinética enzimática de los alcoholes racémicos 26a-b mediante acetilación.....	213
3.7.5. Procedimiento general para la resolución cinética de los ésteres racémicos 27a-b mediante hidrólisis	213
3.7.6. Síntesis de 2,2,2-trifluoro-1-(1-naftil)etanona (25e)	213
3.7.7. Síntesis de 2,2,2-trifluoro-1-(2-naftil)etanona (25f)	214
3.7.8. Síntesis de 1-(9-antracil)-2,2,2-trifluoroetanona (25g)	214
3.7.9. Síntesis de 2,2,2-trifluoro-1-(1 <i>H</i> -indol-3-il)etanona (25h)	215
3.7.10. Síntesis de 4'-[4-(metilsulfonil)fenil]trifluoroacetofenona (29) en medio orgánico	215
3.7.10. Síntesis de 29 en medio acuoso	216
3.7.11. Procedimiento general para los ensayos de biorreducción con ADHs sobreexpresadas en <i>E. coli</i>	216
3.7.12. Procedimiento general para los ensayos de biorreducción con la ADH de <i>Ralstonia</i> sp.....	216

3.7.13. Procedimiento general para los ensayos de biorreducción con la ADH evo-1.1.200.....	217
3.7.14. Procedimiento general para la síntesis de (<i>R</i>)- 26a-f con <i>RasADH</i>	217
3.7.15. Procedimiento general para la síntesis de (<i>S</i>)- 26a-f con evo-1.1.200	217
3.7.16. Síntesis de (<i>R</i>)- 26f con <i>E. coli</i> /ADH-A.....	218
3.7.17. Proceso secuencial a concentración 33 mM de sustratos	218
3.7.18. Proceso secuencial a concentración 100 mM de sustratos ..	218
3.7.19. Escalado de la cascada quimioenzimática a concentración 500 mM de sustratos	219
3.8. Datos experimentales	220
CAPÍTULO 4. PROCESO EN CASCADA COMBINANDO ALCOHOL DESHIDROGENASAS Y TRANSAMINASAS: SÍNTESIS DE AMINOALCOHOLES A PARTIR DE DICETONAS	231
<i>ANTECEDENTES</i>	233
4.1. Síntesis enzimática estereoselectiva de aminoalcoholes	235
4.2. Reacciones en cascada de alcohol deshidrogenasas y transaminasas	238
<i>OBJETIVOS</i>	243
<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	247
4.3. Síntesis química de las dicetonas	250
4.4. Estudios de biorreducción	252
4.4.1. Biorreducción de los acetales intermedios de reacción 34a-c	252
4.4.2. Biorreducción de la 1-(4-acetilfenil)-2,2,2-trifluoroetan-1-ona (35a)	253

4.4.3. Biorreducción de la 1-(3-acetilfenil)-2,2,2-trifluoroetan-1-ona (35b)	258
4.4.4. Estudio enzimático de la 1-(2-acetilfenil)-2,2,2-trifluoroetan-1-ona (35c)	259
4.5. Estudios de biotransaminación	260
4.5.1. Examinación de las enzimas en la transaminación de 35a ...	261
4.5.2. Optimización del cosolvente en la biotransaminación de 35a con ArSTA	263
4.5.3. Optimización de la biotransaminación de 35a	264
4.5.4. Biotransaminación de 35a empleando otras estrategias de desplazamiento del equilibrio	267
4.5.5. Biotransaminación de la 1-(3-acetilfenil)-2,2,2-trifluoroetan-1-ona (35b)	271
4.6. Combinación de una ADH y una TA para la síntesis del 2,2,2-trifluoro-1-[4-(1-aminoetil)fenil]etan-1-ol	272
4.6.1. Obtención del aminoalcohol 44a en dos pasos	272
4.6.2. Síntesis del aminoalcohol 44a en cascada secuencial	274
4.6.3. Obtención del aminoalcohol 44a a través de un proceso en cascada concurrente	277
4.6.4. Optimización de los procesos en cascada para la síntesis asimétrica del aminoalcohol 44a	278
4.7. Síntesis del 2,2,2-trifluoro-1-[3-(1-aminoetil)fenil]etan-1-ol (44b)	279
4.8. Extensión de la metodología al resto de dicetonas	282
4.8.1. 5-Acetil-2-(trifluoroacetil)piridina (35d)	282
4.8.2. 6-Acetil-2-(trifluoroacetil)piridina (35e)	287
4.8.3. 1-(4-acetilfenil)-2,2-difluoroacetofenona (35f)	292
4.8.4. 2-Acetil-4-trifluoroacetil-1H-pirrol (35g)	295

4.9. Procesos en cascada.....	298
<i>CONCLUSIONES</i>	301
<i>PARTE EXPERIMENTAL</i>	305
4.10. General.....	307
4.11. Técnicas de análisis	307
4.11.1. Cromatografía de gases (CG).....	307
4.11.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	309
4.12. Procedimientos sintéticos.....	310
4.12.1. Síntesis de las dicetonas 35a-f	310
4.12.2. Síntesis del 2-acetil-4-trifluoroacetil-1 <i>H</i> -pirrol (35g).....	311
4.12.3. Procedimiento general para los ensayos de biorreducción de las dicetonas 35a-g	312
4.12.4. Procedimiento general para los ensayos de biotransaminación de las dicetonas 35a-g y las hidroxicetonas 38a-f	312
4.12.5. Síntesis de las hidroxicetonas 38a-g mediante biorreducción	312
4.12.6. Síntesis de aminocetonas 41a-f y 42g por biotransaminación	313
4.12.7. Método general para la síntesis de los aminoalcoholes (44a-f) de manera secuencial	313
4.12.8. Método general para la síntesis de los aminoalcoholes (44a-f) de modo concurrente	314
4.12.9. Síntesis enzimática en cascada de aminoalcoholes (44a-f) a mayor escala	314
4.13. Datos experimentales.....	315

<i>CAPÍTULO 5. SÍNTESIS ASIMÉTRICA DE 1-ARILPROPAN-2-AMINAS A TRAVÉS DE UNA CASCA DA SECUENCIAL QUIMIOENZIMÁTICA: OXIDACIÓN DE WACKER-TSUJI Y BIOTRANSAMINACIÓN.....</i>	331
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

<i>ANTECEDENTES</i>	333
5.1. Relevancia de las anfetaminas	335
5.1.1. Actividad biológica de derivados de anfetamina con grupos éter en el anillo aromático	338
5.1.2. Síntesis estereoselectiva de derivados de anfetamina	341
5.2. Oxidación de Wacker-Tsuji	345
<i>OBJETIVOS</i>	351
<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	355
5.3. Oxidación del alilbenceno (45a)	357
5.3.1. Estudio del proceso competitivo de isomerización	364
5.3.2. Identificación de los subproductos de la oxidación	366
5.4. Síntesis asimétrica de 1-fenilpropan-2-amina (48a)	369
5.4.1. Transaminación de 1-fenilpropan-2-ona (47a)	369
5.4.2. Compatibilidad entre los dos pasos sintéticos	372
5.5. Síntesis asimétrica de las 1-arylpropan-2-aminas 48b-i	376
5.5.1. Oxidación en medio acuoso de alilarenos (45b-j)	377
5.5.2. Transaminación de las 1-arylpropan-2-onas 47b-j	382
5.5.3. Síntesis de anfetaminas en cascada secuencial	387
5.6. Oxidación de Wacker-Tsuji ampliada a otras olefinas terminales y combinada con otros procesos enzimáticos	388
5.6.1. Extensión de la oxidación de Wacker-Tsuji de otras olefinas terminales	389
5.6.2. Combinación de la oxidación de Wacker-Tsuji con otros sistemas enzimáticos	391
<i>CONCLUSIONES</i>	395
<i>PARTE EXPERIMENTAL</i>	399
5.7. General	401

Índice

5.8. Técnicas de análisis	401
5.8.1. Cromatografía de gases (CG).....	401
5.8.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	403
5.9. Procedimientos sintéticos.....	404
5.9.1. Síntesis de 4-alil-1,2-dimetoxibenceno (45j)	404
5.9.2. Síntesis de las 1-arilpropan-2-onas 47a-j	405
5.9.3. Procedimiento general para los ensayos de biotransaminación de las 1-arilpropan-2-onas 47a-j	405
5.9.4. Síntesis de las anfetaminas 48a-j en cascada quimioenzimática secuencial utilizando <i>i</i> PrNH ₂ como donador de amino	405
5.9.5. Proceso secuencial de oxidación de Wacker y transaminación utilizando el sistema L-alanina/alaDH para la síntesis de las aminas 48a,g,h	406
5.9.6. Cascada secuencial de oxidación de Wacker y biorreducción para la síntesis de 1-fenilpropan-2-ol (59a).....	406
5.9.7. Síntesis química de <i>N</i> -metil-1-(2-metoxifenil)propan-2-amina racémica (60f)	407
5.9.8. Síntesis en cascada de (<i>R</i>)- 60f con RedAms	407
5.10. Datos experimentales.....	408
 <i>CONCLUSIONES GENERALES</i>	 419
 <i>REFERENCIAS</i>	 423

INTRODUCCIÓN

0.1. Desarrollo sostenible, Química Verde y Biocatálisis

La publicación del Informe Brundtland en 1987 alertando de las consecuencias medioambientales provocadas por la globalización y el exponencial crecimiento demográfico, industrial y económico supuso un punto de inflexión en el paradigma socioeconómico global, dando origen al concepto del desarrollo sostenible. En este modelo alternativo al tradicional crecimiento ilimitado, se pretende reconciliar los aspectos económico, social y ambiental del conjunto de actividades humanas de manera que permita satisfacer las necesidades actuales de la población global sin comprometer los recursos y posibilidades de futuras generaciones. Los fundamentos del desarrollo sostenible se articulan en torno a un consumo de los recursos naturales que permita su regeneración y una producción de contaminantes y residuos tal que pueda ser asimilada por el medio ambiente.¹

En el ámbito de la Química, los principios del desarrollo sostenible se han recogido bajo el término *Química Verde* a partir de la década de 1990 y se basan en un consumo eficiente de las materias primas (y fuentes de energía), a poder ser de origen renovable, reduciendo la cantidad de residuos y evitando el uso de reactivos y disolventes tóxicos o peligrosos en la preparación y aplicación de productos químicos.² El aspecto primordial es la supresión en el origen de la generación de contaminantes y deshechos en los procesos químicos, en lugar de emplear estrategias de remediación una vez generados los residuos, por lo que un factor clave en las estrategias sostenibles es la utilización de catalizadores en las reacciones químicas.³

En este contexto, la Biocatálisis, esto es, el empleo de enzimas o microorganismos como catalizadores en transformaciones orgánicas, ha experimentado un importante auge como tecnología sostenible, suscitando un creciente interés tanto a nivel académico como industrial. Desde un punto de vista medioambiental, los métodos biocatalíticos poseen una serie de ventajas frente a otros métodos sintéticos más tradicionales, que les dotan de un especial

¹ C. G. Brundtland, *Our common future, the world commission on environmental development*, 1987, Oxford University Press, Oxford (Reino Unido).

² R. A. Sheldon, *C. R. Acad. Sci. Paris, Serie IIc, Chimie/Chemistry*, 2000, 3, 541-551.

³ R. A. Sheldon, *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 1437-1451.

atractivo ya que, como se puede observar en la Tabla 1, se adecuan a 10 de los 12 Principios de la Química Verde que Anastas propuso en 1998 como guía para el diseño de procesos químicos sostenibles (los 2 restantes no son relevantes, en este caso, ya que se refieren al diseño de los productos).⁴

Tabla 1. Relación entre los 12 Principios de la Química Verde.

Principio de la Química Verde	Biocatálisis
1 Prevención de la generación de residuos	Reducción de residuos
2 Materias y energías renovables	Las enzimas son renovables
3 Reducir derivatizaciones	Evitar protecciones/desprotecciones
4 Productos biodegradables	No es relevante
5 Métodos sintéticos seguros	Generalmente presentan baja toxicidad
6 Utilización de catalizadores	Las enzimas son catalizadores
7 Eficiencia energética	Temperatura y presión atmosférica
8 Monitorización de los procesos en tiempo real	Aplicable a procesos biocatalíticos
9 Disolventes y sustancias auxiliares inocuos	Normalmente en medios acuosos
10 Maximización de la economía atómica	Rutas sintéticas con menos pasos y elevada economía atómica
11 Diseño de productos con baja toxicidad	No es relevante
12 Procesos inherentemente seguros	Condiciones suaves y seguras

Entre las características generales de los biocatalizadores, se puede destacar su obtención a partir de fuentes renovables, su biodegradabilidad y baja o nula toxicidad y que operan en condiciones suaves de reacción en medios acuosos (temperatura y presión ambientales, pH neutro...). Además, su elevada selectividad permite prescindir de pasos adicionales de derivatización, como reacciones de protección, desprotección o activación de grupos funcionales, por

⁴ P. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301-312.

lo que, en comparación con las rutas sintéticas orgánicas convencionales, las rutas biocatalíticas suelen poseer menos pasos sintéticos lo que se traduce en una mayor economía atómica y una menor generación de residuos.⁵

0.2. Los biocatalizadores en síntesis orgánica

Complementariamente a su interés desde un punto de vista exclusivamente medioambiental, las técnicas biocatalíticas poseen un gran atractivo en síntesis orgánica asimétrica, especialmente en el ámbito de la industria farmacéutica, gracias a la inherente estereoselectividad de las enzimas.⁶ En la última década, distintos avances en biotecnología y en técnicas (bio)computacionales han facilitado una gran expansión de la Biocatálisis en la industria química:⁷

- la *metagenómica*, esto es el análisis de materiales genéticos tomados de muy variados entornos ambientales, permite identificar nuevas enzimas dentro de la gran diversidad que proporciona la Naturaleza;
- la *bioinformática* permite realizar búsquedas en las bases de datos de proteínas, cada vez más extensas, para encontrar catalizadores más adecuados para la transformación deseada;
- la *ingeniería de proteínas* para conseguir enzimas más eficaces para un determinado proceso en términos de actividad, especificidad o estabilidad;
- la *ingeniería metabólica* para utilizar, en este caso, un organismo como biocatalizador para producir una determinada molécula;
- los ensayos de alto rendimiento (*high-throughput screening*) que permiten llevar a cabo una gran cantidad de reacciones y análisis al unísono para identificar con gran eficacia los mejores enzimas y condiciones de reacción en la transformación buscada.

Esto ha propiciado, por un lado, un exponencial incremento en la disponibilidad de herramientas biocatalíticas con utilidad sintética, tanto por el descubrimiento de diferentes familias de enzimas capaces de catalizar nuevas reacciones como por el diseño racional de enzimas genéticamente modificadas

⁵ R. A. Sheldon, J. M. Woodley, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 801-838.

⁶ K. Rosenthal, S. Lütz, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2018**, *11*, 58-64.

⁷ D. L. Hughes, *Org. Process. Res. Dev.* **2018**, *22*, 1063-1080.

y diseñadas para cada caso de interés.⁸ Por otro lado, el desarrollo de las técnicas de secuenciación, síntesis y clonación de ADN recombinante permite producir las enzimas, ya sean nativas o modificadas, en microorganismos huésped consiguiendo una productividad eficiente y rentable de los biocatalizadores adecuada para su aplicación a escala industrial.

0.2.1. Tipos de biocatalizadores

Las biotransformaciones se pueden llevar a cabo con distintos sistemas biológicos, desde enzimas aisladas o purificadas hasta células de microorganismos (células enteras), tanto células “en reposo” como cultivos en crecimiento (fermentaciones), aprovechando sus rutas biosintéticas para producir un determinado metabolito.⁹ Las enzimas aisladas se suelen emplear como catalizadores de una única transformación sintética, son más sencillas de utilizar y poseen una mayor productividad y selectividad, mientras que, como inconveniente, es necesario añadir los cofactores en el caso de que sean necesarios para la reacción. Esto se puede evitar utilizando células enteras, donde intervienen los propios mecanismos naturales de regeneración de los cofactores, pero es más difícil controlar la formación de subproductos y suelen presentar una menor estabilidad. Además, en ambos casos, es posible inmovilizar las enzimas o las células en muy distintos materiales de soporte, orgánicos o inorgánicos, que permiten la recuperación y reutilización de los biocatalizadores.¹⁰

Cada enzima se encuentra catalogada utilizando un sistema de cuatro dígitos (EC A.B.C.D) que alude al tipo de reacción (A), la clase de sustrato o el grupo funcional transferido (B), la naturaleza del cosustrato (C) y el número individual de la enzima (D). Atendiendo al tipo de reacción que catalizan, las enzimas se clasifican en seis grandes categorías (Tabla 2) donde la mayor relevancia desde un punto de vista sintético, por su capacidad de aceptar

⁸ a) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature*, **2012**, *485*, 185-194; b) R. E. Cobb, R. Chao, H. Zhao, *AIChE J.* **2013**, *59*, 1432-1440; c) M. Höning, P. Sondermann, N. J. Turner, E. M. Carreira, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 8942-8973.

⁹ R. A. Sheldon, D. Brady, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 6088-6104.

¹⁰ J. Zdarta, A. S. Meyer, T. J. Jesionowski, M. Pinelo, *Catalysts*, **2018**, *8*, 92.

sustratos no naturales, recae sobre los cuatro primeros grupos e, históricamente, sobre las oxidorreductasas e hidrolasas.¹¹

Tabla 2. Clasificación de las enzimas.

Clase de enzima	Tipo de reacción
1. Oxidorreductasas	Oxidación/reducción: oxigenación de enlaces C-H, C-C o C=C; eliminación o adición formal de hidrógeno
2. Transferasas	Transferencia de grupos funcionales: NH ₃ , aldehído, cetona, azúcar, fosforilo o metilo
3. Hidrolasas	Hidrólisis/síntesis de ésteres amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilos, anhídridos, glicósidos o haluros
4. Liasas	Adición/eliminación de pequeños fragmentos en enlaces C=C, C=N o C=O
5. Isomerasas	Isomerizaciones: reagrupamientos, epimerizaciones, racemizaciones, ciclaciones
6. Ligasas	Formación/ruptura de enlaces C-O, C-S, C-N o C-C junto a la eliminación de trifosfato

A continuación, se profundizará en las características y la aplicación en síntesis orgánica de las lipasas, las alcohol deshidrogenasas y las transaminasas, tres de los tipos de enzimas más relevantes en el ámbito de la Biocatálisis, y que poseen un papel preponderante en esta Tesis Doctoral.

0.3. Lipasas

La función que cumplen las lipasas en la Naturaleza es la hidrólisis de enlaces éster de triglicéridos, perteneciendo así a la familia de las hidrolasas, y desarrollando su actividad catalítica en interfases orgánico-acuosas debido a la baja solubilidad de sus sustratos naturales.

En 1984, el trabajo pionero de Zaks y Klibanov en el que mostraron que las lipasas presentaban una elevada estabilidad y actividad catalítica en disolventes orgánicos supuso un hito en la aplicación de la Biocatálisis en síntesis orgánica.¹²

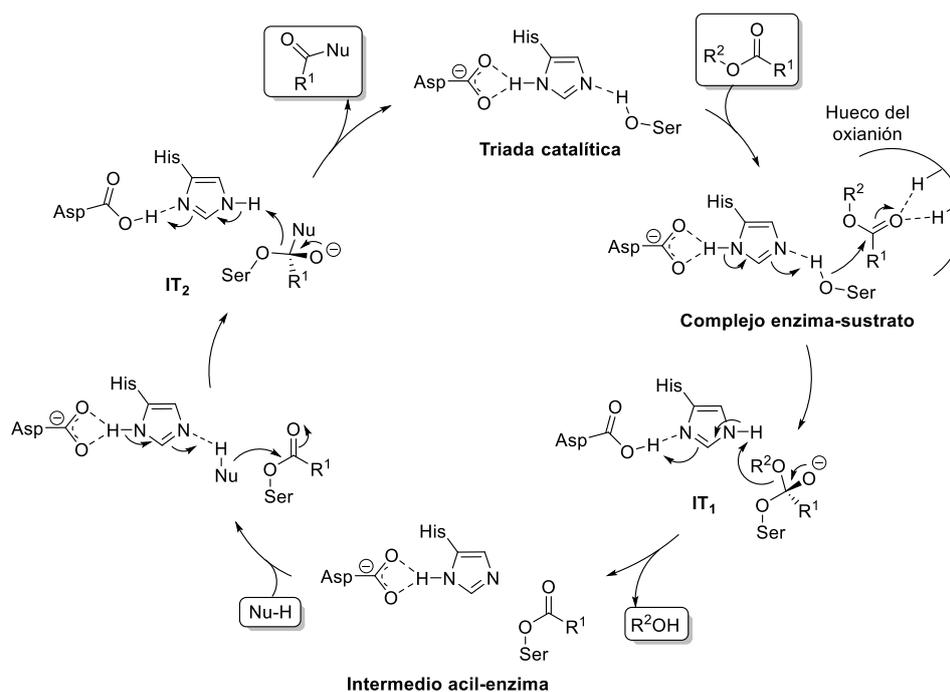
¹¹ K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook, 7th Edition*, Springer Nature, Cham (Suiza), 2018.

¹² A. Zaks, A. M. Klibanov, *Science*, 1984, 224, 1249-1251.

Otras características que explican la gran aceptación de las lipasas como biocatalizadores es que no son dependientes de cofactores, rasgo general de las hidrolasas, pudiendo actuar sobre una gran variedad de sustratos con elevada eficiencia, productividad y selectividad.

La catálisis en el centro activo de las lipasas transcurre siguiendo el mecanismo de las serín-hidrolasas, muy común también en otras clases de hidrolasas como proteasas o esterasas, que se caracteriza por la presencia de una triada catalítica compuesta por tres aminoácidos: una serina, que interacciona covalentemente con los sustratos, una histidina y un ácido aspártico (o ácido glutámico), que actúan sinérgicamente aumentando la nucleofilia de la serina. En el Esquema 1 se muestra el mecanismo de reacción de una hidrolasa serínica sobre un éster genérico, donde el complejo acil-enzima formado a través de un primer intermedio tetraédrico (**IT**₁) sufre el ataque de un nucleófilo para generar un segundo intermedio tetraédrico (**IT**₂) y liberar el producto final (un ácido carboxílico si el nucleófilo empleado es agua).¹³ Durante todo el proceso, una serie de residuos del centro activo que conforman el denominado hueco del oxianión intervienen activando al sustrato o estabilizando las cargas negativas de los diferentes intermedios por medio de enlaces de hidrógeno.

¹³ L. Hedstrom, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501-4523.

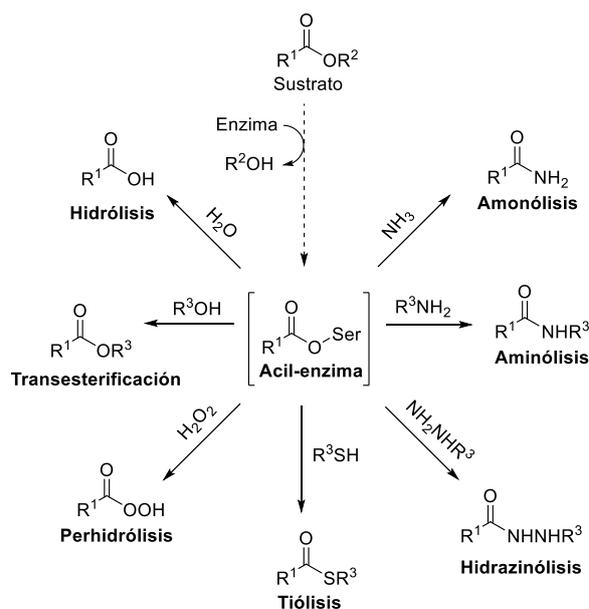


Esquema 1. Mecanismo de actuación de las serín-hidrolasas (por simplicidad, el hueco del oxianión solo se muestra en el primer intermedio).

Cuando las reacciones se llevan a cabo en un medio con una baja concentración acuosa, otros nucleófilos pueden competir con el agua por el intermedio acil-enzima logrando una serie de transformaciones con elevado interés sintético, como transesterificaciones si se utilizan alcoholes o amidaciones empleando aminas (Esquema 2).¹⁴ En cualquiera de estas aplicaciones, las lipasas han mostrado excelentes estereopreferencias al reconocer cualquier tipo de quiralidad presente en el sustrato, siendo el ejemplo más representativo y estudiado la resolución cinética de muy diversos alcoholes secundarios.¹⁵

¹⁴ A. M. Klivanov, *Nature*, **2001**, 409, 241-246; b) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, 111, 3998-4035.

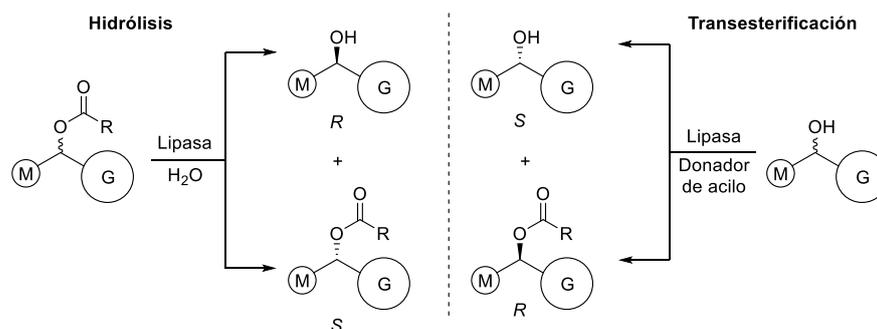
¹⁵ V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, 40, 111-120.



Esquema 2. Potencial sintético de las lipasas.

En general, estos procesos siguen la regla de Kazlauskas, donde el enantiómero de la mezcla racémica que reacciona preferentemente en el centro activo es el alcohol o éster de configuración *R* [siempre que el sustituyente más voluminoso sea el prioritario según las reglas de Cahn-Ingold-Prelog (CIP)], simetría que puede dar lugar a procesos complementarios según se utilice una estrategia de hidrólisis o transesterificación (Esquema 3).¹⁶

¹⁶ R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2656-2665.



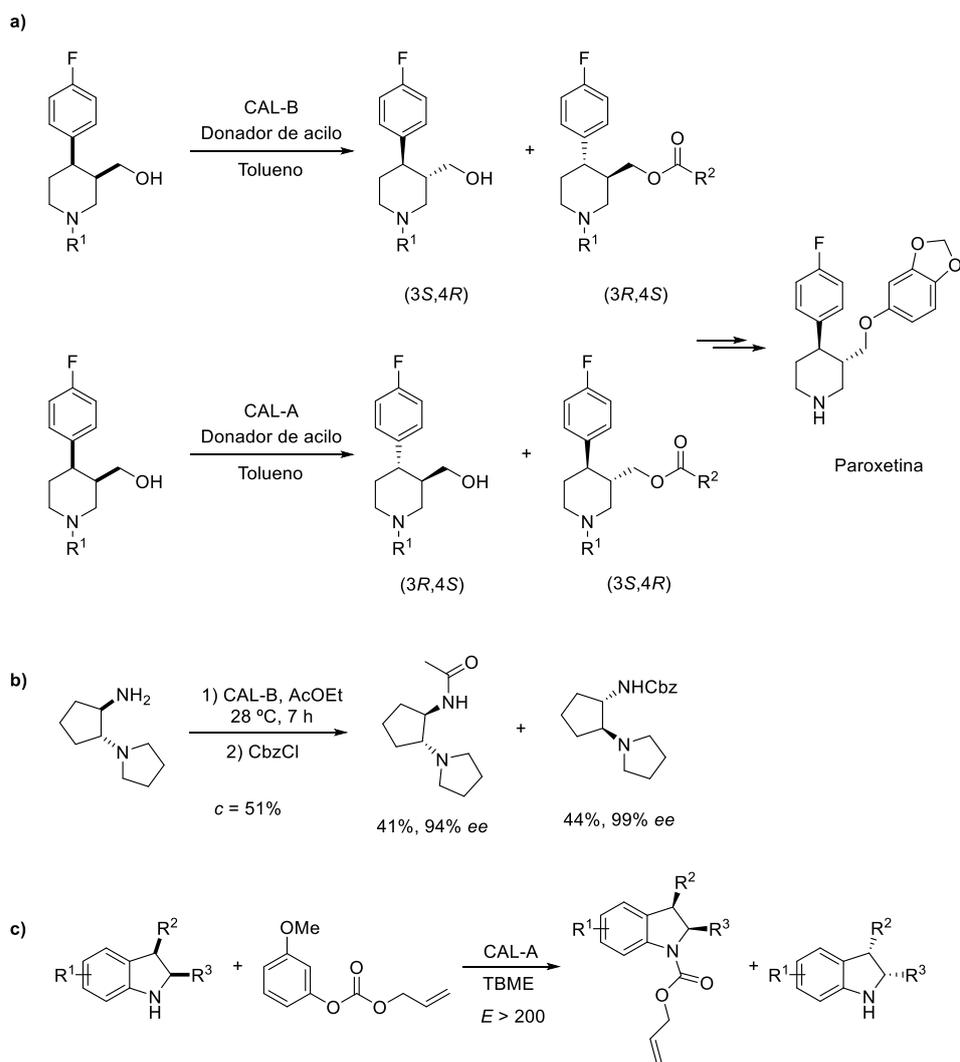
Esquema 3. Resolución cinética enzimática por hidrólisis o transesterificación según la regla de Kazlauskas (G = sustituyente grande, M = sustituyente mediano).

La resolución de alcoholes se ha aplicado, por ejemplo, a la síntesis de del fármaco antidepresivo paroxetina, donde dos isoenzimas de la lipasa de *Candida antarctica* (CAL-A y CAL-B) catalizan la acilación enantioselectiva de distintas *trans*-4-(4'-fluorofenil)-3-(hidroximetil)piperidinas *N*-protegidas con enantiopreferencias complementaria, dando acceso a ambos enantiómeros de forma ópticamente pura (Esquema 4a).¹⁷ Por otro lado, estas lipasas también ha mostrado excelentes resultados en la resolución de aminas, por ejemplo, la CAL-B cataliza la acetilación de la amina primaria de distintos derivados de *trans*-ciclohexano-1,2-diamina (Esquema 4b),¹⁸ mientras que la CAL-A ha mostrado una excelente selectividad en la resolución de *cis*-indolinas racémicas disustituidas en C2 y C3 (Esquema 4c).¹⁹

¹⁷ G. de Gonzalo, R. Brieva, V. M. Sánchez, M. Bayod, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8947-8953.

¹⁸ J. González-Sabín, V. Gotor, F. Rebolledo, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5788-5794.

¹⁹ M. López-Iglesias, E. Busto, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 8049-8055.

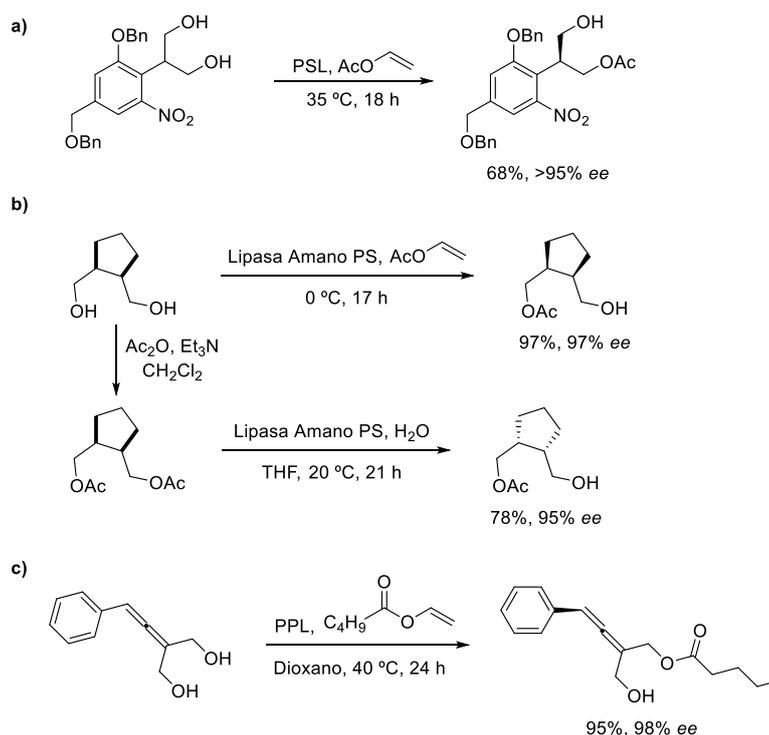


Esquema 4. Resoluciones cinéticas de moléculas de interés catalizadas por lipasas.

Las lipasas no son solo capaces de discriminar entre enantiómeros en una mezcla racémica, sino que también pueden catalizar desimetrizaciones de compuestos proquirales o *meso* que poseen grupos enantiotópicos.²⁰ Se pueden encontrar numerosos ejemplos donde la transesterificación de dioles o la hidrólisis de diésteres se emplea para sintetizar los fragmentos quirales

²⁰ a) E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 313-354; b) E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, PR110-PR180.

empleados en la síntesis total de moléculas complejas. Lipasas como la procedente de *Burkholderia cepacia* (PSL o Amano PS) muestran excelentes selectividades en la monoacetilación de 1,3-dioles (Esquema 5a)²¹ o en la desimetrización de dioles que presentan una forma *meso*, donde se puede acceder complementariamente a los dos posibles enantiómeros llevando a cabo un proceso de hidrólisis o de transesterificación (Esquema 5b).²² Incluso compuestos que presentan quiralidad de tipo axial, como los alenos, son susceptibles de experimentar reacciones selectivas catalizadas por lipasas, como la desimetrización de dioles alénicos proquirales utilizando la lipasa de páncreas porcino (PPL, Esquema 5c).²³



Esquema 5. Ejemplos de procesos de desimetrización catalizados por lipasas.

²¹ I. M. Fellows, D. E. Kaelin, S. F. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10781-10787.

²² L. Moni, L. Banfi, A. Basso, L. Carcone, M. Rasparini, R. Riva, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 3411-3428.

²³ C. M. Sapu, J.-E. Bäckvall, J. Deska, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9731-9734.

0.4. Alcohol deshidrogenasas

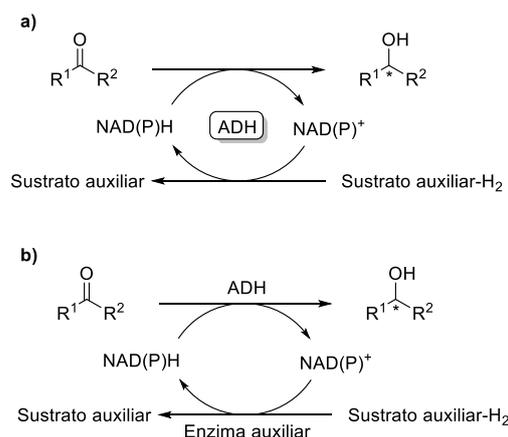
La familia de las oxidorreductasas es la más empleada en la actualidad en síntesis orgánica, donde la clase más estudiada y aplicada a nivel industrial es la de las alcohol deshidrogenasas (ADHs), que catalizan la interconversión entre cetonas o aldehídos y los correspondientes alcoholes secundarios o primarios, respectivamente.²⁴ Estas enzimas se han empleado ampliamente en reducciones asimétricas, especialmente en la reducción enantioselectiva de cetonas proquirales para producir alcoholes secundarios (por ello también son conocidas como ceterreductasas, KREDs), cuya efectividad y productividad las ha convertido en la primera opción de algunas empresas farmacéuticas para el diseño de rutas sintéticas que involucran alcoholes quirales.²⁵

Las ADHs son enzimas que dependen de cofactores redox NADH o NADPH, que poseen un grupo nicotinamida encargado de realizar el transporte de electrones en las oxidaciones o reducciones de los sustratos, y, por su elevado coste, deben ser utilizados en cantidades catalíticas y regenerados en el medio de reacción. Esto se puede conseguir bien por mecanismos naturales en caso de utilizar células enteras, o bien mediante estrategias de reciclado del cofactor si se emplean las ADHs aisladas. Los dos procesos más comunes son, por un lado, la utilización de un cosustrato auxiliar que es transformado por la misma enzima actuando en el sentido opuesto al de la reacción principal, comúnmente isopropanol en los procesos de biorreducción, donde se establece un equilibrio termodinámico entre las especies involucradas (sustrato acoplado, Esquema 6a). Esto se puede evitar, por otro lado, añadiendo una segunda enzima redox que posea una diferente especificidad de sustrato y que actúe independientemente a la ADH, siendo lo más común el uso de glucosa deshidrogenasa (GDH) o formiato deshidrogenasa (FDH) junto con sus respectivos sustratos (enzima acoplada, Esquema 6b).²⁶

²⁴ M. Hall, A. S. Bommarius, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4088-4110.

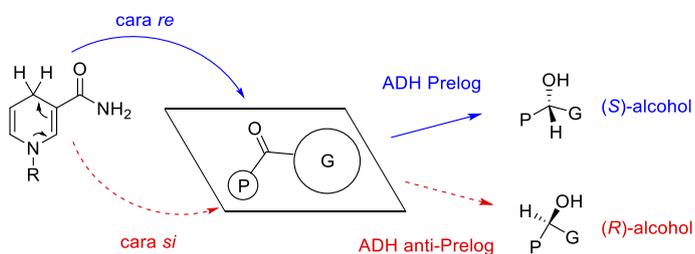
²⁵ J. Lalonde, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *42*, 152-158.

²⁶ K. Goldberg, K. Schroer, S. Lutz, A. Liese, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 237-248.



Esquema 6. Estrategias para la regeneración de los cofactores en su forma reducida: a) sustrato acoplado; b) enzima acoplada.

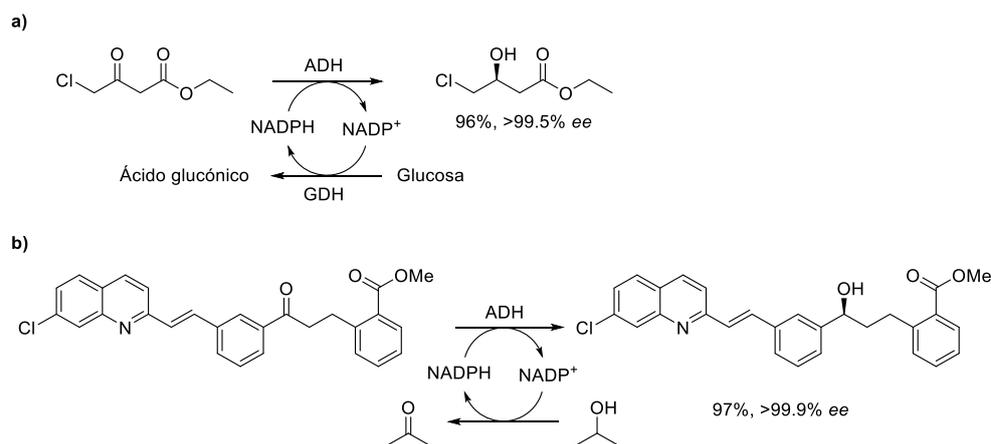
En la biorreducción asimétrica de cetonas, el mecanismo de reacción se basa en el ataque del hidruro procedente del grupo nicotinamida del cofactor situado en el centro activo de la ADH, y puede producirse por una de las dos caras del plano de simetría del carbonilo para generar uno u otro enantiómero. La estereopreferencia de las ADHs depende en gran medida de los impedimentos estéricos entre el sustrato y la enzima, y se han clasificado en dos grupos según el modelo propuesto por Prelog, que permite predecir la estereoquímica de la reacción en función del tamaño de los sustituyentes del carbonilo (Esquema 7).²⁷



Esquema 7. Regla de Prelog en la reducción asimétrica de cetonas proquirales (P = sustituyente pequeño, G = sustituyente grande, configuración absoluta de los alcoholes si G tiene preferencia sobre P según las reglas CIP).

²⁷ V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*, 119-130

Los procesos de biorreducción se han implementado en varias rutas quimioenzimáticas aplicadas a la síntesis de fármacos, donde el descubrimiento de nuevas ADHs y la evolución dirigida de las enzimas han logrado importantes avances incrementando el rango de aceptación de sustratos, tanto alifáticos como aromáticos, la selectividad y la productividad de las reacciones.⁷ Existen distintas rutas quimioenzimáticas para la preparación de la atorvastatina, principio activo del fármaco más vendido del mundo que se utiliza para reducir el colesterol, como la mostrada en el Esquema 8a donde se sintetiza el precursor ópticamente activo a través de una reacción de biorreducción. Una optimización de las enzimas involucradas, la ADH y la GDH, a través de varias rondas de evolución dirigida permitió su aplicación a escala preparativa y de forma acorde a los principios de sostenibilidad.²⁸ Por otro lado, introduciendo hasta 19 mutaciones sobre una ADH natural, se ha logrado obtener con completa enantioselectividad un intermedio clave en la producción del fármaco antiasmático Singulair, donde la enzima exhibe una excelente actividad a concentraciones muy elevadas de sustrato y en presencia de un disolvente orgánico a una escala de 200 kg (Esquema 8b).²⁹

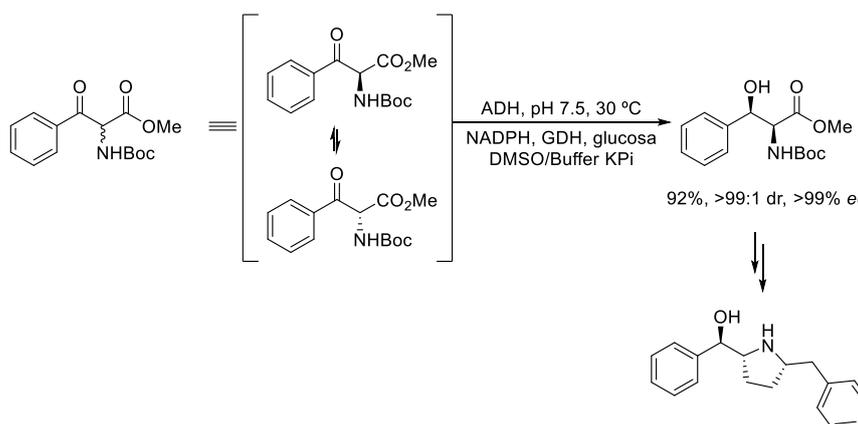


Esquema 8. Procesos de biorreducción catalizados por ADHs aplicados a la síntesis de fármacos.

²⁸ S. K. Ma, J. Gruber, C. Davis, L. Newman, D. Gray, A. Wang, J. Grate, G. W. Huisman, R. A. Sheldon, *Green Chem.* **2010**, *12*, 81-86.

²⁹ J. Liang, J. Lalonde, B. Borup, V. Mitchell, E. Mundorff, N. Trinh, D. A. Kochrekar, R. N. Cherat, G. G. Pai, *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14*, 193-198.

Las ADHs también han sido aplicadas en reacciones de resolución cinética dinámica reductiva (DYRKR) de cetonas α -sustituidas racémicas, donde el estereocentro contiguo al carbonilo epimeriza en las condiciones de reacción y durante la biorreducción se generan dos centros quirales.³⁰ Así, la reducción de ceto ésteres con ADHs presenta excelentes diastereo- y enantioselectividades para generar *syn*-1,2-amino alcoholes que se han aplicado a la obtención de *cis*-pirrolidinas 2,5-disustituidas a escala preparativa para el diseño de nuevos fármacos (Esquema 9).³¹



Esquema 9. Proceso de DYRKR catalizado por una ADH.

0.5. Transaminasas

Las transaminasas (TAs) pertenecen al grupo de las transferasas y son una clase de enzimas dependientes del cofactor piridoxal-5'-fosfato (PLP) que catalizan la transferencia de un grupo amino entre un donador de amino y un compuesto carbonílico (Esquema 10). De los distintos subgrupos en los que se dividen por su parentesco estructural, las más relevantes desde un punto de vista sintético son las ω -transaminasas³² o amino transaminasas (clases I y IV),³³ que

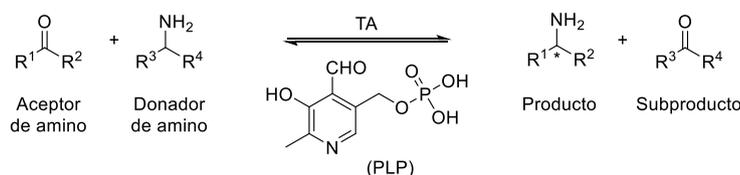
³⁰ G. A. Applegate, D. B. Berkowitz, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, 357, 1619-1632.

³¹ F. Xu, J. Y. Chung, J. C. Moore, Z. Liu, N. Yoshikawa, R. S. Hoermer, J. Lee, M. Royzen, E. Cleator, A. G. Gibson, R. Dunn, K. M. Maloney, M. Alam, A. Goodyear, J. Lynch, N. Yasuda, P. N. Devine, *Org. Lett.* **2013**, 15, 1342-1345.

³² Para diferenciarlas de las α -transaminasas que requieren un grupo carboxilo en posición contigua por lo que solo aceptan como sustratos α -aminoácidos o α -cetoácidos.

³³ P. K. Mehta, T. I. Hale, P. Christen, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 214, 549-561.

catalizan la formación de aminas primarias a partir de una amplia variedad de compuestos carbonílicos como sustratos, tanto cetonas como aldehídos, sin requerir la presencia de un grupo carboxílico. Además, las TAs poseen estereoselectividades complementarias ya que, en general, las de la clase I son (*R*)-selectivas y las de la clase IV (*S*)-selectivas, por lo que poseen un inmenso interés en la síntesis estereoselectiva de aminas en la industria farmacéutica y agroquímica como alternativas al uso tradicional de metales de transición.³⁴

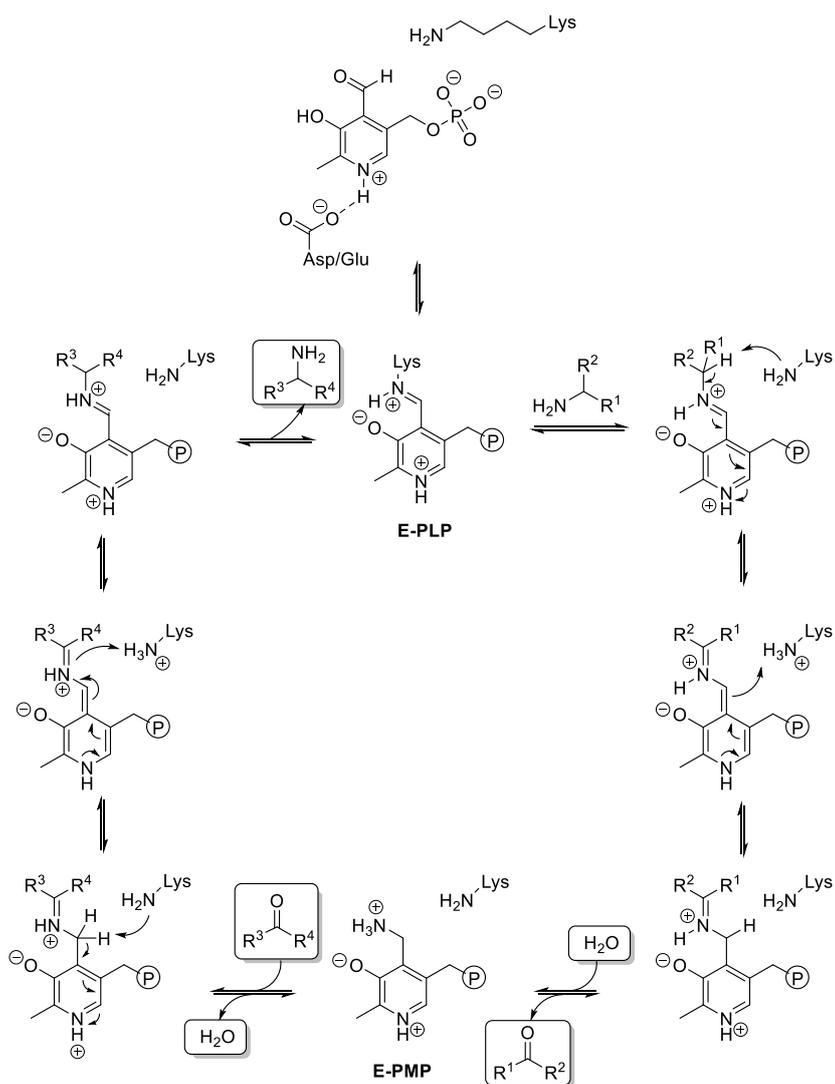


Esquema 10. Esquema general de la biotransaminación de una cetona.

El proceso de biotransaminación sigue un mecanismo ping-pong bi-bi en el que se diferencian dos medias-reacciones simétricas, partiendo de la forma activa de la enzima donde el PLP se enlaza covalentemente al centro activo a través del grupo amino de un residuo de lisina (Esquema 11).³⁵ En la primera mitad, se produce la transferencia del grupo amino al complejo del enzima-cofactor (**E-PLP**), generando la cetona obtenida como subproducto y la piridoxamina-5'-fosfato (PMP) que permanece en el centro activo mediante enlaces intermoleculares. A través de una secuencia de pasos reversibles, la amina se enlaza covalentemente con el aldehído del cofactor y forma un intermedio tipo imina (aldimina externa) en el que, gracias a la deslocalización de la carga en el anillo del piridoxal, la carga negativa en la posición α de la amina está estabilizada y se produce la abstracción del protón. Este intermedio evoluciona para dar un intermedio quinonoide carbaniónico, estabilizado por resonancia, que por protonación en C4' forma la cetimina que libera la amina tras un proceso de hidrólisis.

³⁴ a) I. Slabu, J. L. Galman, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 8263-8284; b) S. A. Kelly, S. Pohle, S. Wharry, S. Mix, C. C. R. Allen, T. S. Moody, B. F. Gilmore, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 349-367.

³⁵ A. C. Eliot, J. F. Kirsch, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 383-415.



Esquema 11. Mecanismo general de una reacción de biotransaminación.

Durante la segunda mitad del proceso ocurren los mismos pasos en el orden contrario, el complejo **E-PMP** reacciona con el sustrato aceptor para transferir el grupo amino, formando el producto y regenerando el PLP que, por tanto, solo es necesario en cantidades catalíticas.³⁶

³⁶ K. E. Cassimjee, B. Manta, F. A. Himo, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 8453-8464.

En términos de equilibrio químico, la reacción de biotransaminación para la síntesis asimétrica de aminas suele estar termodinámicamente desfavorecida, teniendo por tanto que utilizar el donador de amino (alanina o isopropilamina, generalmente) en exceso y/o eliminando el producto del medio de reacción (ácido pirúvico o acetona, en esos casos). Otra alternativa sintética es la resolución cinética de las aminas racémicas en la que el proceso se encuentra favorecido termodinámicamente, pero resulta de menor atractivo por su baja economía atómica ya que el rendimiento teórico máximo de la amina quiral es del 50%.

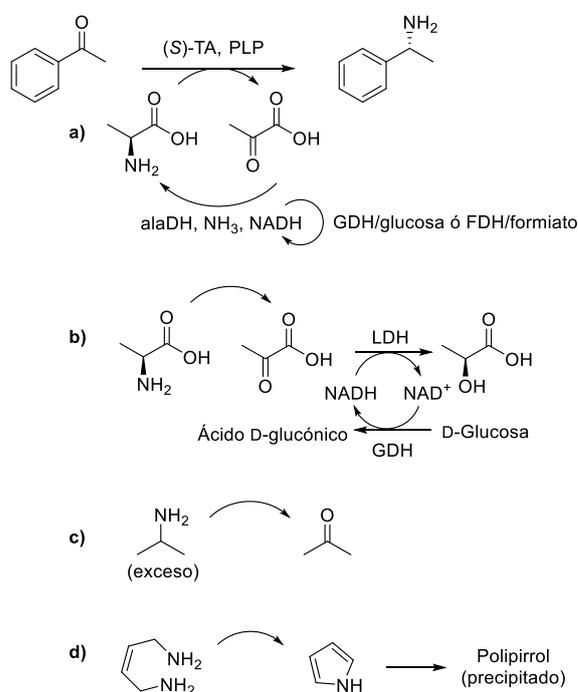
Como se ha comentado con anterioridad, entre los donadores de amino más utilizados se encuentran, por un lado, sus sustratos naturales L- y D-alanina, según sea la transaminasa (*S*)- o (*R*)-selectiva, que son aceptados por prácticamente todas las enzimas nativas. Para lograr procesos eficientes, se requiere un exceso de alanina sumado a una eliminación irreversible del piruvato del medio de reacción, para lo que se han descrito numerosas estrategias multienzimáticas. Entre las más empleadas, es destacable el uso de alanina deshidrogenasa (alaDH) que permite reciclar la L-alanina, y requiere una segunda oxidoreductasa (GDH o FDH) para la regeneración del cofactor (Esquema 12a), o la transformación del piruvato en lactato por acción de la lactato deshidrogenasa (LDH) que se acopla con el sistema GDH/glucosa para regenerar el cofactor y desplazar el equilibrio (Esquema 12b).

Por otro lado, se puede emplear un gran de exceso de isopropilamina (>40 equivalentes) como donador de amino, que resulta económicamente viable por su bajo coste y genera acetona como subproducto, fácilmente eliminable por su bajo punto de ebullición (Esquema 12c).³⁷ Sin embargo, al no ser un sustrato natural y ser una amina aquiral, es prácticamente indispensable modificar las transaminasas para mejorar la aceptación de este donador e incrementar la estabilidad de la proteína frente a concentraciones muy altas de isopropilamina.³⁸

³⁷ P. Tufvesson, M. Nordblad, U. Krühne, M. Schürmann, A. Vogel, R. Wohlgemuth, J. M. Woodley, *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 652-660.

³⁸ P. Kelefiotis-Stratidakis, T. Tyrikos-Ergas, I. V. Pavlidis, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 1634-1642.

Por último, una de las estrategias más novedosas, es el uso de cosustratos sacrificiales, también llamados inteligentes (*smart cosubstrates*), que experimentan reacciones espontáneas de ciclación y/o polimerización tras la transaminación, desplazando el equilibrio irreversiblemente con cantidades estequiométricas del donador de amino (Esquema 12d).³⁹



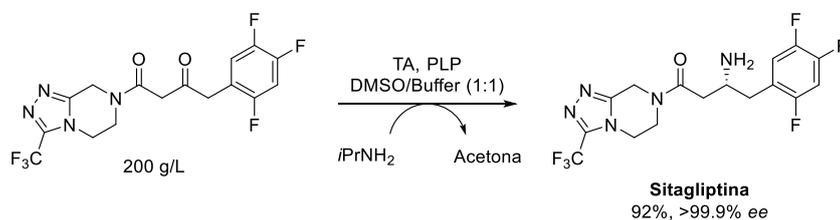
Esquema 12. Biotransaminación de acetofenona con distintos sistemas de desplazamiento del equilibrio.

Uno de los logros de mayor relevancia en la ingeniería de proteínas ha sido el diseño de una transaminasa evolucionada para la síntesis del fármaco antidiabético sitagliptina a partir de la cetona proquiral precursora (prositagliptina), que posee unos sustituyentes muy voluminosos a ambos lados del grupo carbonilo (Esquema 13a). Tomando como modelo la transaminasa (*R*)-selectiva de *Arthrobacter sp.* (clase IV), que prácticamente no mostraba actividad sobre el sustrato debido a los impedimentos estéricos, se introdujeron

³⁹ a) A. P. Green, N. J. Turner, E. O'Reilly, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10714-10717; b) L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 1618-1624.

una serie de mutaciones diseñadas mediante el análisis estructural de la proteína sobre una serie de aminoácidos clave en la zona que forma el hueco que acomoda el sustituyente pequeño del sustrato. A continuación, varias rondas de mutagénesis por saturación en aminoácidos situados en los huecos del centro activo para los sustituyentes grande y pequeño del sustrato y, posteriormente, en otras zonas de la enzima, permitieron obtener un biocatalizador práctico para la producción del fármaco a escala industrial que incluía 27 aminoácidos mutados sobre su estructura nativa tras 11 ciclos evolutivos.⁴⁰

Recientemente, Bornscheuer y colaboradores han seguido un procedimiento similar para diseñar una transaminasa (*S*)-selectiva (clase I) capaz de catalizar la aminación de cetonas que poseen sustituyentes voluminosos a través de la modelización estructural y el diseño racional de mutantes de la enzima nativa de *Ruegeria* sp.⁴¹



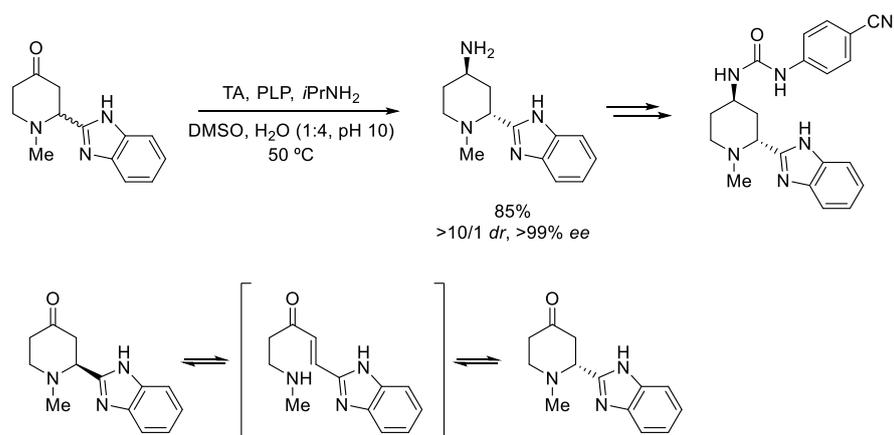
Esquema 13. Síntesis enzimática del fármaco sitagliptina en forma ópticamente pura.

En el diseño de una ruta sintética para sintetizar un inhibidor de un receptor diana en el tratamiento de cánceres sanguíneos, se eligió una ruta quimioenzimática donde en un paso de biotransaminación se establecían simultáneamente los dos centros estereogénicos del fármaco aplicando una estrategia de DKR (Esquema 14). La TA seleccionada cataliza la biotransaminación (*R*)-selectiva del carbonilo, a la vez que actúa únicamente sobre uno de los enantiómeros del sustrato, derivado de la 4-piperidona, que experimenta una racemización espontánea por apertura del anillo (los autores

⁴⁰ C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science*, **2010**, *329*, 305-309.

⁴¹ I. V. Pavlidis, M. S. Weiß, M. Genz, P. Spurr, S. P. Hanlon, B. Wirz, H. Iding, U. T. Bornscheuer, *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 1076-1082.

proponen un mecanismo retro-aza-Michael/aza-Michael), permitiendo obtener únicamente el diastereoisómero *anti* y en forma ópticamente pura.⁴²



Esquema 14. Biotransaminación y DKR de una 4-piperidona.

⁴² Z. Peng, J. W. Wong, E. C. Hansen, A. L. Puchlopek-Dermenci, H. J. Clarke, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 860-863.

OBJETIVOS GENERALES

En la *Introducción*, se ha destacado la creciente importancia de los métodos biocatalíticos en síntesis orgánica con la finalidad de diseñar transformaciones altamente sostenibles. Es por ello que en esta Tesis Doctoral nos planteamos el empleo de diversas enzimas, incluyendo hidrolasas, oxidorreductasas y transferasas, con el fin de obtener productos de alto valor añadido a través de métodos eficientes y selectivos. Así, esta memoria se dividirá en dos bloques bien diferenciados, en función de las estrategias sintéticas a desarrollar.

En un primer bloque, dividido a su vez en dos capítulos, nos planteamos el estudio de procesos catalíticos no convencionales empleando hidrolasas. De esta manera, nos hemos propuesto como objetivos específicos:

- (i) el desarrollo y optimización de un método oxidativo para la obtención de lactonas a través de una reacción de Baeyer-Villiger mediada por una lipasa
- (ii) el estudio de la actividad catalítica promiscua que presentan distintas hidrolasas para la formación de enlaces C-C o C-N en disolventes neotéricos como las mezclas eutécticas

El segundo bloque consta de tres capítulos en los que nos hemos planteado el diseño de cascadas quimioenzimáticas y multienzimáticas para la síntesis estereoselectiva de alcoholes, aminoalcoholes y aminas ópticamente activos utilizando alcohol deshidrogenasas y/o transaminasas. Como objetivos específicos de este apartado se incluyen:

- (i) la optimización de una estrategia *one-pot* para obtener un precursor del fármaco odanacatib mediante una reacción de acoplamiento cruzado catalizada por paladio y una biorreducción,
- (ii) el desarrollo de una cascada multienzimática que involucre una alcohol deshidrogenasa y una transaminasa para tratar de acceder de manera diastereo- y enantioselectiva a una serie de aminoalcoholes,
- (iii) la síntesis asimétrica de anfetaminas ópticamente activas a través de un proceso secuencial por combinación de una oxidación de Wacker-Tsuji de alilbencenos seguida de la biotransaminación de las cetonas intermedias.

BLOQUE I

PROCESOS NO CONVENCIONALES
CATALIZADOS POR HIDROLASAS

INTRODUCCIÓN

Uno de los factores que ha impulsado el auge del empleo de enzimas en síntesis orgánica es el descubrimiento y desarrollo de biocatalizadores, ya sea en su forma nativa o modificados genéticamente, que actúen de una manera eficiente y altamente selectiva sobre una gran variedad de moléculas. Además, en los últimos años, también se han encontrado numerosos ejemplos donde la actividad enzimática no se encuentra restringida únicamente a la reacción que cataliza en la naturaleza, y para la que está especializada la proteína, sino que son capaces de llevar a cabo diferentes transformaciones no convencionales en su centro activo. Esta versatilidad en la reactividad de algunas enzimas se conoce como promiscuidad biocatalítica, y se cree que ha tenido un importante rol en la evolución de las proteínas y que, en la actualidad, todavía se puede encontrar en la naturaleza involucrada en procesos metabólicos secundarios.⁴³

I.1. Promiscuidad catalítica

La búsqueda de nuevas reacciones catalizadas por enzimas aplicables en procesos sintéticos resulta un aspecto clave para el desarrollo de los métodos biocatalíticos en química orgánica y biología sintética. En este contexto, la capacidad de una misma enzima para catalizar distintas reacciones abre un amplio abanico de posibilidades, donde el estudio y la comprensión de los mecanismos que actúan en la catálisis promiscua permiten el diseño de biocatalizadores mejorados, así como el desarrollo de nuevas funciones enzimáticas diferentes a las presentes en la naturaleza.⁴⁴

Las actividades promiscuas pueden deberse a varios factores, como puede ser el empleo de sustratos que no están presentes en las rutas metabólicas, y que pueden ser susceptibles de experimentar otro tipo de reacciones, así como al uso de condiciones de reacción muy diferentes a las de su medio natural, y, además,

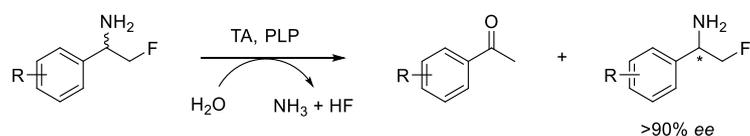
⁴³ a) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6032-6040; b) I. Nobeli, A. D. Favia, J. M. Thornton, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 157-167; c) O. Khersonsky, D. S. Tawfik, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 471-505.

⁴⁴ R. D. Gupta, *Sustain. Chem. Process.* **2016**, *4*, 2.

a la manipulación de los biocatalizadores mediante ingeniería de proteínas que puede potenciar este tipo de reactividades o inducir nuevas transformaciones sintéticas artificiales.⁴⁵

Aunque, tradicionalmente, se creyó que la promiscuidad catalítica era una característica casi exclusiva de la familia de las hidrolasas, donde destaca su versatilidad para catalizar enlaces C-C,⁴⁶ cada vez se descubren más ejemplos de reacciones no naturales catalizadas por, prácticamente, todas las clases de enzimas. A continuación, se muestran algunas de las reacciones promiscuas de mayor relevancia descubiertas recientemente catalizadas por enzimas no hidrolíticas explotando la especial reactividad de sustratos halogenados, o bien introduciendo modificaciones genéticas para promover actividades no naturales.

Las aminas β -fluoradas son potenciales inhibidores de las enzimas dependientes de PLP, dado que pueden formar un aducto covalente con el cofactor y la lisina catalítica del centro activo. Sin embargo, algunas TAs han mostrado ser capaces de actuar sobre este tipo de sustratos para dar un proceso de eliminación del átomo de flúor, además de catalizar al mismo tiempo la reacción de desaminación convencional sin requerir un aceptor de amino. A través de la resolución cinética de aminas aromáticas β -fluoradas, Lavandera y colaboradores han podido obtener los dos enantiómeros de los sustratos remanentes mediante el empleo de TAs con selectividades complementarias (Esquema 15).⁴⁷



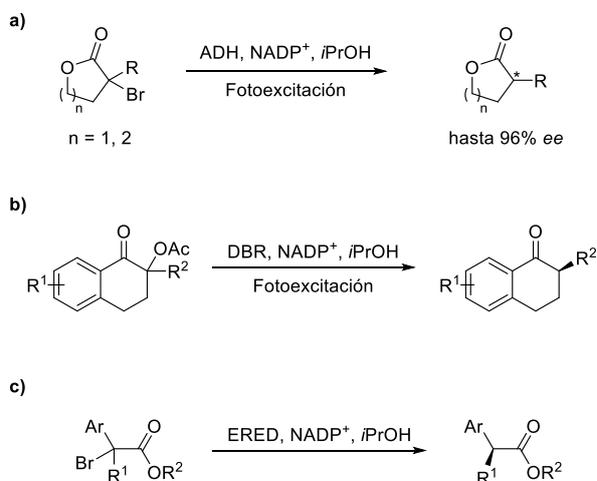
Esquema 15. Resolución cinética de β -fluoroaminas mediante una reacción promiscua de desfluoración catalizada por transaminasas.

⁴⁵ K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, 25, 231-238.

⁴⁶ Y. Miao, M. Rahimi, E. M. Geertsema, G. J. Poelarends, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, 25, 115-123.

⁴⁷ A. Cuetos, M. García-Ramos, E.-M. Fischereeder, A. Díaz-Rodríguez, G. Grogan, V. Gotor, W. Kroutil, I. Lavandera, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 3144-3147.

Algunas oxidorreductasas dependientes de cofactores que poseen un grupo nicotinamida (NADH o NADPH) pueden actuar a través de un mecanismo alternativo cuando son irradiadas con luz en el que se produce la transferencia de un solo electrón (SET, del inglés *single electron transfer*), formando especies radicalarias con un elevado potencial reductor. Así, se han reducido distintas lactonas racémicas α -bromadas empleando ADHs e irradiación con luz visible donde, a través de la formación de un radical proquiral tras la eliminación del halógeno, es posible acceder a los dos enantiómeros según la selectividad de la enzima (Esquema 16a).⁴⁸ De manera similar, se han utilizado reductasas de dobles enlaces (DBRs, del inglés *double bond reductases*) junto con luz visible para la desacetoxilación de α -acetoxitetralonas sustituidas, requiriendo en este caso la adición de un derivado de xanteno como fotocatalizador (Esquema 16b).⁴⁹



Esquema 16. Promiscuidad catalítica exhibida por oxidorreductasas iniciada a través de excitación fotoredox del cofactor.

Por otro lado, el cofactor flavina también es susceptible de generar especies radicalarias y promover este mecanismo si es factible una vía sintética productiva que transcurra a través de la transferencia de un electrón. De esta manera, las eno-reductasas (EREDs), un tipo de oxidorreductasas dependientes de este cofactor, han mostrado ser eficientes catalizadores en la desbromación

⁴⁸ M. A. Emmanuel, N. R. Greenberg, D. G. Oblinsky, T. K. Hyster, *Nature*, **2016**, *540*, 414-417.

⁴⁹ K. F. Biegasiewicz, S. J. Cooper, M. A. Emmanuel, D. C. Miller, T. K. Hyster, *Nat. Chem.* **2018**, *10*, 770-775.

enantioselectiva en posición α de distintos ésteres racémicos, obteniendo el centro quiral con la configuración opuesta a la que muestran las EREDs en su función natural (Esquema 16c).⁵⁰

Empleando técnicas computacionales y de evolución dirigida de proteínas se ha realizado el diseño *de novo* de una nueva clase de enzimas artificiales, apodadas retro-aldolasas por su capacidad para romper enlaces C-C en reacciones retro-aldólicas, donde la catálisis depende de un residuo de lisina que forma intermedios tipo imina o enamina (Esquema 17a).⁵¹ Además, este tipo de enzimas han mostrado poseer actividades promiscuas, siendo capaces de catalizar otro tipo de reacciones que transcurren a través de la formación de bases de Schiff, como condensaciones de Knoevenagel (Esquema 17b)⁵² o adiciones de Michael.⁵³ La evolución dirigida ha permitido obtener variantes de la retro-aldolasa con una diversificación completa de la selectividad que presenta la enzima para la adición Michael de carbaniones terciarios a cetonas insaturadas, posibilitando el acceso a los cuatro posibles diastereoisómeros y demostrando el enorme potencial que tiene esta estrategia en el diseño de enzimas que exhiban reactividades no naturales (Esquema 17c).⁵⁴

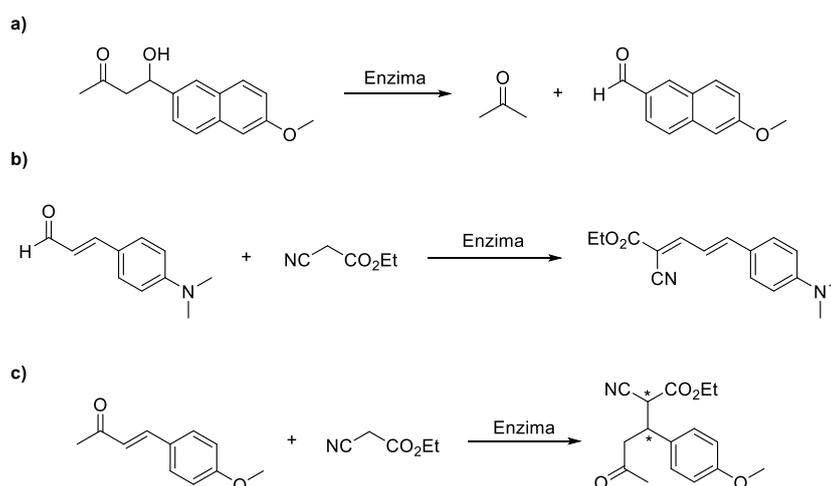
⁵⁰ B. A. Sandoval, A. J. Meichan, T. K. Hyster, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 11313-11316.

⁵¹ a) L. Jiang, E. A. Althoff, F. R. Clemente, L. Doyle, D. Röthlisberger, A. Zanghellini, J. L. Gallaher, J. L. Betker, F. Tanaka, C. F. Barbas, D. Hilvert, K. N. Houk, B. L. Stoddard, D. Baker, *Science*, **2008**, *319*, 1387-1391; b) L. Giger, S. Caner, R. Obexer, P. Kast, D. Baker, N. Ban, D. Hilvert, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 494-498.

⁵² X. Garrabou, B. I. M. Wicky, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 6972-6974.

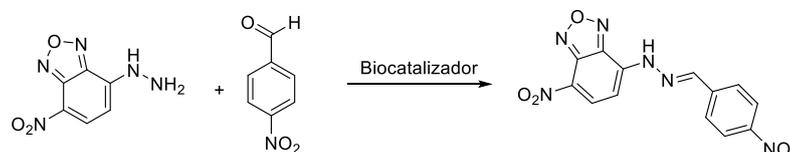
⁵³ X. Garrabou, T. Beck, D. Hilvert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 5609-5612.

⁵⁴ X. Garrabou, D. S. Macdonald, B. I. M. Wicky, D. Hilvert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 5288-5291.



Esquema 17. Reacciones catalizadas por retro-aldolasas artificiales.

Por último, una novedosa estrategia en el diseño de enzimas artificiales con actividades promiscuas consiste en la introducción de un aminoácido no natural que actúe como resto catalítico en el centro activo. En un estudio pionero, Roelfes y colaboradores han logrado un incremento de la actividad catalítica en la formación de hidrazonas y oximas al incluir una cadena lateral con un grupo funcional anilina, concretamente un aminoácido *p*-aminofenilalanina, en el regulador transcripcional de *Lactococcus lactis*, una proteína que posee un gran hueco hidrofóbico que permite una amplia aceptación de sustratos (Esquema 18).⁵⁵



Esquema 18. Reacción promiscua catalizada por una enzima con un aminoácido no natural con una cadena lateral de anilina.

I.1.1. Actividad catalítica promiscua de hidrolasas

Las hidrolasas son el grupo de enzimas que tradicionalmente han mostrado una mayor aplicabilidad en síntesis orgánica por su versatilidad catalítica, dentro

⁵⁵ I. Drienovská, C. Mayer, C. Dulson, G. Roelfes, *Nat. Chem.* **2018**, *10*, 946-952.

de la cual también es destacable su capacidad para llevar a cabo reacciones promiscuas, especialmente las familias de las lipasas y las acilasas. Estas enzimas actúan como eficientes catalizadores en distintas reacciones que involucran la formación de enlaces carbono-carbono o carbono-heteroátomo, así como en distintos procesos oxidativos como se mostrará en el *Capítulo 1*.⁵⁶

El primer ejemplo de la actividad catalítica de las hidrolasas en la formación de enlaces C-C fue descubierto por Berglund y colaboradores cuando observaron que la CAL-B catalizaba en su centro activo la adición aldólica de aldehídos y cetonas en medios anhidros como, por ejemplo, en la reacción entre dos moléculas de hexanal (Esquema 19).⁵⁷ A través de cálculos computacionales, se ha propuesto un mecanismo en el que la histidina de la triada catalítica de la lipasa actúa como base para formar el enolato, que es estabilizado en el hueco del oxianión del enzima. Sin embargo, la serina del centro activo tiene un efecto perjudicial en la reacción, ya que puede promover otros procesos secundarios por su carácter nucleófilo, y se han preparado diferentes mutantes sustituyendo este aminoácido con los que se ha logrado un incremento de la actividad aldólica respecto a la enzima nativa.



Esquema 19. Adición aldólica de hexanal catalizada por CAL-B.

Desde entonces, diferentes lipasas y proteasas han sido empleadas en reacciones aldólicas, especialmente entre cetonas cíclicas y aldehídos, y, en algunos casos, se han encontrado inducciones asimétricas por parte de la enzima obteniendo los productos ópticamente enriquecidos con selectividades moderadas.⁵⁸ Por ejemplo, con la lipasa de páncreas porcino (PPL) se han obtenido los aductos de la adición aldólica entre derivados de benzaldehído con sustituyentes fuertemente electroattractores y acetona con excesos

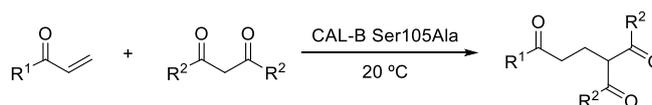
⁵⁶ E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504-4523.

⁵⁷ C. Branneby, P. Carlqvist, A. Magnusson, K. Hult, T. Brinck, P. Berglund, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 874-875.

⁵⁸ Z. Guan, L.-Y. Li, Y.-H. He, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 16801-16814.

enantioméricos de hasta el 44%, donde la enantioselectividad del proceso se encuentra muy influenciada por el contenido de agua del medio de reacción.⁵⁹

La adición conjugada de nucleófilos carbonados a sistemas insaturados es otro proceso que ha sido catalizado eficientemente por hidrolasas y, de nuevo, la supresión del aminoácido de serina del centro catalítico de la CAL-B provoca una mayor actividad en la reacción promiscua (Esquema 20).⁶⁰ Además, como esta mutación elimina la actividad natural hidrolítica de la lipasa, ha sido empleada con éxito en medios acuosos catalizando la reacción entre acrilato de metilo y acetilacetona.⁶¹



Esquema 20. Adición de Michael de compuestos 1,3-dicarbonílicos a carbonilos α,β -insaturados catalizada por CAL-B.

Otras reacciones de formación de enlaces C-C catalizadas por hidrolasas son la reacción de Henry o nitroaldólica (Esquema 21a),⁶² la condensación de Knoevenagel (Esquema 21b)⁶³ o la reacción tricomponente de Mannich (Esquema 21c).⁶⁴ Además, en determinadas condiciones de reacción, la CAL-B ha mostrado actividad descarboxilativa sobre los productos de adiciones aldólicas o condensaciones de Knoevenagel utilizando β -cetoésteres como sustratos (Esquema 22). En este caso, la función de la lipasa es triple, ya que cataliza, en primer lugar, la formación del enlace C-C de manera promiscua para, a continuación, hidrolizar el éster a través de su mecanismo natural y, finalmente, liberar CO_2 a través de la transferencia electrónica desde la histidina catalítica al ácido carboxílico generado.⁶⁵

⁵⁹ C. Li, X.-W. Feng, N. Wang, Y.-J. Zhou, X.-Q. Yu, *Green Chem.* **2008**, *10*, 616-618.

⁶⁰ M. Svedendahl, K. Hult, P. Berglund, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17988-17989.

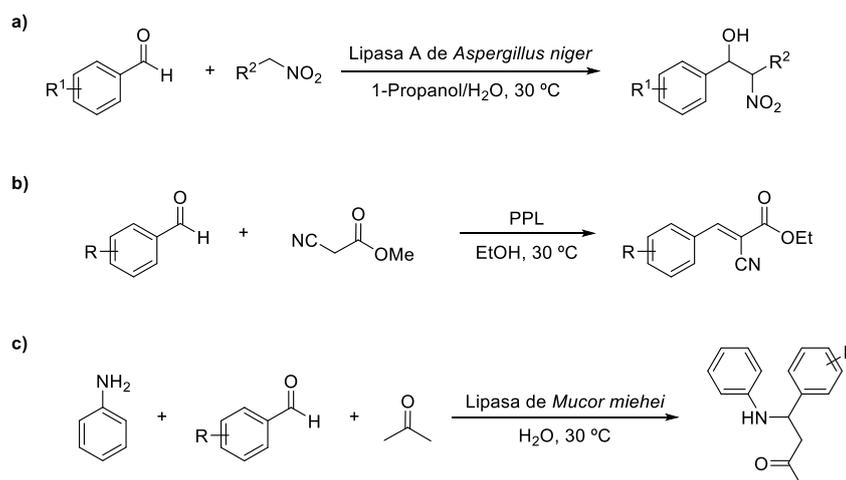
⁶¹ M. Svedendahl, B. Jovanovic, L. Fransson, P. Berglund, *ChemCatChem*, **2009**, *1*, 252-258.

⁶² Z.-G. Le, L.-T. Guo, G.-F. Jiang, X.-B. Yiang, H.-Q. Liu, *Green Chem. Lett. Rev.* **2013**, *6*, 277-281.

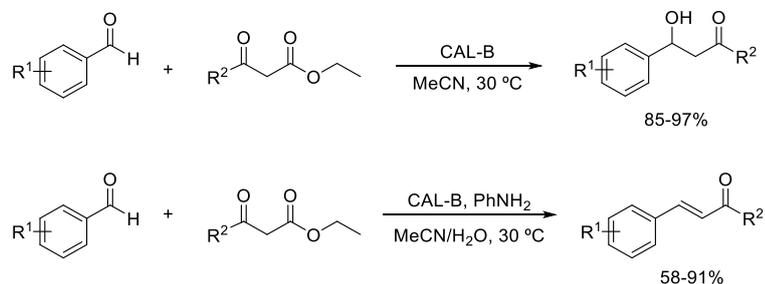
⁶³ Y.-F. Lai, H. Zheng, S.-J. Chai, P.-F. Zhang, X.-Z. Chen, *Green Chem.* **2010**, *12*, 1917-1918.

⁶⁴ K. Li, T. He, C. Li, X.-W. Feng, N. Wang, X.-Q. Yu, *Green Chem.* **2009**, *11*, 777-779.

⁶⁵ X.-W. Feng, C. Li, N. Wang, K. Li, W.-W. Zhang, Z. Wang, X.-Q. Yu, *Green Chem.* **2009**, *11*, 1933-1936.



Esquema 21. Actividades promiscuas mostradas por lipasas en: a) reacción de Henry; b) condensación de Knoevenagel y transesterificación; c) reacción de Mannich.



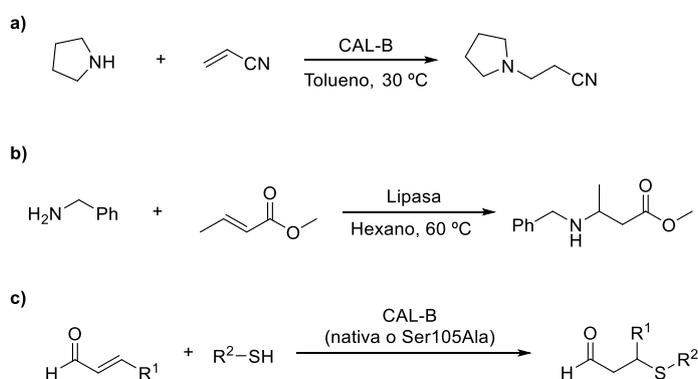
Esquema 22. Reacciones aldólica y de Knoevenagel descarboxilativas catalizadas por la CAL-B.

La principal aplicación de las hidrolasas en reacciones de formación de enlaces carbono-heteroátomo se ha encontrado en la adición de Michael de nucleófilos nitrogenados o sulfurados a sistemas α,β -insaturados, en la que una gran variedad de lipasas, proteasas y acilasas han mostrado actividad.⁶⁶ Por ejemplo, la CAL-B cataliza la adición aza-Michael de distintas aminas secundarias a acrilonitrilo en medios orgánicos (Esquema 23a),⁶⁷ mientras que las lipasas de *Pseudomonas stutzeri* y de *Chromobacterium viscosum* se han aplicado en la adición de aminas primarias, aminoalcoholes o diaminas a ésteres derivados de acrilato para obtener, selectivamente, el aducto de adición 1,4

⁶⁶ M. López-Iglesias, V. Gotor-Fernández, *Chem. Rec.* **2015**, *15*, 743-759.

⁶⁷ O. Torre, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Commun.* **2004**, 1724-1725.

frente al producto de aminólisis (Esquema 23b).⁶⁸ Por otro lado, la adición de tioles a aldehídos α,β -insaturados catalizada por la CAL-B se ha estudiado experimental y computacionalmente, observando que la histidina del centro activo es el aminoácido clave para la actividad promiscua aunque, en este caso, la serina catalítica no parece tener un efecto negativo en la catálisis (Esquema 23c).⁶⁹



Esquema 23. Reacciones aza-Michael (a y b) y tio-Michael (c) catalizadas por hidrolasas.

Por último, también se ha descrito la formación de enlaces C-N y C-S a través de la adición nucleófila a ésteres vinílicos catalizada por ciertas hidrolasas. Por ejemplo, algunas acilasas son capaces de promover la adición de heterociclos nitrogenados a ésteres vinílicos con selectividad Markovnikov (Esquema 24a),⁷⁰ mientras que en la reacción análoga con tioles se encuentra favorecido el proceso de acilación, obteniendo los tioésteres como productos mayoritarios.⁷¹ Para este último caso, la CAL-B muestra actividad promiscua en la formación de enlaces C-S, donde la selectividad del proceso se puede controlar a través de una adecuada selección del disolvente permitiendo acceder a los dos

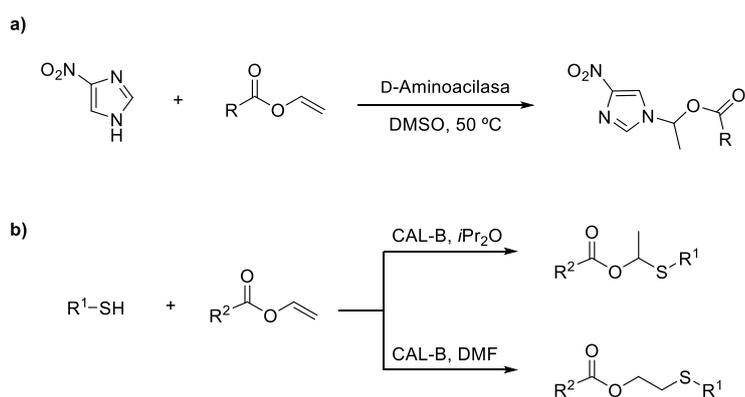
⁶⁸ P. Steunenberg, M. Sijm, H. Zuilhof, J. P. M. Sanders, E. L. Scott, M. C. R. Franssen, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 3802-3813.

⁶⁹ P. Carlqvist, M. Svedendahl, C. Branney, K. Hult, T. Brinck, P. Berglund, *ChemBioChem*, **2005**, *6*, 331-336.

⁷⁰ W.-B. Wu, J.-M. Xu, Q. Wu, D.-S. Lv, X.-F. Lin, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 487-492.

⁷¹ F.-W. Lou, B.-K. Liu, J.-L. Wang, Q. Pan, X.-F. Lin, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *60*, 64-68.

posibles regioisómeros de la adición con selectividades superiores al 90% (Esquema 24b).⁷²



⁷² F.-W. Lou, B.-K. Liu, Q. Wu, D.-S. Lv, X.-F. Lin, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, 350, 1959-1962.

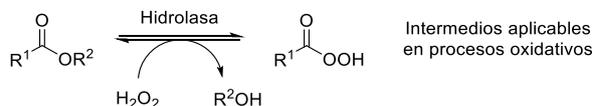
CAPÍTULO 1

REACCIONES DE PERHIDRÓLISIS
CATALIZADAS POR LIPASAS PARA LA
OXIDACIÓN DE CETONAS CÍCLICAS

ANTECEDENTES

Como se ha mostrado en la introducción general de esta Tesis Doctoral, las hidrolasas son capaces de catalizar la adición de distintos nucleófilos a derivados de ácido carboxílico y han sido ampliamente empleadas en procesos selectivos convencionales de hidrólisis, transesterificación, aminólisis o amonólisis, entre otros. A su vez, en la introducción del *Bloque I* se ha puesto de manifiesto el potencial de esta clase de enzimas para catalizar reacciones promiscuas de formación de enlaces C-C, C-N o C-S.

En este punto cabe destacar que, adicionalmente, se ha demostrado la versatilidad catalítica de diversas hidrolasas para promover procesos oxidativos no convencionales basados en la formación de ácidos peroxicarboxílicos *in situ*, aprovechando la actividad perhidrolítica de estas enzimas al ser capaces de aceptar peróxido de hidrógeno como nucleófilo, y que pueden actuar como reactivos oxidativos en distintas aplicaciones (Esquema 25).⁷³



Esquema 25. Reacción de perhidrólisis catalizada por hidrolasas.

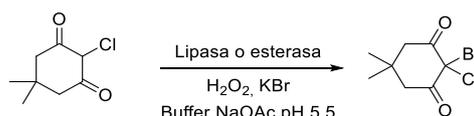
De esta forma, la generación enzimática de perácidos en el medio de reacción y en cantidades catalíticas presenta una serie de ventajas respecto a los métodos oxidativos convencionales, ya que permite llevar a cabo oxidaciones en condiciones muy suaves de reacción, sin requerir reactivos tóxicos, y evita los riesgos asociados al manejo y almacenaje de estos compuestos que poseen elevados índices de peligrosidad.

1.1. Actividad perhidrolítica de las hidrolasas

El descubrimiento de este tipo de actividad catalítica se produjo a raíz del estudio estructural de las haloperoxidasas, enzimas que catalizan reacciones de halogenación a través de un mecanismo oxidativo que emplea H_2O_2 como sustrato natural y de las que existen distintos tipos en función del cofactor redox del que dependen. Este cofactor puede ser de naturaleza metálica (grupo hemo,

⁷³ a) F. Björkling, S. E. Godtfredsen, O. Kirk, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1301-1303; b) F. Björkling, H. Frykman, S. E. Godtfredsen, O. Kirk *Tetrahedron*, **1992**, 48, 4587-4592; c) O. Kirk, M. W. Christensen, T. Dambus, S. E. Godtfredsen, *Biocatalysis*, **1994**, 11, 65-71.

complejos de vanadio o de hierro) u orgánica (flavina).⁷⁴ Inicialmente, se especuló con la existencia de una clase de haloperoxidasas no dependientes de cofactor,⁷⁵ sin embargo, el análisis de su estructura de rayos X mostró la presencia de una triada catalítica (Ser-His-Asp) análoga a la que poseen distintos tipos de hidrolasas y una alta homología con las esterasas,⁷⁶ además de mostrar actividad únicamente en presencia de derivados de ácido carboxílico.⁷⁷ Por ello, se concluyó que la reactividad observada correspondería a un tipo de catálisis exhibida por hidrolasas convencionales, cuya función sería exclusivamente la generación del perácido y que actuaría, posteriormente, como especie oxidante sobre el haluro correspondiente (Esquema 26).⁷⁸



Esquema 26. Reacción de bromación mediada por hidrolasas a través de la formación de ácido peracético que oxida a los aniones bromuro.

Modificando genéticamente el entorno del centro activo de estas enzimas para lograr una mayor afinidad por el peróxido de hidrógeno como nucleófilo, es posible favorecer las reacciones de perhidrólisis sobre los procesos hidrolíticos naturales. Por ejemplo, el simple intercambio de un aminoácido (prolina por leucina) en la esterasa de *Pseudomonas fluorescens* permite la formación de un nuevo enlace por puente de hidrógeno entre el enzima y el peróxido de hidrógeno en el intermedio acil-enzima (Esquema 27), generando una estabilidad adicional que se traduce en un incremento de dos órdenes de magnitud en la constante específica del enzima hacia la formación de ácido peracético y una importante disminución en su actividad hidrolítica.⁷⁹

⁷⁴ A. Timmins, S. P. de Visser, *Catalysts*, **2018**, *8*, 314-339.

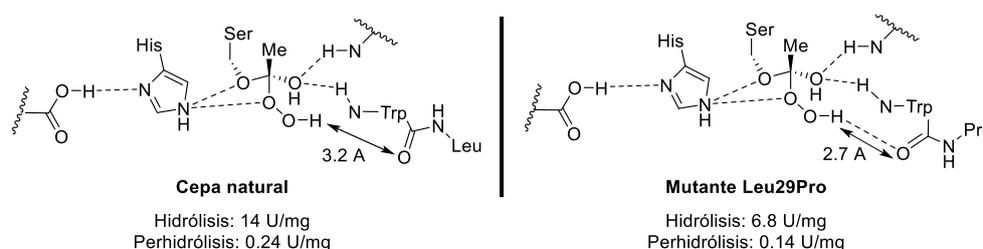
⁷⁵ B. Hofmann, S. Toelzer, I. Pelletier, J. Altenbuchner, K. H. van Pée, H. J. Hecht, *J. Mol. Biol.* **1998**, *279*, 889-900.

⁷⁶ I. Pelletier, J. Altenbuchner, *Microbiology*, **1995**, *141*, 459-468.

⁷⁷ M. Picard, J. Gross, E. Lübbert, S. Tölzer, S. Krauss, K.-H. van Pée, A. Berkessel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1196-1199.

⁷⁸ O. Kirk, L. S. Conrad, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 977-979.

⁷⁹ a) P. Bernhardt, K. Hult, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2742-2746; b) D. L. Yin, P. Bernhardt, K. L. Morley, Y. Jiang, J. D. Cheeseman, V. Purpero, J. D. Schrag, R. J. Kazlauskas, *Biochemistry*, **2010**, *49*, 1931-1942.



Esquema 27. Diferencia estructural entre la esterasa de *Pseudomonas fluorescens* natural y la variante Leu24Pro.

La utilidad de la generación *in situ* de los perácidos no está restringida exclusivamente a transformaciones sintéticas oxidativas, ya que también poseen un gran potencial como desinfectantes o esterilizantes de superficies, instrumental o equipos en el ámbito médico o en la industria alimentaria, así como en diversos procesos textiles o de lavandería industrial. Los perácidos, y concretamente el ácido peracético, han demostrado ser mucho más eficientes que el peróxido de hidrógeno en este tipo de aplicaciones y su descomposición en productos no tóxicos les hacen especialmente atractivos desde el punto de vista sostenible.⁸⁰

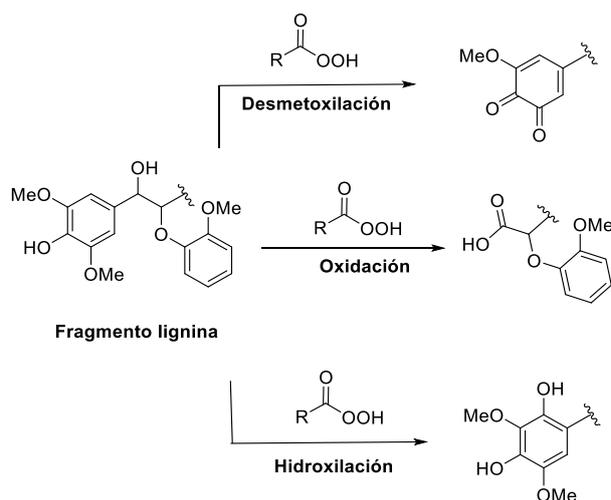
Por otro lado, y en el contexto del aprovechamiento de la biomasa, uno de los grandes desafíos en la obtención tanto de productos químicos como de energía utilizando materias primas renovables,⁸¹ el empleo de ácido peracético generado *in situ* por mediación enzimática ha demostrado ser un tratamiento eficaz para la degradación de la lignina (Esquema 28).⁸² Además de reducir la complejidad molecular, el tratamiento con perácidos permite esterilizar el material e incrementar el rendimiento de procesos enzimáticos hidrolíticos subsiguientes que permiten acceder a productos de interés industrial de una manera sostenible.⁸³

⁸⁰ C. Z. Dinu, G. Zhu, S. S. Bale, G. Anand, P. J. Reeder, K. Sanford, G. Whited, R. S. Kane, J. S. Dordick, *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 392-398.

⁸¹ P. Domínguez de María, *ChemSusChem*, **2011**, *4*, 327-329.

⁸² S. Duncan, Q. Jing, A. Katona, R. J. Kazlauskas, J. Schilling, U. Tschirner, W. W. Aldajani, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *160*, 1637-1652.

⁸³ a) L. C. Teixeira, J. C. Liden, H. A. Schroeder, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2000**, *84*, 111-127; b) H. R. Lee, R. J. Kazlauskas, T. H. Park, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 12216-12226.



Esquema 28. Posibles rutas de degradación de la lignina por tratamiento con perácidos.

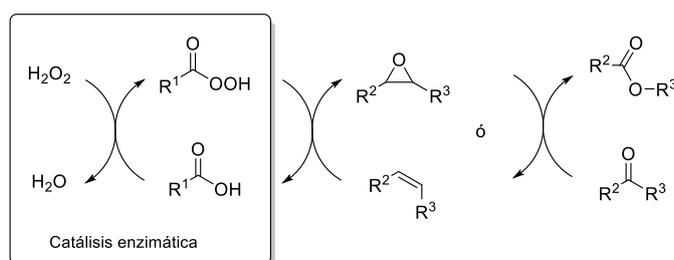
1.1.1. Aplicaciones en síntesis orgánica

Las reacciones de perhidrólisis catalizadas por hidrolasas han sido empleadas en distintas transformaciones químicas entre las que destacan la epoxidación de alquenos o reacción de Prilezhaev,⁸⁴ y la oxidación de cetonas en ésteres también conocida como reacción de Baeyer-Villiger,⁸⁵ donde la función de la enzima es únicamente la de generar en el medio de reacción el oxidante intermedio que posteriormente reacciona con la correspondiente olefina o cetona. Por ello, se suele referir a ellas como reacciones mediadas por hidrolasas, en lugar de catalizadas, al no intervenir el centro activo enzimático en la transformación del grupo funcional y no producirse ninguna inducción asimétrica por parte del biocatalizador (Esquema 29).⁸⁶

⁸⁴ Z. Wang, *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken (Estados Unidos), **2010**, pp. 2270-2274.

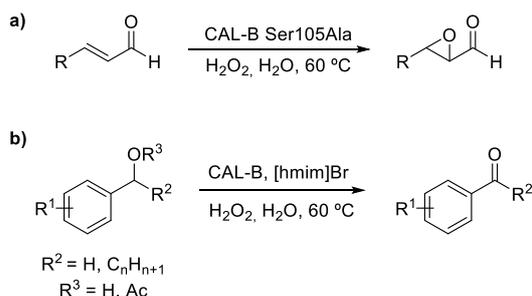
⁸⁵ G.-J. ten Brink, I. W. C. E. Arends, R. A. Sheldon, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 4105-4124.

⁸⁶ C. Carboni-Oerlemans, P. Domínguez de María, B. Tuin, G. Bargeman, A. van der Meer, R. van Gemert, *J. Biotechnol.* **2006**, *126*, 140-151.



Esquema 29. Esquema general del sistema quimioenzimático en la epoxidación de alquenos o en la oxidación de cetonas.

No obstante, estudios experimentales y computacionales han mostrado que una variante de la CAL-B con el aminoácido de serina de la triada catalítica sustituido (Ser105Ala) es capaz de catalizar directamente la epoxidación de aldehídos α,β -insaturados con peróxido de hidrógeno, a través de la activación de este último por la histidina del centro activo (Esquema 30a).⁸⁷ También en la oxidación de alcoholes o acetatos arílicos primarios o secundarios para formar aldehídos o cetonas, respectivamente, la CAL-B nativa ha mostrado actividad promiscua oxidativa activando el peróxido de hidrógeno en una combinación sinérgica con un líquido iónico (Esquema 30b).⁸⁸



Esquema 30. Reacciones de oxidación catalizadas por una lipasa.

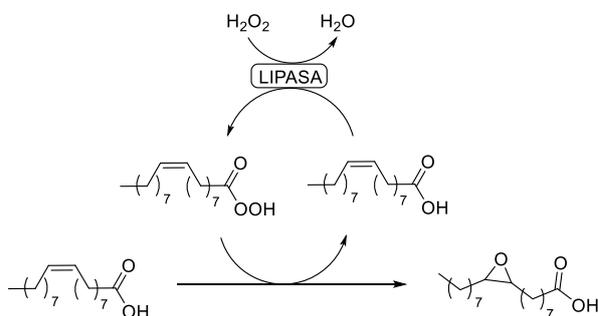
Se han descrito muy variados sistemas oxidativos partiendo de ácidos carboxílicos, ésteres o carbonatos alifáticos de distinta longitud de cadena como precursores del perácido y empleando lipasas como catalizadores, donde destaca

⁸⁷ M. Svedandahl, P. Carlqvist, C. Branneby, O. Allner, A. Frise, K. Hult, P. Berglund, T. Brinck, *ChemBioChem*, **2008**, *9*, 2443-2451.

⁸⁸ U. K. Sharma, N. Sharma, R. Kumar, R. Kumar, A. K. Sinha, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4846-4848.

la CAL-B como la hidrolasa más versátil y comúnmente empleada.⁸⁹ Para conseguir una menor competencia entre el agua y el peróxido de hidrógeno, favoreciendo la actuación de este último como nucleófilo, estos procesos se han realizado en medios bifásicos de disoluciones acuosas de agua oxigenada y disolventes orgánicos, empleando otros disolventes no convencionales como líquidos iónicos,⁹⁰ o utilizando complejos anhidros de peróxido de hidrógeno.⁹¹

Entre las reacciones quimioenzimáticas de epoxidación destaca la transformación de ácidos grasos insaturados,⁹² que actúan como sustratos para la lipasa en la reacción de perhidrólisis y, al mismo tiempo, son auto-epoxidados por el perácido graso formado *in situ* e, incluso, pueden ser empleados como disolvente del proceso (Esquema 31).⁹³ Esta estrategia también ha sido implementada con éxito en la epoxidación de aceites vegetales o de ésteres derivados de ácidos grasos.⁹⁴



Esquema 31. Auto-epoxidación del ácido oleico catalizada por una lipasa.

De forma interesante, en el proceso de epoxidación de éteres de trimetilsililo insaturados con CAL-B y agua oxigenada, la selección del donador de acilo adecuado permite modular la reactividad hacia diferentes productos. Además

⁸⁹ a) M. R. gen. Klass, S. Warwel, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1997**, *117*, 311-319; b) M. R. gen. Klass, S. Warwel, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1025-1026.

⁹⁰ A. J. Kotlewska, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, I. W. C. E. Arends, *Green Chem.* **2011**, *13*, 2154-2160.

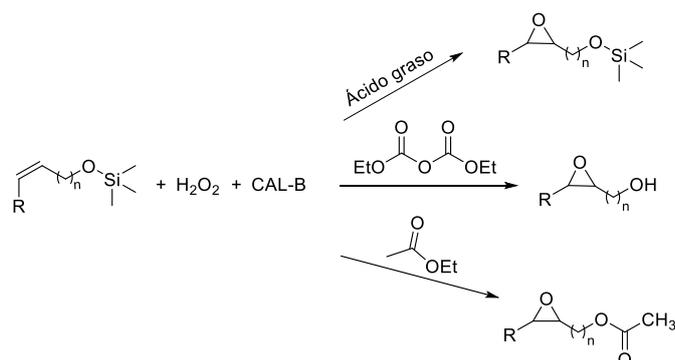
⁹¹ E. G. Ankudey, H. F. Olivo, T. L. Peeples, *Green Chem.* **2006**, *8*, 923-926.

⁹² E. Milchert, K. Malarczyk, M. Klos, *Molecules*, **2015**, *20*, 21481-21493.

⁹³ a) C. Aouf, E. Durand, J. Lecomte, M. C. Figueroa-Espinoza, E. Dubreucq, H. Fulcrand, P. Villeneuve, *Green Chem.* **2014**, *16*, 1740-1754.

⁹⁴ a) I. Hilker, D. Bothe, J. Prüss, H.-J. Warnecke, *Chem. Eng. Sci.* **2001**, *56*, 427-432; b) S. Kern, A. Himmelsbach, K. Grammann, O. Thum, A. Liese, *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20*, 1930-1936.

de la oxidación del doble enlace, se puede producir la hidrólisis del silano y, adicionalmente, la esterificación del hidroxilo generado (Esquema 32).⁹⁵



Esquema 32. Diferentes productos obtenidos en la oxidación de éteres de trimetilsililo insaturados en función del donador de acilo empleado.

Buscando una variante asimétrica, se han utilizados diferentes ácidos carboxílicos ópticamente activos, como, por ejemplo, derivados de prolina, para conseguir una inducción quiral por parte del perácido en la oxidación del doble enlace, que se han aplicado en la oxidación de derivados de estireno mediada por la CAL-B o la lipasa de *Pseudomonas* sp. G6, obteniendo los correspondientes epóxidos con selectividades moderadas (40-80% *ee*).⁹⁶

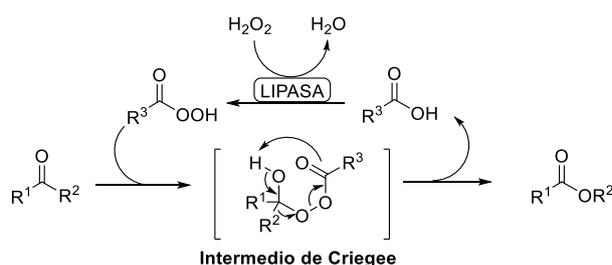
En el caso de la oxidación de Baeyer-Villiger, el mecanismo del proceso quimioenzimático transcurre de forma análoga al de la epoxidación, donde el perácido formado por catálisis enzimática reacciona con el carbonilo a través de un ataque nucleófilo para generar el intermedio de Criegee que, en segundo lugar, experimenta un reordenamiento concertado en el que se produce la migración del resto que soporta una mayor densidad electrónica y es la etapa determinante de la regioselectividad del proceso (Esquema 33).⁹⁷ Estas reacciones se han empleado principalmente para la obtención de lactonas a partir de cetonas cíclicas alifáticas como, por ejemplo, en la oxidación mediada por CAL-B de ciclohexanonas sustituidas en las posiciones 2 y 4 para formar ϵ -

⁹⁵ M. R. gen. Klaas, M. Kunz, S. J. Warwel, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, 7, 283-289.

⁹⁶ a) K. Sarma, N. Bhati, N. Borthakur, A. Goswami, *Tetrahedron*, **2007**, 63, 8735-8741; b) K. Sarma, A. Goswami, B. C. Goswami, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, 20, 1295-1300.

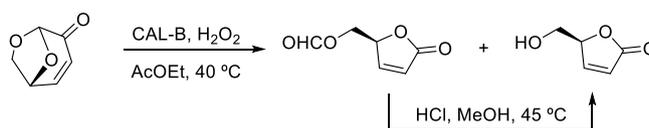
⁹⁷ M. Renz, B. Meunier, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 737-750.

caprolactonas, donde fue necesario emplear un medio anhidro para evitar la reacción subsiguiente de hidrólisis del éster formado.⁹⁸



Esquema 33. Esquema general de la reacción de Baeyer-Villiger mediada por lipasas.

Una interesante aplicación de la reacción Baeyer-Villiger quimioenzimática es en la oxidación de la levoglucosenona, que se genera en la pirólisis de la celulosa, para obtener un importante precursor de diversos fármacos como es la (*S*)- γ -hidroximetil- α,β -butenolida con elevada eficiencia tras un segundo paso de hidrólisis ácida y manteniendo la pureza óptica del sustrato (Esquema 34).⁹⁹



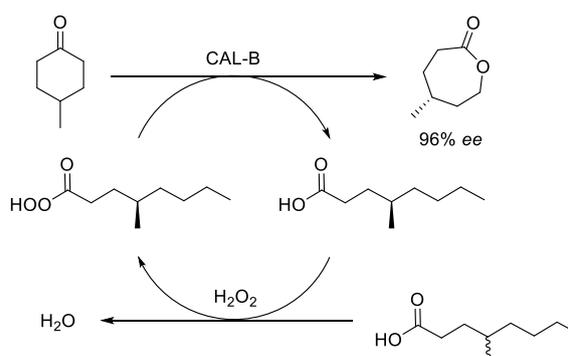
Esquema 34. Oxidación quimioenzimática de levoglucosenona.

Recientemente, se ha descrito por primera vez la versión asimétrica de la reacción de Baeyer-Villiger mediada por la CAL-B de un compuesto proquiral, como es la 4-metilciclohexanona. Esta transformación transcurre a través de la resolución cinética de ácidos carboxílicos racémicos utilizados como precursores del reactivo oxidante. Así, la enzima únicamente genera el perácido con configuración *R* que, al llevar a cabo la oxidación de la cetona, forma la (*R*)-4-metilcaprolactona con un excelente exceso enantiomérico (Esquema 35).¹⁰⁰

⁹⁸ M. Y. Rios, E. Salazar, H. F. Olivo, *Green Chem.* **2007**, *9*, 459-462.

⁹⁹ A. L. Flourat, A. A. M. Peru, A. R. S. Teixeira, F. Brunissen, F. Allais, *Green Chem.* **2015**, *17*, 404-412.

¹⁰⁰ A. Drozd, A. Chrobok, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 1230-1233.



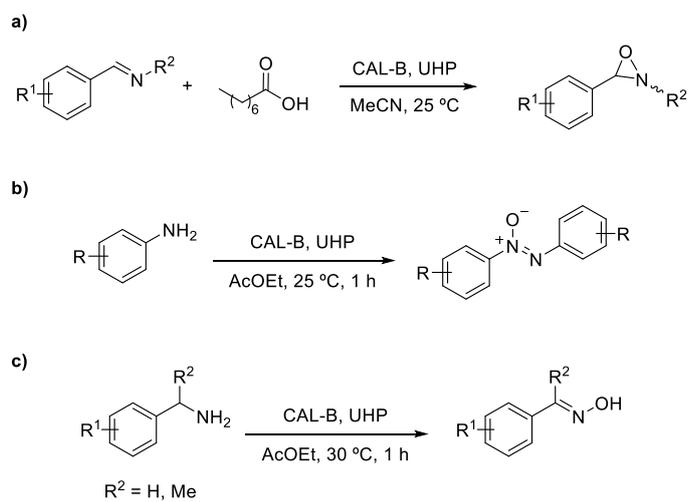
Esquema 35. Oxidación quimioenzimática asimétrica de 4-metilciclohexanona a través de la resolución cinética del ácido carboxílico precursor del perácido.

También se han aplicado con éxito este tipo de metodologías quimioenzimáticas en distintas reacciones de oxidación de compuestos nitrogenados mediadas por la CAL-B. Así, la oxidación de *N*-alquiliminas preformadas derivadas de la bencilamina permite acceder a las correspondientes *N*-alquinoxaziridinas, generalmente como una mezcla de diastereoisómeros *E* y *Z* con una proporción variable en función del sustrato empleado (Esquema 36a).¹⁰¹ Por otro lado, los derivados de anilina son oxidados por el ácido peracético a azoxibencenos con elevada quimioselectividad (Esquema 36b)¹⁰² y, recientemente, nuestro grupo de investigación ha descrito la formación de (*E*)-oximas a partir de bencilaminas o α -metilbencilaminas con excelentes rendimientos (Esquema 36c).¹⁰³

¹⁰¹ T. B. Bitencourt, M. da Graça Nascimento, *Green Chem.* **2009**, *11*, 209-214.

¹⁰² F. Yang, Z. Wang, X. Zhang, L. Jiang, Y. Li, L. Wang, *ChemCatChem*, **2015**, *7*, 3450-3453.

¹⁰³ D. Méndez-Sánchez, I. Lavandera, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 3196-3201.



Esquema 36. Oxidaciones de compuestos nitrogenados mediadas por la CAL-B para la formación de: a) oxaziridinas, b) azobencenos y c) (*E*)-oximas.

OBJETIVOS

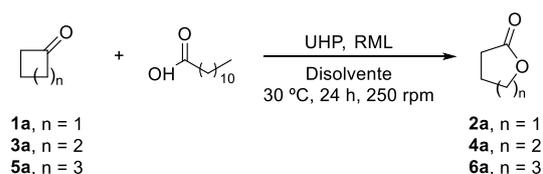
Aprovechando la capacidad de las lipasas para catalizar reacciones de perhidrólisis formando de esta manera perácidos en el medio de reacción, y la posibilidad de utilizar estos en procesos oxidativos, nos planteamos los siguientes objetivos:

- Identificar una cetona cíclica alifática como sustrato modelo y optimizar una metodología sintética para su oxidación de Baeyer-Villiger en condiciones suaves de reacción.
- Sintetizar mediante procedimientos químicos sencillos una familia representativa de cetonas cíclicas y sus correspondientes lactonas, desarrollando métodos analíticos adecuados para el posterior seguimiento de las reacciones quimioenzimáticas de oxidación.
- Extender la metodología de la reacción de Baeyer-Villiger quimioenzimática a diversas ciclobutanonas, ciclopentanonas y ciclohexanonas, con el fin de obtener una serie de lactonas con buenos rendimientos y alta pureza en condiciones sostenibles.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Basándonos en condiciones previamente optimizadas en nuestro grupo de investigación para la epoxidación quimioenzimática de alquenos utilizando la lipasa de *Rhizomucor miehei* (RML),¹⁰⁴ se seleccionó el ácido láurico (ácido dodecanoico) como precursor del perácido correspondiente, el complejo de urea y agua oxigenada (UHP) como agente oxidante y acetonitrilo (MeCN) como disolvente para un estudio inicial de la reacción de Baeyer-Villiger de distintas cetonas cíclicas como son la ciclobutanona (**1a**), ciclopentanona (**3a**) y la ciclohexanona (**5a**). Los resultados obtenidos se han recogido en la Tabla 3.

Tabla 3. Oxidación de Baeyer-Villiger de cetonas cíclicas mediada por la RML empleando ácido láurico (2 eq) y el complejo UHP (1.1 eq).



Entrada	Cetona	Disolvente	c (%) ^a
1	1a	MeCN	n.m. ^b
2	3a	MeCN	27
3	5a	MeCN	34
4	1a	Et ₂ O	94
5	1a	CH ₂ Cl ₂	81
6	1a	TBME	98

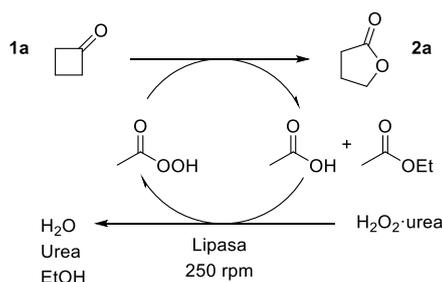
Condiciones de reacción: cetona cíclica (0.5 mmol), ácido láurico (1.0 mmol, 200 mg), UHP (0.55 mmol, 52 mg) y RML (25 mg) en disolvente orgánico (0.76 mL) durante 24 h a 30 °C y 250 rpm.
^a Conversiones medidas mediante cromatografía de gases del crudo de reacción; ^b n.m.: no medido; la volatilidad de la ciclobutanona (**1a**) no permitió su detección por CG al aparecer solapada su señal con la del disolvente.

El crudo de las reacciones tras 24 horas se analizó por cromatografía de gases, siendo inconcluso el resultado con la ciclobutanona (**1a**) al coincidir su tiempo de retención con el del disolvente de la reacción (entrada 1). En el caso de la oxidación de la ciclopentanona (**3a**, entrada 2) y la ciclohexanona (**5a**, entrada 3) se alcanzaron conversiones moderadas (27 y 34%). En este punto, se estudió el uso de otros disolventes orgánicos más volátiles, como dietil éter,

¹⁰⁴ D. Méndez-Sánchez, N. Ríos-Lombardía, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Tetrahedron*, **2014**, *70*, 1144-1148.

diclorometano y *tert*-butilmetil éter (TBME), para la oxidación de la ciclobutanona (**1a**) obteniendo satisfactoriamente conversiones elevadas (81-98%, entradas 4-6).

Una importante desventaja de este método es el dificultoso aislamiento de los productos finales, ya que tras un proceso de extracción líquido-líquido y cromatografía de columna no es posible separar completamente el ácido láurico de la lactona deseada. Por ello, se decidió emplear un sistema libre de ácido, utilizando el acetato de etilo (AcOEt) como disolvente y precursor del ácido peracético. Así, tomando la ciclobutanona (**1a**) como sustrato modelo, se planteó el desarrollo de la metodología mostrada en el Esquema 37.



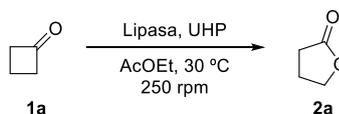
Esquema 37. Oxidación de ciclobutanona (**1a**) mediante formación de ácido peracético a partir de acetato de etilo mediada por una lipasa.

1.2. Oxidación de Baeyer-Villiger de la ciclobutanona

En primer lugar, se llevó a cabo un muestreo de biocatalizadores midiendo las conversiones alcanzadas en la oxidación de la ciclobutanona (**1a**) a una concentración de 660 mM tras 24 h de reacción (Tabla 4). Mientras que en la prueba en ausencia de enzima solo se detectaron trazas de la lactona **2a** (entrada 1), todas las lipasas empleadas condujeron a conversiones superiores al 30%. La CAL-B (entrada 3) mostró ser el catalizador más eficiente, alcanzando una conversión del 77%, mientras que la RML, la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (AK), la lipasa de *Burkholderia cepacia*¹⁰⁵ soportada en diatomita (PSL-SD) y la lipasa de *Candida rugosa* (CRL), no superaron el 46% (entradas 4-6).

¹⁰⁵ Antiguamente conocida como lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

Tabla 4. Síntesis de γ -butirolactona (**2a**) mediada por distintas lipasas empleando el complejo UHP como oxidante (1.1 eq) y AcOEt como precursor del perácido y disolvente.

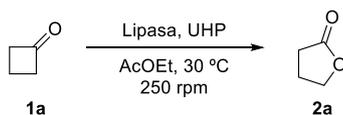


Entrada	Lipasa	<i>c</i> (%) ^a
1	----	3
2	CAL-B	77
3	RML	32
4	AK	34
5	PSL-SD	46
6	CRL	42

Condiciones de reacción: **1a** (0.25 mmol, 19 μ L), UHP (0.25 mmol, 26 mg) y RML (50 mg/mmol de **1a**, 12.5 mg) en AcOEt (0.38 mL) durante 24 h a 30 $^\circ$ C y 250 rpm. ^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción.

A continuación, se estudió la influencia de diversos parámetros de reacción, como el tipo y la cantidad de agente oxidante, así como la concentración de la ciclobutanona (**1a**). Las pruebas llevadas a cabo con una disolución acuosa de H₂O₂ (30% v/v) como fuente de peróxido de hidrógeno, en lugar del complejo UHP, condujeron a la formación de subproductos, una baja reproducibilidad de los resultados y mayor conversión en la reacción de control en ausencia de enzima (la reacción sin catalizador alcanza conversiones del 25-30% en 24 h frente al 3% utilizando UHP). Por lo tanto, se decidió seguir empleando UHP como fuente de peróxido de hidrógeno y se investigó el efecto del aumento de los equivalentes, desde 1.0 hasta 2.0, así como de la concentración de sustrato entre 0.5 M y 1.0 M (Tabla 5).

Tabla 5. Optimización de la oxidación de Baeyer-Villiger de la ciclobutanona (**1a**).



Entrada	Tiempo (h)	UHP (eq)	[1a] (mM)	c (%) ^a
1	24	1.0	660	77
2	24	2.0	660	>99
3	20	2.0	660	97
4	20	1.5	660	>99
5	20	1.0	500	60
6	20	1.0	660	71
7	20	1.0	800	74
8	20	1.0	1000	75
9	20	1.2	1000	79
10	20	1.5	1000	83
11	20	2.0	1000	96

^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción.

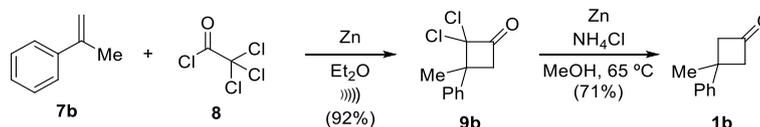
Al duplicar los equivalentes de UHP se observó un aumento de la conversión desde un 77% a una conversión completa del sustrato tras 24 h (entradas 1 y 2). Este tiempo fue estrictamente necesario para la desaparición total del producto de partida, ya que tras 20 horas la conversión alcanzó un 97% (entrada 3). Sin embargo, el empleo de una cantidad intermedia del oxidante (1.5 equivalentes) permitió alcanzar una conversión completa a las 20 h (entrada 4), lo que indica una posible inactivación del enzima en presencia de un exceso demasiado elevado de peróxido de hidrógeno. Desafortunadamente, con cantidades equimolares de UHP y cetona **1a**, tanto a concentraciones de sustrato más bajas como superiores, la formación de lactona no superó el 75% (entradas 5-8).

La metodología mostró buena tolerancia a concentraciones de sustrato muy elevadas (1.0 M) observando que, en este caso, un incremento en la cantidad de oxidante conduce a un aumento de la conversión (entradas 9-11), llegando a obtener un 96% del producto empleando 2.0 equivalentes de UHP (entrada 11).

1.3. Síntesis de ciclobutanonas 3-sustituidas

Con el objetivo de estudiar la generalidad del método oxidativo para la obtención de lactonas de 5 eslabones, se sintetizaron una serie de ciclobutanonas sustituidas en la posición 3 utilizando métodos químicos convencionales.

Por un lado, se utilizó una reacción de cicloadición [2+2] entre distintos estirenos (**7b-g**) y 2,2-diclorocetena, generada en el medio de reacción a partir del cloruro de tricloroacetilo (**8**), y una posterior reducción de la correspondiente ciclobutanona 2,2-diclorada **9b-g** empleando zinc metálico (Esquema 38). Inicialmente, partiendo de α -metilestireno (**7b**) se obtuvo la 2,2-diclorociclobutanona **9b** mediante formación *in situ* de la cetena utilizando Zn y promoviendo la cicloadición por sonicación.¹⁰⁶ Tras la reducción con Zn y cloruro amónico en MeOH a reflujo, se obtuvo la ciclobutanona **1b** disustituida en la posición 3 con un 65% de rendimiento global tras purificación por cromatografía de columna.

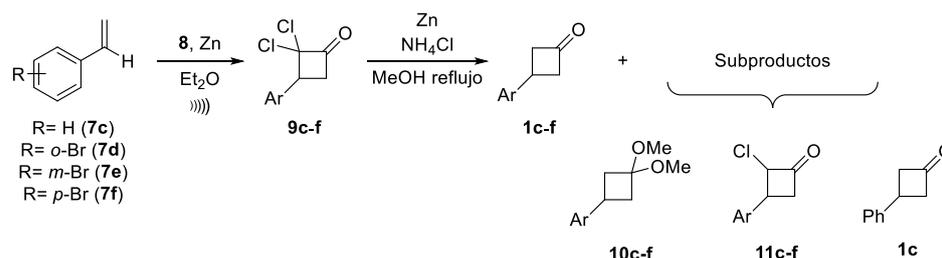


Esquema 38. Síntesis de la 3-fenil-3-metilciclobutanona (**1b**).

De manera análoga, esta ruta sintética permitió obtener la 3-fenilciclobutanona (**1c**) empleando como material de partida el estireno (**7c**), sin embargo, cuando se emplearon los derivados bromados **7d-f** los resultados fueron poco satisfactorios, obteniendo rendimientos muy bajos en el caso de las cetonas **1e-f** y sin observar formación del producto de cicloadición **9d** cuando se partió del *orto*-bromoestireno (**7d**). Los principales problemas tuvieron lugar durante el segundo paso de reacción, donde se obtuvieron como subproductos los acetales dimetílicos **10c-f** de las correspondientes ciclobutanonas y, en algunos casos, las ciclobutanonas monocloradas **11c-f**, debidas a una reducción incompleta y cuya separación por cromatografía de columna no fue posible. Además, en el caso de los compuestos bromados se observó la sustitución del

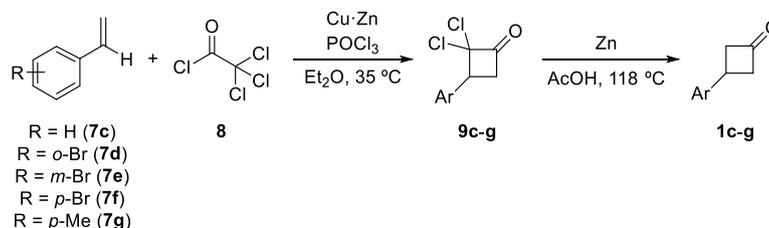
¹⁰⁶ G. Metha, P. S. H. Rao, *Synth. Commun.* **1985**, *15*, 991-1000.

átomo de bromo por hidrógeno, obteniendo la cetona **1c** y dificultando de nuevo la purificación de la ciclobutanona buscada (Esquema 39).



Esquema 39. Subproductos obtenidos en la síntesis de las ciclobutanonas **1c-f**.

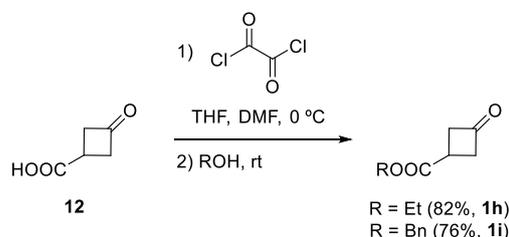
Para evitar estas reacciones secundarias, se llevó a cabo la síntesis de la cetona **1d** empleando, por un lado, una mezcla de Cu y Zn para el proceso de cicloadición en condiciones térmicas (calentamiento a reflujo de Et₂O) en presencia de un ácido fuerte de Lewis y, por otro, la reducción de la 2,2-diclorociclobutanona en ácido acético glacial en lugar de metanol.¹⁰⁷ De esta manera, se evita la formación del acetal dimetílico y, más importante, no se observa reducción del enlace C-Br del anillo aromático. Además, el empleo de estas condiciones más severas permitió la eliminación de los dos átomos de cloro de forma más eficaz de las 2,2-diclorociclobutanonas. El procedimiento se aplicó con éxito al estireno no sustituido **7c** y a los derivados bromados en las tres posiciones del anillo **7d-f** y metilado en *para* **7g**, obteniéndose las 3-aryl-ciclobutanonas **1c-g** con rendimientos globales entre bajos y moderados (12-50%, Esquema 40).



Esquema 40. Síntesis de las 3-aryl-ciclobutanonas **1c-g**.

¹⁰⁷ a) F. Coelho, M. B. M. de Azevedo, R. Boschiero, P. Resende, *Synth. Commun.* **1997**, *27*, 2455-2465; b) B. M. Trost, J. Xie, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6231-6242.

Adicionalmente, utilizando el ácido 3-oxociclobutanocarboxílico (**12**) como material de partida, se llevó a cabo su esterificación con etanol o alcohol bencílico empleando cloruro de oxalilo para la formación del correspondiente cloruro de ácido intermedio, obteniendo las ciclobutanonas **1h** y **1i** con un 82 y un 76% de rendimiento aislado, respectivamente, tras purificación por cromatografía de columna en gel de sílice (Esquema 41).



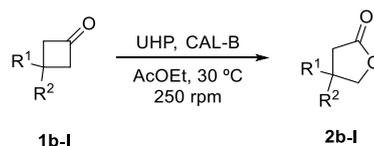
Esquema 41. Preparación de los cetoésteres **1h** y **1i** mediante esterificación del ácido 3-oxociclobutanocarboxílico (**12**).

1.4. Oxidación mediada por CAL-B de las ciclobutanonas **1b-1**

Además de las ciclobutanonas sintetizadas **1b-i**, se incorporaron al conjunto de sustratos otros derivados comercialmente accesibles como la 3-(*p*-clorofenil)ciclobutanona (**1j**), la 3-(*p*-fluorofenil)ciclobutanona (**1k**) y la 3-benciloxiciclobutanona (**1l**). Los patrones de las lactonas de oxidación Baeyer-Villiger (**2b-1**) se prepararon por reacción con ácido *meta*-cloroperbenzoico en diclorometano para el análisis y seguimiento de las reacciones quimioenzimáticas por CG.

En la Tabla 6 se recogen los resultados obtenidos en la reacción de Baeyer-Villiger empleando la CAL-B, complejo UHP como agente oxidante y el AcOEt como disolvente y, a su vez, precursor del ácido peracético. Antes de la discusión de estos resultados, cabe destacar que en ausencia enzima se obtuvieron conversiones muy bajas, en todos los casos inferiores al 25%, alcanzando los valores más elevados con las cetonas bromadas, siendo el más alto el de la reacción con la cetona **1d** (22%) probablemente por el efecto estérico del bromo en posición *orto*. Con los cetoésteres **1h** y **1i** y las cetonas sustituidas con un grupo fenilo **1b** y **1c** prácticamente no se observó conversión del blanco (< 5%).

Tabla 6. Oxidación de Baeyer-Villiger de las ciclobutanonas **1b-l**.



Entrada	Sustrato ^a	R ¹	R ²	t (h)	c (%) ^b	Rdto. (%)
1	1b	Me	Ph	20	94	---
2				30	>99	93
3	1c	H	Ph	20	94	---
4				30	>99	99
5	1d	H	2-Br-C ₆ H ₄	20	>99	98
6	1e	H	3-Br-C ₆ H ₄	20	>99	97
7	1f	H	4-Br-C ₆ H ₄	20	>99	99
8	1g	H	4-Me-C ₆ H ₄	20	>99	97
9	1h	H	COOEt	20	>99	84
10	1i	H	COOBn	20	>99	96
11	1j	H	4-Cl-C ₆ H ₄	20	>99	87
12	1k	H	4-F-C ₆ H ₄	20	78	51 ^c
13	1l	H	OBn	20	90	---
14				40	>99	94

^a Se emplearon 0.20-0.55 mmoles de cetona, excepto en la entrada 8 que se escaló la reacción a 250 mg (1.56 mmoles) de la ciclobutanona **1g**; ^b conversiones medidas por CG del crudo de reacción; ^c el seguimiento de la reacción a tiempos más largos no mostró un incremento de la conversión por lo que se purificó mediante cromatografía de columna.

En las oxidaciones mediadas por la CAL-B, se midieron las conversiones a las 20 horas de reacción siendo en todos los casos superiores al 90%, excepto para el compuesto fluorado en posición *para* del anillo aromático (**1k**, entrada 12). Salvo en este caso, se hizo un seguimiento periódico de las reacciones hasta observar la desaparición completa de la cetona de partida, momento en el cual se llevó a cabo el aislamiento de los productos finales y se obtuvieron las correspondientes lactonas con rendimientos aislados comprendidos entre el 84% y el 99%. El proceso de purificación requerido es muy simple y efectivo, constando simplemente de una filtración del enzima y una extracción líquido-líquido del producto final, en contra de lo que sucede con otros procesos de

oxidación químicos catalizados por metales o sales inorgánicas que requieren etapas adicionales de purificación.

Entre los casos estudiados, solo un escaso número de cetonas requirieron de más de 20 horas de reacción para alcanzar una conversión completa: las 3-fenilciclobutanonas **1b** y **1c** (entradas 1-4) necesitaron de 30 horas y la cetona **1l** que requirió de 40 horas (entradas 13 y 14). Cabe destacar que los cetoésteres **1h** y **1i** (entradas 9 y 10) experimentaron la oxidación de Baeyer-Villiger sin observarse formación de productos secundarios de hidrólisis, que podrían ser esperables por la presencia de la enzima hidrolítica.

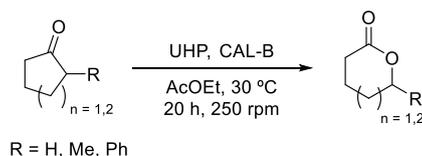
Sorprendentemente, la cetona fluorada en posición *para* **1k** (entrada 12) mostró una reactividad menor al análogo clorado (**1j**) o bromado (**1f**) y no avanzó de un 78% de conversión, por lo que fue necesaria una purificación por cromatografía de columna para aislar la lactona **2k**, que se obtuvo con un rendimiento moderado del 51% pese a que el análisis por cromatografía de gases del crudo de reacción no mostraba la formación de otros subproductos.

Por último, es destacable la eficiencia en el escalado de las reacciones, así, con la cetona metilada en posición *para* **1g**, se alcanzó una conversión completa a las 20 horas de reacción partiendo de 250 mg de sustrato (entrada 8).

1.5. Oxidación de derivados de ciclopentanona y ciclohexanona

Finalmente, se decidió llevar a cabo un estudio de la posible aplicabilidad de este procedimiento a otras cetonas cíclicas, como ciclopentanonas y ciclohexanonas con o sin sustitución en la posición 2. Así, empleando las condiciones de reacción previamente optimizadas con la ciclobutanona (**1a**), se observó la formación exclusiva de un producto de reacción en proporciones muy variables según la estructura del producto de partida (Tabla 7).

Tabla 7. Oxidación de las ciclopentanonas **3a** y **3b** y las ciclohexanonas **5a-c** mediada por la CAL-B.



Entrada	Sustrato	c (%) ^a
1	Ciclopentanona (3a)	25
2	2-Metilciclopentanona (3b)	58
3	Ciclohexanona (5a)	44
4	2-Metilciclohexanona (5b)	83
5	2-Fenilciclohexanona (5c)	87

Condiciones de reacción: cetona cíclica (0.25-0.5 mmol), UHP (1.5 equivalentes) y CAL-B (50 mg/mmol de cetona) en AcOEt (concentración 0.66 M de cetona) durante 20 h a 30 °C y 250 rpm.

^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción.

En los tres sustratos estudiados que podrían conducir a dos posibles productos según la regioselectividad de la reacción (entradas 2, 4 y 5) se obtuvo únicamente el regioisómero esperado en la oxidación Baeyer-Villiger, es decir, la lactona que posee el grupo más sustituido en posición α al átomo de oxígeno debido a la migración del sustituyente con mayor densidad electrónica. Los valores observados en la conversión muestran que la oxidación de las ciclohexanonas **5a-c** se produce más fácilmente que la de las ciclopentanonas **3a** y **3b** y, por otro lado, que existe un aumento importante en la reactividad cuando uno de los carbonos en α al carbonilo se encuentra sustituido, lo que parece indicar que el reordenamiento del intermedio de Criegee es el paso limitante en la oxidación de los sustratos.

CONCLUSIONES

✓ Se ha estudiado la síntesis de γ -butirolactona a partir de ciclobutanona empleando una metodología quimioenzimática basada en la formación *in situ* de un perácido catalizada por una lipasa.

✓ La CAL-B ha resultado ser el catalizador más eficaz en el proceso de perhidrólisis del acetato de etilo con el complejo urea-peróxido de hidrógeno como agente oxidante, optimizando las condiciones de reacción en términos de tiempos de reacción, cantidad de UHP y concentración de ciclobutanona.

✓ Se han sintetizado una serie de ciclobutanonas con sustitución en la posición 3, ya sea a través de reacciones de cicloadición [2+2] partiendo de derivados de estireno o mediante esterificación del ácido 3-oxociclobutanocarboxílico.

✓ La metodología quimioenzimática se ha extendido a las distintas ciclobutanonas obtenidas para formar las correspondientes lactonas, que se han aislado con elevada pureza y rendimiento, generalmente tras un simple proceso de filtración y extracción.

✓ El proceso ha mostrado una excelente tolerancia a concentraciones de los reactivos muy elevadas, incluso de 1 M, siendo fácilmente escalable hasta, al menos, 250 mg de sustrato.

PARTE EXPERIMENTAL

1.6. General

Los reactivos químicos y disolventes empleados proceden de distintas casas comerciales como Sigma-Aldrich, Acros Organics, Fluka o VWR Chemicals. La lipasa de *Candida antarctica* tipo B (CAL-B) fue donada por la compañía Novo-Nordisk (Novozym-435, 7300 PLU/g), la lipasa de *Rhizomucor miehei* procede de Novo-Nordisk (RML, 150 IUN/g) y las lipasas de *Pseudomonas cepacia* (PSL-SD, 23000 U/g), AK de *Pseudomonas fluorescens* (AK, 23700 U/g) y *Candida rugosa* (CRL, 1410 U/g) fueron adquiridas a Sigma-Aldrich.

El Et₂O empleado en las reacciones de cicloadición y el THF utilizado en las esterificaciones se secaron con sodio, empleando como indicador la benzofenona, y se almacenaron bajo atmósfera de nitrógeno. El oxiclورو de fósforo (POCl₃) fue destilado bajo presión reducida previamente a su utilización. El resto de los reactivos y disolventes fueron empleados sin purificación adicional.

1.7. Técnicas de análisis

1.7.1. Cromatografía en gel de sílice

Para los análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC, del inglés *thin layer chromatography*) se utilizaron cromatofolios de gel de sílice Merck Sílica Gel 60 F₂₅₄ que llevan incorporado un indicador fluorescente para la detección por ultravioleta.

Como revelador se empleó una disolución acuosa al 1% de KMnO₄ (2 g), con un 5% de K₂CO₃ (10 g) y un 5% de NaOH (10 g) en 200 mL de agua, estando las proporciones indicadas en relación peso:volumen. Alternativamente, se utilizó una disolución de *p*-anisaldehído (12 mL) en ácido sulfúrico fumante (17 mL), ácido acético (5 mL) y MeOH (450 mL).

Las cromatografías en columna se realizaron sobre gel de sílice 60, con tamaño de partícula de 40-63 μm o 230-400 *mesh*, adquirido a Merck.

1.7.2. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los experimentos de resonancia magnética nuclear de RMN-¹H, RMN-¹³C y DEPT-135 se realizaron en los espectrómetros Bruker AV-300 (300.13 MHz para ¹H y 75.5 MHz para ¹³C) y Bruker DPX-300 (300.13 MHz para ¹H y 75.5 MHz para ¹³C), empleando en todos los casos CDCl₃ como disolvente. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón, relativos a la señal del tetrametilsilano (TMS) y cuyos valores se han calibrado por medio de la señal residual del disolvente protonado, y las constantes de acoplamiento (J) en Hertzios (Hz).

1.7.3. Espectroscopía infrarroja (IR)

Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro PERKIN-ELMER FT: ESPECTRUM 100T empleando como soporte dos monocristales de NaCl, utilizando nujol para disolver los compuestos sólidos, en la zona comprendida entre 4000 y 700 cm⁻¹. Las bandas de vibración se indican en valores de ν máxima y se expresan en cm⁻¹.

1.7.4. Puntos de fusión

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

1.7.5. Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)

Los experimentos de masas de alta resolución se llevaron a cabo utilizando un espectrómetro Bruker micrOTOF-Q utilizando la técnica de ionización por electrospray en modo positivo (ESI⁺). Los valores se refieren a unidades de masa atómica (uma). En todos los casos se observaron las señales correspondientes a los iones moleculares de los compuestos estudiados excepto en la 3-(4-bromofenil)ciclobutan-2-ona (**1f**).

1.7.6. Cromatografía de gases (CG)

Los análisis por cromatografía de gases (CG) de las reacciones de Baeyer-Villiger se llevaron a cabo en un cromatógrafo Hewlett-Packard 6860 con detector de ionización de llama (FID), utilizando las columnas de relleno aquiral HP-1 (30 m x 0.32 mm x 0.25 μ m) y HP-5 (30 m x 0.32 mm x 0.25 μ m). Las condiciones y tiempos de retención se muestran en las Tablas 8 y 9.

Tabla 8. Separación analítica de las ciclobutanonas y las γ -butirolactonas.

Compuesto	Columna	Programa de temperaturas ^a	t_R (min)
1a	HP-5	30/5/30/180	2.1
2a			7.0
1b	HP-1	70/7/10/90/0/20/200	11.5
2b			13.7
1c	HP-1	100/5/10/220	7.0
2c			10.8
1d	HP-1	100/5/10/220	11.2
2d			13.8
1e	HP-1	100/5/10/220	11.6
2e			14.4
1f	HP-1	100/5/10/220	11.8
2f			14.6
1g	HP-1	100/5/10/220	8.7
2g			11.0
1h	HP-1	70/7/10/90/0/20/200	6.5
2h			11.4
1i	HP-1	70/7/10/90/0/20/200	14.7
2i			16.0
1j	HP-1	100/5/10/220	6.8
2j			10.5
1k	HP-1	100/5/10/220	10.3
2k			13.3
1l	HP-1	100/5/10/220	11.8
2l			13.2

^a T_{inicial} (°C)/tiempo (min)/rampa (°C/min)/T (°C)/tiempo (min)/rampa (°C/min)/T_{final} (°C).

Tabla 9. Separación analítica por CG utilizando la columna HP-1.

Compuesto	Programa de temperaturas ^a	<i>t_R</i> (min)
3a	30/5/30/180	3.4
4a		5.9
3b	70/10/40/200/4	1.9
4b		5.9
5a	70/10/40/200/4	2.2
6a		7.5
5b	70/10/40/200/4	2.9
6b		9.7
5c	70/10/40/200/4	13.9
6c		15.1

^a T_{inicial} (°C)/tiempo (min)/rampa (°C/min)/T_{final} (°C)/tiempo (min)

1.8. Procedimientos sintéticos

1.8.1. Procedimiento general para la síntesis quimioenzimática de lactonas utilizando ácido láurico y la lipasa de *Rhizomucor miehei*

Sobre una disolución de ciclobutanona (**1a**, 0.5 mmol, 37 µL), ciclopentanona (**3a**, 0.5 mmol, 44 µL) o ciclohexanona (**5a**, 0.5 mmol, 52 µL) en un disolvente orgánico (MeCN, Et₂O, CH₂Cl₂ o TBME, 760 µL) en un matraz Erlenmeyer se añaden, sucesivamente, ácido láurico (1.0 mmol, 200 mg), UHP (0.55 mmol, 52 mg) y la RML (25 mg). La reacción se agita durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. Transcurrido ese tiempo, se añaden 2 mL de agua, se filtra el enzima y se extrae con AcOEt (3 x 5 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan primero con agua (2 x 5 mL) y posteriormente con una disolución acuosa saturada de NaCl (5 mL), se secan con Na₂SO₄ y se analiza directamente el crudo de reacción mediante CG.

1.8.2. Síntesis de la 3-fenil-3-metilciclobutanona (**1b**)

a) Reacción de cicloadición [2+2]

Bajo atmósfera de nitrógeno, se disuelve α -metilestireno (**7b**, 5.0 mmol, 650 μ L) en Et₂O seco (50 mL) en un matraz de dos bocas y se añade Zn (10.0 mmol, 654 mg). A continuación, se acopla un embudo de adición compensada donde se coloca una disolución de cloruro de tricloroacetilo (**8**, 7.5 mmol, 837 μ L) en Et₂O seco (25 mL). Se introduce el montaje en el baño de ultrasonidos y se deja gotear lentamente la disolución de **8** sobre la suspensión, manteniendo la temperatura del baño entre 15 y 20 °C. Se sonica durante otra hora adicional, siempre controlando la temperatura del baño para que no supere los 20 °C, y, transcurrido ese tiempo, se detiene la reacción por filtración en una placa con celita. El crudo de reacción se lava repetidas veces con agua (2 x 25 mL), una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (5 x 25 mL) y una disolución acuosa saturada de NaCl (25 mL). La fase orgánica resultante se seca con Na₂SO₄, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (5% AcOEt/hexano), aislándose la 2,2-dicloro-3-metil-3-fenilciclobutanona **9b** con un 92% de rendimiento.

b) Reducción con Zn

En un matraz provisto de un imán se disuelve la 2,2-dicloro-3-metil-3-fenilciclobutanona (**9b**, 5.1 mmol, 1.16 g) en MeOH (20 mL) y se añade NH₄Cl hasta saturación. Se añade Zn (30.4 mmol, 1.99 g) y se agita la suspensión a reflujo durante 12 h. Transcurrido ese tiempo, se filtra en una placa con celita y se evapora el disolvente bajo presión reducida. El crudo obtenido se redissuelve en Et₂O (100 mL) y se lava con agua (2 x 50 mL), una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (2 x 50 mL) y una disolución acuosa saturada de NaCl (50 mL). La fase orgánica resultante se seca con Na₂SO₄, se filtra y el disolvente se elimina en el rotavapor. El crudo de reacción obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (10% AcOEt/hexano), aislándose la ciclobutanona **1b** con un 71% rendimiento (65% de rendimiento global en las dos etapas).

1.8.3. Síntesis de las ciclobutanonas 1c-g

a) Preparación de la aleación Cu·Zn

Una disolución de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3.0 mmol, 760 mg) en agua (5 mL) se añade en dos porciones sobre una suspensión de Zn (99.4 mmol, 6.50 g) en agua (10 mL). Tras un minuto, se filtra en una placa y se lava con agua (2 x 5 mL), acetona (2 x 5 mL) y Et_2O (2 x 5 mL). El sólido gris negruzco obtenido se seca a presión reducida en un horno de bolas a 100 °C durante 6 h y se almacena bajo atmósfera de nitrógeno.

b) Reacción de cicloadición [2+2]

En un matraz Schlenk provisto de un imán y bajo atmósfera de nitrógeno, se prepara una suspensión del correspondiente estireno **7c-g** (5.0 mmol) y Cu·Zn (1.31 g, 0.26 g/ mmol estireno) en Et_2O seco (20 mL). Se acopla un embudo de adición con una disolución de cloruro de tricloroacetilo (**8**, 10.0 mmol, 1116 μL) y POCl_3 recién destilado (5.5 mmol, 512 μL) en Et_2O seco (11 mL) que se deja gotear lentamente sobre la suspensión a temperatura ambiente. Una vez completada la adición, se calienta la mezcla a reflujo y, tras 24 h, el crudo de reacción se deja enfriar y se filtra con celita. Se elimina parte del Et_2O en el rotavapor y se añade hexano (100 mL), se agita vigorosamente y se deja reposar, formándose un precipitado. La disolución sobrenadante se decanta y se lava con una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 (2 x 40 mL) y una disolución acuosa saturada de NaCl (40 mL). La fase orgánica resultante se seca con Na_2SO_4 , se filtra y el disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose la correspondiente 2,2-diclorocetona **9c-g** que se somete al paso de reducción sin purificación adicional.

c) Reducción con Zn

El crudo obtenido en el paso anterior, donde está presente la ciclobutanona diclorada correspondiente **9c-g** (5.0 mmol) se disuelve en ácido acético glacial (20 mL) y se añade Zn (20.0 mmol, 1.34 g). La reacción se agita a reflujo durante 12 h y, transcurrido ese tiempo, se añade agua (25 mL). Se extrae con Et_2O (2 x 15 mL) y las fases orgánicas combinadas se lavan con una disolución saturada de NaHCO_3 (4 x 15 mL) y una disolución acuosa saturada de NaCl (2 x 15 mL), se secan con Na_2SO_4 , se filtran y se elimina el disolvente en el rotavapor. El

crudo de reacción obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (10-20% AcOEt/hexano), aislándose las ciclobutanonas **1c-g** con rendimientos globales comprendidos entre el 12 y el 50%.

1.8.4. Síntesis del 3-oxociclobutanocarboxilato de etilo (**1h**)

En un matraz Schlenk bajo atmósfera de nitrógeno, se disuelve el ácido 3-oxociclobutanocarboxílico (**12**, 1.75 mmol, 200 mg) en THF seco (7 mL), se adiciona una gota de DMF y la disolución se enfría en un baño de hielo. Se añade cloruro de oxalilo (3.5 mmol, 276 μ L) y se agita durante 30 minutos, tras lo cual, se evapora el THF en el rotavapor. La mezcla se redissuelve en EtOH (7 mL) y se agita a temperatura ambiente durante 8 h. Transcurrido este tiempo, se evapora el disolvente en el rotavapor y se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (10-20% AcOEt/hexano), obteniéndose la ciclobutanona **1h** en forma de aceite incoloro con un 82% de rendimiento.

1.8.5. Síntesis del 3-oxociclobutanocarboxilato de bencilo (**1i**)

En un matraz Schlenk bajo atmósfera de nitrógeno, se disuelve el ácido 3-oxociclobutanocarboxílico (**12**, 1.75 mmol, 200 mg) en THF seco (7 mL), se adiciona una gota de DMF y se enfría la disolución en un baño de hielo. Se añade cloruro de oxalilo (3.5 mmol, 276 μ L), agitando durante 30 minutos la mezcla. Transcurrido este tiempo, se retira la reacción del baño de hielo y se adiciona alcohol bencílico (5.26 mmol, 544 μ L), agitando durante 8 h a temperatura ambiente. Se elimina el disolvente en el rotavapor y se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (20% AcOEt/hexano), obteniendo la ciclobutanona **1i** en forma de aceite incoloro con un 76% de rendimiento.

1.8.6. Síntesis química de las lactonas **2b-1**

A una disolución de la correspondiente ciclobutanona **1b-1** (0.25 mmol) en CH_2Cl_2 (1.0 mL) se añade el ácido *meta*-cloroperbenzoico (MCPBA, 0.50 mmol, 88 mg) y se agita durante 20 h. El crudo de reacción se lava repetidamente con una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 (6 x 5 mL), la fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y se elimina el disolvente en el rotavapor. El crudo de reacción obtenido se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice

(10-30% AcOEt/hexano) para obtener las lactonas **2a-l** (rendimientos: 93% **2b**; 83% **2c**; 72% **2d**; 99% **2e**; 85% **2f**; 86% **2g**; 88% **2h**; 44% **2i**; 77% **2j**; 75% **2k**; y 96% **2l**)

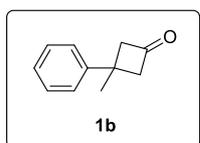
1.8.7. Procedimiento general para la síntesis quimioenzimática de lactonas empleando CAL-B en AcOEt

Sobre una disolución de la correspondiente ciclobutanona **1a-l** (0.25 mmol) en AcOEt (30.0 mmol, 379 μ L) se añade el complejo UHP (0.38 mmol, 35 mg) y la CAL-B (12.5 mg). La suspensión se agita durante 20 h a 30 °C y 250 rpm y se toma una alícuota para la medida de la conversión por CG. La reacción se mantiene en agitación orbitalica hasta alcanzar una conversión completa y, transcurrido ese tiempo, se añade agua (2 mL) y se filtra el enzima. Se extrae con AcOEt (3 x 5 mL) y las fases orgánicas combinadas se lavan primero con agua (2 x 5 mL) y posteriormente con una disolución acuosa saturada de NaCl (5 mL). A continuación, la fase orgánica resultante se seca con Na₂SO₄, se filtra y el disolvente se elimina a presión reducida, obteniendo las correspondientes lactonas **2a-l** con rendimientos comprendidos entre el 84 y el 99%.¹⁰⁸

¹⁰⁸ En el caso de la reacción con **1k** se llevó a cabo la purificación mediante columna cromatográfica en gel de sílice (30% AcOEt/hexano), obteniendo la lactona **2k** con un 51% de rendimiento.

1.9. Datos experimentales

3-Fenil-3-metilciclobutan-1-ona (1b)



Fórmula empírica: C₁₁H₁₂O

Peso molecular: 160.22 g/mol

Aspecto: aceite incoloro

Rendimiento: 65% R_f (20% AcOEt/hexano): 0.68

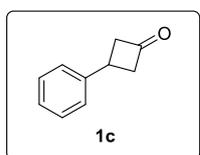
RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.62 (s, 3H), δ 3.07-3.17 (m, 2H), δ 3.42-3.53 (m, 2H), δ 7.23-7.42 (m, 5H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 31.1 (CH₃), δ 34.0 (C), δ 59.3 (2CH₂), δ 125.7 (CH), δ 126.3 (CH), δ 128.6 (2CH), δ 148.3 (C), δ 206.6 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3059, 3026, 2958, 2921, 1785, 1602, 1496, 1445, 1381, 1080, 764 cm⁻¹

HRMS (ESI⁺, *m/z*) (C₁₁H₁₂NaO) (M+Na)⁺: calculada 183.0780, encontrada: 183.0776

3-Fenilciclobutan-1-ona (1c)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₀O

Peso molecular: 146.19 g/mol

Aspecto: aceite incoloro

Rendimiento: 34% R_f (20% AcOEt/hexano): 0.45

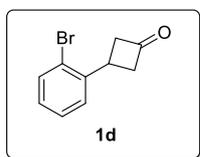
RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 3.10-3.22 (m, 2H), 3.35-3.47 (m, 2H), 3.51-3.65 (m, 1H), 7.13-7.31 (m, 5H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 28.5 (CH), 54.8 (2CH₂), 126.6 (2CH), 126.7 (CH), 128.8 (2CH), 143.7 (C), 206.8 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3062, 3029, 2975, 2923, 1785, 1603, 1496, 1380, 1104, 780 cm⁻¹

HRMS (ESI⁺, *m/z*) (C₁₁H₁₀NaO) (M+Na)⁺: calculada 169.0624, encontrada: 169.0632

3-(2-Bromofenil)ciclobutan-1-ona (1d)



Fórmula empírica: C₁₀H₉BrO

Peso molecular: 225.08 g/mol

Aspecto: aceite incoloro

Rendimiento: 31% *R_f* (20% AcOEt/hexano): 0.72

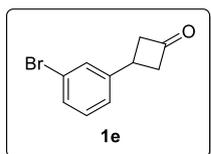
RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 3.16-3.29 (m, 2H), 3.46-3.59 (m, 2H), 3.87-4.02 (m, 1H), 7.10-7.19 (m, 1H), 7.30-7.39 (m, 2H), 7.57-7.64 (m, 1H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 29.1 (CH), 53.2 (2CH₂), 124.9 (C), 126.6 (CH), 127.8 (CH), 128.4 (CH), 133.3 (CH), 141.7 (C), 206.0 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3062, 2983, 2927, 1788, 1590, 1567, 1472, 1380, 1102, 1027, 755 cm⁻¹

HRMS (ESI⁺, *m/z*) (C₁₀H₉BrNaO) (M+Na)⁺: calculada 246.9729, encontrada: 246.9703

3-(3-Bromofenil)ciclobutan-1-ona (1e)



Fórmula empírica: C₁₀H₉BrO

Peso molecular: 225.08 g/mol

Aspecto: aceite amarillento

Rendimiento: 32% **R_f** (20% AcOEt/hexano): 0.77

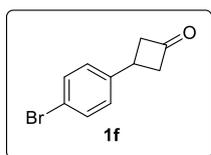
RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 3.18-3.30 (m, 2H), 3.45-3.58 (m, 2H), 3.61-3.74 (m, 1H), 7.22-7.27 (m, 2H), 7.36-7.43 (m, 1H), 7.45-7.48 (m, 1H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 38.3 (CH), 54.7 (2CH₂), 122.9 (C), 125.3 (CH), 129.9 (2CH), 130.4 (CH), 146.0 (C), 205.7 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3062, 2975, 2923, 1785, 1636, 1596, 1566, 1477, 1378, 1102, 1074, 780 cm⁻¹

HRMS (ESI⁺, *m/z*) (C₁₀H₁₀BrO) (M+H)⁺: calculada 224.9910, encontrada: 224.9889

3-(4-Bromofenil)ciclobutan-1-ona (1f)



Fórmula empírica: C₁₀H₉BrO

Peso molecular: 225.08 g/mol

Aspecto: sólido amarillo anaranjado

Rendimiento: 50% **R_f** (20% AcOEt/hexano): 0.59

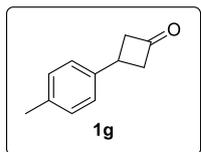
Pf: 49-51 °C

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 3.13-3.25 (m, 2H), 3.42-3.55 (m, 2H), 3.57-3.69 (m, 1H), 7.13-7.19 (m, 2H), 7.42-7.48 (m, 2H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 28.2 (CH), 54.8 (2CH₂), 120.6 (C), 128.4 (2CH), 131.9 (2CH), 142.7 (C), 206.0 (C) ppm

IR (nujol): ν 3055, 2987, 1786, 1489, 1422, 1395, 1101, 1075, 1009, 821 cm⁻¹

3-(3-Metilfenil)ciclobutan-1-ona (1g)



Fórmula empírica: C₁₁H₁₂O

Peso molecular: 160.22 g/mol

Aspecto: aceite amarillento

Rendimiento: 12% **R_f** (20% AcOEt/hexano): 0.79

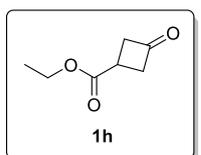
RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.38 (s, 3H), 3.18-3.31 (m, 2H), 3.43-3.55 (m, 2H), 3.60-3.72 (m, 1H), 7.10-7.25 (m, 4H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 21.0 (CH₃), 28.1 (CH), 54.8 (2CH₂), 126.4 (2CH), 129.4 (2CH), 136.2 (C), 140.6 (C), 206.9 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3023, 2974, 2922, 1785, 1608, 1516, 1450, 1417, 1379, 1167, 1109, 1020, 813 cm⁻¹

HRMS (ESI⁺, *m/z*) (C₂₂H₂₄NaO₂) (2M+Na)⁺: calculada 343.1669, encontrada: 334.1654

3-Oxociclobutanocarboxilato de etilo (1h)



Fórmula empírica: C₇H₁₀O₃

Peso molecular: 142.15 g/mol

Aspecto: aceite incoloro

Rendimiento: 82% **R_f** (40% AcOEt/hexano): 0.54

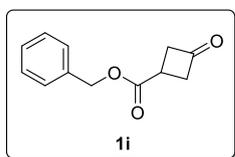
RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.25 (t, *J*_{HH} = 7.1 Hz, 3H), 3.12-3.43 (m, 5H), 3.87-4.02 (m, 1H), 4.17 (q, ³*J*_{HH} = 7.1 Hz, 2H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 14.2 (CH₃), 27.4 (CH), 51.6 (2CH₂), 61.3 (CH₂), 174.1 (C), 203.9 (C) ppm

IR (NaCl): ν 2985, 2937, 1797, 1733, 1467, 1375, 1346, 1215, 1193, 1099, 1052, 858 cm⁻¹

HRMS (ESI⁺, *m/z*) (C₇H₁₀NaO₃) (M+Na)⁺: calculada 165.0522, encontrada: 165.0531

3-Oxociclobutanocarboxilato de bencilo (**1i**)



Fórmula empírica: C₁₂H₁₂O₃

Peso molecular: 204.23 g/mol

Aspecto: aceite incoloro

Rendimiento: 76% **R_f** (30% AcOEt/hexano): 0.56

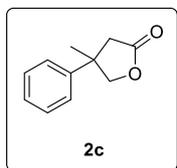
RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 3.20-3.50 (m, 5H), 5.19 (s, 2H), 7.33-7.39 (m, 5H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 27.5 (CH), 51.7 (2CH₂), 67.2 (CH₂), 128.4 (2CH), 128.6 (CH), 128.7 (2CH), 135.5 (C), 203.6 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3034, 2926, 2854, 1792, 1732, 1498, 1456, 1380, 1347, 1186, 1100, 1051, 752 cm⁻¹

HRMS (ESI⁺, *m/z*) (C₁₂H₁₂NaO₃) (M+Na)⁺: calculada 227.0679, encontrada: 227.0660

4-Fenil-4-metildihidrofuran-2(3H)-ona (**2b**)



Fórmula empírica: C₁₁H₁₂O₂

Peso molecular: 176.21 g/mol

Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 93% **R_f** (30% AcOEt/hexano): 0.43

Pf: 49-51 °C

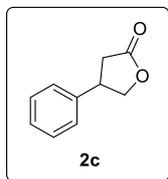
RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.54 (s, 3H), 2.68 (dd, $J_{\text{HH}} = 16.8, 0.4$ Hz, 1H), 2.93 (dd, $J_{\text{HH}} = 16.8, 0.6$ Hz, 1H), 4.39-4.47 (m, 2H), 7.18-7.23 (m, 2H), 7.27-7.33 (m, 1H), 7.36-7.42 (m, 2H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 28.1 (CH₃), 42.1 (CH₂), 44.2 (C), 78.5 (CH₂), 125.2 (2CH), 127.3 (CH), 129.1 (2CH), 144.4 (C), 176.2 (C) ppm

IR (nujol): ν 3024, 2969, 2930, 2904, 1773, 1601, 1497, 1305, 1173, 1094, 1020, 767 cm⁻¹

HRMS (ESI⁺, m/z) (C₁₁H₁₂NaO₂) (M+Na)⁺: calculada 199.0730, encontrada: 199.0781

4-Fenildihidrofuran-2(3H)-ona (2c)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₀O₂

Peso molecular: 162.07 g/mol

Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 99% R_f (20% AcOEt/hexano): 0.20

Pf: 46-47 °C

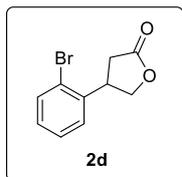
RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.67 (dd, $J_{\text{HH}} = 17.5, 9.1$ Hz, 1H), 2.92 (dd, $J_{\text{HH}} = 17.5, 8.3$ Hz, 1H), 3.73-3.85 (m, 1H), 4.26 (dd, $J_{\text{HH}} = 9.0, 8.1$ Hz, 1H), 4.66 (dd, $J_{\text{HH}} = 9.0, 8.3$ Hz, 1H), 7.21-7.40 (m, 5H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 35.8 (CH₂), 41.2 (CH), 74.1 (CH₂), 126.8 (2CH), 127.8 (CH), 129.2 (2CH), 139.5 (C), 176.5 (C) ppm

IR (nujol): ν 3064, 3032, 2973, 2904, 1763, 1601, 1456, 1355, 1163, 1010, 761 cm⁻¹

HRMS (ESI⁺, m/z) (C₁₀H₁₀NaO₂) (M+Na)⁺: calculada 185.0573, encontrada: 185.0592

4-(2-Bromofenil)dihidrofuran-2(3H)-ona (2d)



Fórmula empírica: C₁₀H₉BrO₂

Peso molecular: 241.08 g/mol

Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 98% **R_f** (30% AcOEt/hexano): 0.50

Pf: 56-57 °C

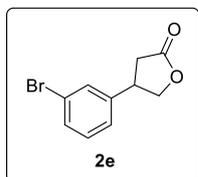
RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.67 (dd, *J*_{HH}= 17.6, 6.7 Hz, 1H), 2.97 (dd, *J*_{HH}= 17.6, 8.6 Hz, 1H), 4.17-4.24 (m, 2H), 4.71 (dd, *J*_{HH}= 9.0, 7.2 Hz, 1H), 7.17 (ddd, *J*_{HH}= 8.0, 7.1, 1.9 Hz, 1H), 7.26-7.35 (m, 2H), 7.61 (dd, *J*_{HH}= 8.0, 1.3 Hz, 1H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 34.9 (CH₂), 40.3 (CH), 73.0 (CH₂), 124.5 (C), 126.8 (CH), 128.4 (CH), 129.3 (CH), 133.6 (CH), 140.0 (C), 176.2 (C) ppm

IR (nujol): ν 3064, 2990, 2914, 1779, 1568, 1473, 1440, 1372, 1168, 1023, 753 cm⁻¹

HRMS (ESI⁺, *m/z*) (C₁₀H₉BrNaO₂) (M+Na)⁺: calculada 262.9678, encontrada: 262.9670

4-(3-Bromofenil)dihidrofuran-2(3H)-ona (2e)



Fórmula empírica: C₁₀H₉BrO₂

Peso molecular: 241.08 g/mol

Aspecto: aceite amarillento

Rendimiento: 97% **R_f** (30% AcOEt/hexano): 0.50

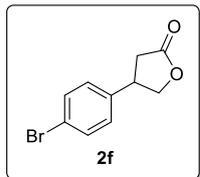
RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.64 (dd, *J*_{HH}= 17.5, 8.8 Hz, 1H), 2.93 (dd, *J*_{HH}= 17.5, 8.7 Hz, 1H), 3.70-3.82 (m, 1H), 4.25 (dd, *J*_{HH}= 9.1, 7.6 Hz, 1H), 4.66 (dd, *J*_{HH}= 9.1, 7.8 Hz, 1H), 7.16 (dt, *J*_{HH}= 7.7, 1.2 Hz, 1H), 7.25 (t, *J*_{HH}= 7.8 Hz, 1H), 7.38 (t, *J*_{HH}= 1.8 Hz, 1H), 7.42 (ddd, *J*_{HH}= 7.8, 1.8, 1.2 Hz, 1H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 35.6 (CH₂), 40.8 (CH), 73.7 (CH₂), 123.3 (C), 125.4 (CH), 130.1 (CH), 130.9 (CH), 131.0 (CH), 141.9 (C), 175.9 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3058, 2971, 2913, 1781, 1597, 1568, 1479, 1266, 1169, 1024, 737 cm⁻¹

HRMS (ESI⁺, *m/z*) (C₁₀H₉BrNaO₂) (M+Na)⁺: calculada 262.9678, encontrada: 262.9657

4-(4-Bromofenil)dihidrofuran-2(3H)-ona (2f)



Fórmula empírica: C₁₀H₉BrO₂

Peso molecular: 241.08 g/mol

Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 99% **R_f** (30% AcOEt/hexano): 0.31

Pf: 72-74 °C

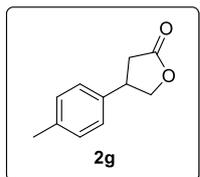
RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.62 (dd, *J*_{HH}= 17.5, 8.8 Hz, 1H), 2.93 (dd, *J*_{HH}= 17.5, 8.7 Hz, 1H), 3.68-3.83 (m, 1H), 4.23 (dd, *J*_{HH}= 9.1, 7.6 Hz, 1H), 4.65 (dd, *J*_{HH}= 9.1, 7.8 Hz, 1H), 7.08-7.14 (m, 2H), 7.46-7.52 (m, 2H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 35.7 (CH₂), 40.7 (CH), 73.8 (CH₂), 121.7 (C), 128.5 (2CH), 132.4 (2CH), 138.6 (C), 176.0 (C) ppm

IR (nujol): ν 3016, 2930, 2901, 1767, 1589, 1487, 1424, 1221, 1158, 1016, 826 cm⁻¹

HRMS (ESI⁺, *m/z*) (C₁₀H₉BrNaO₂) (M+Na)⁺: calculada 262.9678, encontrada: 262.9673

4-(4-Metilfenil)dihidrofuran-2(3H)-ona (2g)



Fórmula empírica: C₁₁H₁₂O₂

Peso molecular: 176.21 g/mol

Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 97% **R_f** (30% AcOEt/hexano): 0.54

Pf: 40-42 °C

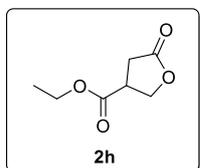
RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.34 (s, 3H), 2.65 (dd, *J*_{HH}= 17.5, 9.2 Hz, 1H), 2.90 (dd, *J*_{HH}= 17.5, 8.6 Hz, 1H), 3.69-3.82 (m, 1H), 4.24 (dd, *J*_{HH}= 9.1, 8.0 Hz, 1H), 4.65 (dd, *J*_{HH}= 9.1, 7.9 Hz, 1H), 7.10-7.20 (m, 4H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 21.1 (CH₃), 35.9 (CH₂), 40.9 (CH), 74.3 (CH₂), 126.7 (2CH), 129.9 (2CH), 136.4 (C), 137.6 (C), 176.6 (C) ppm

IR (nujol): ν 2978, 2948, 2916, 1761, 1608, 1519, 1484, 1455, 1427, 1350, 1214, 1158, 1008, 827 cm⁻¹

HRMS (ESI⁺, *m/z*) (C₁₁H₁₂NaO₂) (M+Na)⁺: calculada 199.0730, encontrada: 199.0728

Tetrahidro-5-oxo-3-furanocarboxilato de etilo (2h)



Fórmula empírica: C₇H₁₀O₄

Peso molecular: 158.15 g/mol

Aspecto: aceite incoloro

Rendimiento: 84% **R_f** (40% AcOEt/hexano): 0.30

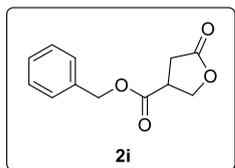
RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.25 (t, *J*_{HH}= 7.1 Hz, 3H), 2.64-2.88 (m, 2H), 3.87-4.02 (m, 1H), 4.17 (q, *J*_{HH}= 7.1 Hz, 2H), 4.37-4.52 (m, 2H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 14.1 (CH₃), 30.9 (CH₂), 40.0 (CH), 61.9 (CH₂), 69.1 (CH₂), 171.2 (C), 175.3 (C) ppm

IR (NaCl): ν 2986, 2941, 1783, 1733, 1477, 1375, 1348, 1198, 1176, 1024, 845 cm^{-1}

HRMS (ESI⁺, m/z) ($\text{C}_7\text{H}_{10}\text{NaO}_4$) ($\text{M}+\text{Na}$)⁺: calculada 181.0471, encontrada: 181.0477

Tetrahidro-5-oxo-3-furanocarboxilato de bencilo (2i)



Fórmula empírica: $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_4$

Peso molecular: 220.22 g/mol

Aspecto: sólido gomoso blanco

Rendimiento: 96% R_f (30% AcOEt/hexano): 0.33

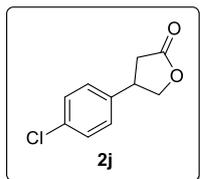
RMN-¹H (CDCl_3 , 300.13 MHz): δ 2.71-2.95 (m, 2H), 3.44-3.56 (m, 1H), 4.42-4.56 (m, 2H), 5.20 (s, 2H), 7.33-7.44 (m, 5H) ppm

RMN-¹³C (CDCl_3 , 75.5 MHz): δ 30.9 (CH_2), 40.1 (CH), 67.7 (CH_2), 69.0 (CH_2), 128.5 (2CH), 128.8 (3CH), 135.0 (C), 171.0 (C), 175.1 (C) ppm

IR (nujol): ν 3066, 3034, 2959, 1779, 1736, 1636, 1498, 1456, 1383, 1350, 1175, 1013, 754 cm^{-1}

HRMS (ESI⁺, m/z) ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{NaO}_4$) ($\text{M}+\text{Na}$)⁺: calculada 243.0628, encontrada: 243.0671

4-(4-Clorofenil)dihidrofuran-2(3H)-ona (2j)



Fórmula empírica: C₁₀H₉ClO₂

Peso molecular: 196.63 g/mol

Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 87% **R_f** (30% AcOEt/hexano): 0.41

Pf: 54-56 °C

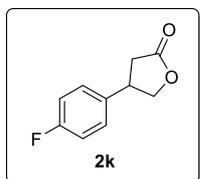
RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.61 (dd, $J_{\text{HH}} = 17.5, 8.9$ Hz, 1H), 2.92 (dd, $J_{\text{HH}} = 17.5, 8.7$ Hz, 1H), 3.70-3.82 (m, 1H), 4.23 (dd, $J_{\text{HH}} = 9.1, 7.7$ Hz, 1H), 4.65 (dd, $J_{\text{HH}} = 9.1, 7.8$ Hz, 1H), 7.13-7.19 (m, 2H), 7.30-7.36 (m, 2H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 35.7 (CH₂), 40.6 (CH), 73.9 (CH₂), 128.2 (C), 129.4 (2CH), 133.6 (C), 138.1 (C), 176.1 (C) ppm

IR (nujol): ν 3055, 2987, 2914, 1782, 1496, 1423, 1170, 1094, 1025, 828 cm⁻¹

HRMS (ESI⁺, m/z) (C₁₀H₉ClNaO₂) (M+Na)⁺: calculada 219.0183, encontrada: 219.0156

4-(4-Fluorofenil)dihidrofuran-2(3H)-ona (2k)



Fórmula empírica: C₁₀H₉FO₂

Peso molecular: 180.18 g/mol

Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 51% **R_f** (30% AcOEt/hexano): 0.38

Pf: 65-67 °C

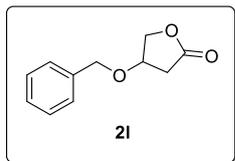
RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.62 (dd, $J_{\text{HH}} = 17.5, 8.9$ Hz, 1H), 2.92 (dd, $J_{\text{HH}} = 17.5, 8.7$ Hz, 1H), 3.71-3.84 (m, 1H), 4.23 (dd, $J_{\text{HH}} = 9.1, 7.7$ Hz, 1H), 4.65 (dd, $J_{\text{HH}} = 9.1, 7.8$ Hz, 1H), 7.00-7.09 (m, 2H), 7.16-7.24 (m, 2H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 35.9 (CH₂), 40.6 (CH), 74.1 (CH₂), 116.2 (d, ²J_{CF}= 21.5, 2CH), 128.4 (d, ³J_{CF}= 8.0, 2CH), 128.4 (d, ⁴J_{CF}= 2.9, C), 162.2 (d, ¹J_{CF}= 246.6, C), 176.2 (C) ppm

IR (nujol): ν 3068, 2914, 1777, 1602, 1514, 1433, 1219, 1165, 1013, 843 cm⁻¹

HRMS (ESI⁺, *m/z*) (C₁₀H₉FN₂O₂) (M+Na)⁺: calculada 203.0479, encontrada: 203.0474

4-Benciloxidihidrofuran-2(3H)-ona (2I)



Fórmula empírica: C₁₁H₁₂O₃

Peso molecular: 192.21 g/mol

Aspecto: sólido gomoso blanco

Rendimiento: 94% **R_f** (40% AcOEt/hexano): 0.30

Pf: 65-67 °C

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.55-2.74 (m, 2H), 4.32-4.43 (m, 3H), 4.48-4.55 (m, 1H), 7.27-7.40 (m, 5H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 35.0 (CH₂), 71.2 (CH₂), 73.2 (CH₂), 73.9 (CH), 127.8 (2CH), 128.2 (CH), 128.7 (2CH), 137.0 (C), 175.6 (C) ppm

IR (nujol): ν 3066, 3034, 2923, 1779, 1603, 1455, 1401, 1374, 1333, 1166, 1086, 1050, 993, 886, 747 cm⁻¹

HRMS (ESI⁺, *m/z*) (C₁₁H₁₂NaO₃) (M+Na)⁺: calculada 215.0679, encontrada: 215.0726

CAPÍTULO 2

PROMISCUIDAD CATALÍTICA
DE HIDROLASAS EN
DISOLVENTES EUTÉCTICOS

ANTECEDENTES

La correcta selección del disolvente es uno de los aspectos clave para lograr procesos químicos eficientes y, a su vez, influye de manera crucial en su impacto ambiental por la elevada toxicidad de los disolventes orgánicos volátiles tradicionales, que representan uno de los principales focos de contaminación y consumo energético, con una influencia nociva sobre la calidad del aire y el cambio climático. Por ello, el descubrimiento e implementación de disolventes alternativos en síntesis orgánica es un requisito indispensable para el desarrollo de procesos sostenibles donde, además de las propiedades *verdes* y el resultado del disolvente en la transformación sintética, se deben considerar su obtención, reciclaje y descomposición.¹⁰⁹ Algunas de las clases de disolventes más estudiados como alternativas sostenibles durante los últimos años son los líquidos iónicos (sales que presentan un estado líquido a temperaturas próximas a la ambiental),¹¹⁰ derivados de celulosa como el 2-metil tetrahidrofurano,¹¹¹ polímeros líquidos,¹¹² CO₂ en estado supercrítico¹¹³ o los disolventes eutécticos de bajo punto de fusión (DES, del inglés *deep eutectic solvents*).¹¹⁴

2.1. DES

Los *deep eutectic solvents*, cuya traducción literal sería disolventes eutécticos profundos, se caracterizan por estar constituidos por, al menos, dos componentes que interactúan entre sí mediante fuerzas intermoleculares, y no por enlaces iónicos o covalentes, donde el punto de fusión de la mezcla

¹⁰⁹ C. J. Clark, W.-C. Tu, O. Levers, A. Bröhl, J. P. Hallett, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 747-800.

¹¹⁰ J. S. A. Wilkes, *Green Chem.* **2002**, *4*, 73-80.

¹¹¹ a) V. Pace, P. Hoyos, L. Castoldi, P. Domínguez de María, A. R. Alcántara, *ChemSusChem*, **2012**, *5*, 1369-1379; b) A. Alcántara, P. Domínguez de María, *Curr. Green Chem.* **2018**, *5*, 85-102.

¹¹² a) J. Chen, S. K. Spear, J. G. Huddleston, R. D. Rogers, *Green Chem.* **2005**, *7*, 64-82; b) M. L. Harrell, T. Malinski, C. Torres-López, K. Gonzalez, J. Suriboot, D. E. Bergbreiter, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 14650-14657.

¹¹³ a) C. A. Eckert, B. L. Knuston, P. G. Debenedetti, *Nature*, **1996**, *383*, 313-318; b) H. R. Hobbs, N. R. Thomas, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2786-2820.

¹¹⁴ a) Q. Zhang, K. De Oliveira Vigier, S. Royer, F. Jérôme, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 7108-7416; b) D. A. Alonso, A. Baeza, R. Chinchilla, G. Guillena, I. M. Pastor, D. J. Ramon, *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 612-632.

resultante experimenta un marcado descenso respecto al de los componentes por separado, lo que permite su utilización como disolventes (Figura 1). Generalmente, uno de los componentes es un haluro de amonio, que actúa como aceptor de enlaces de hidrógeno, y el otro es una molécula neutra donadora de enlaces de hidrógeno (ureas, ácidos carboxílicos, azúcares o polioles). De esta forma, la estructura del líquido se basa en una fuerte red de enlaces de hidrógeno en la que, en el caso de la mezcla entre cloruro de colina (ChCl) y urea (U), se ha demostrado que las interacciones se establecen sinérgicamente entre el anión y el donador de enlaces de hidrógeno y también con el grupo hidroxilo de la colina, formando complejas estructuras tipo sándwich.¹¹⁵

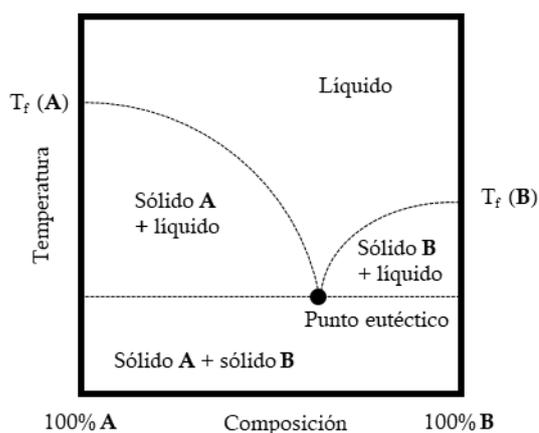


Figura 1. Diagrama de fases de una mezcla binaria (cuyos componentes son A y B) que presenta un punto eutéctico.

Una de las principales ventajas de este tipo de disolventes es que sus componentes pueden ser de origen natural (NADES: *natural deep eutectic solvents*), lo que les dota de unas excelentes características en el contexto de los disolventes verdes por su obtención a partir fuentes renovables, su biocompatibilidad y biodegradabilidad, su baja volatilidad y la posibilidad de ser reciclados.¹¹⁶ Por otro lado, presentan unas características propiedades físico-químicas, como su viscosidad, conductividad, polaridad o poder solubilizante, que los convierten en una clase de disolvente muy interesante en distintas aplicaciones de procesos

¹¹⁵ O. S. Hammond, D. T. Brown, K. J. Edler, *Green Chem.* **2016**, *18*, 2736-2744.

¹¹⁶ a) Y. Liu, J. B. Friesen, J. B. McAlpine, D. C. Lankin, S.-N. Chen, G. F. Pauli, *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 679-690; b) H. Vanda, Y. Dai, E. G. Wilson, R. Verpoorte, Y. H. Choi, *Compte Rendus Chimie*, **2018**, *21*, 628-638.

químicos, además de en síntesis orgánica. Por ejemplo, se han empleado ampliamente como medios de extracción de muy variadas moléculas de interés¹¹⁷ y en métodos analíticos,¹¹⁸ o en biotecnología y bioingeniería, en la preservación de materiales biológicos y en nanomedicina.¹¹⁹

2.1.1. Aplicación en síntesis orgánica

Las propiedades de los DES no solo han permitido su utilización como sustitutivos sostenibles de disolventes orgánicos clásicos en distintas reacciones organometálicas,¹²⁰ como cicloisomerizaciones catalizadas por Au(I)¹²¹ o cicloadiciones 1,3-dipolares entre azidas y alquinos (reacciones *click*),¹²² sino que pueden desempeñar un papel activo en la reactividad de determinadas especies químicas.¹²³ Además, han sido empleados en reacciones organocatalíticas ácidas o básicas, donde puede actuar simultáneamente como disolvente y catalizador,¹²⁴ o bien con la adición de un organocatalizador externo para lograr procesos estereoselectivos como, por ejemplo, la L-prolina en reacciones de adición aldólica.¹²⁵

Uno de los ejemplos referentes en este campo es la adición de reactivos de Grignard u organolíticos a carbonilos bajo condiciones muy suaves de reacción (temperatura ambiente y sin necesidad de trabajar bajo atmósfera inerte) en DES formados por CHCl_3 y glicerol (Gly) o agua (Esquema 42, arriba). La reacción transcurre de forma instantánea y con completa quimioselectividad, sin

¹¹⁷ a) Y. Dai, J. van Spronsen, G. J. Witkamp, R. Verpoorte, Y. H. J. Choi, *Nat. Prod.* **2013**, *76*, 2162-2173; b) F. Pena-Pereira, J. Namieśnik, *ChemSusChem*, **2014**, *7*, 1784-1800; c) M. Ruesgas-Ramón, M. C. Figueroa-Espinoza, E. Durand, *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 3591-3601.

¹¹⁸ M. A. Fernández, J. Boiteux, M. Espino, F. J. V. Gomez, M. F. Silva, *Anal. Chim. Acta*, **2018**, *1038*, 1-10.

¹¹⁹ Y. P. Mbous, M. Hayyan, A. Hayyan, W. F. Wong, M. A. Hashim, C. Y. Looi, *Biotechnol. Adv.* **2017**, *35*, 105-145.

¹²⁰ a) J. García-Álvarez, E. Hevia, V. Capriati, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 6779-6799; b) M. Obst, B. König, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 4213-4232.

¹²¹ a) M. J. Rodríguez-Álvarez, C. Vidal, J. Díez, J. García-Álvarez, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 12927-12929; b) C. Vidal, L. Merz, J. García-Álvarez, *Green Chem.* **2015**, *17*, 3870-3878.

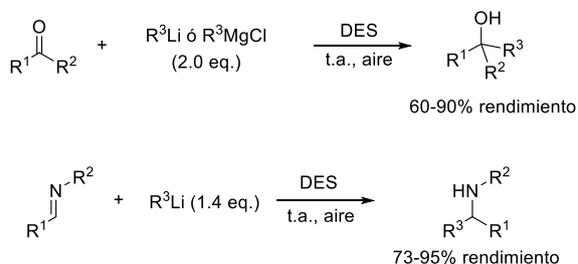
¹²² a) F. Illgen, B. König, *Green Chem.* **2009**, *11*, 848-854; b) J. Lu, X. T. Li, E. Q. Ma, L. P. Mo, Z. H. Zhang, *ChemCatChem*, **2014**, *6*, 2854-2859.

¹²³ J. García-Álvarez, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, 5147-5157.

¹²⁴ N. Guajardo, C. R. Müller, R. Schrebler, C. Carlesi, P. Domínguez de María, *ChemCatChem*, **2016**, *8*, 1020-1027.

¹²⁵ D. Brenna, E. Massolo, A. Puglisi, S. Rossi, G. Celentano, M. Benaglia, V. Capriati, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 2620-2626.

observarse los subproductos de reducción de las cetonas, que los autores atribuyen a la formación de especies aniónicas muy nucleófilas al interaccionar los compuestos organometálicos con el DES.¹²⁶ La adición de derivados organolíticos a iminas preformadas permite obtener las aminas secundarias en unas condiciones similares, con los mejores resultados en mezclas de ChCl y glicerol, medio en el que se ha observado una inusual estabilidad cinética del BuLi (Esquema 42, abajo).¹²⁷



Esquema 42. Adición de reactivos de Grignard u organolíticos a cetonas e iminas en disolventes eutécticos (ChCl:Gly o ChCl:H₂O).

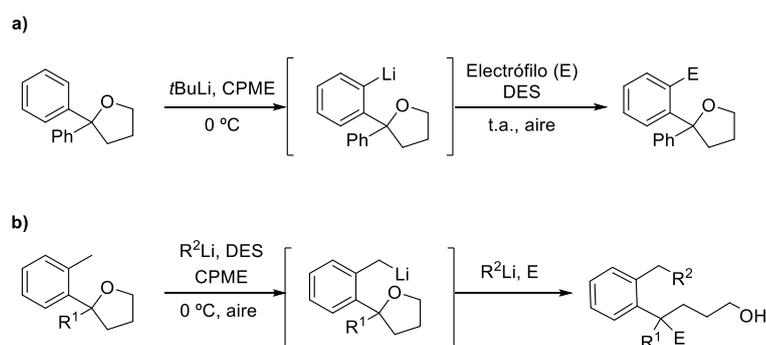
La funcionalización de diariltetrahidrofuranos a través de la *orto*-litiación dirigida por el átomo de oxígeno y la posterior sustitución nucleófila, empleando distintos reactivos electrófilos como acetona, benzofenona o DMF, se pudo llevar a cabo en DES formados por ChCl y glicerol o urea (Esquema 43a).¹²⁸ Además, empleando derivados de *orto*-toliltetrahidrofurano se ha observado una novedosa reactividad como resultado de la litiación lateral dirigida, que da lugar a una apertura regioselectiva del heterociclo y la formación de un nuevo enlace C-C en la posición bencílica con un segundo equivalente de la base que, adicionalmente, permite introducir un electrófilo en el carbono terciario (Esquema 43b).¹²⁹

¹²⁶ C. Vidal, J. García-Álvarez, A. Hernán-Gómez, A. R. Kennedy, E. Hevia, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5969-5973.

¹²⁷ C. Vidal, J. García-Álvarez, A. Hernán-Gómez, A. R. Kennedy, E. Hevia, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 16145-16148.

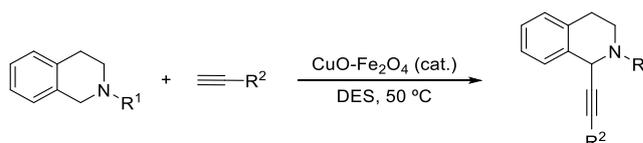
¹²⁸ V. Mallardo, R. Rizzi, F. C. Sassone, R. Mansueto, F. M. Perna, A. Salomone, V. Capriati, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 8655-8658.

¹²⁹ F. C. Sassone, F. M. Perna, A. Salomone, S. Florio, V. Capriati, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 9459-9462.



Esquema 43. Funcionalización de derivados de ariltetrahidrofurano a partir de reacciones de *ortho*-litiación en DES.

Otro ejemplo de la aplicación en procesos sostenibles es la activación C-H en la posición α al nitrógeno de diferentes tetrahidroisoquinolinas catalizada por CuO impregnado en magnetita (Esquema 44). En este caso, el uso del DES resultó indispensable para alcanzar buenos rendimientos y quimioselectividades hacia los productos de acoplamiento buscados, encontrando una correlación entre la conductividad del disolvente y la formación del aducto de adición nucleófila. Además, permitió el reciclaje del sistema catalítico junto con el disolvente sin observar pérdida de la actividad tras 10 ciclos.¹³⁰



Esquema 44. Síntesis de tetrahidroisoquinolinas mediante activación C-H catalizada por Cu(II) en DES.

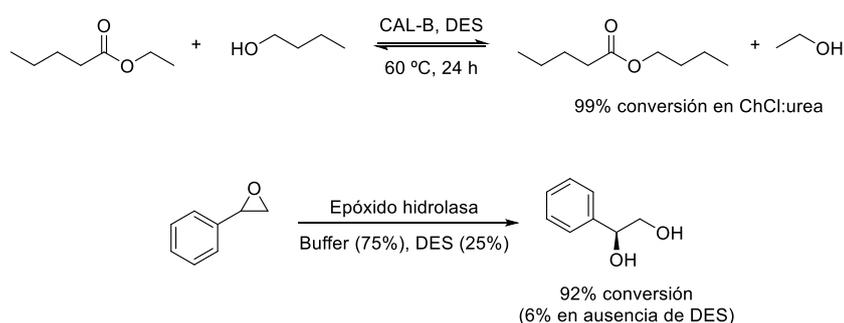
2.1.2. DES en Biocatálisis

En el ámbito de la Biocatálisis, los DES basados en colina también han encontrado un importante campo de aplicación y se han descrito numerosos ejemplos donde se utilizan estos disolventes en transformaciones sintéticas catalizadas por enzimas aisladas o células enteras.¹³¹ Las hidrolasas son la clase

¹³⁰ X. Marse, J. M. Pérez, D. J. Ramón, *Green Chem.* **2016**, *18*, 826-833.

¹³¹ a) R. A. Sheldon, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 12984-12999; b) P. Xu, G.-W. Zheng, M.-H. Zong, N. Li, W.-Y. Lou, *Bioresour. Bioprocess.* **2017**, *4*, 34-52; c) V. Gotor-Fernández, C. E. Paul, *J. Biotechnol.* **2019**, *293*, 24-35.

de enzimas más estudiadas en estos medios¹³² donde, en un estudio pionero, Kazlauskas y colaboradores demostraron la actividad de las lipasas en reacciones de transesterificación (Esquema 45, arriba) y aminólisis en diferentes DES, así como la eficiencia de las epóxido hidrolasas en mezclas de DES y disoluciones acuosas (Esquema 45, abajo).¹³³ Sorprendentemente, se observó una elevada estabilidad de las enzimas en disolventes eutécticos formados por urea y, a través de estudios de dinámica molecular, se ha concluido que los enlaces de hidrógeno entre los componentes del DES impiden que la urea difunda al interior de la proteína y, además, las interacciones entre el disolvente y los aminoácidos de la superficie repercuten en una mayor estabilidad de la enzima.¹³⁴



Esquema 45. Primeros ejemplos de reacciones catalizadas por hidrolasas en DES.

Desde entonces, han sido empleadas en distintos procesos de resolución cinética catalizados por lipasas, en la obtención de biodiésel mediante reacciones de transesterificación¹³⁵ o en la formación de enlaces peptídicos catalizada por proteasas (Esquema 46), donde las elevadas concentraciones de sustrato admitidas han permitido alcanzar valores de productividad de 20 g L⁻¹ h⁻¹.¹³⁶

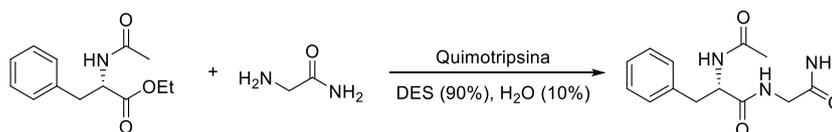
¹³² E. Durand, J. Lecomte, P. Villeneuve, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2013**, *115*, 379-385.

¹³³ J. T. Gorke, F. Srienc, R. J. Kazlauskas, *Chem. Commun.* **2008**, 1235-1237

¹³⁴ H. Monhemi, M. R. Housaindokht, A. A. Moosavi-Movahedi, M. R. Bozorgmehr, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 14882-14895.

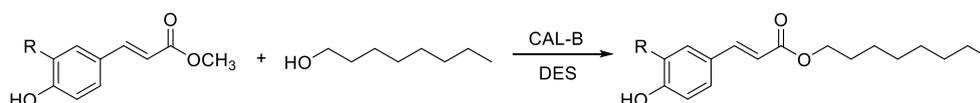
¹³⁵ H. Zhao, G. A. Baker, S. Holmes, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1908-1916.

¹³⁶ Z. Maugeri, W. Leitner, P. Domínguez de María, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 4223-4228.



Esquema 46. Síntesis de péptidos catalizada por una proteasa.

Gracias a la capacidad de los DES de disolver sustratos con distintas polaridades, se han empleado en reacciones de lipofilización de compuestos fenólicos catalizadas por CAL-B, estudiando en profundidad el efecto de pequeños porcentajes de agua en el rendimiento y la selectividad de la reacción.¹³⁷



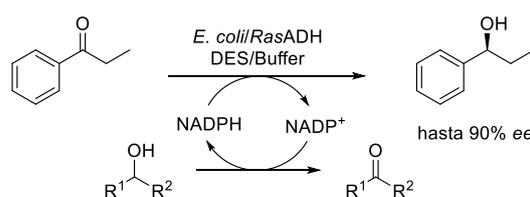
Esquema 47. Alcohólisis de *p*-cumarato de metilo (R = H) y ferulato de metilo (R = OMe).

Por otro lado, se ha estudiado el comportamiento de diversas oxidorreductasas en disolventes formados por mezclas de disolventes eutécticos y disoluciones acuosas.^{131c} Cabe destacar dentro de estas transformaciones las reacciones de biorreducción, donde se han observado cambios en la estereoselectividad de los procesos en función de la cantidad de DES utilizada cuando se emplean células enteras como biocatalizadores. Inicialmente, se describió la reducción de acetoacetato de etilo con levadura de panadería en mezclas de ChCl:glicerol y agua, en la que tiene lugar una completa inversión de la configuración del centro quiral en el alcohol obtenido cuando se varía la proporción de los componentes del medio. Mientras que en medio puramente acuoso se obtiene el producto *S* con un 95% *ee*, cuando se incrementa la proporción del DES se invierte progresivamente la enantioselectividad, generando la mezcla racémica a un volumen de DES del 30% hasta alcanzar, a volúmenes superiores al 80%, un exceso enantiómero del 95% del enantiómero de configuración *R*. Sin embargo, en este último caso la actividad del biocatalizador disminuía notablemente, por lo que los autores proponen como

¹³⁷ E. Durand, J. Lecomte, B. Barea, E. Dubreucq, R. Lortie, P. Villeneuve, *Green Chem.* **2013**, *15*, 2275-2282.

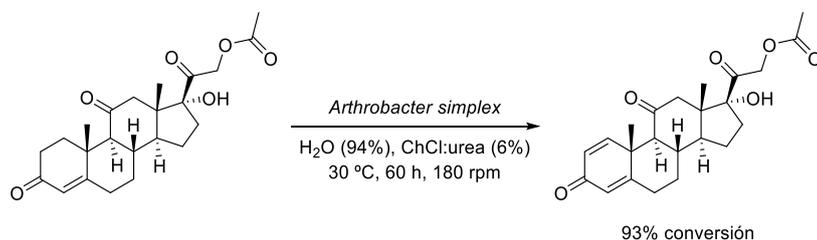
una posible explicación que no todas las ADHs presentes en la levadura son activas en este medio y que, en este caso, únicamente actúan las (*R*)-selectivas.¹³⁸

Al utilizar células recombinantes de *E. coli* con una ADH sobreexpresada, se evidenció la necesidad de utilizar pequeños porcentajes de agua como aditivo para que las enzimas retuviesen su actividad. De nuevo, el efecto más importante fue sobre la estereoselectividad ya que utilizando la ADH de *Ralstonia* sp. (*RasADH*) se consiguió reducir con elevada enantioselectividad distintos sustratos sobre los que la enzima no presenta enantiodiscriminación en su medio natural, evidenciando así una clara influencia del DES sobre la estructura de la proteína (Esquema 48).



Esquema 48. Reducción de propiofenona catalizada por la *RasADH* en mezclas de disoluciones acuosas y DES.

Desde un punto de vista industrial, la utilización del DES ChCl:urea como cosolvente ha permitido una mayor solubilidad en la biodeshidrogenación del acetato de cortisona catalizada por células enteras de *Arthrobacter simplex* (Esquema 49), permitiendo operar a mayores concentraciones del sustrato (5 g L⁻¹) y mejorando, además, la reciclabilidad del biocatalizador inmovilizado.¹³⁹

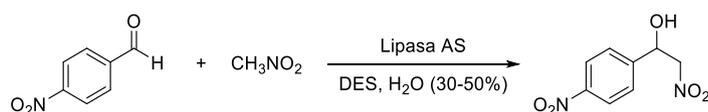


Esquema 49. Biosíntesis de un esteroide con propiedades farmacológicas utilizando un DES como cosolvente.

¹³⁸ Z. Maugeri, P. Domínguez de María, *ChemCatChem*, **2014**, *6*, 1535-1537.

¹³⁹ S. Mao, L. Yu, S. Ji, X. Liu, F. Lu, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2016**, *91*, 1099-1104.

En el contexto de la promiscuidad catalítica, la lipasa de *Rhizopus oryzae* se ha utilizado en ChCl:urea en la reacción multicomponente de Bignelli para sintetizar 3,4-dihidropirimidin-2(1H)-onas, donde la enzima muestra una actividad ligeramente superior a la exhibida por aminoácidos como histidina o prolina.¹⁴⁰ Recientemente, se ha estudiado la reacción de Henry entre derivados de benzaldehído y nitrometano en mezclas de DES y agua catalizada por la lipasa de *Aspergillus niger* (lipasa AS, Esquema 50). La selección del medio de reacción resultó determinante para conseguir una catálisis efectiva ya que, por un lado, el uso de DES permitió una mayor actividad catalítica de la enzima, pero, por otro, en ausencia de agua se forman cantidades significativas del producto por mediación del DES. Las condiciones óptimas se encontraron empleando la mezcla ChCl:glicerol y una cantidad de agua del 30-50%, con las que se alcanzan conversiones superiores al 90% y se minimiza la reacción de fondo (<5%). La formación de enlaces de hidrógeno entre el disolvente y la enzima provoca ligeros cambios en su conformación tridimensional, que han sido detectados mediante espectroscopía de fluorescencia, y permiten una mayor actividad catalítica cuando el DES y el agua se encuentran en una proporción adecuada.¹⁴¹



Esquema 50. Reacción de Henry catalizada por una lipasa en DES.

¹⁴⁰ B. N. Borse, V. S. Borude, S. R. Shukla, *Curr. Chem. Lett.* **2012**, *1*, 59-68.

¹⁴¹ X. Tian, S. Zhang, L. Zheng, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *26*, 80-88.

OBJETIVOS

La creciente importancia de los DES y otros disolventes sostenibles en rutas sintéticas, y concretamente en el ámbito de la Biocatálisis, requiere un pormenorizado estudio del comportamiento de las enzimas en estos medios neotéricos. La promiscuidad catalítica de las hidrolasas es uno de los fenómenos menos estudiados en estos disolventes, por lo que nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- Estudiar la actividad de las hidrolasas en distintos DES en reacciones de formación de enlaces C-N a través de adiciones de Michael de aminas a compuestos α,β -insaturados.
- Explorar la reacción de adición aldólica de cetonas a aldehídos no enolizables catalizada por hidrolasas en DES.
- Realizar una optimización de las condiciones de la reacción promiscua modelo entre 4-nitrobenzaldehído y acetona, considerando distintos parámetros que afectan a la catálisis enzimática como la temperatura, la concentración de los sustratos o la adición de agua como aditivo.
- Extender el estudio de la reacción aldólica entre diversos benzaldehídos y cetonas alifáticas que permitan generalizar la metodología enzimática desarrollada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Basándonos en estudios previos donde se ha mostrado la eficacia catalítica de distintas hidrolasas en reacciones promiscuas de formación de enlaces C-C y C-N, nos planteamos examinar la actividad de esta clase de biocatalizadores, y concretamente de las lipasas, en reacciones aza-Michael o adiciones aldólicas en DES.¹⁴²

Como medio de reacción, se seleccionaron mezclas compuestas por cloruro de colina, como aceptor de enlaces de hidrógeno, y distintos compuestos naturales de bajo peso molecular como donadores de enlaces de hidrógeno en proporciones molares variables (urea -U-, glicerol -Gly- o etilenglicol -EG-). Estas mezclas eutécticas poseen un punto de fusión inferior a 30 °C, lo que permite su utilización como disolventes en las reacciones enzimáticas, además de presentar viscosidades variables en función de su naturaleza y la proporción de sus componentes (**DES1-4**, Figura 2).

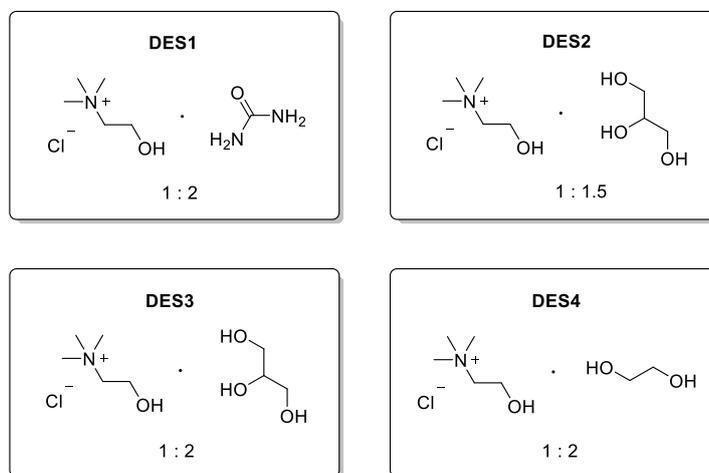


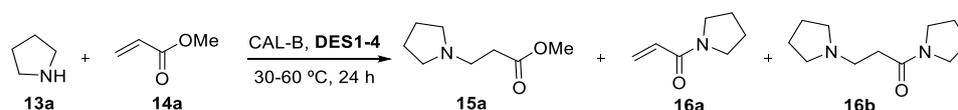
Figura 2. Mezclas eutécticas seleccionadas para este estudio enzimático: **DES1** (ChCl:U, 1:2 mol/mol), **DES2** (ChCl:Gly, 1:1.5 mol/mol), **DES3** (ChCl:Gly, 1:2 mol/mol) y **DES4** (ChCl:EG, 1:2 mol/mol).

¹⁴² M. López-Iglesias, E. Busto, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 2345-2353.

2.2. Reacción aza-Michael

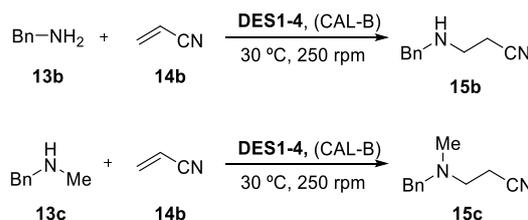
En primer lugar, se estudió la actividad promiscua de distintas enzimas en DES para formar enlaces C-N a través de la adición conjugada de distintas aminas primarias o secundarias (pirrolidina, bencilamina y *N,N*-metilbencilamina, **13a-c**) a diversos sistemas α,β -insaturados (acrilato de metilo, acrilonitrilo y crotonato de metilo, **14a-c**).

Cuando se utilizó como electrófilo el acrilato de metilo (**14a**) se observó la formación de mezclas de productos correspondientes al de adición aza-Michael **15a**, el de aminólisis **16a** y el resultante de la doble reacción de aminólisis y aza-Michael **16b** (Esquema 51). Por otro lado, las pruebas de control llevadas a cabo en ausencia de lipasa mostraron la formación del aducto de adición aza-Michael **15a**, sin observarse los productos relacionados con el proceso de aminólisis.



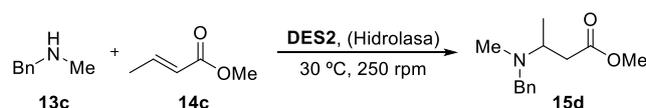
Esquema 51. Adición de pirrolidina a acrilato de metilo catalizada por CAL-B.

Explorando otras reacciones donde no se produjese la reacción paralela de aminólisis, se utilizó acrilonitrilo (**14b**) como electrófilo y aminas primarias o secundarias como nucleófilos (Esquema 52). En estos casos, se obtuvo como único producto el aducto de adición 1,4 pero se alcanzaron conversiones equivalentes para los procesos en presencia de CAL-B o en ausencia de esta enzima. Se observó una velocidad de reacción más elevada al utilizar los DES que en otros disolventes orgánicos polares no próticos convencionales, con una desaparición total de los productos de reacción en tiempos inferiores a 1 h cuando se utilizó la bencilamina (**13b**) como nucleófilo.



Esquema 52. Adiciones de bencilaminas a acrilonitrilo en DES.

Por último, se estudió la posible actividad catalítica de otras hidrolasas en la reacción de Michael entre *N,N*-metilbencilamina y crotonato de metilo en el **DES2** (Esquema 53). Además de la CAL-B, se probaron las lipasas CAL-A, PSL-IM, PPL y TL-IM, así como la proteasa de *Bacillus licheniformis* (Alcalasa-CLEA), la papaína de *Carica papaya*, la penicilina G amidasa y la acilasa I de *Aspergillus melleus*. Sin embargo, la monitorización de las reacciones mediante CG mostró una nula actividad catalítica enzimática hacia la formación de enlaces C-N en este medio de reacción, observando la misma cinética química en la prueba de control en ausencia de biocatalizador. Por ello, en este punto, se decidieron focalizar los esfuerzos al estudio de reacciones aldólicas catalizadas por hidrolasas.



Esquema 53. Adición de *N,N*-metilbencilamina a crotonato de metilo en DES.

2.3. Reacción aldólica

La promiscuidad catalítica de las hidrolasas para formar enlaces C-C en DES se estudió con la adición aldólica de cetonas a aldehídos, seleccionando las lipasas CAL-B y PPL y la proteasa Alcalasa-CLEA, ya que todas ellas han demostrado previamente su actividad biocatalítica promiscua en la formación de los productos aldólicos.⁶⁶

Se eligió como reacción modelo de este estudio el proceso entre el 4-nitrobenzaldehído (**17a**, 0.1 M) y la acetona (**18**, 5 equivalentes) en un DES formado por ChCl y glicerol (**DES2**, relación molar 1:1.5), incubando las reacciones durante 24 h en un agitador orbital a 250 rpm y a diferentes temperaturas (Figura 3). El análisis de las reacciones se realizó mediante RMN-¹H del crudo de reacción obtenido tras un proceso extracción con un disolvente orgánico, como el acetato de etilo, que permitió separar el aducto de adición

aldólica **19a** y el 4-nitrobenzaldehído (**17a**) de partida de la mezcla formada por el DES y el biocatalizador.¹⁴³

En este caso, no se detectó la formación del producto **19a** en ninguna de las reacciones de control en ausencia de enzima, como tampoco ocurrió con las pruebas realizadas con la CAL-B. Sin embargo, la Alcalasa-CLEA catalizó la formación de un 16% del producto a 60 °C, mientras que la PPL mostró actividad catalítica a 30, 45 y 60 °C, alcanzando una prometedora conversión del 36% a la temperatura más alta.

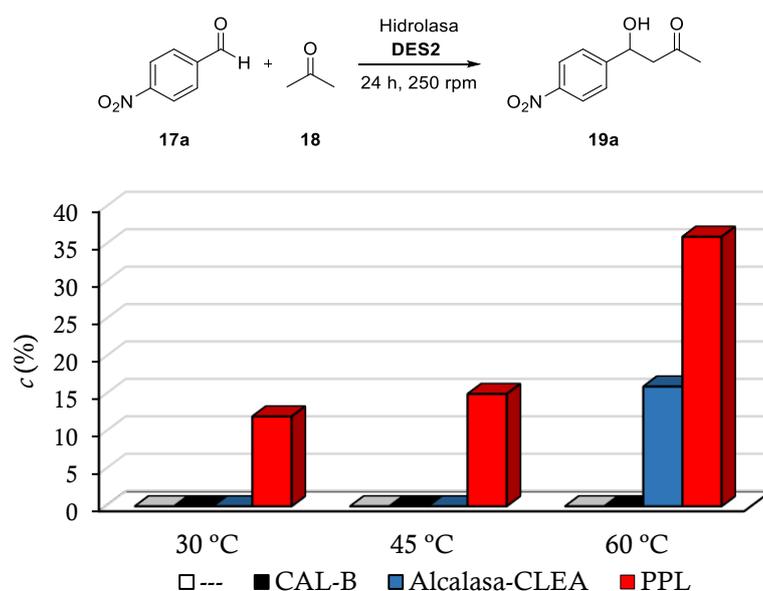


Figura 3. Reacciones aldólicas entre **17a** y **18** en el **DES2**: en ausencia de enzima (blanco), con CAL-B (1:1 peso, negro), PPL (1:1 peso, azul) y Alcalasa-CLEA (2:1 peso, rojo).

2.3.1. Optimización de la reacción aldólica modelo

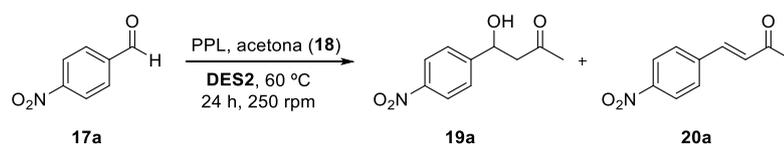
Antes de realizar una optimización de los parámetros de reacción, se evaluó el funcionamiento del proceso utilizando mezclas eutécticas compuestas por otros donadores de enlaces de hidrógeno distintos al glicerol. Así, por un lado, en las condiciones de reacción mostradas en la Figura 3 a 60 °C con la PPL,

¹⁴³ En estas reacciones la medida de las conversiones por CG resultó inviable al tener lugar el proceso retro-aldólico a la temperatura de análisis del detector.

utilizando la mezcla de ChCl:U (**DES1**), pese a observarse analíticamente una conversión cuantitativa, se obtuvo un bajo rendimiento debido a una ineficaz extracción de los productos del medio de reacción. Por otro lado, la mezcla ChCl:EG (**DES4**) permitió obtener el aducto **19a** con un 50% de conversión, pero parte del etilenglicol del DES se extraía en la capa orgánica, por lo que se decidió continuar el estudio con los DES compuestos por glicerol (**DES2** y **DES3**).

Un incremento de la concentración de los sustratos produjo una importante mejora en los valores de conversión alcanzados (Tabla 10), logrando un 90% cuando se trabaja a concentración 1.0 M del aldehído **17a** (entrada 3) y donde, de nuevo, la prueba en ausencia de enzima mostró una nula transformación de los productos de partida (entrada 4). Cabe mencionar que el producto resultante de la adición aldólica y posterior deshidratación **20a** (aducto de condensación aldólica) se detectó en todas las pruebas como producto minoritario.

Tabla 10. Influencia de la concentración de sustratos en la reacción modelo entre 4-nitrobenzaldehído y acetona en el **DES2** tras 2 h a 60 °C y 250 rpm.

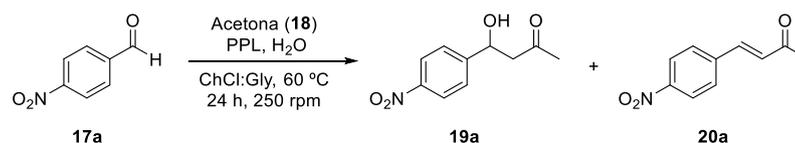


Entrada	PPL/17a ^a	[17a] (M)	c (%) ^b	19a/20a ^b
1	1:1	0.1	36	5:1
2	1:1	0.5	71	6:1
3	1:1	1.0	90	4.5:1
4	0:1	1.0	<3	-

Condiciones de reacción: 4-nitrobenzaldehído (**17a**), acetona (**18**, 5 equivalentes), PPL (1:1 peso) en ChCl:Gly (1:1.5 mol/mol, 1.0 mL) a 60 °C durante 24 h a 250 rpm. ^a Relación enzima/sustrato en peso; ^b conversiones medidas mediante RMN-¹H del crudo de reacción.

Con el fin de dotar a la enzima de una mayor estabilidad se adicionaron pequeñas cantidades de agua al medio de reacción (Tabla 11), consiguiendo un aumento en las conversiones desde un 90% en ausencia de agua (entrada 1) hasta una conversión completa con un 20% (v/v) empleando tanto el **DES2** como el **DES3** (entradas 2 y 3), y sin observar ninguna reactividad en estas condiciones pero en ausencia de PPL (entrada 4).

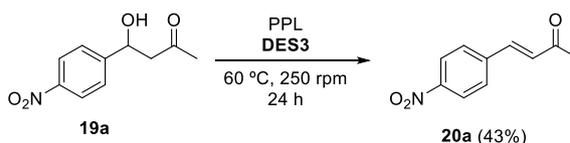
Tabla 11. Optimización de la reacción modelo entre 4-nitrobenzaldehído y acetona.



Entrada	PPL/17a ^a	T (°C)	DES	18 (eq)	H ₂ O (%) ^b	c (%) ^c	19a/20a ^c
1	1:1	60	DES2	5	0	90	4.5:1
2	1:1	60	DES2	5	20	>97	6:1
3	1:1	60	DES3	5	20	>97	6:1
4	0:1	60	DES3	5	20	<3	-
5	1:2	60	DES2	5	20	80	10:1
6	1:2	60	DES3	5	20	82	11:1
7	1:2	60	DES3	5	5	80	10:1
8	1.5:2	60	DES3	5	5	89	6:1
9	1:1	60	DES3	5	5	>97	6:1
10	1:1	30	DES3	5	5	77	12:1
11	1:2	60	DES3	2.5	5	54	6.5:1
12	1:2	60	DES3	1	5	25	6:1
13 ^d	1:1	60	DES3	5	5	9	3:1
14	1:2	60	Tolueno	5	0	8	5.5:1

Condiciones de reacción: 17a (1.0 mmol, 151 mg), acetona (18, 5 equivalentes), PPL en ChCl:Gly (1.0 mL) a 60 °C durante 24 h a 250 rpm. ^a Relación enzima/sustrato en peso; ^b porcentaje en volumen de agua en el medio de reacción; ^c conversiones medidas mediante RMN-¹H del crudo de reacción; ^d reacción a 30 °C; ^d enzima inhibida mediante pretratamiento con PMSF durante 16 h a 30 °C.

Al reducir a la mitad la carga de enzima, las conversiones alcanzadas se mantuvieron en un 80% pero, de forma interesante, se observó una menor formación del producto de condensación aldólica 20a (entradas 5-7), lo cual parecía indicar una cierta influencia del biocatalizador en el proceso de deshidratación. Esto se constató con un experimento en el que se incubó el producto 19a aislado con la PPL observando la formación del aducto de deshidratación 20a en un 43% de conversión, mientras que solo se detectaron trazas de este en la prueba en ausencia de enzima (Esquema 54).



Esquema 54. Promiscuidad catalítica en la deshidratación del aldol.

Como era esperable, un descenso en la temperatura de reacción repercutió en una mayor producción del aducto **19a** frente a **20a** (entrada 10). Por otro lado, el uso de un exceso de acetona (5 equivalentes) resultó indispensable para alcanzar conversiones cuantitativas, ya que con 1 o 2.5 equivalentes las conversiones fueron moderadas (entradas 11 y 12). Las pruebas de control realizadas siguieron mostrando una nula reactividad en ausencia del enzima en las condiciones óptimas halladas y, además, se constató que se trataba de una catálisis específica ya que cuando se utilizó la PPL inhibida previamente por tratamiento con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) se observó una conversión inferior al 10% (entrada 13). Por último, se investigó la influencia del DES en la eficiencia del proceso, llevando a cabo la reacción enzimática en las condiciones optimizadas pero, en este caso, en un disolvente orgánico poco polar y muy empleado con lipasas, como es el tolueno, en el cual la PPL tan solo catalizó la formación de un 8% de los productos (entrada 14).

Ya que el proceso operaba óptimamente a concentraciones excepcionalmente altas para reacciones enzimáticas, se llevó a cabo un estudio incrementando las concentraciones de aldehído desde 1 M hasta 6 M en DES, alcanzando conversiones superiores al 75% en todos los casos (Figura 4). Los valores se mantuvieron en su máximo hasta una concentración de 2 M del sustrato **17a**, a partir de la cual se produjo un ligero descenso, aunque la actividad relativa del enzima se mantuvo por encima del 85%. A partir de una concentración 5 M de aldehído se observa un leve repunte que puede atribuirse al elevado volumen de acetona (aproximadamente el doble que el del DES en el experimento a concentración 6 M), ya que el valor de conversión hallado en la prueba de control sin emplear disolvente fue de un 53% que, aun así, es menor del observado a concentraciones tan elevadas donde el DES sigue manteniendo un efecto positivo en el proceso.

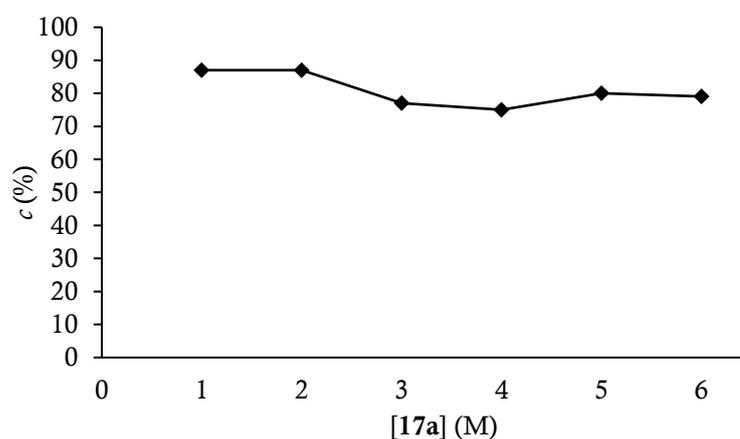


Figura 4. Reacción aldólica a diferentes concentraciones de 4-nitrobenzaldehído (**17a**, 1.0-6.0 M) con acetona (5 eq) catalizada por la PPL (1:2 en relación de peso enzima/sustrato) en **DES3** con un 5% v/v de agua durante 24 h a 250 rpm y 60 °C.

Por último, debido a la viscosidad de los DES, se consideró la importancia que pudiera tener en el proceso el tipo y la velocidad de agitación utilizada (Figura 5). La incubación de las reacciones en un agitador orbital mostró ser superior a la agitación magnética, siempre y cuando se mantuvieran unos niveles de velocidad de rotación moderados, con una máxima conversión del 87% y una relación de productos de 8:1 en la formación de **19a** y **20a** en la reacción llevada a cabo en el **DES3** a 300 rpm.

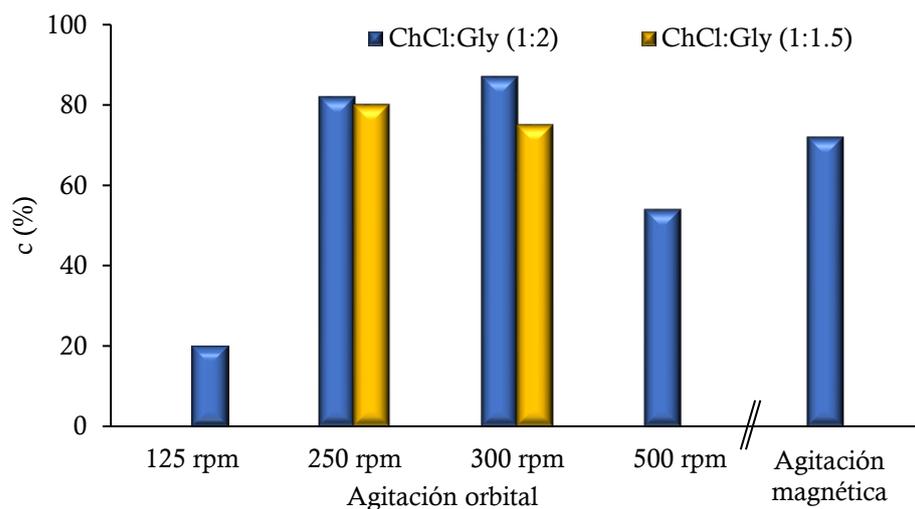
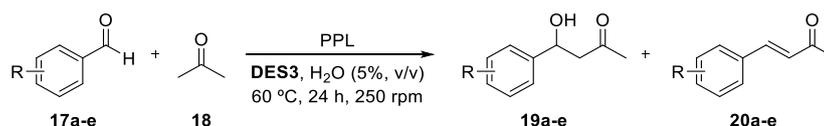


Figura 5. Efecto de diferentes tipos de agitación en la reacción aldólica entre **17a** y acetona (5 eq) catalizada por la PPL (1:2 en peso) en **DES2** (naranja) y **DES3** (azul) con un 5% de agua (v/v) durante 24 h a 60 °C.

2.3.2. Reacción aldólica entre derivados de benzaldehído y acetona. Influencia del electrófilo

Una vez identificadas las condiciones óptimas de reacción, se exploró la extensión y generalización de esta reacción promiscua de adición aldólica catalizada por PPL, considerando la reactividad entre acetona y benzaldehídos con diversas sustituciones en el anillo aromático (Tabla 12). Las transformaciones transcurrieron con conversiones cuantitativas en casi todos los casos, observando que las proporciones entre los aldoles **19a-e** y los productos de condensación **20a-e** dependían del poder electrotractor del anillo aromático. Con un grupo nitro en posición *orto* la relación era análoga a la hallada en la reacción modelo con *para*-nitrobenzaldehído (entradas 1 y 3) pero, en cambio, cuando este se encontraba en posición *meta* se observó un considerable aumento de la proporción del compuesto deshidratado **20b** (entrada 2). Con otros sustituyentes aceptores más débiles como el ciano y el trifluorometilo en posición *para*, la proporción del aducto de condensación aldólica también experimentó un importante aumento (entradas 4 y 5).

Tabla 12. Reacción aldólica entre los derivados de benzaldehído **17a-e** y acetona catalizada por PPL en ChCl:Gly (1:2).



Entrada	R	<i>c</i> (%) ^a	19/20 ^{a,b}
1	4-NO ₂ (17a)	>97	6:1 (99)
2	3-NO ₂ (17b)	>97	3:1 (99)
3	2-NO ₂ (17c)	>97	6:1 (99)
4	4-CN (17d)	>97	3.5:1 (92)
5	4-CF ₃ (17e)	96	2:1 (72)

Condiciones de reacción: **17a-e** (1.0 mmol), acetona (**18**, 5 equivalentes, 368 μ L), PPL (relación 1:1 en peso de enzima/sustrato) en ChCl:Gly (1:2 mol/mol, 1.0 mL) con un 5% de agua (50 μ L) a 60 $^\circ$ C durante 24 h a 250 rpm. ^a Conversiones medidas mediante RMN-¹H del crudo de reacción; ^b entre paréntesis rendimientos de los productos aislados por extracción con AcOEt.

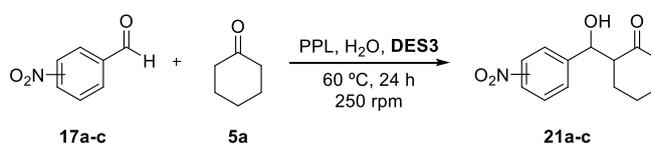
Desafortunadamente, la estrategia enzimática no resultó adecuada para otros sustratos como el benzaldehído (**17f**) y el 2-cianobenzaldehído (**17g**), que no se muestran en la tabla anterior. En el primer caso, se obtuvieron mezclas complejas de productos, además de una menor reactividad, y, en el segundo, se observó la desaparición completa del aldehído pero dando lugar a reacciones secundarias de polimerización sin detectarse los productos esperados.

2.3.3. Reacción aldólica entre derivados de benzaldehído y cetonas cíclicas alifáticas. Influencia del nucleófilo

Finalmente, se estudió la actividad de la PPL para catalizar la adición aldólica entre los benzaldehídos **17a-e** y las cetonas cíclicas ciclopentanona (**3a**) y ciclohexanona (**5a**) como nucleófilos para poder generalizar la metodología desarrollada. En primer lugar, se eligió la ciclohexanona (**5a**) que se hizo reaccionar con el 4-nitrobenzaldehído (**17a**, Tabla 13). Con tan solo un ligero exceso de 1.1 equivalentes de la cetona y una carga de enzima de 1:2 en peso (enzima/**17a**), se alcanzaron conversiones muy elevadas, con una mínima mejora al añadir pequeños volúmenes de agua (5-20% v/v, entradas 1-6). Los dos posibles productos diastereoméricos del aldol **21a** se obtuvieron de forma prácticamente equimolar y no se detectó el aducto de deshidratación. En términos del patrón de sustitución del sustrato (entradas 7-9), la reactividad

observada fue similar con el derivado nitrado en posición *meta* (**17b**) y resultó inferior cuando el sustituyente estaba situado en posición *orto* (**17c**).

Tabla 13. Reacción aldólica catalizada por PPL entre nitrobenzaldehídos (**17a-c**, 1.0 M) y ciclohexanona (**5a**) en el **DES3**.

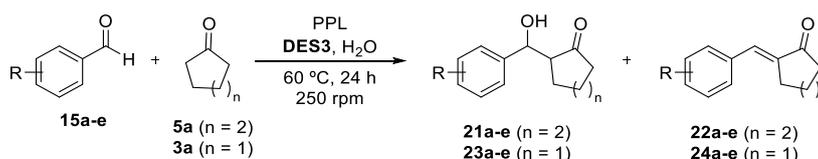


Entrada	Aldehído	PPL/17 ^a	5a (M)	H ₂ O (%) ^b	c (%) ^c	rd (%) ^{c,d}
1		0:1	1.1	0	<3	---
2		1:2	1.1	0	82	56:44
3	17a	1:2	1.1	5	86	54:46
4		1:2	1.1	10	87	54:46
5		1:2	1.1	15	87	53:47
6		1:2	1.1	20	87	53:47
7		17a	1:1	1.1	5	92
8	17b	1:1	1.1	5	88	57:43
9	17c	1:1	1.1	5	70	52:48
10	17a	1:1	2.0	5	>97	55:45

Condiciones de reacción: **17a-c** (1.0 mmol), ciclohexanona (**5a**), PPL en ChCl:Gly (1:2 mol/mol, 1.0 mL) a 60 °C durante 24 h a 250 rpm. ^a Relación enzima/sustrato en peso; ^b porcentaje en volumen de agua en el medio de reacción; ^c medidos mediante RMN-¹H del crudo de reacción; ^d relación diastereomérica *syn/anti*.

Para conseguir conversiones completas se incrementó la cantidad de ciclohexanona hasta los dos equivalentes (entrada 10) y estas condiciones se implementaron para las reacciones entre los derivados de benzaldehído **17a-e** con ciclohexanona (**5a**) y ciclopentanona (**3a**) que se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Reacción aldólica catalizada por PPL entre derivados de benzaldehído (**15a-e**, 1.0 M) y ciclohexanona (**5a**, 2.0 M) o ciclopentanona (**3a**, 2.0 M) en ChCl:Gly.



Entrada	Aldehído	Cetona	<i>c</i> (%) ^{a,b}	<i>rd</i> (%) ^{a,c}	22,24 (%) ^a
1	17a (R = 4-NO ₂)	5a	>97 (89)	55:45	<3
2		3a	>97 (93)	55:45	3
3	17b (R = 3-NO ₂)	5a	>97 (91)	62:38	7
4		3a	>97 (99)	57:43	13
5	17c (R = 2-NO ₂)	5a	70	53:47	<3
6		3a	55	53:47	<3
7	17d (R = 4-CN)	5a	>97 (96)	57:43	<3
8		3a	>97 (99)	57:43	11
9	17e (R = 4-CF ₃)	5a	>97 (99)	52:48	<3
10		3a	>97 (98)	55:45	20 ^d

Condiciones de reacción: **17a-c** (1.0 mmol), ciclohexanona (**5a**, 2.0 mmol, 207 μL) o ciclopentanona (**3a**, 2.0 mmol, 177 μL), PPL (1:1 en peso) en ChCl:Gly (1:2 mol/mol, 1.0 mL) a 60 $^\circ\text{C}$ durante 24 h a 250 rpm. ^a Conversiones medidas mediante RMN-¹H del crudo de reacción, ^b entre paréntesis rendimientos de los productos aislados tras extracción líquido-líquido; ^c relaciones diastereoméricas *syn/anti* del aldol **21** o **23**; ^d más un 8% del producto de doble condensación aldólica.

Excepto en el caso del 2-nitrobenzaldehído (entradas 5 y 6), se alcanzaron conversiones cuantitativas y una eficiente recuperación de los productos del medio de reacción mediante un simple proceso de extracción líquido-líquido, obteniendo los aldoles **21a-e** y **23a-e** como productos mayoritarios y con una baja diastereoselectividad. El aducto de condensación se detectó especialmente en las reacciones entre la ciclopentanona y los benzaldehídos menos electrófilos (entradas 4, 8 y 10).

2.3.4. Estudios de reciclaje

Una potencial ventaja que presentan las estrategias enzimáticas en DES es el reciclaje conjunto del catalizador junto con el medio de reacción una vez extraídos los productos con un disolvente orgánico. Con nuestro sistema, se evaluó esta posibilidad realizando sucesivas repeticiones de la adición aldólica

de ciclohexanona a 4-nitrobenzaldehído con el mismo disolvente y la PPL contenida en este (condiciones de la Tabla 14, entrada 1). En cada ciclo, los productos fueron extraídos con AcOEt y el sistema catalítico se reutilizó inmediatamente sin ningún tratamiento adicional.

En la Figura 6 se representan las conversiones medidas en cuatro ciclos de reciclaje, donde el sistema lipasa/DES sigue siendo catalíticamente activo, si bien se observó una importante pérdida de su eficiencia. Es especialmente notable la caída de conversión alcanzada tras el primer reciclaje, casi de un 40% de la actividad de la enzima, que puede ser debido a efectos de inhibición al estar expuesta a condiciones drásticas de reacción (temperatura y concentración de sustratos/productos) durante periodos muy prolongados de tiempo. Así, a partir del segundo reciclaje la disminución de la actividad se produce de forma gradual y menos pronunciada. Es importante destacar que el biocatalizador empleado es un crudo enzimático liofilizado, sin ningún tipo de soporte por lo que posee una menor estabilidad, que resultaría imposible de reutilizar en otras condiciones.

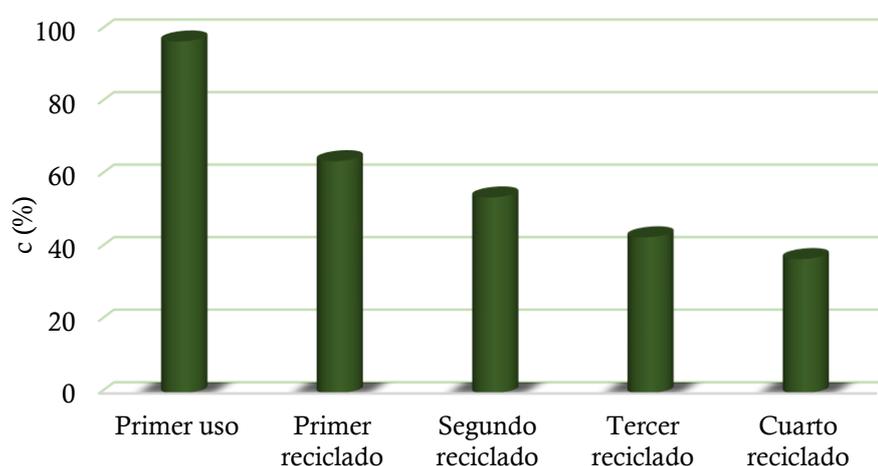


Figura 6. Estudio de reciclaje de la PPL y el **DES3** en sucesivas reacciones entre 4-nitrobenzaldehído (**17a**, 1.0 M) y ciclohexanona (**5a**, 2.0 M) con 5% de H₂O (v/v) durante 24 h a 60 °C y 250 rpm.

CONCLUSIONES

✓ Se ha estudiado el uso de distintos DES en reacciones de adición de diversas aminas primarias y secundarias a ésteres o nitrilos α,β -insaturados, observando en algunos casos conversiones significativas. Las velocidades de estas reacciones en presencia de hidrolasas no sufrieron variaciones significativas, si bien se observó como algunas enzimas como la CAL-B catalizan la formación de las amidas derivadas de las correspondientes reacciones de aminólisis.

✓ La adición aldólica en DES entre 4-nitrobenzaldehído y acetona se ha estudiado en detalle, encontrando que la lipasa PPL y la proteasa Alcalasa-CLEA han mostrado cierta actividad, lo cual no sucede en ausencia del biocatalizador.

✓ Se ha optimizado la reacción catalizada por la PPL y se han hallado unas condiciones idóneas que han permitido alcanzar conversiones completas, observando una elevada tolerancia a la concentración de sustrato (1.0-6.0 M).

✓ Por lo general, se ha observado cierta formación de los correspondientes aductos de condensación aldólica como productos minoritarios, variable según las condiciones de reacción y que son debidos a la catálisis enzimática.

✓ Las pruebas del reciclaje conjunto de disolvente y enzima muestran prometedores resultados ya que el sistema catalítico sigue siendo activo tras varios ciclos, aunque se produce una progresiva pérdida de actividad, especialmente después del primer ciclo.

✓ La metodología se ha aplicado con éxito a las reacciones entre derivados de benzaldehído con sustituyentes atractores de electrones y nucleófilos como la acetona, ciclohexanona y ciclopentanona.

PARTE EXPERIMENTAL

2.4. General

La lipasa de páncreas porcino tipo II (PPL, 30-90 U/mg) y la proteasa de *Bacillus licheniformis* (Alcalasa CLEA, 5.81 U/mg) fueron adquiridas a Sigma-Aldrich. La procedencia de los compuestos químicos y disolventes es común a lo establecido en el Capítulo 1. Las aminas utilizadas en las reacciones de adición de Michael se purificaron por destilación y se almacenaron bajo atmósfera de nitrógeno. El resto de los reactivos se utilizaron sin tratamiento adicional.

2.5. Técnicas de análisis

Las técnicas de cromatografía en gel de sílice y resonancia magnética nuclear se emplearon según se ha descrito en el Capítulo 1.

Las medidas de conversión de las reacciones aldólicas se calcularon por RMN-¹H con las integrales de las señales $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{O}$ del sustrato, $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{OH}$ del producto de adición aldólica y $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}=\underline{\text{C}}\text{H}-\text{CO}$ del aducto de deshidratación. En las reacciones con cetonas cíclicas, las medidas de las relaciones diastereotópicas se realizaron por integración de las señales de los protones contiguos al grupo hidroxilo.

2.6. Procedimientos sintéticos

2.6.1. Preparación de los DES

Una mezcla de cloruro de colina (ChCl, 50 mmol, 6.98 g) y el componente donador de enlaces de hidrógeno correspondiente en la relación molar indicada (por ejemplo, para el **DES3**: glicerol, 100 mmol, 7.30 mL) se agitan a 80 °C hasta obtener una disolución transparente. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se emplea en las reacciones enzimáticas sin purificación adicional.

2.6.2. Adición aza-Michael de pirrolidina a acrilato de metilo en DES

Se mezclan el acrilato de metilo (**14a**, 2.0 mmol, 181 μ L), el DES correspondiente (**DES1-4**, 3.0 mL) y la pirrolidina (**13a**, 2.0 mmol, 167 μ L), se añade la CAL-B (15 mg/mmol, 30 mg) y se incuba la mezcla en un agitador orbital a 250 rpm. Tras 24 h, se extrae la reacción con AcOEt (3 x 10 mL), las fases orgánicas combinadas se lavan con una disolución acuosa saturada de NaCl (25 mL), se secan con Na₂SO₄, se filtran y el disolvente se evapora a presión reducida. El crudo de reacción obtenido se analiza mediante RMN-¹H.

2.6.3. Adición aza-Michael a acrilonitrilo en DES

Se mezclan el acrilonitrilo (**14b**, 0.67 mmol, 86.5 μ L), el DES correspondiente (**DES1-4**, 1.0 mL) y la amina (**13b-c**, 0.67 mmol), se añade la CAL-B (30 mg/mmol, 20 mg) y se incuba la mezcla en un agitador orbital a 250 rpm a 30 °C. La reacción se detiene por adición de AcOEt (3 x 2 mL), las fases orgánicas combinadas se lavan con una disolución acuosa saturada de NaCl (25 mL), se secan con Na₂SO₄, se filtran y el disolvente se evapora a presión reducida. El crudo de reacción obtenido se analiza mediante RMN-¹H.

2.6.4. Adición aza-Michael a crotonato de metilo en DES

Se mezclan el crotonato de metilo (**14c**, 0.67 mmol, 86.5 μ L), el DES correspondiente (**DES1-4**, 1.0 mL) y la *N,N*-bencilmetilamina (**13c**, 0.67 mmol, 71 μ L), se añade la hidrolasa (20 mg, excepto la Alcalasa-CLEA 110 mg) y se incuba la mezcla en un agitador orbital a 250 rpm a 30 °C. La reacción se detiene por adición de AcOEt (3 x 2 mL), las fases orgánicas combinadas se lavan con una disolución acuosa saturada de NaCl (25 mL), se secan con Na₂SO₄, se filtran y el disolvente se evapora a presión reducida. El crudo de reacción obtenido se analiza mediante RMN-¹H.

2.6.5. Procedimiento general para la reacción aldólica entre 4-nitrobenzaldehído y acetona en DES

Una mezcla de 4-nitrobenzaldehído (**17a**, 1.0 mmol, 151 mg), acetona (**18**, 5.0 mmol, 368 μ L) y PPL (151 mg, 1:1 en peso) en cloruro de colina/glicerol

(**DES3**, 1:2 mol/mol, 1.0 mL) con un 5% de agua (50 μ L) se incuba en un agitador orbital a 60 °C y 250 rpm. Tras 24 h, la mezcla se extrae con AcOEt (5 x 5 mL), las fases orgánicas combinadas se lavan con una disolución acuosa saturada de NaCl (2 x 10 mL), se secan con Na₂SO₄, se filtran y el disolvente se evapora a presión reducida. La mezcla de productos aldólicos se aísla en forma de un sólido naranja y su composición se analiza mediante RMN-¹H.

2.6.6. Procedimiento general para la reacción aldólica entre derivados de benzaldehídos y acetona en DES

Una mezcla del correspondiente benzaldehído (**17a-g**, 1.0 mmol), acetona (**18**, 5.0 mmol, 368 μ L) y PPL (1:1 en peso) en ChCl:Gly (**DES3**, 1:2 mol/mol, 1.0 mL) con un 5% de agua (50 μ L) se incuba en un agitador orbital a 60 °C y 250 rpm. Tras 24 h, la mezcla se extrae con AcOEt (5 x 5 mL), las fases orgánicas combinadas se lavan con una disolución acuosa saturada de NaCl (2 x 10 mL), se secan con Na₂SO₄, se filtran y el disolvente se evapora a presión reducida, obteniendo la mezcla de productos aldólicos que se analizan mediante RMN-¹H.

2.6.7. Procedimiento general para la reacción aldólica entre derivados de benzaldehídos y cetonas cíclicas en DES

Una mezcla del correspondiente benzaldehído (**17a-g**, 1.0 mmol), PPL (1:1 en peso) y ciclohexanona (**5a**, 2.0 mmol, 207 μ L) o ciclopentanona (**3a**, 2.0 mmol, 177 μ L) en ChCl:Gly (**DES3**, 1:2 mol/mol, 1.0 mL) con un 5% de agua (50 μ L) se incuba en un agitador orbital a 60 °C y 250 rpm. Tras 24 h, la mezcla se extrae con AcOEt (5 x 5 mL), las fases orgánicas combinadas se lavan con una disolución acuosa saturada de NaCl (2 x 10 mL), se secan con Na₂SO₄, se filtran y el disolvente se evapora a presión reducida, obteniendo la mezcla de productos aldólicos que se analizan mediante RMN-¹H.

BLOQUE II

DESARROLLO DE PROCESOS
ENZIMÁTICOS EN CASCADA

INTRODUCCIÓN

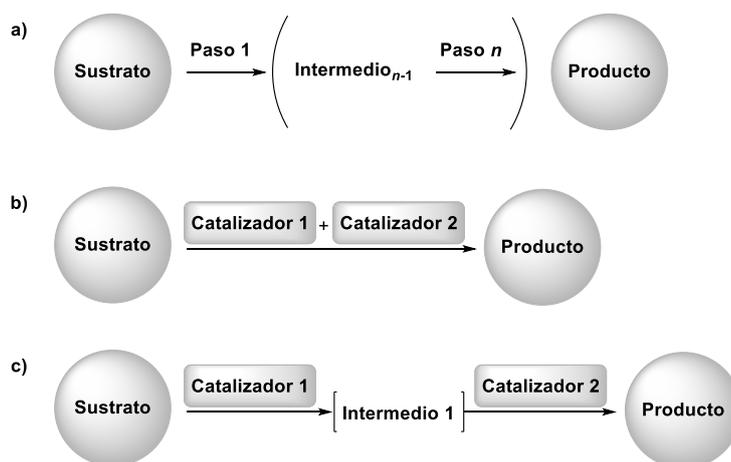
Un proceso en cascada consiste en la combinación de, al menos, dos pasos sintéticos en un mismo reactor (*one-pot*) evitando el aislamiento de los intermedios de reacción.¹⁴⁴ Esto, además de repercutir en un importante ahorro de reactivos, disolventes, así como de tiempo y energía que serían requeridos para el aislamiento y purificación de los intermedios, conlleva una notable disminución de los residuos generados y permite que compuestos inestables que se puedan formar en la secuencia sintética sean directamente consumidos en el paso siguiente. Por ello, generalmente las estrategias en cascada proporcionan una mayor eficiencia económica, energética y sintética, al poder obtenerse mayores rendimientos de reacción, y resultan aproximaciones ideales cuando se requiere el empleo de sustratos peligrosos o tóxicos que pueden ser generados *in situ*. Además, es posible conseguir procesos más seguros y predictivos, evitando potenciales reacciones secundarias.¹⁴⁵

Atendiendo al diseño y funcionalidad del proceso en cascada se pueden diferenciar distintos tipos, donde el más interesante desde un punto de vista sintético es la cascada lineal, en la cual un sustrato es convertido en un producto a través de uno o varios intermedios en una secuencia de transformaciones (Esquema 55a). En el contexto de la Biocatálisis, pueden diseñarse: (i) cascadas multienzimáticas, donde cada reacción química es catalizada por un enzima; (ii) la combinación de una reacción enzimática con una subsecuente reacción química espontánea, o bien, (iii) el desarrollo de una o más biotransformaciones seguidas de transformaciones químicas catalizadas por metales u organocatalizadores, o viceversa.¹⁴⁶

¹⁴⁴ W. Kroutil, M. Rueping, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 2086-2087.

¹⁴⁵ J. H. Schrittwieser, S. Velikogne, M. Hall, W. Kroutil, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 270-348.

¹⁴⁶ R. C. Simon, N. Richter, E. Busto, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 129-143.



Esquema 55. Cascadas lineales: a) esquema general para una reacción de n pasos donde el sustrato se transforma en el producto a través de $n-1$ intermedios no aislados, b) ejemplo de cascada concurrente en la que intervienen dos catalizadores, c) ejemplo de cascada secuencial en dos pasos.

En este punto, es importante diferenciar entre procesos:

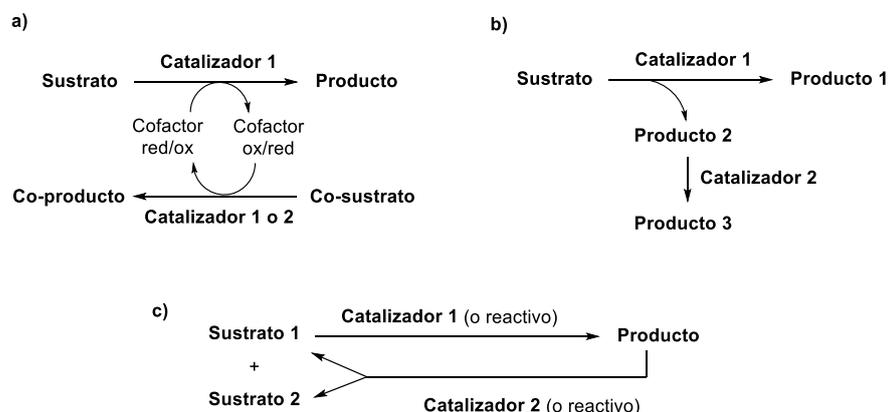
- concurrentes (Esquema 55b), también denominados tándem o dominó (aunque algunos autores hacen distinciones entre los términos),¹⁴⁷ donde todos los reactivos y catalizadores involucrados en la cascada se añaden juntos al medio de reacción, consumiéndose los intermedios a medida que se van generando;
- secuenciales (Esquema 55c), donde los catalizadores o reactivos se van añadiendo sucesivamente a medida que el sustrato se convierte íntegramente en cada intermedio de reacción.¹⁴⁸

¹⁴⁷ a) L. F. Tieze, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 115-136; b) S. F. Mayer, W. Kroutil, K. Faber, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *30*, 332-339. Tieze acuña el término dominó como diferenciador de cascada para procesos que ocurren de forma espontánea por acción simultánea de uno o varios catalizadores y/o reactivos. Faber y colaboradores diferencian, en el ámbito de la Biocatálisis, entre los procesos dominó o cascada, donde en una secuencia sintética espontánea iniciada por un biocatalizador se transforma un sustrato en un producto a través de intermedios muy reactivos, y tándem, donde se combina la acción de varios biocatalizadores que, en principio, podrían actuar por separado. Actualmente, se tiende a integrar todos los procesos que ocurren en un mismo reactor bajo el término cascada.^{144,2}

¹⁴⁸ E. García-Junceda, I. Lavandera, D. Rother, J. H. Schrittwieser, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, *114*, 1-6.

Otros tipos de cascadas que adquieren especial relevancia en los sistemas multienzimáticos son:

- las cascadas paralelas (Esquema 56a), muy utilizadas para la regeneración de cofactores en reacciones con oxidorreductasas¹⁴⁹
- las cascadas ortogonales (Esquema 56b), empleadas para el desplazamiento del equilibrio hacia la formación del producto, por ejemplo en reacciones catalizadas por transaminasas,¹⁵⁰ o para minimizar la inhibición del enzima por parte de intermedios de reacción.
- las cascadas cíclicas (Esquema 56c), usadas en procesos de desracemización y estereoinversión.¹⁵¹



Esquema 56. Esquemas generales de cascadas: a) paralelas, b) ortogonales y c) cíclicas.

Para el desarrollo de una cascada (quimio)enzimática deben cumplirse una serie de condicionamientos como son la compatibilidad de los diferentes

¹⁴⁹ a) C. Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor, *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 2525-2541; b) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, K. Buehler, *ChemCatChem*, **2010**, *2*, 762-782; c) V. Uppada, S. Bhaduri, S. B. Noronha, *Curr. Sci.* **2014**, *106*, 946-957.

¹⁵⁰ a) J.-S. Shin, B.-G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *65*, 206-211; b) D. Koeszelewski, I. Lavandera, D. Clay, D. Rozzell, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2761-2766; c) D. Koeszelewski, I. Lavandera, D. Clay, G. M. Guebitz, D. Rozzell, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9337-9340, d) M. Höhne, S. Kühn, K. Robins, U. T. Bornscheuer, *ChemBioChem*, **2010**, *2*, 73-77.

¹⁵¹ a) C. C. Gruber, I. Lavandera, K. Faber, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1789-1805; b) N. J. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 115-121, c) J. H. Schrittwieser, B. Groenendaal, V. Resch, D. Ghislieri, S. Wallner, E.-M. Fischereder, E. Fuchs, B. Grischek, J. H. Sattler, P. Macheroux, N. J. Turner, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3731-3734.

catalizadores involucrados, tanto entre ellos mismos como con los reactivos e intermedios formados, requiriendo una tolerancia al pH, temperatura o cosolventes similares y una especificidad de sustrato tal que evite reactividades cruzadas. Además, es necesario que el proceso global hacia el producto deseado se encuentre termodinámicamente favorecido de manera que el sistema se desplace eficientemente en el sentido deseado.¹⁵²

En determinados casos, la única opción pasa por llevar a cabo la cascada de manera secuencial ya que posibilita el empleo de condiciones de reacción adecuadas para cada catalizador y que resultarían incompatibles entre sí, además de evitar potenciales problemas de inhibición.

Debido a que en esta Tesis Doctoral se enfatizará en el uso de procesos en cascada lineales, a continuación se muestran una serie de ejemplos de este tipo de procesos, de especial relevancia por su potencial sintético, que se clasificarán en dos grupos: (i) combinaciones de metales o complejos organometálicos con enzimas y (ii) cascadas multienzimáticas.

II.1. Reacciones en cascada de metales y enzimas

La combinación de reacciones catalizadas por metales y enzimas en procesos en cascada es un concepto muy atractivo en síntesis orgánica desde el punto de vista económico y ecológico ya que, además de las ventajas enumeradas anteriormente, permite aunar la versatilidad catalítica de los metales con la elevada selectividad de las enzimas, especialmente relevante en síntesis asimétrica.¹⁵³ La tendencia general es llevar a cabo estos procesos en medios acuosos, de esta manera se utiliza un disolvente barato y completamente inocuo, permitiendo la utilización de cualquier biocatalizador o combinación de ellos al ser su medio natural. Esto conlleva el desafío de desarrollar reacciones organometálicas efectivas en medio acuoso, además de conseguir una compatibilidad entre metales y enzimas que suele ser mucho más problemática y limitante que en el caso de los sistemas multienzimáticos.¹⁵⁴

¹⁵² S. P. France, L. J. Hepworth, N. J. Turner, S. L. Flitsch, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 710-724.

¹⁵³ H. Gröger, W. Hummel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 171-179.

¹⁵⁴ H. Gröger, *Cooperative catalysis. Designing Efficient Catalysts for Synthesis*, Ed. R. Peters, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2015**, pp. 325-350.

En los últimos años, se han descrito varias soluciones que permiten combinar catalizadores inicialmente incompatibles utilizando estrategias de inmovilización y de compartimentación o encapsulación en diferentes membranas o nanoestructuras, tanto de origen natural como sintético.¹⁵⁵ También existe otra destacable línea de investigación que se basa en la creación de metaloenzimas artificiales a través de la ingeniería de proteínas con el fin de promover distintas reacciones catalizadas por metales dentro del entorno quirral que ofrece la proteína¹⁵⁶ y que han mostrado su compatibilidad con biocatalizadores convencionales en procesos en cascada.¹⁵⁷

Históricamente, el trabajo pionero en el que se describió por primera vez la combinación de un metal y una enzima en un proceso concurrente fue desarrollado por el grupo de van Bekkum donde la D-glucosa era transformada en D-fructosa por una D-glucosa isomerasa, produciendo D-manitol como producto mayoritario tras una subsiguiente hidrogenación en fase heterogénea catalizada por platino soportado sobre carbono.¹⁵⁸ Recientemente, se ha desarrollado un proceso de hidrogenación en flujo continuo acoplado con una resolución oxidativa catalizada por una Baeyer-Villiger monooxigenasa (BVMO)¹⁵⁹ para la síntesis diastereo- y enantioselectiva de lactonas (Esquema 57).¹⁶⁰

¹⁵⁵ S. Schmidt, K. Castiglione, R. Kourist, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 1755-1768.

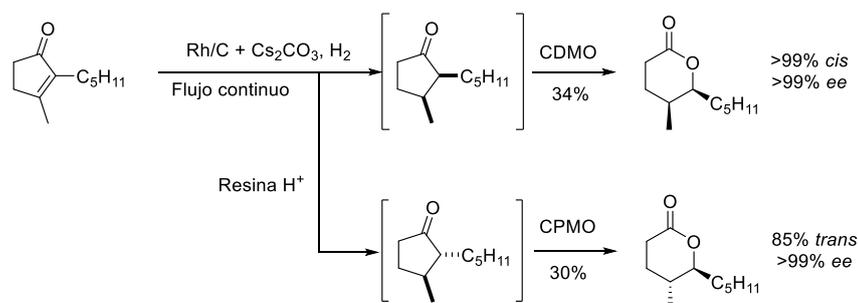
¹⁵⁶ a) O. Pàmies, M. Diéguez, J.-E. Bäckvall, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1567-1586; b) T. Heinisch, T. R. Ward, *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 1711-1721, c) F. Schwizer, Y. Okamoto, T. Heinisch, Y. Gu, M. M. Pellizzoni, V. Lebrun, R. Reuter, V. Köhler, J. C. Lewis, T. R. Ward, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 142-231.

¹⁵⁷ V. Köhler, Y. M. Wilson, M. Dürrenberger, D. Ghislieri, E. Churakova, T. Quinto, L. Knörr, D. Häussinger, F. Hollmann, N. J. Turner, T. R. Ward, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 93-99.

¹⁵⁸ M. Makkee, A. P. G. Kieboom, H. van Bekkum, J. A. Roels, *J. C. S. Chem. Commun.* **1980**, 930-931.

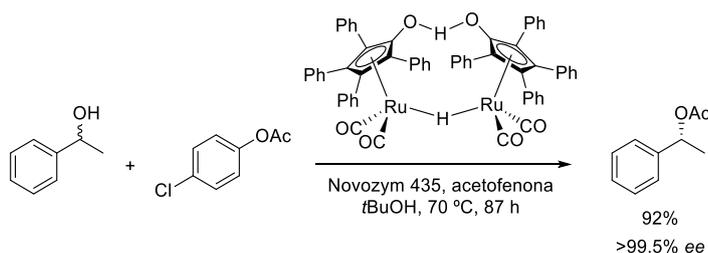
¹⁵⁹ G. de Gonzalo, M. D. Mihovilovic, M. W. Fraaije, *ChemBioChem*, **2010**, *11*, 2208-2231.

¹⁶⁰ M. J. Fink, M. Schön, F. Rudroff, M. Schnürch, M. D. Mihovilovic, *ChemCatChem*, **2013**, *5*, 724-727.



Esquema 57. Cascada secuencial de hidrogenación heterogénea en flujo y resolución cinética catalizada por BVMO (CDMO: ciclodecanona monooxigenasa de *Rhodococcus ruber* SC1, CPMO: ciclopentanona monooxigenasa de *Comamonas* sp.). Un paso adicional en flujo de epimerización utilizando una resina ácida de intercambio iónico permite acceder complementariamente al estereoisómero *trans*.

Uno de los procesos donde mayor implementación han tenido este tipo de estrategias es la resolución cinética dinámica (DKR) de alcoholes, ésteres y aminas, entre otros compuestos orgánicos. En estos casos, se selecciona una lipasa para resolver la mezcla racémica a través de un proceso altamente enantioselectivo, generalmente una reacción de acilación, y utilizando un complejo metálico como catalizador para la racemización *in situ* del enantiómero inalterado (Esquema 58).¹⁶¹



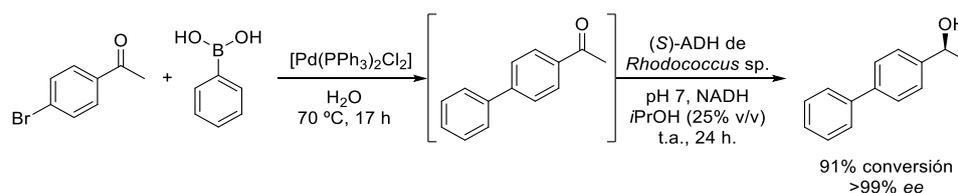
Esquema 58. Primer ejemplo de DKR eficiente de alcoholes catalizada por una lipasa (CAL-B, *Novozym* 435) y un complejo de Ru(I).¹⁶²

Un hito en este campo lo supuso el trabajo publicado conjuntamente por Gröger y Hummel en el que se combina un acoplamiento cruzado catalizado

¹⁶¹ a) O. Pàmies, J.-E. Bäckvall, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3247-3261; b) O. Verho, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3996-4009; c) O. Långvik, T. Saloranta, D. Y. Murzin, R. Leino, *ChemCatChem*, **2015**, *7*, 4004-4015.

¹⁶² A. L. E. Larsson, B. A. Persson, J.-E. Bäckvall, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1211-1212.

por paladio y una biorreducción asimétrica en medio acuoso de forma secuencial (Esquema 59).¹⁶³



Esquema 59. Prueba de concepto de la reacción secuencial de acoplamiento cruzado de Suzuki seguida de la reducción asimétrica catalizada por una alcohol deshidrogenasa.

Desde entonces, se ha aprovechado esta compatibilidad entre complejos de paladio y biocatalizadores para desarrollar diferentes procesos quimioenzimáticos: acoplamiento de Suzuki con ADHs¹⁶⁴ y con halogenasas,¹⁶⁵ permitiendo la arilación de heterociclos a través de activación C-H enzimática (Esquema 60),¹⁶⁶ o la reacción de Heck de alcoholes alílicos, empleando nanopartículas de paladio, con ADHs (Esquema 61).¹⁶⁷ También se ha descrito el acoplamiento de diazocompuestos catalizado por complejos de Rh(II), para formar (*E*)-alquenos 1,4-dicarbonílicos, y su reducción asimétrica con eno-reductasas¹⁶⁸ de forma secuencial (aunque requiere el cambio de disolvente entre cada paso).¹⁶⁹

¹⁶³ E. Burda, W. Hummel, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9551-9554.

¹⁶⁴ a) A. Prastaro, P. Ceci, E. Chiancone, A. Boffi, R. Cirilli, M. Colone, G. Fabrizi, A. Stringaro, S. Cacchi, *Green Chem.* **2009**, *11*, 1929-1932; b) V. Gauchot, W. Kroutil, A. R. Schmitzer, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6748-6751; c) S. Borchert, E. Burda, J. Schatz, W. Hummel, H. Gröger, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *84*, 89-93.

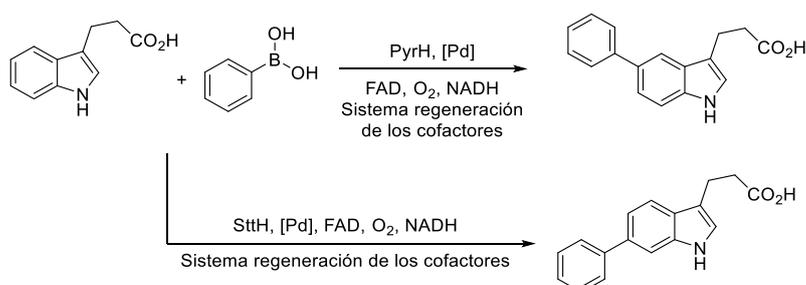
¹⁶⁵ a) M. Frese, C. Schnepel, H. Minges, H. Voß, R. Feiner, N. Sewald, *ChemCatChem*, **2016**, *8*, 1799-1803; b) L. J. Durak, J. T. Payne, J. C. Lewis, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 1451-1454.

¹⁶⁶ J. Latham, J.-M. Henry, H. H. Sharif, B. R. K. Menon, S. A. Shepherd, M. F. Greaney, J. Micklefield, *Nat. Comm.* **2016**, *7*, 11873-11881.

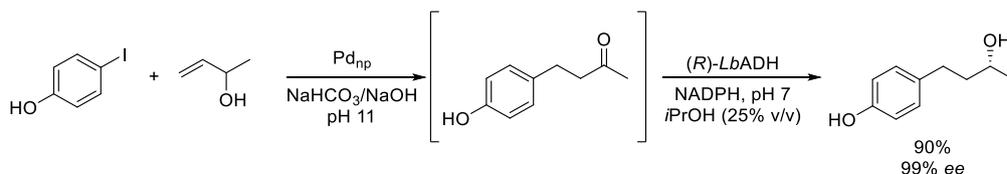
¹⁶⁷ A. Boffi, S. Cacchi, P. Ceci, R. Cirilli, G. Fabrizi, A. Prastaro, S. Niembro, A. Shafir, A. Vallribera, *ChemCatChem*, **2011**, *3*, 347-353.

¹⁶⁸ C. K. Winkler, G. Tasnádi, D. Clay, M. Hall, K. Faber, *J. Biotechnol.* **2012**, *162*, 381-389.

¹⁶⁹ Y. Wang, M. J. Bartlett, C. A. Denard, J. F. Hartwig, H. Zhao, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 2548-2552.

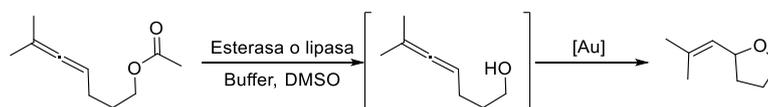


Esquema 60. Ejemplo de arilación regioselectiva y regiodivergente en un proceso quimioenzimático en cascada (PyrH: triptófano 5-halogenasa, SttH: triptófano 6-halogenasa).



Esquema 61. Aplicación de la reacción secuencial de Heck y biorreducción con la ADH de *Lactobacillus brevis* (*LbADH*) utilizando nanopartículas de paladio (inmovilizadas en gel de sílice fluorado)

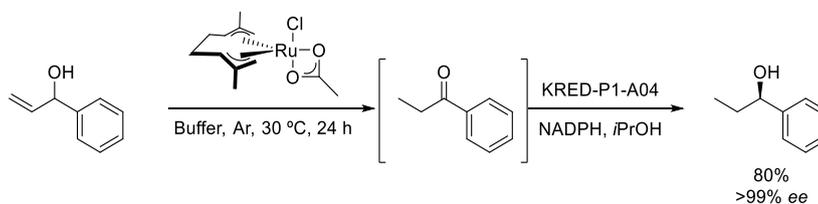
El ensamblaje de complejos de Au(I) o Ru(II) en clústeres de galio mostró una gran mejora en la compatibilidad de estos sistemas con biocatalizadores, pudiendo utilizarse en procesos concurrentes con lipasas, esterases o ADHs.¹⁷⁰ En concreto, la hidrólisis enzimática de ésteres y posterior ciclación catalizada por complejos de oro permitió obtener tetrahidrofuranos (Esquema 62), donde es posible desarrollar una resolución cinética dinámica si se parte de compuestos racémicos.



Esquema 62. Hidrólisis enzimática y ciclación catalizada por Au (I) de forma concurrente (esterasa de hígado de conejo, lipasa *Amano PS*; [Au]: cloro(trimetilfosfina) oro (I) encapsulado en un clúster tetraédrico Ga₄L₆).

¹⁷⁰ Z. Jane Wang, K. N. Clary, R. G. Bergman, K. N. Raymond, F. D. Toste, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 100-103.

Por otro lado, la isomerización catalizada por complejos de Ru(II) de alcoholes alílicos a aldehídos y su posterior reducción catalizada por ADHs dio acceso a los correspondientes alcoholes primarios. Al emplear este proceso para la obtención de cetonas, fue posible llevar a cabo la síntesis asimétrica de alcoholes, tanto de forma secuencial como concurrente (Esquema 63),¹⁷¹ y de aminas, en este caso únicamente de manera secuencial,¹⁷² utilizando ADHs y transaminasas, respectivamente, en combinación con complejos de Ru(IV).



Esquema 63. Síntesis concurrente de alcoholes a través de una isomerización catalizada por un complejo de Ru(IV) y una reducción asimétrica con ADHs.

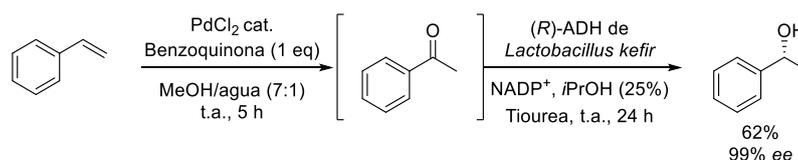
La oxidación de estirenos mediante la reacción de Wacker-Tsuji (ver *Capítulo 5*) catalizada por Pd(II) y empleando 1,4-benzoquinona como oxidante terminal ha sido acoplada con una posterior biorreducción de manera secuencial (Esquema 64).¹⁷³ Más recientemente, este proceso se ha descrito utilizando las condiciones clásicas, donde se utiliza como oxidante terminal O₂ y como mediador de la oxidación sales de Cu(II) que, idealmente, se pueden utilizar en condiciones catalíticas para regenerar el catalizador de Pd(II). Para evitar la desactivación del biocatalizador por parte de las sales de cobre, se ha utilizado una estrategia de compartimentalización empleando una membrana hidrofóbica de polidimetilsiloxano. El primer paso tiene lugar dentro de esta membrana para que, una vez finalizada la oxidación, el producto difunda al exterior tras ser rellenado con una mezcla de disolución reguladora e isopropanol, el cofactor y la ADH. Así, se consigue separar en el reactor los dos sistemas catalíticos

¹⁷¹ N. Ríos-Lombardía, C. Vidal, E. Liardo, F. Morís, J. García-Álvarez, J. González-Sabín, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8691-8695.

¹⁷² N. Ríos-Lombardía, C. Vidal, M. Cocina, F. Morís, J. García-Álvarez, J. González-Sabín, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 10937-10940.

¹⁷³ I. Schnapperelle, W. Hummel, H. Gröger, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1073-1076.

incompatibles entre sí para llevar a cabo el proceso en cascada secuencial, posibilitando además la reutilización de la fase interior de la membrana.¹⁷⁴



Esquema 64. Combinación secuencial de oxidación y biorreducción en una reacción global de, formalmente, hidratación alquenos no activados.

Por último, las reacciones de metátesis entre alquenos catalizadas por complejos rutenio-carbeno (catalizadores de Grubbs)¹⁷⁵ han sido empleadas conjuntamente con distintas biotransformaciones. El primer ejemplo de ello es la monohidrólisis de un diéster producido a través de una metátesis intramolecular de cierre de anillo utilizando la esterasa de hígado de cerdo (PLE).¹⁷⁶ Por otro lado, la combinación de una metátesis cruzada y una monooxigenasa P450 para la síntesis asimétrica de epóxidos¹⁷⁷ mostró una mayor efectividad al llevar a cabo los dos procesos de forma concurrente frente a la cascada secuencial, probando la cooperatividad entre los dos catalizadores al establecerse un equilibrio dinámico entre los posibles alquenos formados en la metátesis (Esquema 65).¹⁷⁸ A través de una cascada secuencial utilizando una decarboxilasa encapsulada en criogeles y una posterior reacción de metátesis, se han logrado sintetizar distintos estilbenos con propiedades antioxidantes partiendo de diferentes ácidos hidroxicinámicos.¹⁷⁹

¹⁷⁴ H. Sato, W. Hummel, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4488-4492.

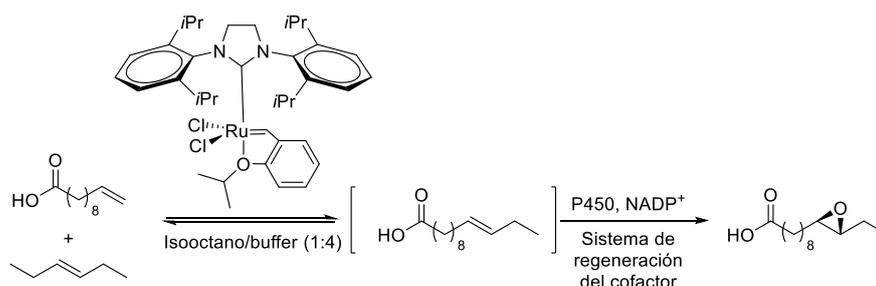
¹⁷⁵ T. M. Trnka, R. H. Grubbs, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 18-29.

¹⁷⁶ K. Tenbrink, M. Seßler, J. Schatz, H. Gröger, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2363-2367.

¹⁷⁷ C. A. Denard, M. J. Bartlett, Y. Wang, L. Lu, J. F. Hartwig, H. Zhao, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 3817-3822-

¹⁷⁸ C. A. Denard, H. Huang, M. J. Bartlett, L. Lu, Y. Tan, H. Zhao, J. F. Hartwig, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 475-479.

¹⁷⁹ A. G. Baraibar, D. Reichert, C. Mügge, S. Seger, H. Gröger, R. Kourist, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 14823-14827.



Esquema 65. Reacción de metátesis cruzada seguida de una oxidación con citocromo P450 que funciona tanto de forma concurrente como secuencial, obteniendo mejores conversiones en el primer caso.

II.2. Cascadas multienzimáticas

Gracias al continuo descubrimiento e ingeniería evolutiva de nuevas enzimas, la diversificación de rutas quimioenzimáticas hacia moléculas de interés ha sido posible gracias al planteamiento de distintas estrategias retrosintéticas.¹⁸⁰ Así, el diseño de cascadas biocatalíticas se ha multiplicado en número y variedad en los últimos años. Emulando las rutas metabólicas, es posible emplear células de microorganismos vivos como sistemas catalíticos, estrategia *in vivo*, un excelente ejemplo de esto es la síntesis completa de derivados de opiáceos en cepas de levaduras modificadas;¹⁸¹ o bien optar por una estrategia *in vitro* multienzimática, donde los biocatalizadores se pueden utilizar con distintos grados de pureza (células enteras liofilizadas, lisado celular, extracto libre de células o proteínas purificadas).^{152,182} A continuación, se muestran algunos ejemplos recientes de cascadas multienzimáticas lineales seleccionadas por el atractivo de las transformaciones orgánicas.

La oxidación directa de alcanos cíclicos a cetonas consumiendo únicamente oxígeno ha sido descrita por combinación entre una monooxigenasa P450¹⁸³ y

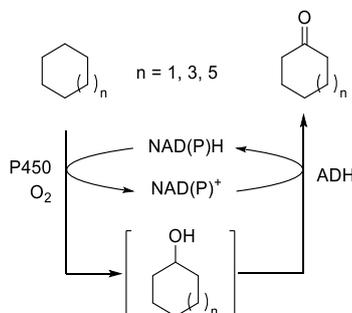
¹⁸⁰ N. J. Turner, E. O'Reilly, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 285-288.

¹⁸¹ S. Galanie, K. Thodey, I. J. Trenchard, M. F. Interrante, C. D. Smoke, *Science*, **2015**, *349*, 1095-1100.

¹⁸² F. López-Gallego, C. Schmidt-Dannert, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 174-183.

¹⁸³ E. Weber, A. Seifert, M. Antonovici, C. Geinitz, J. Pleiss, V. B. Urlacher, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 944-946.

una ADH, dando lugar a una reacción global redox neutra (Esquema 66).¹⁸⁴ Si se añade un tercer paso, es posible generar las correspondientes lactonas por medio de la acción de una Baeyer-Villiger monooxigenasa,¹⁸⁵ además, este proceso se ha podido llevar a cabo *in vivo* para la obtención de caprolactona¹⁸⁶ o, partiendo del ciclohexanol, producir el ácido 6-aminohexanoico *in vitro* en una secuencia que involucra seis transformaciones enzimáticas llevadas a cabo en dos módulos secuenciales.¹⁸⁷



Esquema 66. Oxidación biocatalítica de cicloalcanos en cicloalcanonas.

La transformación de alcoholes en aminas es una reacción que posee un elevado interés en síntesis orgánica, especialmente si esta tiene lugar de forma enantioselectiva y en condiciones suaves de reacción. Para ello se han descrito distintas estrategias aprovechando las actividades de distintos biocatalizadores.¹⁸⁸ Uno de los procesos de aminación de alcoholes más elegantes es la combinación de una ADH no selectiva (o bien dos ADHs selectivas) y una amino deshidrogenasa (AmDH)¹⁸⁹ en una cascada redox autosuficiente, que transcurre con una elevada economía atómica y resulta

¹⁸⁴ S. Staudt, E. Burda, C. Giese, C. A. Müller, J. Marienhagen, U. Schwaneberg, W. Hummel, K. Drauz, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2359-2363.

¹⁸⁵ A. Pennec, F. Hollmann, M. S. Smit, D. J. Opperman, *ChemCatChem*, **2015**, *7*, 236-239.

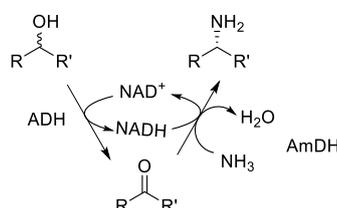
¹⁸⁶ R. Karande, D. Salamanca, A. Schmid, K. Buehler, *Biotechnol. Bioeng.* **2018**, *115*, 312-320.

¹⁸⁷ J. H. Sattler, M. Fuchs, F. G. Mutti, B. Grischek, P. Engel, J. Pfeffer, J. M. Woodley, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14153-14157.

¹⁸⁸ a) J. H. Sattler, M. Fuchs, K. Tauber, F. G. Mutti, K. Faber, J. Pfeffer, T. Haas, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9156-9159; b) K. Tauber, M. Fuchs, J. H. Sattler, J. Pitzer, D. Pressnitz, D. Koeszelweski, K. Faber, J. Pfeffer, T. Haas, W. Kroutil, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4030-4035; c) L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Green Chem.* **2017**, *19*, 471-480.

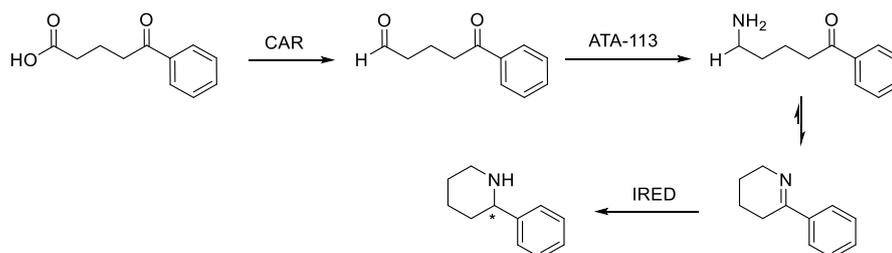
¹⁸⁹ a) M. J. Abrahamson, E. Vázquez-Figueroa, N. B. Woodall, J. C. Moore, A. S. Bommaris, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3969-3972; b) M. J. Abrahamson, J. W. Wong, A. S. Bommaris, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 1780-1786.

adecuada para la aminación de un amplio rango de alcoholes alifáticos y aromáticos (Esquema 67).¹⁹⁰ Recientemente, esta estrategia se ha expandido para la producción de (*R*)-aminas secundarias utilizando la aminsasa reductiva de *Aspergillus oryzae* (*AspRedAm*)¹⁹¹ que permite acoplar la cetona generada *in situ* con distintas aminas primarias.¹⁹²



Esquema 67. Esquema general de la aminación de alcoholes a través de un proceso formal de transferencia de hidrógeno entre las dos enzimas involucradas.

La síntesis asimétrica de pirrolidinas y piperidinas mono- y disustituidas se ha realizado mediante un proceso concurrente combinando una ácido carboxílico reductasa (CAR)¹⁹³, una amino transaminasa (ATA) y una imino reductasa (IRED) que actúa sobre la imina cíclica formada espontáneamente (Esquema 68).



Esquema 68. Ejemplo de la síntesis de una piperidina sustituida en posición 2 empleando una cascada concurrente multienzimática.

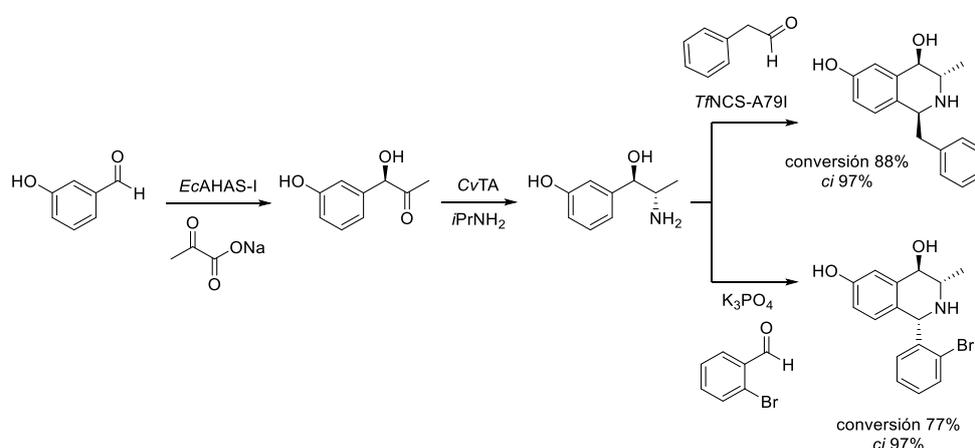
¹⁹⁰ a) F. G. Mutti, T. Knauss, N. S. Scrutton, M. Breuer, N. J. Turner, *Science*, **2015**, *349*, 1525-1529; b) F.-F. Chen, Y.-Y. Liu, G.-W. Zheng, J.-H. Xu, *ChemCatChem*, **2015**, *7*, 3838-3841; c) W. Böhmer, T. Knaus, F. Mutti, *ChemCatChem*, **2018**, *10*, 731-735.

¹⁹¹ G. A. Aleku, S. P. France, H. Man, J. Mangas-Sánchez, S. Montgomery, M. Sharma, F. Leipold, S. Hussain, G. Grogan, N. J. Turner, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 961-969.

¹⁹² S. L. Montgomery, J. Mangas-Sánchez, M. P. Thompson, G. A. Aleku, B. Dominguez, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 10491-10494.

¹⁹³ W. Finnigan, A. Thomas, H. Cromar, B. Gough, R. Snajdrova, J. P. Adams, J. A. Littlechild, N. J. Harmer, *ChemCatChem*, **2017**, *9*, 1005-1017.

En otra cascada multienzimática, en este caso desarrollada secuencialmente, se han logrado sintetizar tetrahidroisoquinolinas con tres centros quirales definidos por una carboligasa, una transaminasa y, finalmente, una reacción de Pictet Spengler que puede ser catalizada por una norcoclaurina sintasa (NCS)¹⁹⁴ o ser promovida de forma química, permitiendo acceder a las dos configuraciones complementarias de este centro quiral (Esquema 69).¹⁹⁵



Esquema 69. Síntesis de tetrahidroisoquinolinas trisustituidas con estereoquímica complementaria (*EcAHAS-I*: ácido acetohidroxi sintasa I de *Escherichia coli*, *CvTA*: transaminasa de *Chromobacterium violaceum*, *TfNCS-A79I*: norcoclaurina sintasa de *Thalictrum flavum* modificada, *ci*: contenido isomérico)

Las tirosina fenol liasas (TPL)¹⁹⁶ catalizan la formación de enlaces C-C mediante la activación C-H de fenoles y han resultado muy eficaces como iniciadoras en el diseño de procesos en cascada multienzimáticos hacia moléculas de interés. En combinación secuencial con una L-aminoácido deaminasa (L-AAD)¹⁹⁷ y una isocaproato reductasa (HicDH)¹⁹⁸ se han podido obtener los dos enantiómeros, en función de la estereopreferencia de esta última

¹⁹⁴ a) T. Pesnot, M. C. Gershater, J. M. Ward, H. C. Hailes, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 2997-3008; b) B. R. Lichman, J. Zhao, H. C. Hailes, J. M. Ward, *Nat. Comm.* **2017**, *8*, 14883-14890.

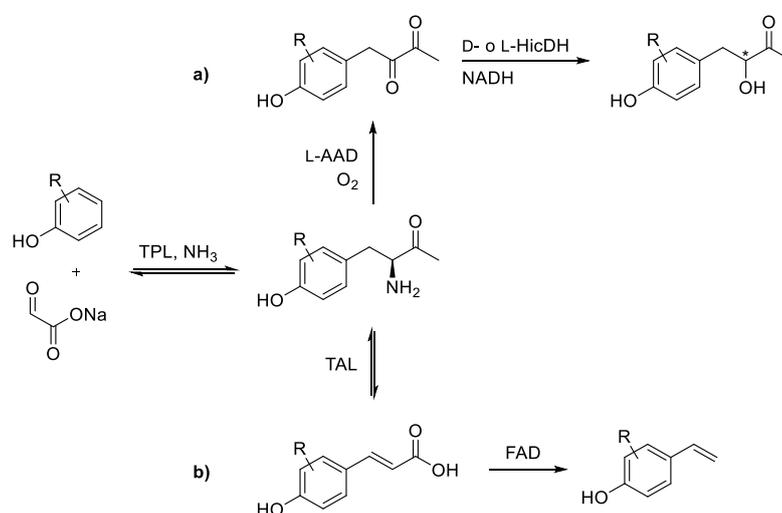
¹⁹⁵ V. Erdmann, B. R. Lichman, J. Zhao, R. C. Simon, W. Kroutil, J. M. Ward, H. C. Hailes, D. Rother, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 12503-12507.

¹⁹⁶ B. Seisser, R. Zinkl, K. Gruber, F. Kaufmann, A. Hafner, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 731-736.

¹⁹⁷ D. P. Pantaleone, A. M. Geller, P. P. Taylor, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 795-803.

¹⁹⁸ H. Schütte, W. Hummel, M.-R. Kula, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1985**, *21*, 7-15.

enzima, de derivados del ácido láctico (Esquema 70a).¹⁹⁹ También se ha logrado desarrollar una cascada en la que se vinila la posición *para* de fenoles por acción de una TPL, una tirosina amonio liasa (TAL)²⁰⁰ y una ácido ferúlico descarboxilasa (FAD)²⁰¹ consumiendo únicamente piruvato y generando CO₂ y agua como subproductos (Esquema 70b).²⁰²



Esquema 70. Reacciones en cascada de fenoles catalizada por TPL para: (a) la síntesis asimétrica de derivados de ácido láctico y (b) la vinilación en posición *para* en un proceso concurrente.

¹⁹⁹ E. Busto, R. C. Simon, N. Richter, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 2393-2397.

²⁰⁰ J. A. Kyndt, T. E. Meyer, M. A. Cusanovic, J. J. Von Beeumen, *FEBS Lett.* **2002**, *512*, 240-244.

²⁰¹ C. Wuensch, S. M. Glueck, J. Gross, D. Koszelewski, M. Schober, K. Faber, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1974-1977.

²⁰² E. Busto, R. C. Simon, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10899-10902.

CAPÍTULO 3

BIORREDUCCIÓN DE TRIFLUOROMETILCETONAS:
SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE UN
PRECURSOR DEL ODANACATIB

ANTECEDENTES

La importancia de los compuestos organofluorados en química médica se pone de relieve por la presencia de los átomos de flúor en más de un 20% de los fármacos aprobados y prescritos en la actualidad. A pesar de que, prácticamente, no existen compuestos biológicos fluorados, en las últimas décadas se ha puesto de manifiesto un especial interés en el desarrollo de nuevos compuestos que contienen flúor y que, en muchos casos, muestran interesantes perfiles biológicos. Para ello, ha sido necesaria la investigación y diseño de reacciones sintéticas que permitan acceder a estas estructuras de manera muy selectiva, donde también las especiales características de los átomos de flúor influyen en la reactividad de sustratos y catalizadores.²⁰³

Diferentes propiedades biológicas pueden ser modificadas por la introducción de átomos de flúor: cambios conformacionales (gracias a las fuertes interacciones que pueden formar estos átomos debido a su especial electronegatividad), modificación de la acidez, la actividad intrínseca del compuesto, la permeabilidad a través de membranas, sus propiedades farmacocinéticas o cambios en las rutas metabólicas en las que se ven involucrados.²⁰⁴

Existen fármacos prescritos para multitud de enfermedades que poseen átomos de flúor en su estructura, incluyendo algunos de los más vendidos mundialmente (*blockbusters*), donde se pueden encontrar aplicaciones en la totalidad de los campos médicos al actuar como anticancerígenos, antidiabéticos, sobre los sistemas cardiovascular, nervioso central, respiratorio, gastrointestinal, endocrino o para combatir enfermedades infecciosas, entre otros.²⁰⁵ En esta Tesis Doctoral, se va a prestar especial atención al desarrollo de un método quimioenzimático eficiente para la síntesis del fármaco odanacatib, por lo que sus propiedades y características estructurales serán presentadas a continuación.

²⁰³ D. L. Orsi, R. A. Altman, *Chem. Commun.* **2017**, 53, 7168-7181.

²⁰⁴ E. P. Gillis, K. J. Eastman, M. D. Hill, D. J. Donnelly, N. A. Meanwell, *J. Med. Chem.* **2015**, 58, 8315-8359.

²⁰⁵ J. Wang, M. Sánchez-Roselló, J. L. Aceña, C. del Pozo, A. E. Sorochinsky, S. Fustero, V. A. Soloshonok, H. Liu, *Chem. Rev.* **2014**, 114, 2432-2506.

3.1. Odanacatib

El odanacatib (Ilustración 1) es un inhibidor potente y selectivo de la catepsina K, una cisteín-proteasa lisosomal presente predominantemente en los osteoclastos, células responsables de la degradación del hueso durante el remodelado óseo.²⁰⁶ Este efecto previene la pérdida de hueso a la vez que permite que el proceso de formación de éste continúe, siendo empleado en el tratamiento de la osteoporosis y la metástasis ósea.²⁰⁷ Curiosamente, se ha encontrado además un potencial uso como fármaco antiparasitario contra anquilostomas, ya que se ha demostrado que provoca su muerte en experimentos *in vivo*.²⁰⁸

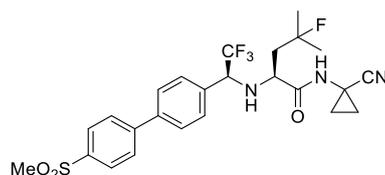


Ilustración 1. Estructura del fármaco odanacatib.

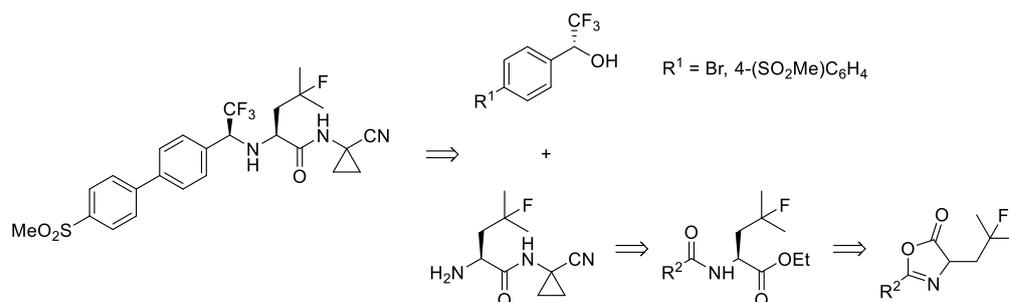
Realizando un análisis retrosintético sobre la molécula de odanacatib, desde un punto de vista biocatalítico, se puede plantear la desconexión mostrada en el Esquema 71 en la que se obtienen dos fragmentos quirales accesibles a través de métodos (quimio)enzimáticos. El acoplamiento estereoselectivo entre ambos se ha descrito a través de un proceso S_N2 entre una amina derivada de la (*S*)- γ -fluoroleucina y distintos (*R*)- α -trifluorometilbencil triflato, obtenidos de manera sencilla a partir de los correspondientes alcoholes.²⁰⁹

²⁰⁶ J. Y. Gauthier, N. Chauret, W. Cromlish, S. Desmarais, L. T. Duong, J.-P. Falguyret, D. B. Kimmel, S. Lamontagne, S. Léger, T. LeRiche, C. S. Li, F. Massé, D. J. McKay, D. A. Nicoll-Griffith, R. M. Oballa, J. T. Palmer, M. D. Percival, D. Riendeau, J. Robichaud, G. A. Rodan, S. B. Rodan, C. Seto, M. Thérien, V.-L. Truong, M. C. Venuti, G. Wesolowski, R. N. Young, R. Zamboni, W. C. Black, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 923-928.

²⁰⁷ K. Kassahun, I. McIntosh, K. Koeplinger, L. Sun, J. E. Talaty, D. L. Miller, R. Dixon, S. Zajic, S. A. Stoch, *Drug. Metab. Dispos.* **2014**, *42*, 818-827.

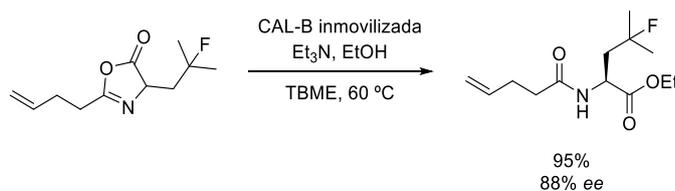
²⁰⁸ J. J. Vermeire, B. M. Suzuki, C. R. Caffrey, *Pharmaceuticals*, **2016**, *9*, 39-47.

²⁰⁹ P. D. O'Shea, C. Chen, D. Gauvreau, F. Gosselin, G. Hughes, C. Nadeau, R. P. Volante, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1605-1610.



Esquema 71. Análisis retrosintético de la molécula de odanacatib.

Por un lado, la síntesis del éster de etilo de la (*S*)- γ -fluoroleucina *N*-protegida se ha descrito mediante un proceso cinético dinámico de apertura de anillo por etanolisis de la correspondiente oxazolona catalizado por la CAL-B (Esquema 72). La racemización ocurre de forma espontánea por tautomerización a la forma enólica²¹⁰ y, tras una optimización del proceso estudiando su viabilidad en flujo,²¹¹ así como distintos soportes para la enzima inmovilizada, se ha logrado su aplicación a escala de 100 kg con rendimientos superiores al 90%.²¹²



Esquema 72. Obtención de un precursor de odanacatib a través de una DKR catalizada por la CAL-B.

Por otro lado, el fragmento biarílico es accesible a partir del (*R*)-4-bromofenil-2,2,2-trifluoroetanol, que puede obtenerse mediante una resolución cinética de su racemato con CAL-B y acetato de vinilo con moderada enantioselectividad (34% de rendimiento y 82% *ee*),²¹³ o a través de una

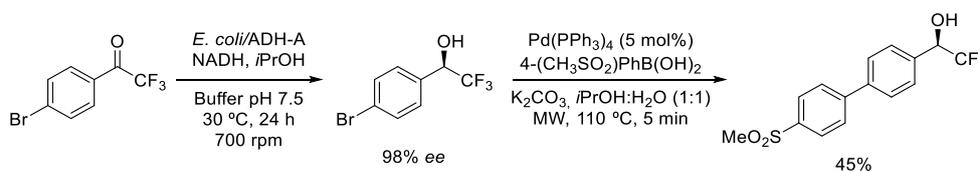
²¹⁰ J. Limanto, A. Shafice, P. N. Devine, V. Upadhyay, R. A. Desmond, B. R. Foster, D. R. Gauthier, R. A. Reamer, R. P. Volante, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2372-2375.

²¹¹ M. D. Truppo, D. J. Pollard, J. C. Moore, P. N. Devine, *Chem. Eng. Sci.* **2008**, *63*, 122-130.

²¹² M. D. Truppo, G. Hughes, *Org. Process. Res. Dev.* **2011**, *15*, 1033-1035.

²¹³ S. S. Ribeiro, C. Raminelli, A. L. M. Porto, *J. Fluorine Chem.* **2013**, *154*, 53-59.

biorreducción de la 4'-bromotrifluoroacetofenona catalizada por un crudo enzimático liofilizado de la ADH-A de *Rhodococcus ruber* sobreexpresada en *E. coli* (*E. coli*/ADH-A). Una posterior reacción de acoplamiento cruzado de Suzuki empleando irradiación con microondas permite obtener el producto biarílico buscado con un 45% de rendimiento global, tras purificación mediante columna cromatográfica, con un 98% *ee* (Esquema 73).²¹⁴ Se ha realizado un estudio de este proceso en cascada, observando que se produce una inhibición del catalizador de paladio por las células de *E. coli*, resultando inviable la metodología *one-pot*. Así, de Souza y colaboradores optaron por realizar una centrifugación una vez finalizada la reacción biocatalítica y, con el sobrenadante, realizar directamente el acoplamiento de Suzuki utilizando una estrategia en flujo continuo.



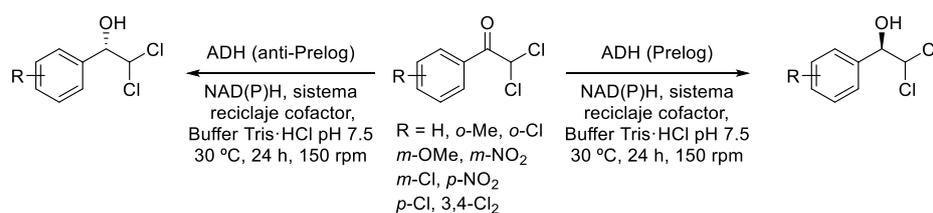
Esquema 73. Síntesis asimétrica del precursor del odanacatib utilizando ADHs.

En nuestro grupo de investigación, se ha estudiado la biorreducción de derivados de acetofenona con halógenos en posición α utilizando diferentes ADHs, tanto de origen comercial como proteínas recombinantes expresadas en *E. coli*. En concreto, la ADH de *Lactobacillus brevis* (*E. coli*/*LbADH*), que posee selectividad anti-Prelog, se ha estudiado en detalle como biocatalizador para la obtención de alcoholes con configuración *R* (excepto en los sustratos que poseen un heteroátomo en posición α que provoca un cambio en las reglas CIP) atendiendo a la influencia de los efectos estéricos y electrónicos de los sustituyentes del sustrato en su actividad.²¹⁵ Por otro lado, la biorreducción de acetofenonas α,α -dicloradas con diferente sustitución en el anillo (Esquema 74) y de α,α -dibromoacetofenona utilizando ADHs con selectividades complementarias ha permitido la síntesis asimétrica de los dos posibles

²¹⁴ R. O. Lopes, A. S. de Miranda, B. Reichart, T. Glasnov, C. O. Kappe, R. C. Simon, W. Kroutil, L. S. M. Miranda, I. C. R. Leal, R. O. M. A. de Souza, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2014**, *103*, 101-107.

²¹⁵ C. Rodríguez, W. Borzęcka, J. H. Sattler, W. Kroutil, I. Lavandera, V. Gotor, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 673-681.

enantiómeros de los correspondientes alcoholes con excelentes excesos enantioméricos.²¹⁶



Esquema 74. Biorreducción de derivados de α,α -dicloroacetofenona para obtener los alcoholes con configuración *S* (izquierda) o *R* (derecha).

En colaboración con el grupo de Gideon Grogan, se ha obtenido la estructura cristalográfica de la ADH de *Ralstonia* sp. (*E. coli*/*RasADH*), que posee selectividad tipo Prelog y ha mostrado la peculiaridad de aceptar en su centro activo cetonas con sustituyentes hidrofóbicos voluminosos en ambas posiciones contiguas al carbonilo.²¹⁷ Este es, por tanto, uno de los biocatalizadores que mejores resultados ofrece en la reducción de cetonas dicloradas o dibromadas para la obtención de los alcoholes con configuración *R*.

Gracias a este modelo se ha podido entender la dependencia de esta enzima por el cofactor NADPH, debido a interacciones con dos argininas y un aspartato, así como estudiar el centro activo, donde el oxígeno carbonílico se fijaría por enlaces de hidrógeno a una tirosina y/o una serina mostrando la cara *re* al anillo de nicotinamida del cofactor. Además, es muy interesante la configuración de los dos bolsillos hidrofóbicos donde se colocan los dos sustituyentes del sustrato, uno en la parte interna (donde se enlazaría la parte alquílica) y otro muy cercano al túnel de entrada al centro activo (donde se situaría la parte arílica). Por todo ello, mostraremos especial atención en este capítulo a estudiar el comportamiento de la *RasADH* en la reducción de diversas cetonas.

²¹⁶ K. Kędziora, F. R. Bisogno, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, J. Montejo-Bernardo, S. García-Granda, W. Kroutil, V. Gotor, *ChemCatChem*, **2014**, *6*, 1066-1072.

²¹⁷ H. Man, K. Kędziora, J. Kulig, A. Frank, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, D. Rother, S. Hart, J. P. Turkenburg, G. Grogan, *Top Catal.* **2014**, *57*, 356-365.

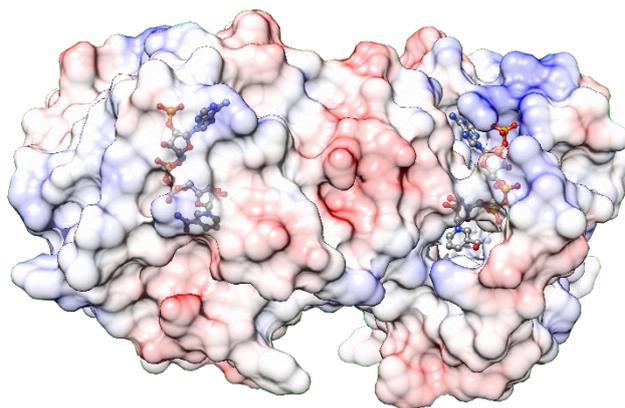
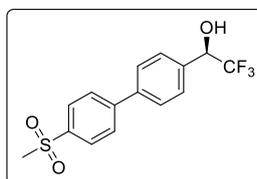


Figura 7. Estructura de uno de los tres dímeros que conforman la estructura cristalográfica obtenida para la *RasADH* con el cofactor NADPH.

OBJETIVOS

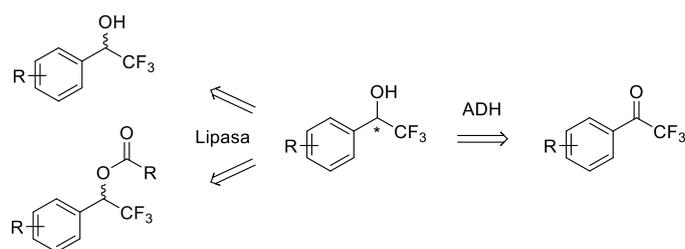
La síntesis asimétrica de fragmentos organofluorados atrae un elevado interés debido a los interesantes perfiles biológicos mostrados por compuestos farmacológicamente activos de esta familia, y a su papel versátil como precursores de moléculas más complejas. En concreto, en los antecedentes se ha mostrado la utilidad de derivados enantiopuros de 1-aryl-2,2,2-trifluoroetanol para la síntesis del odanacatib, por ello nos planteamos los siguientes objetivos:

- Estudiar y comparar distintos métodos biocatalíticos para obtener este tipo de compuestos en forma enantiopura, prestando especial atención al desarrollo de resoluciones cinéticas catalizadas por lipasas, mediante reacciones de esterificación o hidrólisis, y la biorreducción de derivados de trifluoroacetofenona catalizada por ADHs.
- Optimizar las condiciones de reacción enzimáticas para lograr procesos eficientes, los cuales pudieran dar acceso de manera independiente a los dos enantiómeros de los alcoholes objeto de estudio.
- Extender y generalizar la metodología empleando diferentes sustratos que permitan acceder a un número representativo de alcoholes de interés.
- Desarrollar un método quimioenzimático en cascada que combine un acoplamiento cruzado catalizado por paladio con un proceso enzimático para obtener el fragmento biarílico precursor del odanacatib.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los antecedentes de este capítulo se han descrito los métodos enzimáticos más empleados para la obtención de alcoholes enantiopuros, como son la resolución cinética de alcoholes o ésteres racémicos a través de procesos de acilación o hidrólisis catalizados por lipasa, así como o la biorreducción de cetonas empleando ADHs (Esquema 75).



Esquema 75. Análisis retrosintético de derivados de 1-fenil-2,2,2-trifluoroetanol considerando la resolución cinética catalizada por lipasas o procesos de biorreducción con ADHs.

En el caso de los procesos catalizados por lipasas, la limitación intrínseca de la resolución cinética solo permite obtener un 50% de rendimiento máximo, requiriendo un paso de aislamiento y purificación de las dos especies formadas que permite acceder a los dos enantiómeros en el proceso si este transcurre con elevada selectividad.

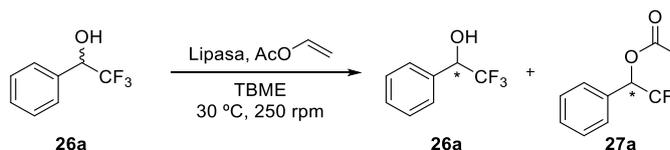
En las biorreducciones catalizadas por ADHs es posible acceder a los alcoholes con rendimientos teóricos del 100%, aislando de manera sencilla los productos, y pudiendo obtener ambos enantiómeros si se emplean de manera independiente enzimas con estereoselectividad complementaria. Sin embargo, estos métodos suelen resultar más costosos y complejos debido al requerimiento del uso de cofactores y sistemas de regeneración de los mismos, como se ha detallado en la introducción. Teniendo en cuenta los sustratos seleccionados, este método resulta el más prometedor *a priori* ya que las trifluoroacetofenonas presentan una elevada electrofilia sobre el carbonilo que facilita su reducción, tanto por vías químicas como enzimáticas.

3.2. Resolución con lipasas

La resolución cinética de alcoholes trifluorados se abordó inicialmente tomando como estructuras modelo el 1-fenil-2,2,2-trifluoroetanol (**26a**) y el 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol (**26b**), este último precursor del odanacatib. Los alcoholes racémicos se obtuvieron en rendimientos moderados por reducción de las correspondientes trifluoroacetofenonas **25a** y **25b** con borohidruro sódico y, por acetilación de los alcoholes, fue posible acceder los correspondientes ésteres **27a** y **27b** (ver *Secciones 3.7.1 - 3.7.3*).

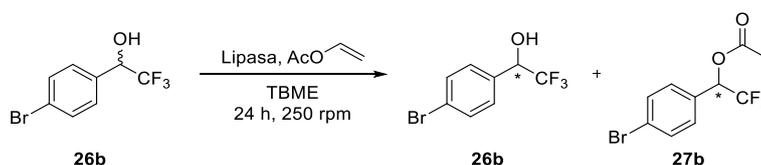
Por un lado, se estudió la reacción de acetilación del alcohol **26a** empleando acetato de vinilo (5 equivalentes) en TBME seco a 30 °C con distintas lipasas (Tabla 15). En general se observaron selectividades entre bajas y moderadas, con lipasas como la CAL-A, AK y PSL-IM, o una escasa reactividad por parte de las lipasas CRL, PPL, RML y TL-IM. Únicamente la CAL-B mostró una excelente selectividad, aunque con una baja conversión (entrada 1), por lo que se decidió intentar aumentar su reactividad utilizando el agente acilante como disolvente (entrada 9) o aumentando la temperatura a 45 °C (entrada 10), resultando inadecuados para alcanzar una conversión adecuada para fines sintéticos.

Basándonos en los resultados encontrados en la resolución del alcohol **26a**, se decidió seleccionar la enzima más selectiva (CAL-B) para el estudio de la reacción de transesterificación entre el acetato de vinilo y el alcohol bromado **26b**. De nuevo, se observaron bajas conversiones y un notable descenso de la enantioselectividad con respecto al sustrato **26a** (Tabla 16). En ambos procesos la CAL-B actúa siguiendo la regla de Kazlauskas, de manera que el enantiómero que reacciona es el que posee configuración *S* (debido al cambio en las reglas CIP) por lo que se requeriría una conversión mínima del 50% para lograr el enantiómero deseado con elevada pureza enantiomérica.

Tabla 15. Resolución cinética del alcohol **26a** mediante acilación catalizada por lipasas.

Entrada	Enzima	t (h)	c (%) ^a	ee _S (%) ^{a,b}	ee _P (%) ^{a,b}	E ^c
1	CAL-B	24	5	5 (R)	>99 (S)	>200
2	CAL-A	6	44	48 (S)	80 (R)	14
3	AK	24	40	13 (R)	69 (S)	6
4	PSL-IM	20	21	22 (R)	95 (R)	48
5	CRL	20	2	---	56 (R)	---
6	PPL	20	<1	---	---	---
7	RML	28	<1	---	---	---
8	TL-IM	28	2	---	84 (R)	---
9 ^d	CAL-B	24	3	3 (R)	>99 (S)	>200
10 ^c	CAL-B	24	21	21 (R)	>99 (S)	>200

Condiciones de reacción: **26a** (0.14 mmol, 24 mg), acetato de vinilo (5 equivalentes, 63 μ L), lipasa (1:1 peso, 24 mg) en TBME anhidro (1.36 mL) a 30 °C y 250 rpm. ^a Conversiones y excesos enantioméricos medidos mediante CG del crudo de reacción; ^b enantiómero mayoritario entre paréntesis; ^c enantioselectividad: $E = \ln[(1-c)(1-ee_P)] / \ln[(1-c)(1+ee_S)]$; ^d acetato de vinilo utilizado como disolvente; ^e 45 °C en tolueno.

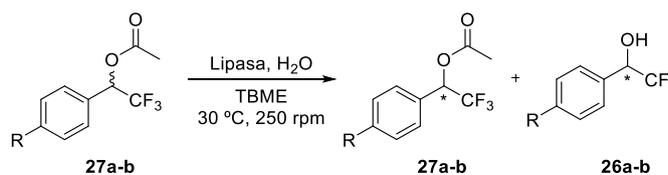
Tabla 16. Resolución cinética del alcohol **26b** mediante acetilación catalizada por lipasas.

Entrada	Enzima	T (°C)	c (%) ^a	ee _S (%) ^{a,b}	ee _P (%) ^{a,b}	E ^c
1	CAL-B	30	12	13 (R)	94 (S)	37
2	CAL-B	45	30	15 (R)	33 (S)	2
3	CAL-A	30	4	<1	<1	---

Condiciones de reacción: **26b** (0.07 mmol, 18 mg), acetato de vinilo (5 equivalentes, 32 μ L), lipasa (1:1 peso, 18 mg) en TBME anhidro (0.70 mL) durante 24 h a 250 rpm. ^a Conversiones y excesos enantioméricos medidos mediante CG del crudo de reacción; ^b enantiómero mayoritario entre paréntesis; ^c enantioselectividad: $E = \ln[(1-c)(1-ee_P)] / \ln[(1-c)(1+ee_S)]$.

Alternativamente, se estudió la hidrólisis de los derivados acetilados **27a** y **27b** y, en este caso, se alcanzaron conversiones del 50% utilizando la CAL-B (Tabla 17) tras 19 horas de reacción con el acetato **27a** (entrada 1) o 16 horas con **27b** (entrada 5). La selectividad mostrada por la CAL-B fue excelente en los dos casos, sin embargo, es necesario un paso adicional de hidrólisis del (*R*)-éster para obtener el alcohol buscado lo cual, sumado al máximo rendimiento teórico del 50% de la resolución cinética, resta interés sintético a esta ruta quimioenzimática.

Tabla 17. Resolución cinética de los acetatos **27a** y **27b** mediante hidrólisis enzimática empleando lipasas.



Entrada	Sustrato	Enzima	t (h)	<i>c</i> (%) ^a	<i>ee_S</i> (%) ^{a,b}	<i>ee_P</i> (%) ^{a,b}	<i>E</i> ^c
1		CAL-B	19	50	>99 (<i>R</i>)	>99 (<i>S</i>)	>200
2	27a	CAL-A	19	34	46 (<i>S</i>)	67 (<i>R</i>)	8
3		PSL-SD	19	<1	---	---	---
4		CAL-B	14.5	49	94	97	>200
5	27b	CAL-B	16	50	98	97	>200

Condiciones de reacción: **27a-b** (0.11 mmol), agua (5 equivalentes), lipasa (1:1 peso, 24 mg) en TBME anhidro (1.10 mL) a 30 °C durante 19 h a 250 rpm^a Conversiones y excesos enantioméricos medidos mediante CG del crudo de reacción; ^b enantiómero mayoritario entre paréntesis; ^c enantioselectividad: $E = \ln[(1-c)(1-ee_P)] / \ln[(1-c)(1+ee_S)]$.

3.3. Biorreducción con ADHs

Teniendo en cuenta lo descrito en los antecedentes de este capítulo, se seleccionaron una serie de ADHs entre las que se encuentran las ya mencionadas ADH-A, *RasADH* y *LbADH*, a las que se sumaron las ADHs de *Sphingobium yanoikuyae* (*SyADH*),²¹⁷ *Thermoanaerobacter* sp. (*ADH-T*),²¹⁸ *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus* (*TeSADH*)²¹⁹, todas ellas sobreexpresadas en *E. coli* y utilizadas

²¹⁸ H. G. Naik, B. Yenziad, C. E. Koning, A. Heise, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 4961-4967.

²¹⁹ K. I. Ziegelmann-Fjeld, M. M. Musa, R. S. Phillips, J. G. Zeikus, C. Vieille, *Prot. Eng. Des. Sel.* **2007**, *20*, 47-55.

en forma de células enteras tras un proceso de liofilización, más la ADH comercial evo-1.1.200. Con esta selección de biocatalizadores se podría acceder, en principio, a los dos enantiómeros de los productos buscados: el alcohol *R* se obtendría con las ADHs que sigue la regla de Prelog (ADH-A, ADH-T, *TeSADH* y *RasADH*) mientras que las ADHs anti-Prelog conducirían a los alcoholes de configuración *S* (*LbADH*, *SyADH* y evo-1.1.200).

3.3.1. Biorreducción de 4'-bromo-2,2,2-trifluoroacetofenona (**26b**)

En la Tabla 18 se muestran los resultados obtenidos en la biorreducción de la cetona **25b** donde se constató que la enantioselectividad exhibida por las enzimas se corresponde con la esperada según su selectividad Prelog o anti-Prelog.

Tabla 18. Biorreducción asimétrica de **25b** catalizada por ADHs.



Entrada	Enzima	Cofactor	<i>c</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^{a,b}
1	ADH-A	NAD ⁺	>99	99 (<i>R</i>)
2	ADH-T	NADP ⁺	>99	>99 (<i>R</i>)
3	<i>TeSADH</i>	NADP ⁺	40	72 (<i>R</i>)
4	<i>RasADH</i>	NADP ⁺	>99	>99 (<i>R</i>)
5	<i>LbADH</i>	NADP ⁺	>99	92 (<i>S</i>)
6	<i>SyADH</i>	NADP ⁺	12	69 (<i>S</i>)
7	evo-1.1.200	NAD ⁺	>99	>99 (<i>S</i>)-

Condiciones de reacción: **25b** (0.010 mmol, 2.5 mg), ADH (15 mg enzimas sobreexpresadas, 0.06 mg evo-1.1.200), NAD(P)⁺ (1 mM) utilizando *i*PrOH (25 μ L) excepto en el caso de *RasADH* [glucosa (60 mM) y GDH (5 U)] como sistema de regeneración del cofactor, en buffer Tris·HCl (50 mM, pH 7.5, 600 μ L) durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. ^a Conversiones y excesos enantioméricos medidos mediante CG del crudo de reacción; ^b enantiómero mayoritario entre paréntesis.

Además del ya esperado resultado con la ADH-A (entrada 1),²¹⁴ se identificaron dos ADHs que permitían obtener el alcohol (*R*)-**26b** con excelente selectividad y conversión, como son la ADH-T (entrada 2) y *RasADH* (entrada 4), mientras que la *LbADH* (entrada 5) y la evo-1.1.200 (entrada 7) condujeron

de forma cuantitativa al alcohol (*S*)-**26b**, destacando la selectividad mostrada por esta última preparación enzimática.

Con las ADHs que mostraron los mejores resultados, se llevó a cabo la repetición de los experimentos a una mayor escala con el fin de realizar un seguimiento temporal de las biorreducciones midiendo las conversiones a partir de alícuotas tomadas cada hora mediante cromatografía de gases. Así, se encontró que la velocidad con la que transcurren estos procesos es muy elevada, alcanzándose conversiones completas en todos los experimentos en tiempos inferiores a las 2 horas de reacción (Tabla 19).

Tabla 19. Estudio de la biorreducción de **25b** a tiempos cortos.



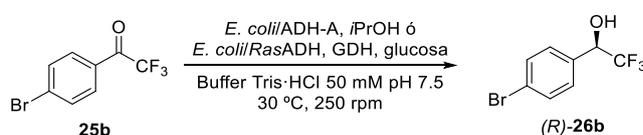
Entrada	Enzima	t (h)	c (%) ^a	ee (%) ^{a,b}
1	ADH-A	1	>99	99 (<i>R</i>)
2	ADH-T	1	>99	>99 (<i>R</i>)
3	<i>Ras</i> ADH	1	>99	>99 (<i>R</i>)
4	<i>Lb</i> ADH	1	98	92 (<i>S</i>)
5		2	>99	92 (<i>S</i>)
6	evo-1.1.200	1	>99	>99 (<i>S</i>)

Condiciones de reacción: **25b** (0.024 mmol, 6.1 mg), ADH (20 mg enzimas sobreexpresadas, 0.12 mg evo-1.1.200), NAD(P)⁺ (1 mM) utilizando *i*PrOH (50 μ L) excepto en el caso de *Ras*ADH [glucosa (60 mM) y GDH (10 U)], en buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7.5, 1.2 mL) a 30 °C y 250 rpm. ^a Conversiones y excesos enantioméricos medidos mediante CG del crudo de reacción; ^b enantiómero mayoritario entre paréntesis.

Una ventaja del uso de células enteras con la ADH sobreexpresada es la posibilidad de que los cofactores necesarios para la catálisis se encuentren de forma residual en el crudo celular, evitando la adición externa de estos costosos reactivos. En la Tabla 20 se muestran las conversiones obtenidas en la síntesis de (*R*)-**26b** con las ADH-A y *Ras*ADH sin adición externa de NAD⁺ y NADP⁺, respectivamente. Aunque presentan una cinética más lenta, es posible alcanzar conversiones completas en la reacción catalizada por la ADH-A tras 16 horas de reacción a una concentración de sustrato de 20 mM (entradas 1 y 2), mientras que en el caso de la *Ras*ADH se detiene a un 82% de conversión (entradas 3 y

4). Esto también ocurre con la ADH-A cuando se utiliza una concentración mucho mayor de sustrato (100 mM), observando que la conversión se detenía en un 85% (entradas 5-7).

Tabla 20. Biorreducción de **25b** sin adición externa de cofactor.



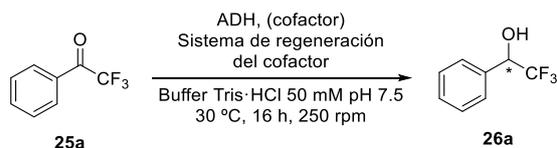
Entrada	Enzima	t (h)	[25b] (mM)	c (%) ^a
1	ADH-A	1	20	76
2		16	20	>99
3	RasADH	1	20	74
4		16	20	82
5	ADH-A	0.5	100	50
6		1	100	60
7		16	100	85

Condiciones de reacción: **25b**, ADH (1:1 peso), *i*PrOH (25 μ L) o glucosa (60 mM) y GDH (5 U), en buffer Tris·HCl (50 mM, pH 7.5, 0.6 mL) a 30 °C y 250 rpm. ^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción.

3.3.2. Biorreducción de 2,2,2-trifluoroacetofenona (25a)

En vista de los prometedores resultados obtenidos con la cetona bromada **25b**, a continuación se procedió a estudiar la biorreducción del sustrato **25a** en profundidad. Los primeros experimentos utilizando las ADHs seleccionadas anteriormente, sin adición externa de cofactor en los casos donde se emplean enzimas sobreexpresadas en *E. coli*, mostraron una elevada actividad y selectividad, así como la posibilidad de obtener ambos enantiómeros de **26a** (Tabla 21).

Tabla 21. Biorreducción de **25a** catalizada por ADHs.



Entrada	Enzima	Cofactor ^a	<i>c</i> (%) ^b	<i>ee</i> (%) ^{b,c}
1	ADH-A	---	92	>99 (<i>R</i>)
2	ADH-T	---	69	>99 (<i>R</i>)
3	<i>Ras</i> ADH	---	>99	>99 (<i>R</i>)
4	<i>Lb</i> ADH	---	>99	97 (<i>S</i>)
5	evo-1.1.200	NAD ⁺	>99	>99 (<i>S</i>)

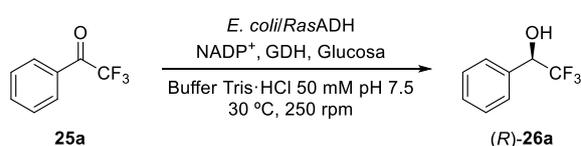
Condiciones de reacción: **25a** (0.012 mmol, 1.7 μ L), ADH (2 mg enzimas sobreexpresadas, 0.02 mg con evo-1.1.200), *i*PrOH (25 μ L) o glucosa (60 mM) y GDH (5 U), en buffer Tris·HCl (50 mM, pH 7.5, 0.6 mL) a 30 °C y 250 rpm durante 16 horas. ^a Sin adición externa de cofactor cuando se utilizaron enzimas sobreexpresadas, concentración 1 mM con evo-1.1.200; ^b conversiones y excesos enantioméricos medidos mediante CG del crudo de reacción; ^c enantiómero mayoritario entre paréntesis.

Cuando se trató de incrementar la concentración del sustrato de 20 mM hasta 100 mM (21 mg) la conversión máxima obtenida utilizando la ADH-A fue del 59% (16 h) y del 92% con la *Ras*ADH (5 h), en ambos casos sin adición externa de cofactor y utilizando una relación en peso enzima-sustrato de 1:1. Sin embargo, la reproducibilidad de estos experimentos fue baja al depender de la cantidad de cofactor que se encuentre en el crudo celular, obteniendo tan solo un 60% de conversión en una segunda prueba con *Ras*ADH a menor escala (10 mg de **25a**).

Por ello, se decidió realizar las pruebas de optimización añadiendo 1 mM del cofactor y tratando de reducir la carga de catalizador (Tabla 22). El empleo de cosolventes resultó imprescindible a estas elevadas concentraciones del sustrato para conseguir conversiones completas. Así, se estudió por un lado el efecto en la reacción de disolventes inmiscibles (hexano y tolueno) en sistemas bifásicos que pueden actuar como reservorio del sustrato y, por otro lado, el empleo de dioxano que da lugar a una única fase acuosa. En ambos casos se tradujo en una mejoría en los valores de conversión cuando el volumen de cosolvente se mantenía por debajo del 10% del total. Esto permitió obtener el alcohol (*R*)-**26a** con conversión completa y logrando una reducción de la carga

de enzima a 1:2 para una concentración de **25a** de 100 mM (entrada 4) y a 1:1.5 a una concentración de 200 mM (entrada 16) en tiempos inferiores a media hora.

Tabla 22. Optimización de la biorreducción de **25a** con *RasADH* a concentraciones elevadas de sustrato.

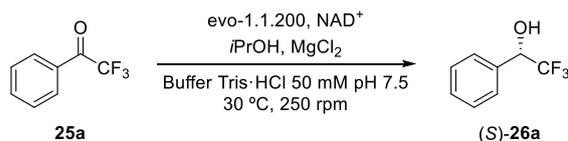


Entrada	[25a] (mM)	Carga enzima ^a	t (h)	Cosolvente (v/v, %)	c (%) ^b
1 ^c	100	1:1	1	---	92
2	100	1:1	0.5	Hexano (10%)	>99
3	100	1:2	1.5	Hexano (10%)	97
4	100	1:2	0.5	Tolueno (5%)	>99
5	100	1:2	0.5	Tolueno (10%)	98
6	100	1:2	0.5	Tolueno (15%)	91
7	150	1:2	0.5	Tolueno (5%)	84
8	200	1:2	0.5	Tolueno (5%)	81
9	200	1:2	0.5	Tolueno (2.5%)	70
10	200	1:2	0.5	Hexano (5%)	81
11	200	1:2	0.5	Hexano (15%)	67
12	200	1:1	0.5	---	86
13	200	1:1	0.5	Hexano (10%)	98
14	200	1:2	3	Dioxano (10%)	90
15	200	1:2	3	Dioxano (10%)	95
16	200	1:1.5	0.3	Dioxano (10%)	>99

Condiciones de reacción: **25a**, *RasADH*, NADP⁺ (1 mM), glucosa (3 equivalentes) y GDH (25 U), en buffer Tris·HCl (50 mM, pH 7.5, 0.6 mL) a 30 °C y 250 rpm. ^a Relación enzima:sustrato en peso; ^b conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción; ^c no avanzó más la reacción a tiempos más largos ni con un recebado de la enzima.

Paralelamente, el enantiómero complementario (*S*)-**26a** se pudo obtener utilizando la ADH evo-1.1.200 a una concentración de sustrato 100 mM optimizando la cantidad empleada de isopropanol, que actúa tanto de cosolvente como de sistema de regeneración del cofactor (Tabla 23).

Tabla 23. Optimización de la biorreducción de **25a** con evo-1.1.200.



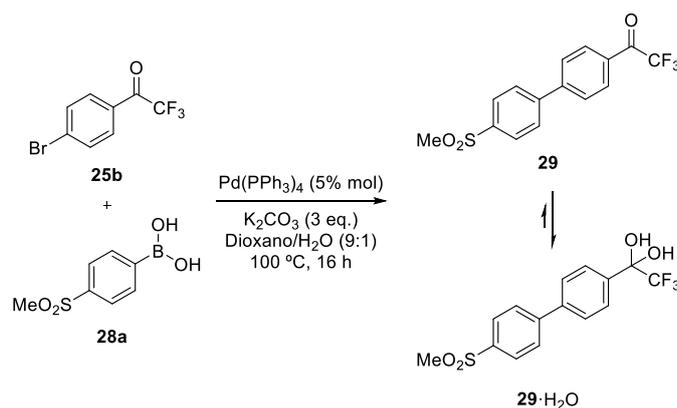
Entrada	t (h)	Cosolvente (v/v, %)	c (%) ^a
1	0.5	<i>i</i> PrOH (5%), tolueno (5%)	31
2	0.5	<i>i</i> PrOH (5%)	34
3	2	<i>i</i> PrOH (5%)	94
4	3	<i>i</i> PrOH (5%)	>99
5 ^b	2	<i>i</i> PrOH (10%)	>99

Condiciones de reacción: **25a** (0.06 mmol, 8.4 μ L), evo-1.1.200 (0.06 mg), NAD⁺ (1 mM), *i*PrOH, MgCl₂ (1.25 mM) en buffer Tris·HCl (50 mM, pH 7.5, 0.6 mL) a 30 °C y 250 rpm. ^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción; ^b no se midió la conversión a tiempos más cortos.

3.3.3. Biorreducción de la cetona **29** precursora del odanacatib

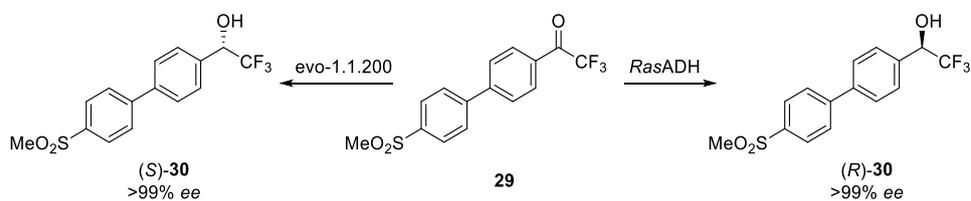
En este momento, se procedió a extender la metodología desarrollada para la biorreducción del precursor diarílico del odanacatib **29**, que se sintetizó mediante una reacción de acoplamiento cruzado entre la cetona **25b** y el ácido borónico **28a** catalizada por Pd(PPh₃)₄ en una mezcla de dioxano y agua a 100 °C (Esquema 76). El análisis del crudo de reacción por RMN-¹H mostró que el producto **29** obtenido se encuentra mayoritariamente en su forma hidratada, como diol geminal, gracias a la mayor estabilidad que le confieren los efectos electrónicos combinados del grupo trifluorometilo y del sulfonilo.²²⁰

²²⁰ C. B. Kelly, M. A. Mercadante, N. E. Leadbeater, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 11133-11148.



Esquema 76. Síntesis del precursor del odanacatib **29**.

Esto no resultó ser un impedimento para las ADHs, pese a la mayor proporción esperada de **29**·H₂O en el medio acuoso en el que actúan las enzimas, encontrando que era posible obtener los dos enantiómeros de **30** en forma enantiopura (Esquema 77). Debido a la baja solubilidad del sustrato, las reacciones se llevaron a cabo a una concentración de 10 mM estudiando el comportamiento de distintos cosolventes: DMSO, THF, tolueno y dioxano. Los mejores resultados se obtuvieron con una proporción de 10% de dioxano (v/v), alcanzando una conversión completa en la síntesis del precursor (*R*)-**30**.²²¹ Por otro lado, el alcohol (*S*)-**30** se obtuvo también con conversión completa empleando la enzima de selectividad opuesta evo-1.1.200 (0.2 mg), utilizando una mezcla 10% de *i*PrOH y 10% de dioxano (v/v) con una concentración de **29** de 20 mM (3.3 mg).



Esquema 77. Síntesis enzimática de los dos enantiómeros de **30** por biorreducción enzimática de **29**.

²²¹ La conversión de la reacción no se pudo analizar cuantitativamente mediante CG porque el producto **30** descompone a las temperaturas de análisis en el cromatógrafo, por lo que el transcurso de la reacción se analizó de manera cualitativa por TLC.

Con estos prometedores resultados, el proceso quimioenzimático en cascada de acoplamiento cruzado y reducción catalizada por una (*R*)-ADH se planteaba viable y las investigaciones realizadas al respecto se muestran en la Sección 3.4.

3.3.4. Extensión del estudio a otras trifluorocetonas

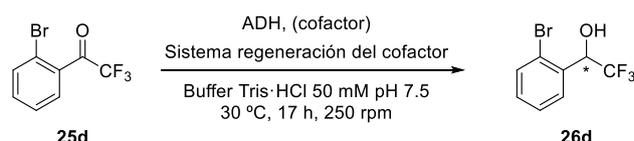
La viabilidad de las ADHs empleadas con los sustratos modelo **25a** y **25b** se evaluó utilizando una serie de derivados de interés como son las 2,2,2-trifluoroacetofenonas monosustituidas con un átomo de bromo en posición *meta* (**25c**) u *orto* (**25d**), así como los derivados de naftilo con el grupo trifluoroacetilo en posiciones 1 (**25e**) o 2 (**25f**). En las Tablas 24-27 se muestran las pruebas preliminares enfocadas a determinar la estereoselectividad que presentan las ADHs, para las que se ha utilizado una concentración de sustrato 20 mM y no se ha añadido cofactor con las enzimas sobreexpresadas.

Tabla 24. Biorreducción de **25c** catalizada por diversas ADHs.



Entrada	Enzima	<i>c</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^{a,b}
1	ADH-A	79	>99 (<i>R</i>)
2	<i>Ras</i> ADH	54	>99 (<i>R</i>)
3	<i>Lb</i> ADH	26	10 (<i>S</i>)
4	evo-1.1.200	74	>99 (<i>S</i>)

Condiciones de reacción: **25c** (0.012 mmol, 1.85 μ L), ADH (6 mg enzimas sobreexpresadas, 0.02 mg evo-1.1.200), sin adición externa de cofactor excepto con evo-1.1.200 (NAD⁺, 1 mM) utilizando *i*PrOH (25 μ L) o, para *Ras*ADH, glucosa (60 mM) y GDH (5 U) en buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7.5, 600 μ L) durante 1 h a 30 °C y 250 rpm. ^a Conversiones y excesos enantioméricos medidos mediante CG del crudo de reacción; ^b enantiómero mayoritario entre paréntesis.

Tabla 25. Biorreducción de **25d** catalizada por distintas ADHs.

Entrada	Enzima	<i>c</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^{a,b}
1	ADH-A	97	>99 (<i>R</i>)
2	<i>Ras</i> ADH	>99	>99 (<i>R</i>)
3	<i>Lb</i> ADH	>99	94 (<i>R</i>)
4	evo-1.1.200	96	>99 (<i>S</i>)

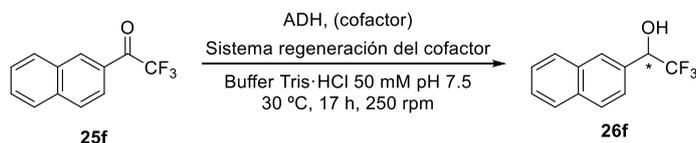
Condiciones de reacción: **25d** (0.012 mmol, 1.85 μ L), ADH (6 mg enzimas sobreexpresadas, 0.02 mg evo-1.1.200), sin adición externa de cofactor excepto con evo-1.1.200 (NAD⁺, 1 mM) utilizando *i*PrOH (25 μ L) o, para *Ras*ADH, glucosa (60 mM) y GDH (5 U) en buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7.5, 600 μ L) durante 17 h a 30 °C y 250 rpm. ^a Conversiones y excesos enantioméricos medidos mediante CG del crudo de reacción; ^b enantiómero mayoritario entre paréntesis.

Sin embargo, la *Lb*ADH exhibió un comportamiento excepcional, ya que entre los sustratos **25b** (Tabla 18) y **25d** (Tabla 25) se produce una inversión en la selectividad, pasando de obtener el enantiómero (*S*)-**26b**, predicho por su selectividad tipo anti-Prelog, a generar (*R*)-**26d** con un 94% *ee*. En el caso del derivado **25c** se observa una situación intermedia donde el producto de la reacción es prácticamente racémico (10% *ee*, Tabla 24). El impedimento estérico cuando el átomo de bromo está situado cerca del carbonilo hace que el sustrato adquiera una conformación alternativa en el centro activo, especialmente cuando el sustituyente está presente en posición *orto*. Esto también se observa con el derivado de naftilo **25e**, aunque con una menor selectividad (Tabla 26). Este es un comportamiento del que no hemos hallado precedente, ya que esta enzima siempre ha mostrado una selectividad anti-Prelog.

Tabla 26. Biorreducción de **25e** catalizada por diversas ADHs.


Entrada	Enzima	<i>c</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^{b,c}
1	ADH-A	>99	>99 (<i>R</i>)
2	<i>Ras</i> ADH	>99	99 (<i>R</i>)
3	<i>Lb</i> ADH	19	71 (<i>R</i>)
4	evo-1.1.200	>99	>99 (<i>S</i>)

Condiciones de reacción: **25e** (0.012 mmol, 2.7 mg), ADH (3 mg enzimas sobreexpresadas, 0.02 mg evo-1.1.200), sin adición externa de cofactor excepto con evo-1.1.200 (NAD⁺, 1 mM) utilizando *i*PrOH (60 μ L) o, para *Ras*ADH, glucosa (60 mM), GDH (5 U) y dioxano (10% v/v) en buffer Tris·HCl (50 mM, pH 7.5, 600 μ L) durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. ^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción; ^b excesos enantioméricos medidos mediante HPLC a partir del derivado acetilado con DMAP y anhídrido acético; ^c enantiómero mayoritario entre paréntesis.

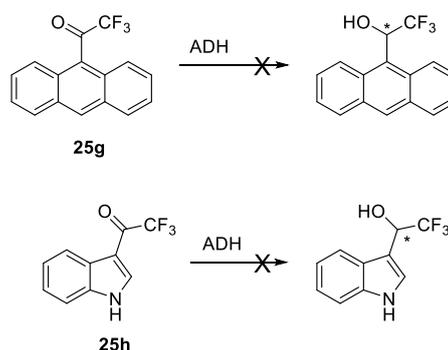
Tabla 27. Biorreducción de **25f** catalizada por distintas ADHs.


Entrada	Enzima	<i>c</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^{b,c}
1	ADH-A	>99	98 (<i>R</i>)
2	<i>Ras</i> ADH	>99	92 (<i>R</i>)
3	<i>Lb</i> ADH	>99	92 (<i>S</i>)
4	evo-1.1.200	>99	>99 (<i>S</i>)

Condiciones de reacción: **25f** (0.012 mmol, 2.7 mg), ADH (6 mg enzimas sobreexpresadas, 0.02 mg evo-1.1.200), sin adición externa de cofactor excepto con evo-1.1.200 (NAD⁺, 1 mM) utilizando *i*PrOH (25 μ L) o, para *Ras*ADH, glucosa (60 mM), GDH (5 U) en buffer Tris·HCl (50 mM, pH 7.5, 600 μ L) durante 24 h a 30 °C y 250 rpm. ^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción; ^b excesos enantioméricos medidos mediante CG a partir del derivado acetilado con DMAP y anhídrido acético; ^c enantiómero mayoritario entre paréntesis.

Por otro lado, las cetonas **25g** y **25h** no resultaron ser sustratos adecuados para las ADHs y no se detectó formación de los correspondientes alcoholes (Esquema 78). El derivado de antraceno (**25g**) posee demasiado impedimento estérico para el centro activo de estas enzimas, mientras que la nula actividad

que presentaron sobre el derivado de indol (**25h**) se debería, presumiblemente, a efectos electrónicos.

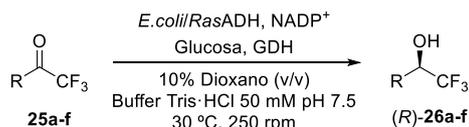


Esquema 78. Trifluoroacetonas no reducidas por las ADHs.

3.3.5. Escalados de los procesos de biorreducción para la síntesis asimétrica de los alcoholes (*R*)- y (*S*)-**26a-f**

La obtención de los alcoholes **26a-f** a una escala de 20-30 mg, que permitió su aislamiento y caracterización, se generalizó con las enzimas *RasADH* y *evo-1.1.200* para sintetizar los enantiómeros *R* y *S*, respectivamente. Como se ha mostrado en las Tablas 22 y 23, el objetivo fijado se basaba en conseguir procesos que operen a concentraciones elevadas de sustrato, de 100 a 200 mM, una carga de ADH lo más baja posible y tiempos cortos de reacción que resulten atractivos desde un punto de vista sintético. Así, utilizando la *RasADH* se han podido obtener los seis alcoholes deseados utilizando una concentración de sustrato de 200 mM y una relación en peso de enzima-sustrato de 1:2 para los derivados **25b-e** (Tabla 28).

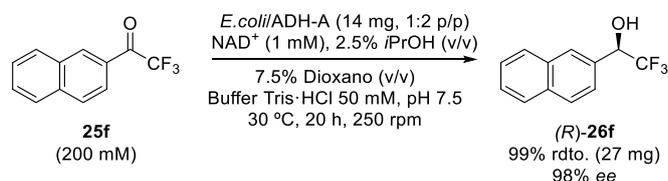
Tabla 28. Biorreducción de trifluoroacetofenonas para la síntesis de (*R*)-**26a-f**.



Entrada	Cetona	RasADH ^a	t (h)	c (%) ^b	ee (%) ^b	Rdto. (%) ^c
1	25a	1:1.5	0.3	>99	>99	99 (21 mg)
2	25b	1:2	5	>99	99	99 (30.5 mg)
3	25c	1:2	5	>99	>99	99 (30.5 mg)
4	25d	1:2	5	>99	>99	95 (29 mg)
5	25e	1:2	5	>99	99	99 (27 mg)
6	25f	1:1.5	5	>99	92	99 (27 mg)

Condiciones de reacción: **25a-f** (0.12 mmol), RasADH, NADP⁺ (1 mM), glucosa (600 mM, 65 mg), GDH (25 U, 0.5 mg) en dioxano (60 μL, 10% v/v) y buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7.5, 540 μL) a 30 °C y 250 rpm. ^a Relación en peso enzima:sustrato; ^b conversiones y excesos enantioméricos medidos mediante CG del crudo de reacción; ^c rendimientos de los productos aislados tras extracción con AcOEt (3 x 5 mL), cantidad de alcohol obtenida entre paréntesis.

Adicionalmente, se escaló la biorreducción de la cetona **25f** con la ADH-A para obtener el correspondiente alcohol con una mayor selectividad (Esquema 79). Esta enzima también fue capaz de convertir el sustrato completamente con una carga 1:2 de enzima-sustrato (p/p), a una concentración de 200 mM de **25f**, cuando se empleó una mezcla de dioxano (7.5% v/v) e isopropanol (2.5% v/v).

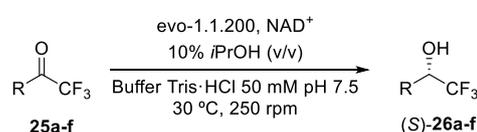


Esquema 79. Escalado de la biorreducción de **25f** con la ADH-A.

Por otro lado, las reacciones catalizadas por la evo-1.1.200 requirieron tiempos más largos de reacción y de ligeras modificaciones en las condiciones de reacción en algún caso (Tabla 29), si bien finalmente se pudieron obtener los seis alcoholes deseados con excelentes rendimientos (98-99%). Un caso sorprendente es el del sustrato *meta*-bromado (**25c**, entrada 3), para el que fue necesario añadir un cosolvente adicional al isopropanol (10% de dioxano) para que la enzima mostrara actividad a estas elevadas concentraciones, recuperando

íntegramente el producto de partida en su ausencia. Por otro lado, la cetona bromada en *orto* (**25d**, entrada 4) solo pudo ser transformada de forma completa reduciendo la concentración a 100 mM, ya que a 200 mM la reacción se detenía en el 86% de conversión tras cuatro días de reacción.

Tabla 29. Síntesis enzimática de (*S*)-**26a-f**.



Entrada	Cetona	evo-1.1.200 (mg)	t (h)	c (%) ^a	ee (%) ^a	Rdto. (%) ^b
1	25a	0.1	4	>99	>99	99 (21 mg)
2	25b	0.1	20	>99	>99	99 (30.5 mg)
3 ^c	25c	0.2	15	>99	>99	98 (30 mg)
4 ^d	25d	0.5	50	99	>99	98 (30 mg)
5	25e	0.1	20	>99	>99	99 (27 mg)
6 ^e	25f	0.2	20	>99	>99	99 (27 mg)

Condiciones de reacción generales: **25a-f** (0.12 mmol), evo-1.1.200, NAD⁺ (1 mM), MgCl₂ (2 mM), isopropanol (60 μL, 10% v/v) en buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7.5, 540 μL) a 30 °C y 250 rpm. ^a Conversiones y excesos enantioméricos medidos mediante CG del crudo de reacción; ^b rendimientos de los productos aislados tras extracción con AcOEt (3 x 5 mL), mostrando la cantidad de alcohol obtenida entre paréntesis; ^c se utilizó 10% de dioxano y 5% de isopropanol (v/v), con 0.1 mg de enzima la conversión es de 85% tras 24 h; ^d concentración de sustrato 100 mM; ^e se alcanzó un 96% de conversión con 0.1 mg de enzima.

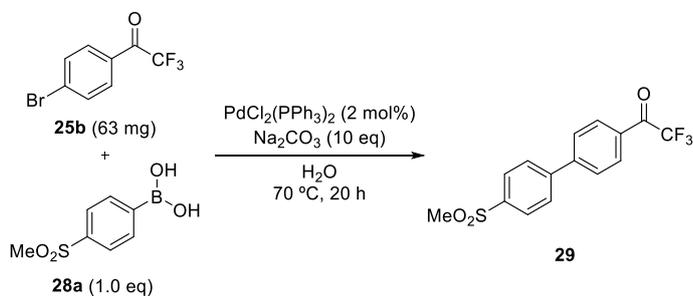
En todos los casos, el sustrato se consume rápidamente al inicio de la reacción, observando conversiones siempre superiores al 50% con la evo-1.1.200 y al 90% con la *RasADH* tras 3 horas de reacción, para luego presentar una cinética más lenta hasta alcanzar la transformación completa en el alcohol. Esta tendencia se evidencia en el caso de la obtención de (*S*)-**25d** (entrada 4), donde fueron necesarias 50 horas para transformar completamente el sustrato pese a que en las 20 primeras horas ya se había obtenido un 88% de conversión.

Además, es importante remarcar la elevada pureza con la que se recuperaron los productos finales tras un simple proceso de extracción y centrifugación (siempre y cuando se haya alcanzado una conversión completa), sin requerir pasos adicionales de purificación y con rendimientos cuantitativos.

3.4. Reacción quimioenzimática *one-pot*

3.4.1. Acoplamiento cruzado en medio acuoso

Identificada la *RasADH* como biocatalizador adecuado para la reducción asimétrica de **29** (ver *Sección 3.3.3*), el siguiente paso fue llevar a cabo la reacción de acoplamiento catalizada por paladio en un medio compatible con las enzimas. Con este fin, se empleó el procedimiento descrito por Gröger y colaboradores¹⁶³ donde se usan los dos reactivos en cantidades estequiométricas a concentración 33 mM, $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ como catalizador (2 mol%) y agua como disolvente a un pH básico (Esquema 80). Satisfactoriamente, se obtuvo la cetona **29** con un excelente rendimiento (95%), precipitando en el medio de reacción en forma de sólido blanco y permitiendo su aislamiento mediante una simple filtración obteniéndose, además, con elevada pureza.

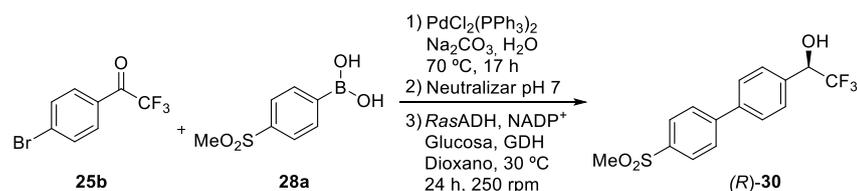


Esquema 80. Reacción de acoplamiento cruzado en medio acuoso.

3.4.2. Prueba de concepto del proceso secuencial

La reacción de acoplamiento se repitió a menor escala (0.033 mmoles de **25b** y **28a**, 1 mL volumen total) y, una vez finalizada, se realizó una neutralización con una disolución acuosa de HCl 1 M, ya que el pH final estaba en torno a 12, demasiado básico para un correcto funcionamiento de la enzima. Después, se añadieron la *RasADH* (en relación 2:1 en peso respecto a **29**) junto con el cofactor (NADP^+ , 1 mM), el sistema de regeneración del cofactor consistente en glucosa (100 mM) y GDH (15 U) y el cosolvente (100 μL de dioxano) necesario para solubilizar la cetona. Tras 24 horas de reacción, el

alcohol (*R*)-**30** se obtuvo con conversión completa y en forma enantiopura (Esquema 81).



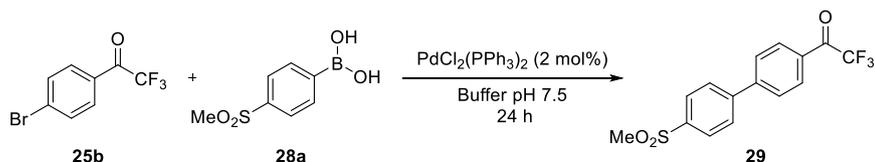
Esquema 81. Síntesis a pequeña escala de (*R*)-**30** en dos pasos secuenciales *one-pot*.

3.4.3. Optimización de las condiciones de reacción

Se trató de encontrar unas condiciones compatibles para el proceso global que evitara el paso intermedio de neutralización, para lo cual se estudió la reacción de acoplamiento cruzado en disoluciones de sales Tris o fosfato a pH 7.5 en pequeña escala (1 mL de volumen total, Tabla 30). En el primer caso, se encontró que la sal Tris inactivaba al catalizador de paladio obteniendo una conversión de **25b** en **29** del 50% cuando se empleaba la disolución reguladora con una concentración de sal de 50 mM y se daba una inactivación total cuando esta se incrementaba hasta 1.0 M (entradas 1 y 2).

Por el contrario, las sales de fosfato no tuvieron ningún efecto negativo sobre el catalizador de paladio y la reacción avanzó más cuanto más elevada fue la concentración de estas, consiguiendo la transformación completa del sustrato usando una concentración de sales de fosfato de 1.0 M en la disolución reguladora. Esto se debe a la necesidad de mantener un pH ligeramente básico para que avance la reacción y las disoluciones de fosfato de 50 y 100 mM no tienen la suficiente capacidad reguladora para neutralizar el ácido formado, obteniendo pHs finales de entre 5 y 6.

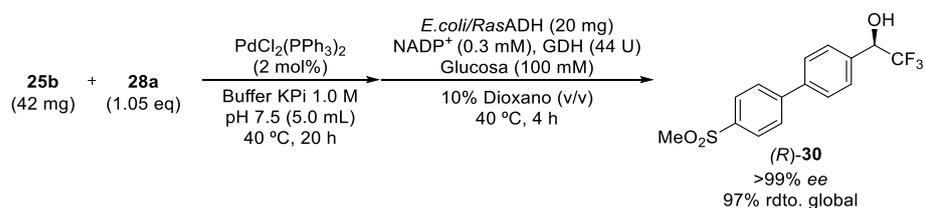
Tabla 30. Reacción de acoplamiento cruzado en disoluciones reguladoras.



Entrada	Buffer (M)	T (°C)	c (%) ^a
1	Tris (50)	70	50
2	Tris (1000)	70	<1
3	KPi (50)	30	78
4	KPi (100)	30	86
5	KPi (1000)	30	>99

^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción.

El uso de un 10% de dioxano como cosolvente, requerido para la biorreducción, no resultó compatible con el primer paso de reacción por lo que debe añadirse junto con la enzima. Finalmente, se encontró que una temperatura de 40 °C era la óptima para llevar a cabo el proceso a mayor escala (Esquema 82). En estas condiciones, se pudo encadenar los dos pasos de reacción secuencialmente a una misma temperatura (40 °C), manteniendo siempre un pH de 7.5 y reduciendo la carga de *RasADH* a 1:2.5 (en relación en peso con el sustrato **29**) para obtener 53 mg del alcohol enantiopuro tras 24 horas.



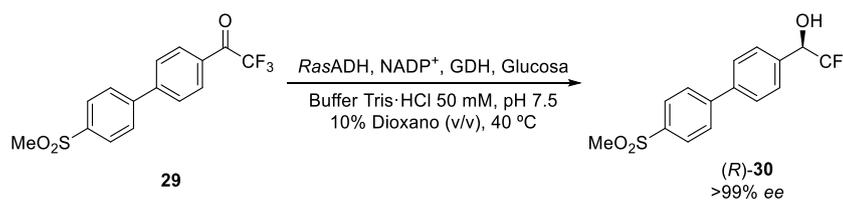
Esquema 82. Escalado de la reacción *one-pot* a concentración 33 mM de **25b**.

Si bien se han hallado unas condiciones homogéneas para ambos pasos, una estrategia en cascada concurrente sigue sin resultar viable ya que se produce la inactivación tanto del catalizador de paladio por el crudo enzimático (no se detecta formación de **29**), como de la ADH por el ácido borónico (14% de formación de **26b** tras 24 horas).

3.4.4. Biorreducción a elevadas concentraciones de sustrato

Aunque generalmente las ADHs, y los biocatalizadores en general, requieren concentraciones bajas de sustrato para operar correctamente (típicamente comprendidos entre 1-50 mM), en vista de los resultados obtenidos con las cetonas trifluorometiladas **25a-f** se trató de determinar la máxima concentración de la cetona **29** admitida por la *RasADH* con el fin de lograr la mayor productividad posible. En la Tabla 31 se muestran las conversiones obtenidas empleando concentraciones de 100-800 mM a pequeña escala (volúmenes de reacción de 450-600 μ L).

Tabla 31. Viabilidad de la biorreducción de **29** a altas concentraciones de sustrato.



Entrada	[29] (mM)	29 (mg)	<i>RasADH</i> ^a	t (h)	c (%) ^b
1	100	19.7	1:2	4	>97
2	200	39.0	1:3	24	>97
3	400	58.5	1:6	24	>97
4	800	120	1:6	24	85

Condiciones de reacción: **29**, *E. coli/RasADH*, NADP⁺ (1 mM), glucosa (1.5 equivalentes) y GDH (10-40 U) en una mezcla de dioxano y buffer Tris·HCl 50 mM pH 7.5 (1:9) agitando magnéticamente a 40 °C. ^a Relación en peso enzima-sustrato; ^b conversiones medidas mediante RMN-¹H tras extraer la reacción con AcOEt (5 x 1 mL).

Aunque la temperatura de reacción se fijó en 40 °C para homogeneizar las condiciones de reacción con las empleadas en el acoplamiento cruzado, los resultados no mostraron una diferencia significativa a 30 °C mientras que una temperatura de 60 °C resulta demasiado elevada para la enzima produciendo su inactivación.

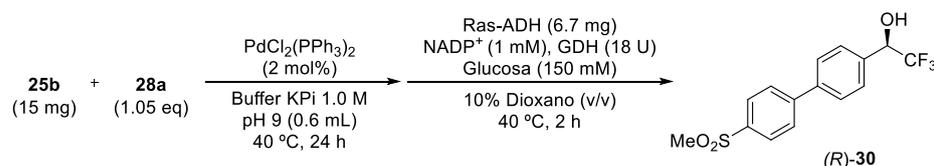
De manera reseñable, los resultados fueron excelentes incluso a una concentración de sustrato de 800 mM, donde se recuperó un 15% de cetona tras la extracción, aunque esto se atribuye a problemas de solubilidad que impidieron su completa conversión, ya que se empleaban 120 mg de **29** en 450 μ L de

volumen (mediante análisis por TLC en el medio de reacción no se detectaba sustrato). Así, la ADH de *Ralstonia* species mostró una actividad sobresaliente, pudiendo transformar 120 mg de sustrato empleando tan solo 20 mg del crudo celular con la enzima sobreexpresada.

3.4.5. Estudio del acoplamiento cruzado en medio acuoso

Para poder combinar satisfactoriamente los dos pasos de reacción, se trasladó el incremento en la concentración de los sustratos en la reacción de acoplamiento de Suzuki. Desafortunadamente, las condiciones utilizadas previamente (Esquema 82) no resultaron adecuadas para una concentración de los reactivos de 100 mM, alcanzando bajas conversiones en **29** a 40 °C.

De nuevo el problema se achacó al pH del medio que, como se ha comentado anteriormente, debe mantenerse alcalino para activar al compuesto borónico y, a medida que avanza la reacción, neutralizar la formación del ácido generado. Así, utilizando una disolución de fosfatos 1.0 M a pH 9 (no actuaría como disolución reguladora propiamente hasta un pH cercano a 8), en lugar de 7.5, el acoplamiento cruzado transcurre con conversión completa. Además, durante la reacción el pH del medio disminuye hasta alcanzar valores óptimos para las enzimas (entre 7.5 y 8) que permiten operar el proceso secuencial de forma sencilla (Esquema 83).



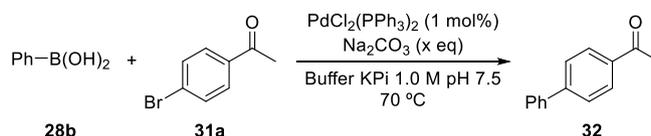
Esquema 83. Proceso a pequeña escala a una concentración de reactivos de 100 mM.

Sin embargo, esta solución no resultó efectiva al doblar la concentración a un valor de 200 mM, ya que al no poseer la disolución de fosfato la suficiente capacidad reguladora la reacción se detenía aproximadamente a un 50% de conversión. Se trató de utilizar una disolución de amonio 1.0 M a pH 9, que sí posee capacidad reguladora a este pH, encontrando una nula formación de **29** probablemente por inhibición del catalizador de paladio. Así, la única

posibilidad para concentraciones superiores a 100 mM fue volver a las condiciones estándar donde es necesario el empleo de una base.

Otro factor que se estudió fue la influencia de la temperatura que, si bien mostró una influencia favorable sobre la velocidad de reacción cuando se incrementó a 60-70 °C, no tuvo un efecto determinante en los valores de conversión finales cuando se observaba un estancamiento de la reacción al disminuir demasiado el pH.

Tomando como reacción modelo el acoplamiento cruzado entre la cetona **28b** y el ácido borónico **31a**, ambos a una concentración 1.0 M en buffer fosfato 1.0 M a pH 7.5, se emplearon distintas concentraciones de la base Na₂CO₃, partiendo inicialmente de 5 equivalentes hasta reducirlos a los 0.5 equivalentes requeridos estequiométricamente (Esquema 84). En todos los casos, la reacción alcanzó conversión completa tras 2 horas y se obtuvo un pH final de 7.5 cuando se emplearon 0.5 equivalentes de Na₂CO₃, un pH de 9 con 1 equivalente o un pH fuertemente básico al usar 5 equivalentes.



Esquema 84. Reacción modelo de acoplamiento cruzado (x = 0.5, 1.0 o 5.0 eq).

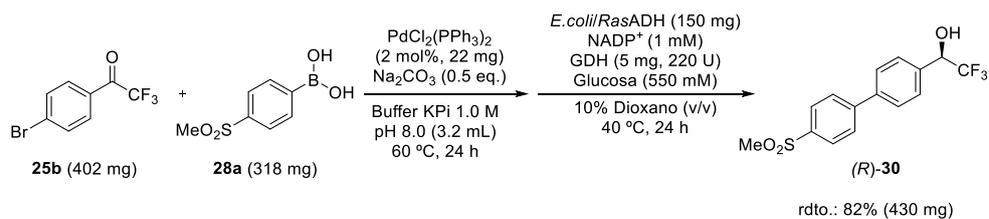
Las condiciones mostradas en el Esquema 84 se trasladaron para la síntesis del precursor del odanacatib, obteniendo la cetona **29** en concentración 1.0 M con un 90% de conversión que precipita como una amalgama de sólido blanco, pudiendo ser directamente filtrado para su aislamiento pero que impide su biorreducción secuencial al no ser eficazmente disuelta por el cosolvente.

3.4.6. Proceso en cascada optimizado

Finalmente, se optó por alcanzar una situación de compromiso en la concentración del proceso, tomando un valor de 500 mM para desarrollar la reacción quimioenzimática de forma secuencial, aunque los dos pasos por separado puedan operar a concentraciones superiores. Con esta estrategia se

pudo evitar el paso intermedio de ajuste de pH aunque sí requiere un cambio en la temperatura de los 60 °C del primer paso a 40 °C en la biorreducción.

Inicialmente, en una escala de 0.55 mL de volumen total, se obtuvieron 70 mg del producto enantiopuro (*R*)-**30** (85% de rendimiento) tras 24 horas de reacción (20 horas para el acoplamiento cruzado y tan solo 4 horas para la biorreducción), obteniendo una productividad de 128 g L⁻¹ d⁻¹. Seguidamente, el escalado del proceso permitió obtener 430 mg del precursor del odanacatib buscado en un 82% de rendimiento tras cinco extracciones con AcOEt y una filtración en sílica para eliminar los restos de paladio (Esquema 85).



Esquema 85. Escalado del proceso quimioenzimático en dos pasos secuenciales a una concentración de reactivos de 500 mM.

CONCLUSIONES

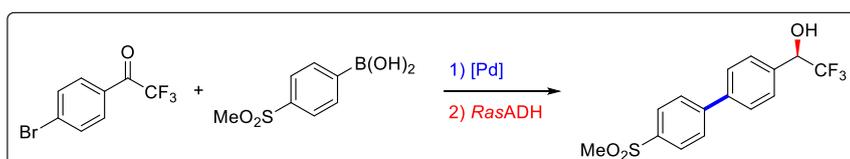
✓ Se han estudiado las resoluciones cinéticas de derivados de 1-fenil-2,2,2-trifluoroetanol mediante procesos de transesterificación o hidrólisis catalizadas por lipasas, encontrando los mejores resultados con la CAL-B en la hidrólisis de los correspondientes acetatos en medio acuoso.

✓ Se han identificado distintas ADHs con enantioselectividad complementaria para llevar a cabo la reducción asimétrica de una serie de derivados de trifluoroacetofenona, lo cual permite la formación de los correspondientes alcoholes de configuración *S* o *R* con excelente selectividad. Este método quimioenzimático se ha seleccionado como el más adecuado para el posterior desarrollo de una metodología secuencial en combinación con procesos de acoplamiento cruzado catalizados por paladio dirigida hacia la formación de un precursor del fármaco odanacatib.

✓ El proceso de biorreducción se ha optimizado pudiendo acceder con conversiones cuantitativas tanto a los alcoholes de configuración *R* con la *E. coli/RasADH*, como a los alcoholes de configuración *S* utilizando la ADH comercial evo-1.1.200, empleando elevadas concentraciones de los sustratos.

✓ La metodología ha resultado ser bastante general, destacando los buenos niveles de actividad y selectividad obtenidos con los derivados bromados de trifluoroacetofenona en las tres posiciones del anillo, pudiendo acceder a los dos enantiómeros de cada alcohol.

✓ Por último, se ha puesto a punto una metodología secuencial en dos pasos para la obtención del (*R*)-alcohol biarílico precursor del odanacatib combinando una reacción de Suzuki, catalizada por un complejo de paladio, y una biorreducción con la *RasADH*.



PARTE EXPERIMENTAL

3.5. General

La procedencia de los reactivos químicos y de las lipasas es común a lo establecido en el Capítulo 1. La ADH evo-1.1.200 (17.6 U/mg) se adquirió a la compañía Evoxx Technologies GmbH (previamente llamada Evocatal) y la glucosa deshidrogenasa a Codexis Inc. (GDH-105, 44 U/mg). Los cofactores NAD⁺ y NADP⁺ fueron adquiridos a Sigma Aldrich. El grupo del profesor Wolfgang Kroutil de la Universidad de Graz cedió las cepas de las alcohol deshidrogenasas procedentes de *Rhodococcus ruber*, *Ralstonia* sp., *Lactobacillus brevis*, *Sphingobium yanoikuyae*, *Thermoanaerboacter* sp. y *Thermoanaerobacter pseudoethanolicus*, que se sobreexpresaron en células de *E. coli*. Los biocatalizadores se utilizaron en forma de células enteras tras un proceso de liofilización del medio de crecimiento y se almacenaron a 4 °C.

El TBME y THF se destilaron y secaron con sodio empleando benzofenona como indicador, y se almacenaron bajo atmósfera de nitrógeno (TBME) o argón (THF) para su uso. La DMF se secó por destilación bajo presión reducida y se almacenó bajo nitrógeno. Los disolventes utilizados como cosolventes en las reacciones de biorreducción se utilizaron sin tratamiento adicional.

3.6. Técnicas de análisis

Las técnicas de cromatografía en gel de sílice, resonancia magnética nuclear, punto de fusión y espectrometría de masas de alta resolución se emplearon según se ha descrito en el Capítulo 1.

Los calibrados de los espectros de RMN de los compuestos **29** y **30** se realizaron sobre las señales del THF-d₈ (¹³C, 25.4 y 67.6 ppm) o las señales residuales del THF-d₄ (¹H, 1.73 y 3.58 ppm).

3.6.1. Cromatografía de gases (CG)

Los análisis mediante cromatografía de gases se realizaron según lo descrito en el Capítulo 1 para el seguimiento de las conversiones y, adicionalmente, se empleó la columna de relleno quiral CP-Chirasil-Dex CB (25 m x 0.25 mm x

0.25 μm) para la medida de los excesos enantioméricos. Las condiciones y los tiempos de retención se recogen en las Tablas 32 y 33.

Tabla 32. Separación analítica mediante CG utilizando la columna aquiral HP-1.

Compuesto	Programa de temperaturas ^a	t_R (min)
25a	60/2/10/150/0/30/220	2.7
26a	60/2/10/150/0/30/220	5.0
25b	90/2/10/180/0/30/300	3.5
26b	90/2/10/180/0/30/300	6.1
25c	90/2/10/180/0/30/300	3.4
26c	90/2/10/180/0/30/300	5.7
25d	90/2/10/180/0/30/300	3.3
26d	90/2/10/180/0/30/300	5.6
25e	90/2/10/180/0/30/300	6.8
26e	90/2/10/180/0/30/300	9.1
25f	90/2/10/180/0/30/300	7.1
26f	90/2/10/180/0/30/300	9.1
25b	100/0/15/300/2	2.3
29	100/0/15/300/2	11.0

^a T_{inicial} (°C)/tiempo (min)/rampa (°C/min)/ T (°C)/tiempo (min)/rampa (°C/min)/ T_{final} (°C).

Tabla 33. Separación analítica quiral por CG utilizando la columna Chirasil-Dex CB.

Compuesto	Programa de temperaturas ^a	t_R (min)
26a	120/5/1/135/0/20/155	13.9 (S) y 14.6 (R)
26a	100/10/10/150/10	19.4 (S) y 19.7 (R)
27a	100/10/10/150/10	5.4 (R) y 5.7 (S)
26b	150/10/1/155/3/20/200	15.3 (S) y 16.1 (R)
27b	115/5/1/120/2/20/180	12.6 (R) y 13.2 (S)
26c	150/10/1/155/3/20/200	15.7 (S) y 16.3 (R)
27c	115/5/1/120/2/20/180	9.6 (R) y 10.3 (S)
26d	150/10/1/155/3/20/200	15.5 (S) y 17.7 (R)
27f	140/15/1/145/0/20/200	16.1 (R) y 16.6 (S)

^a T_{inicial} (°C)/tiempo (min)/rampa (°C/min)/ T (°C)/tiempo (min)/rampa (°C/min)/ T_{final} (°C).

3.6.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se empleó el análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) quiral para la separación analítica de aquellos compuestos racémicos para los que no se encontró un método adecuado mediante CG. Los análisis se realizaron en un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 con un detector visible-ultravioleta, a longitudes de onda 210, 215 y 254 nm, con las columnas Chiralcel OJ-H y Chiralpak AD-H (25 cm x 4.6 mm, tamaño de partícula de 5 μm). Como fase móvil se emplearon mezclas de hexano e isopropanol (*i*PrOH) con un flujo isocrático de 0.8 mL/min a 30 °C de temperatura (Tabla 34).

Tabla 34. Separación analítica mediante HPLC.

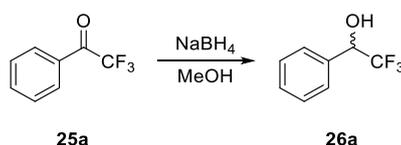
Compuesto	Columna	Hexano/ <i>i</i> PrOH	t_R (min)
27e	Chiralcel OJ-H	97:3	11.8 (<i>R</i>) y 13.8 (<i>S</i>)
30	Chiralpak AD-H	85:15	27.7 (<i>R</i>) y 32.8 (<i>S</i>)

3.6.3. Rotación óptica específica

Las medidas de rotación óptica específica están realizadas en un polarímetro Perkin Elmer 241 utilizando la línea D de una lámpara de sodio (589.3 nm) a 20 °C. Las concentraciones (*c*) están expresadas en g/100 mL y las unidades de los valores de rotación óptica específica son ° mL g⁻¹ dm⁻¹.

3.7. Procedimientos sintéticos

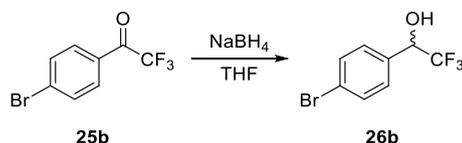
3.7.1. Síntesis de 1-fenil-2,2,2-trifluoroetanol racémico (26a)



Sobre una disolución de la cetona **25a** (2.0 mmol, 281 μL) en MeOH (20 mL) se va añadiendo gradualmente NaBH₄ (8.0 mmol, 303 mg) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación, se añade agua (10 mL) y se destila el MeOH en el rotavapor. Se lleva a cabo la extracción del producto en AcOEt (2 x 20 mL) y las fracciones orgánicas combinadas se lavan

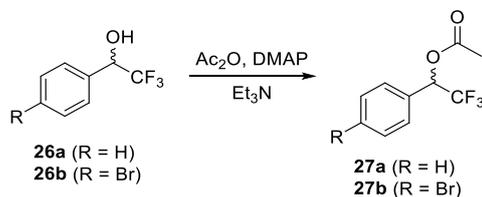
primero con una disolución acuosa saturada de NH_4Cl (2 x 20 mL) y finalmente con una disolución acuosa saturada de NaCl (2 x 20 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 , se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida, obteniendo el alcohol **26a** como un líquido incoloro (210 mg, 60% de rendimiento).

3.7.2. Síntesis de 1-(4-bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol racémico (**26b**)



Una disolución de la cetona **25b** (0.6 mmol, 150 mg) en THF (2 mL) se enfría en un baño de hielo y se añade, poco a poco, NaBH_4 (0.66 mmol, 25 mg). Se deja que la reacción alcance temperatura ambiente y, tras 12 horas, se añaden 4 mL de agua y se destila el THF en el rotavapor. El producto se extrae en AcOEt (4 x 5 mL), las fracciones orgánicas se combinan y se lavan con una disolución acuosa de NaCl saturada (2 x 10 mL). La fase orgánica resultante se seca con Na_2SO_4 , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida, obteniendo el alcohol **26b** como un líquido incoloro (110 mg, 73% de rendimiento).

3.7.3. Síntesis de los ésteres racémicos **27a-b**



En un tubo Schlenk bajo atmósfera de nitrógeno, se añaden el correspondiente alcohol (**26a-b**, 1.0 mmol), anhídrido acético (1 mL, 110.0 mmol), trietilamina destilada (1 mL, 73.0 mmol) y 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina (DMAP, 15 mg, 0.12 mmol) y se agita la disolución a temperatura ambiente durante 4 horas. Se detiene la reacción por adición de una disolución acuosa de HCl 1 N (1.5 mL) y se extrae con AcOEt (3 x 5 mL). Las fases orgánicas se combinan, se secan con Na_2SO_4 , se filtran y el disolvente se

evapora a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (15% AcOEt/hexano) obteniendo los derivados acetilados **27a** (68%) y **27b** (79%).

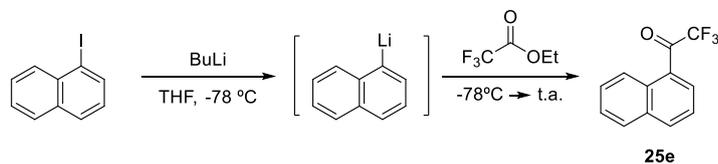
3.7.4. Procedimiento general para la resolución cinética enzimática de los alcoholes racémicos **26a-b** mediante acetilación

En un Erlenmeyer se añade a una disolución del alcohol **26a-b** (0.14 mmol) en TBME seco (1.36 mL) y bajo atmósfera de nitrógeno el acetato de vinilo (0.70 mmol, 63 μ L) y la lipasa (relación 1:1 en peso enzima-sustrato). La reacción se incuba a 30 °C en un agitador orbital a 250 rpm, monitorizando el transcurso de la reacción mediante CG y, alcanzado el tiempo óptimo, se detiene la reacción por filtración de la enzima.

3.7.5. Procedimiento general para la resolución cinética de los ésteres racémicos **27a-b** mediante hidrólisis

En un Erlenmeyer, se disuelve el éster **27a-b** (0.11 mmol) en TBME seco (1.1 mL) y se añade agua (0.55 mmol, 10 μ L) y la lipasa (relación 1:1 en peso enzima-sustrato). La reacción se incuba a 30 °C en un agitador orbital a 250 rpm, monitorizando el transcurso de la reacción mediante CG.

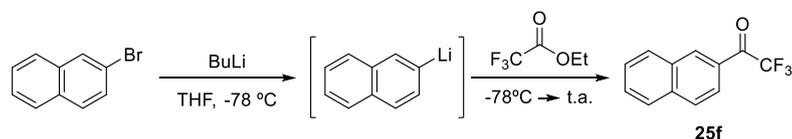
3.7.6. Síntesis de 2,2,2-trifluoro-1-(1-naftil)etanona (**25e**)



En un tubo Schlenk, se disuelve 1-yodonaftaleno (1.5 mmol, 219 μ L) en THF seco (7.5 mL) bajo atmósfera de argón y se enfría a -78 °C. Se añade lentamente BuLi (2.5 M en hexano, 1.65 mmol, 660 μ L), manteniendo la temperatura a -78 °C, y se agita durante 30 minutos, tras lo cual se añade trifluoroacetato de etilo (1.8 mmol, 214 μ L) y se deja que la reacción alcance temperatura ambiente. Tras una hora, se evapora el disolvente en el rotavapor, el crudo se redisuelve en AcOEt (10 mL) y se lava, en primer lugar, con agua

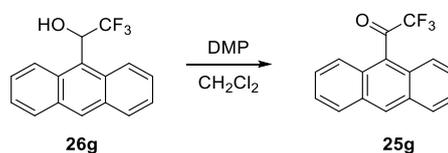
(10 mL) y luego con una disolución acuosa saturada de NaCl (10 mL). La fase orgánica resultante se seca con Na₂SO₄, se filtra y el disolvente se evapora a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (10% AcOEt/hexano), obteniendo **25e** como un aceite amarillo (202 mg, 60%).

3.7.7. Síntesis de 2,2,2-trifluoro-1-(2-naftil)etanona (**25f**)



El 2-bromonaftaleno (1.5 mmol, 311 mg) se disuelve en THF seco (7.5 mL) en un matraz Schlenk bajo atmósfera de argón y se enfría a -78 °C. Se añade gota a gota BuLi (2.5 M en hexano, 1.65 mmol, 660 μL) y se agita durante 30 minutos, manteniendo la temperatura a -78 °C. Una vez formado el anión, se añade trifluoroacetato de etilo (1.8 mmol, 214 μL) y se agita una hora adicional dejando alcanzar temperatura ambiente. A continuación, se evapora el disolvente bajo presión reducida y se redisuelve en AcOEt (10 mL), se lava con agua (10 mL) y una disolución salina concentrada (10 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ y el disolvente se evapora a presión reducida para obtener **25f** como un sólido amarillo (261 mg, 78%).

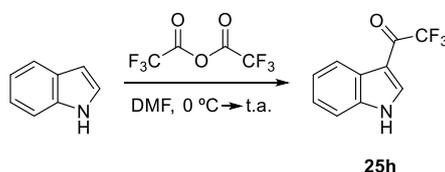
3.7.8. Síntesis de 1-(9-antracil)-2,2,2-trifluoroetanona (**25g**)



Sobre una disolución de 1-(9-antracil)-2,2,2-trifluoroetanol (**26g**, 0.10 mmol, 28 mg) en diclorometano (0.67 mL) se añade el peryodinano de Dess-Martin (DMP, 0.11 mmol, 47 mg) y se agita a temperatura ambiente durante 16 horas. Se detiene la reacción añadiendo una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ y Na₂S₂O₃ (5 x 2 mL), y se extrae el producto en CH₂Cl₂ (2 x 5 mL). Se combinan las fases orgánicas y se lavan con una disolución acuosa saturada

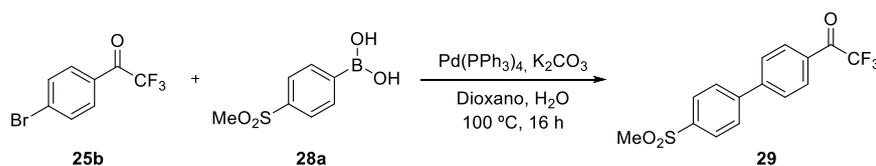
de NaCl (2 x 5 mL). La fase orgánica resultante se seca con Na₂SO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida, obteniendo la cetona **25g** como un sólido naranja (23 mg, 86% rendimiento).

3.7.9. Síntesis de 2,2,2-trifluoro-1-(1*H*-indol-3-il)etanona (**25h**)



En un matraz Schlenk bajo atmósfera de nitrógeno, se disuelve indol (0.5 mmol, 59 mg) en DMF seca (2.5 mL) y se enfría a 0 °C. A continuación, se añade anhídrido trifluoroacético (0.75 mmol, 104 µL) y se agita la disolución durante 1 hora, tras lo cual se deja alcanzar temperatura ambiente y se agita otra hora adicional. Se detiene la reacción añadiendo una mezcla de agua/hielo que produce la precipitación del producto **25h**, el cual se aísla por filtración (65 mg, 61%).

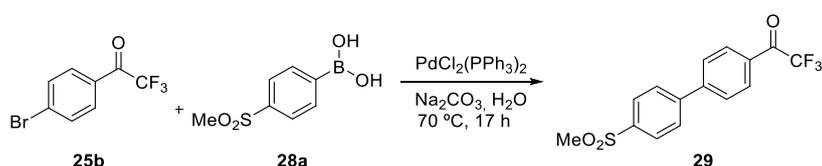
3.7.10. Síntesis de 4'-[4-(metilsulfonil)fenil]trifluoroacetofenona (**29**) en medio orgánico



En un matraz tipo Schlenk, se añaden K₂CO₃ (3.0 mmol, 415 mg) y ácido 4-(metilsulfonil)fenilborónico (**28a**, 1.0 mmol, 200 mg) y una mezcla de dioxano/agua desoxigenada (9:1 en volumen, 6 mL). Bajo atmósfera de nitrógeno, se adiciona 4'-bromotrifluoroacetofenona (**25b**, 1.0 mmol, 152 µL) y el catalizador Pd(PPh₃)₄ (0.05 mmol, 58 mg), agitando la mezcla durante 16 horas a reflujo. A continuación, se destila el dioxano en el rotavapor y la mezcla obtenida se extrae empleando CH₂Cl₂ (4 x 5 mL). Se combinan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄ y se filtran, tras lo cual se elimina el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante filtración en gel de

sílice (50% AcOEt/hexano), obteniendo el producto del acoplamiento **29** como un sólido amarillento (115 mg, 35%).

3.7.10. Síntesis de **29** en medio acuoso



Sobre una disolución de Na_2CO_3 (2.5 mmol, 265 mg) en agua (7.5 mL) se añaden, sucesivamente, el ácido borónico **28a** (0.25 mmol, 50 mg), el bromuro **25b** (0.25 mmol, 38 μL) y el catalizador $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (0.005 mmol, 3.5 mg). La mezcla se agita durante 17 horas a $70\text{ }^\circ\text{C}$, observando la formación de un precipitado blanco. El producto se filtra en una placa y se lava con agua fría, obteniendo **29** como un sólido blanco (78 mg, 95%).

3.7.11. Procedimiento general para los ensayos de biorreducción con ADHs sobreexpresadas en *E. coli*

En un tubo Eppendorf, se suspenden las células de *E. coli* que contienen sobreexpresada la correspondiente ADH (3-15 mg) en buffer Tris·HCl (600 μL , 50 mM, pH 7.5) y se añade isopropanol (25 μL) como sistema de regeneración del cofactor y el sustrato **25a-h** o **29** (0.012 mmol) y se incuba en un agitador orbital a 250 rpm y $30\text{ }^\circ\text{C}$. La reacción se detiene y se extrae con AcOEt (3 x 500 μL), se lavan las fases orgánicas con agua (500 μL), se secan con Na_2SO_4 . y se analiza directamente mediante cromatografía de gases.

3.7.12. Procedimiento general para los ensayos de biorreducción con la ADH de *Ralstonia* sp.

En un tubo Eppendorf, se suspende la ADH de *Ralstonia* sp. sobreexpresada en *E. coli* (3-15 mg) en buffer Tris·HCl (600 μL , 50 mM, pH 7.5) y se añaden glucosa (60 mM) y GDH (5 U), como sistema de regeneración del cofactor, y el sustrato **25a-h** o **29** (0.012 mmol) y se incuba en un agitador orbital a 250 rpm y $30\text{ }^\circ\text{C}$. La reacción se detiene y se extrae con AcOEt (3 x 500 μL), se lavan las

fases orgánicas con agua (500 μ L), se secan con Na_2SO_4 . y se analiza directamente mediante cromatografía de gases.

3.7.13. Procedimiento general para los ensayos de biorreducción con la ADH evo-1.1.200

En un tubo Eppendorf, se disuelve el sustrato **25a-h** o **29** (0.012 mmol) en isopropanol (25 μ L) y se añaden NAD^+ (1 mM), MgCl_2 (1.25 mM), la enzima evo-1.1.200 (20 μ L de un *stock* preparado disolviendo 1 mg de enzima en 1 mL de buffer Tris·HCl 50 mM a pH 7.5) y el buffer Tris·HCl (600 μ L volumen total, 50 mM, pH 7.5) y se incuba en un agitador orbital a 250 rpm y 30 °C. La reacción se detiene y se extrae con AcOEt (3 x 500 μ L), se lavan las fases orgánicas con agua (500 μ L), se secan con Na_2SO_4 y se analiza directamente mediante cromatografía de gases.

3.7.14. Procedimiento general para la síntesis de (*R*)-26a-f con *RasADH*

Sobre una disolución del alcohol **25a-f** (0.12 mmol) en dioxano (60 μ L, 10% v/v), se añaden NADP^+ (1 mM), glucosa (600 mM) y GDH (0.5 mg, 25 U) y buffer Tris·HCl (540 μ L, 50 mM, pH 7.5). Se adicionan la *E. coli/RasADH* (1:1.5 a 1:2 en peso enzima-sustrato) y se agita a 250 rpm y 30 °C durante el tiempo indicado (ver *Sección 3.3.5*, Tabla 28). Una vez completada la reacción, se extrae con AcOEt (3 x 5 mL), las fases orgánicas combinadas se lavan con agua (2 x 5 mL), se secan con Na_2SO_4 y se filtran. El disolvente se evapora a presión reducida, aislando los alcoholes (*R*)-**26a-f** sin necesidad de purificación adicional.

3.7.15. Procedimiento general para la síntesis de (*S*)-26a-f con evo-1.1.200

Sobre una mezcla del alcohol **25a-f** (0.12 mmol) e isopropanol (60 μ L, 10% v/v), se añaden NAD^+ (1 mM), MgCl_2 (2 mM), buffer Tris·HCl (540 μ L, 50 mM, pH 7.5) y la ADH evo-1.1.200 (0.1-0.5 mg). La reacción se incuba en un agitador orbital a 250 rpm y 30 °C durante el tiempo especificado (ver *Sección 3.3.5*, Tabla 29). Una vez transformado todo el producto de partida, se extrae la reacción con AcOEt (3 x 5 mL) y se combinan las fases orgánicas para lavarlas con agua (2 x

5 mL), secarlas con Na₂SO₄ y filtrarlas. El disolvente se evapora a presión reducida y, sin requerir purificación adicional, se obtienen los alcoholes (*S*)-**26a-f**.

3.7.16. Síntesis de (*R*)-**26f** con *E. coli*/ADH-A

El sustrato **25f** (27 mg, 0.12 mmol) se disuelve en una mezcla de dioxano (45 µL, 7.5% v/v) e isopropanol (15 µL, 2.5% v/v), se añade NAD⁺ (1 mM), buffer Tris·HCl (540 µL, 50 mM, pH 7.5) y el liofilizado de *E. coli* que contiene la ADH de *Rhodococcus ruber* (14 mg, 1:2 en peso respecto al sustrato). La reacción se agita a 250 rpm y 30 °C durante 20 horas, tras lo cual, se extrae en AcOEt (3 x 5 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con agua (2 x 5 mL), se secan con Na₂SO₄, se filtran y el disolvente se evapora a presión reducida, obteniendo el alcohol (*R*)-**26f** (27 mg, 99% rendimiento, 98% de exceso enantiomérico).

3.7.17. Proceso secuencial a concentración 33 mM de sustratos

En una disolución reguladora de fosfatos (5.0 mL, 1.0 M, pH 7.5) se añaden, sucesivamente, el ácido borónico **28a** (0.173 mmol, 35 mg), el bromuro **25b** (0.165 mmol, 42 mg) y el catalizador PdCl₂(PPh₃)₂ (0.0033 mmol, 2.3 mg) y se agita a 40 °C durante 20 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se añaden dioxano (500 µL, 10% v/v), NADP⁺ (1 mg, 0.3 mM), GDH (1 mg, 44 U), glucosa (90 mg, 100 mM) y *E. coli*/RasADH (20 mg) y se agita 4 horas adicionales a 40 °C. La reacción se extrae con AcOEt (4 x 8 mL) y las fases orgánicas combinadas se lavan con agua (2 x 10 mL), se secan con Na₂SO₄, se filtran y el disolvente se evapora a presión reducida, obteniendo (*R*)-**30** en forma de sólido amarillo (53 mg, 97% de rendimiento global).

3.7.18. Proceso secuencial a concentración 100 mM de sustratos

En una disolución de fosfatos (600 µL, 1.0 M, pH 9.0) se mezclan ácido borónico **28a** (0.065 mmol, 13 mg), bromuro **25b** (0.06 mmol, 15 mg) y PdCl₂(PPh₃)₂ (0.0012 mmol, 0.8 mg) y se agita a 40 °C durante 24 horas. Una vez finalizado el primer paso, se obtiene una medida de pH de 8 en el medio de reacción y se añaden dioxano (60 µL, 10% v/v), NADP⁺ (0.4 mg, 1 mM), GDH

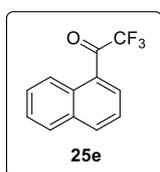
(0.4 mg, 18 U), glucosa (16 mg, 100 mM) y *E. coli/RasADH* (6.5 mg, relación 1:3 en peso enzima-**29**) y se agita otras 4 horas manteniendo la temperatura a 40 °C. Se realizan tres extracciones con AcOEt (3 x 3 mL) y las fases orgánicas combinadas se lavan con agua (1 x 5 mL), se secan con Na₂SO₄, se filtran y el disolvente se evapora a presión reducida, obteniendo (*R*)-**30** como un sólido amarillo (19 mg, 97% de rendimiento global).

3.7.19. Escalado de la cascada quimioenzimática a concentración 500 mM de sustratos

Se disuelve Na₂CO₃ (2.15 mmol, 228 mg) en una reguladora de fosfatos (3.2 mL, 1.0 M, pH 8) y se añaden el borónico **28a** (1.59 mmol, 318 mg), el bromuro **25b** (1.59 mmol, 402 mg) y PdCl₂(PPh₃)₂ (0.032 mmol, 22 mg). La mezcla se agita durante 24 horas a 60 °C obteniendo un pH de 8 al finalizar el primer paso de reacción. A continuación, se añaden dioxano (300 µL), NADP⁺ (2.5 mg, 1 mM), GDH (5 mg, 220 U), glucosa (347 mg, 550 mM) y el crudo enzimático liofilizado de *RasADH* (150 mg, relación 1:3.5 en peso enzima-**29**) y se agita a 40 °C durante 24 horas. El producto se extrae en un tubo de centrifuga Falcon con AcOEt (4 x 20 mL), las fases orgánicas combinadas se lavan con agua (2 x 20 mL) y se filtran a través de gel de sílice. Se seca con Na₂SO₄, se filtra y el disolvente se evapora a presión reducida, obteniendo (*R*)-**30** con un 82% de rendimiento global (430 mg).

3.8. Datos experimentales

2,2,2-Trifluoro-1-(1-naftil)etanona (25e)



Fórmula empírica: C₁₂H₇F₃O

Peso molecular: 224.18 g/mol

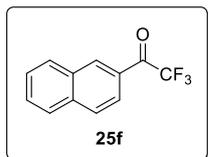
Aspecto: aceite amarillo

Rendimiento: 60% *R_f* (10% AcOEt/hexano): 0.48

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.51-7.64 (m, 2H), 7.66-7.74 (m, 1H), 7.91 (d, ³*J*_{HH} = 8.0 Hz, 1H), 8.12 (d, ³*J*_{HH} = 8.3 Hz, 1H), 8.19-8.25 (m, 1H), 8.87 (d, ³*J*_{HH} = 8.6 Hz, 1H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 116.8 (q, ¹*J*_{CF} = 293.1 Hz, C), 124.2 (CH), 125.3 (CH), 126.3 (C), 127.2 (CH), 129.1 (CH), 129.6 (CH), 131.3 (C), 131.8 (q, ⁴*J*_{CF} = 4.0 Hz, CH), 134.0 (C), 136.3 (CH), 182.4 (q, ²*J*_{CF} = 33.7 Hz, C) ppm

2,2,2-Trifluoro-1-(2-naftil)etanona (25f)



Fórmula empírica: C₁₂H₇F₃O

Peso molecular: 224.18 g/mol

Aspecto: sólido amarillento

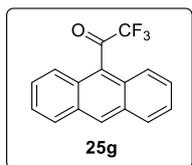
Rendimiento: 78% **R_f** (10% AcOEt/hexano): 0.39

Pf: 37.6-38.4 °C; bibliografía:²²² 35-37 °C

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.58-7.73 (m, 2H), 7.86-8.10 (m, 4H), 8.62 (s, 1H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 117.0 (q, ¹J_{CF} = 291.5 Hz, C), 124.3 (q, ⁴J_{CF} = 1.5 Hz, CH), 127.3 (C), 127.6 (CH), 128.0 (CH), 129.2 (CH), 130.2 (CH), 130.3 (CH), 132.3 (C), 133.4 (q, ⁴J_{CF} = 2.7 Hz, CH), 136.6 (C), 180.6 (q, ²J_{CF} = 35.0 Hz, C) ppm

1-(9-Antracil)-2,2,2-trifluoroetanona (25g)



Fórmula empírica: C₁₆H₉F₃O

Peso molecular: 274.24 g/mol

Aspecto: sólido amarillo

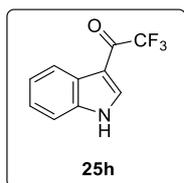
Rendimiento: 86% **Pf:** 174.2-175.7 °C

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.50-7.62 (m, 4H), 7.72-7.78 (m, 2H), 8.03-8.10 (m, 2H), 8.61 (s, 1H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 116.1 (q, ¹J_{CF} = 293.3 Hz, C), 124.0 (2CH), 126.0 (2CH), 127.5 (C), 128.0 (2CH), 128.9 (2C), 129.1 (2CH), 130.8 (2C), 131.1 (CH), 191.3 (q, ²J_{CF} = 37.6 Hz, C) ppm

²²² H. A. Schenck, P. W. Lenkoski, I. Choudhury-Mukherjee, S.-H. Ko, J. P. Stables, M. K. Patel, M. L. Brown, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 979-993.

2,2,2-Trifluoro-1-(1*H*-indol-3-il)etanona (25h)



Fórmula empírica: C₁₀H₆F₃NO

Peso molecular: 213.16 g/mol

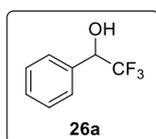
Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 61% **Pf:** 208.9-209.5 °C; bibliografía:²²³ 207-211 °C

RMN-¹H (THF-d₈, 300.13 MHz): δ 7.24-7.33 (m, 2H), 7.44-7.51 (m, 1H), 8.21 (dq, *J*_{HH} = 3.6, 1.7 Hz), 1H 8.28-8.34 (m, 1H), 11.6 (sa, 1H) ppm

RMN-¹³C (THF-d₈, 75.5 MHz): δ 111.2 (q, ³*J*_{CF} = 6.0 Hz, C), 113.1 (CH), 118.3 (q, ¹*J*_{CF} = 291.4 Hz, C), 122.9 (CH), 124.1 (CH), 125.2 (CH), 127.5 (C), 136.7 (q, ⁴*J*_{CF} = 5.0 Hz, CH), 138.0 (C), 175.2 (q, ²*J*_{CF} = 34.2 Hz, C) ppm

1-Fenil-2,2,2-trifluoroetanol (26a)



Fórmula empírica: C₈H₇F₃O

Peso molecular: 176.14 g/mol

Aspecto: aceite incoloro

Rendimiento: 99% **R_f** (30% AcOEt/hexano): 0.80

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 3.06 (sa, 1H), 5.00 (q, ³*J*_{HF} = 6.8 Hz, 1H), 7.38-7.51 (m, 5H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 72.9 (q, ²*J*_{CF} = 32.6 Hz, CH), 124.4 (q, ¹*J*_{CF} = 282.1 Hz, C), 127.6 (2CH), 128.7 (2CH), 129.7 (CH), 134.1 (C) ppm

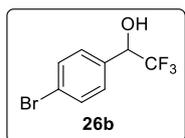
RMN-¹⁹F (CDCl₃, 282.35 MHz): δ -78.38 (d, ³*J*_{HF} = 6.8 Hz) ppm

Rotación óptica específica: [α]_D²⁰ = -29.8 (*c* 1, CH₂Cl₂, >99% *ee* (*R*)-**26a**); bibliografía [α]_D²⁰ = -12.5 (*c* 0.4, CH₂Cl₂, 56% *ee*)²²⁴

²²³ J. H. Wynne, C. T. Lloyd, S. D. Jensen, S. Boson, W. M. Stalick, *Synthesis*, **2004**, 2277-2282.

²²⁴ H. Zhao, B. Qin, X. Liu, X. Feng, *Tetrahedron*, **2007**, 63, 6822-6826.

1-(4-Bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol (26b)



Fórmula empírica: C₈H₆BrF₃O

Peso molecular: 255.03 g/mol

Aspecto: aceite incoloro

Rendimiento: 99% **R_f** (20% AcOEt/hexano): 0.56

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 3.20 (sa, 1H), 4.96 (q, ³J_{HF} = 6.6 Hz, 1H), 7.33 (d, ³J_{HH} = 8.2, 2H), 7.51-7.57 (m, 2H) ppm

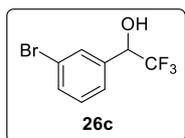
RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 72.3 (q, ²J_{CF} = 32.4 Hz, CH), 123.9 (C), 124.1 (q, ¹J_{CF} = 282.2 Hz, C), 129.2 (2CH), 131.9 (2CH), 132.9 (C) ppm

RMN-¹⁹F (CDCl₃, 282.35 MHz): δ -78.50 (d, ³J_{HF} = 6.7 Hz) ppm

HRMS (ESI, *m/z*) (C₈H₅BrF₃O)⁺ (M-H): calculada 252.9481, encontrada 252.9471

Rotación óptica específica: [α]_D²⁰ = -32.0 (*c* 1, CH₂Cl₂, >99% *ee* (*R*)-**26b**); bibliografía [α]_D²⁰ = -27.5 (*c* 1.06, EtOH, 92% *ee*)²⁰⁹

1-(3-Bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol (26c)



Fórmula empírica: C₈H₆BrF₃O

Peso molecular: 255.03 g/mol

Aspecto: aceite incoloro **Rendimiento:** 99%

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.88 (sa, 1H), 5.02 (q, ³J_{HF} = 6.7 Hz, 1H), 7.03 (t, ³J_{HH} = 7.8 Hz, 1H), 7.43 (d, ³J_{HH} = 7.7 Hz, 1H), 7.57 (d, ³J_{HH} = 7.8 Hz, 1H), 7.73 (s, 1H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 72.2 (q, ²J_{CF} = 32.3 Hz, CH), 122.8 (C), 124.1 (q, ¹J_{CF} = 282.3 Hz, C), 126.3 (q, ⁴J_{CF} = 1.4 Hz, CH), 130.3 (CH), 130.6 (q, ⁴J_{CF} = 1.2 Hz, CH), 132.8 (CH), 136.1 (q, ³J_{CF} = 1.2 Hz, C) ppm

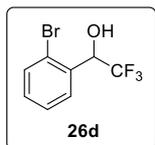
RMN-¹⁹F (CDCl₃, 282.35 MHz): δ -78.35 (d, ³J_{HF} = 6.7 Hz) ppm

HRMS (ESI, *m/z*) (C₈H₅BrF₃O)⁻ (M-H): calculada 252.9481, encontrada 252.9468

Rotación óptica específica: [α]_D²⁰ = -23.5 (*c* 1, CH₂Cl₂, >99% *ee* (*R*)-**26c**); bibliografía [α]_D²⁰ = -7.3 (*c* 0.11, CH₂Cl₂, 51% *ee*)²²⁵

²²⁵ S. Wu, J. Guo, M. Sohail, C. Cao, F.-X. Chen, *J. Fluorine Chem.* **2013**, *148*, 19-29.

1-(2-Bromofenil)-2,2,2-trifluoroetanol (26d)



Fórmula empírica: C₈H₆BrF₃O

Peso molecular: 255.03 g/mol

Aspecto: aceite incoloro

Rendimiento: 98%

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.95 (sa, 1H), 5.67 (q, ³J_{HF} = 6.3 Hz, 1H), 7.31 (td, ³J_{HH} = 7.8, ⁴J_{HH} = 1.7 Hz, 1H), 7.45 (td, ³J_{HH} = 7.6, ⁴J_{HH} = 1.0 Hz, 1H), 7.65 (dd, ³J_{HH} = 8.0, ⁴J_{HH} = 1.2 Hz, 1H), 7.73 (d, ³J_{HH} = 7.7 Hz, 1H) ppm

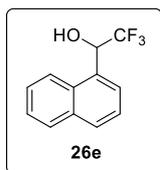
RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 71.3 (q, ²J_{CF} = 32.5 Hz, CH), 124.0 (C), 124.4 (q, ¹J_{CF} = 282.9 Hz, C), 128.0 (CH), 129.4 (q, ⁴J_{CF} = 1.5 Hz, CH), 131.1 (CH), 133.1 (CH), 133.8 (q, ³J_{CF} = 1.2 Hz, C) ppm

RMN-¹⁹F (CDCl₃, 282.35 MHz): δ -77.62 (d, ³J_{HF} = 6.3 Hz) ppm

HRMS (ESI, *m/z*) (C₈H₅BrF₃O)⁻ (M-H): calculada 252.9481, encontrada 252.9491

Rotación óptica específica: [α]_D²⁰ = -15.4 (*c* 0.5, CH₂Cl₂, >99% *ee* (*R*)-**26c**)

2,2,2-Trifluoro-1-(1-naftil)etanol (26e)



Fórmula empírica: C₁₂H₉F₃O

Peso molecular: 226.20 g/mol

Aspecto: aceite amarillo

Rendimiento: 99%

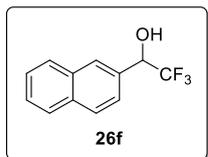
RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.90 (sa, 1H), 5.89 (q, ³J_{HF} = 6.5 Hz, 1H), 7.50-7.61 (m, 3H), 7.84 (d, ³J_{HH} = 7.3 Hz, 1H), 7.89-7.95 (m, 2H), 8.05 (d, ³J_{HH} = 8.2 Hz, 1H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 69.0 (q, ²J_{CF} = 32.3 Hz, CH), 122.9 (CH), 124.8 (q, ¹J_{CF} = 283.0 Hz, C), 125.3 (CH), 125.9 (q, ⁴J_{CF} = 1.4 Hz, CH), 126.1 (CH), 127.0 (CH), 129.1 (CH), 130.1 (q, ³J_{CF} = 1.0 Hz, C), 130.3 (CH), 131.2 (C), 133.8 (C) ppm

RMN-¹⁹F (CDCl₃, 282.35 MHz): δ -76.85 (d, ³J_{HF} = 6.4 Hz) ppm

Rotación óptica específica: [α]_D²⁰ = -17.8 (c 1, CH₂Cl₂, 99% ee (R)-**26e**); bibliografía [α]_D²⁰ = -14.6 (c 0.47, CH₂Cl₂, 60% ee)²²⁵

2,2,2-Trifluoro-1-(2-naftil)etanol (26f)



Fórmula empírica: C₁₂H₉F₃O

Peso molecular: 226.20 g/mol

Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 99% **Pf:** 96.2-97.5 °C

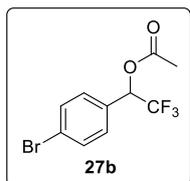
RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.93 (sa, 1H), 5.19 (q, ³J_{HF} = 6.7 Hz, 1H), 7.50-7.61 (m, 3H), 7.84-7.91 (m, 3H), 7.95 (s, 1H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 73.1 (q, ²J_{CF} = 32.1 Hz, CH), 124.4 (CH), 124.5 (q, ¹J_{CF} = 282.3 Hz, C), 126.7 (CH), 127.0 (CH), 127.5 (CH), 127.9 (CH), 128.4 (CH), 128.6 (CH), 131.4 (C), 133.0 (C), 133.9 (C) ppm

RMN-¹⁹F (CDCl₃, 282.35 MHz): δ -76.05 (d, ³J_{HF} = 6.8 Hz) ppm

Rotación óptica específica: [α]_D²⁰ = -35.8 (c 1, CH₂Cl₂, 98% ee (R)-**26f**); bibliografía [α]_D²⁰ = -23.7 (c 0.16, CH₂Cl₂, 71% ee)²²⁴

1-(4-Bromofenil)-2,2,2-trifluoroetil acetato (27b)



Fórmula empírica: C₁₀H₈BrF₃O₂

Peso molecular: 297.07 g/mol

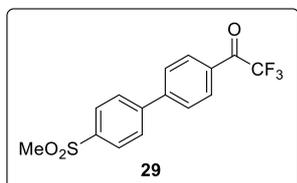
Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 79% **R_f** (25% AcOEt/hexano): 0.75

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.19 (s, 3H), 6.08 (q, ³J_{HF} = 6.8 Hz, 1H), 7.34 (d, ³J_{HH} = 8.4, 2H), 7.52-7.58 (m, 2H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 72.3 (q, ²J_{CF} = 32.4 Hz, CH), 123.9 (C), 124.1 (q, ¹J_{CF} = 282.2 Hz, C), 129.2 (2CH), 131.9 (2CH), 132.9 (C) ppm

4'-[4-(metilsulfonil)fenil]trifluoroacetofenona (29)



Fórmula empírica: C₁₅H₁₁F₃O₃S

Peso molecular: 328.31 g/mol

Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 95% **R_f** (50% AcOEt/hexano): 0.48

Pf: 163.0-163.8 °C; bibliografía:²²⁶ 157.9-158.8 °C

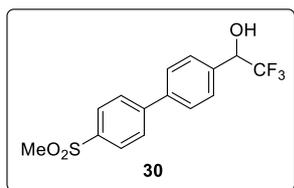
RMN-¹H (THF-d₈, 300.13 MHz): forma diol (**29**·H₂O) δ 3.05 (s, 3H), 6.79 (sa, 2H), 7.69-7.76 (m, 2H), 7.79-7.92 (m, 4H), 7.98-8.04 (m, 2H); forma ceto (**29**) 3.08 (s, 3H), 7.94-7.99 (m, 4H), 8.04-8.09 (m, 2H), 8.17-8.23 (m, 2H) ppm

RMN-¹³C (THF-d₈, 75.5 MHz): forma diol (**29**·H₂O) δ 44.3 (CH₃), 93.8 (q, ²J_{CF} = 31.6 Hz, C), 124.8 (q, ¹J_{CF} = 287.8 Hz, C), 127.6 (2CH), 128.7 (2CH), 129.0 (2CH), 129.3 (2CH), 140.4 (C), 141.0 (C), 141.9 (C), 146.4 (C) ppm

RMN-¹⁹F (THF-d₈, 282.35 MHz): forma diol (**29**·H₂O) δ -84.99; forma ceto (**29**) -72.42 ppm

²²⁶ S. J. Dolman, F. Gosselin, P. D. O'Shea, I. W. Davies, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5092-5098.

2,2,2-Trifluoro-1-[4'-metilsulfonil-(1,1'-bifenil)-4-il]etanol (30)



Fórmula empírica: C₁₅H₁₃F₃O₃S

Peso molecular: 330.32 g/mol

Aspecto: sólido amarillento

Rendimiento: 97%

R_f (50% AcOEt/hexano): 0.35

Pf: 153.8-154.9 °C

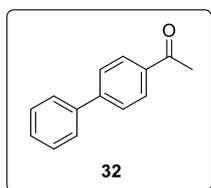
RMN-¹H (THF-d₈, 300.13 MHz): δ 3.05 (s, 3H), 5.06-5.16 (m, 1H), 5.96 (d, ³J_{HH} = 5.1 Hz, 1H), 7.60-7.66 (m, 2H), 7.70-7.73 (m, 2H), 7.84-7.89 (m, 2H), 7.98-8.03 (m, 2H) ppm

RMN-¹³C (THF-d₈, 75.5 MHz): δ 44.4 (CH₃), 72.5 (q, ²J_{CF} = 30.7 Hz, CH), 126.1 (q, ¹J_{CF} = 282.9 Hz, C), 128.1 (2CH), 128.6 (2CH), 128.9 (2CH), 129.3 (2CH), 137.4 (C), 140.7 (C), 141.5 (C), 146.3 (C) ppm

RMN-¹⁹F (THF-d₈, 282.35 MHz): δ -80.83 (d, ³J_{HF} = 7.1 Hz) ppm

Rotación óptica específica: [α]_D²⁰ = -27.2 (c 1.5, THF, >99% ee (R)-30)

4'-[4-(metilsulfonil)fenil]trifluoroacetofenona (32)



Fórmula empírica: C₁₄H₁₂O

Peso molecular: 196.25 g/mol

Aspecto: sólido amarillo **Rendimiento:** 92%

Pf: 116.9-118.3 °C

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.64 (s, 3H), 7.37-7.52 (m, 3H), 7.60-7.73 (m, 4H), 8.01-8.06 (m, 2H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 26.8 (CH₃), 127.3 (2CH), 127.4 (2CH), 128.3 (CH), 129.0 (2CH), 129.1 (2CH), 136.0 (C), 137.0 (C), 145.9 (C), 197.9 (C) ppm

CAPÍTULO 4

PROCESO EN CASCADA COMBINANDO ALCOHOL
DESHIDROGENASAS Y TRANSAMINASAS:
SÍNTESIS DE AMINOALCOHOLES A PARTIR DE DICETONAS

ANTECEDENTES

Los aminoalcoholes presentan un elevado interés en química farmacéutica y en catálisis,²²⁷ particularmente aquellos en forma enantioméricamente pura por su relevante papel en catálisis asimétrica al poder ser empleados como auxiliares quirales en muy diversas de transformaciones sintéticas.²²⁸ Además, este tipo de compuestos orgánicos han despertado un gran interés en química médica ya que sus propiedades biológicas presentan un amplio espectro de aplicabilidad, destacando su uso como agentes antimicrobianos,²²⁹ en terapias contra el Alzheimer²³⁰ o como moduladores de las propiedades fisicoquímicas de otros fármacos. La síntesis estereoselectiva de aminoalcoholes representa, hoy en día, una interesante área de trabajo, de crucial importancia para el diseño de moléculas más complejas con aplicaciones muy variadas en distintos ámbitos de la Química.

4.1. Síntesis enzimática estereoselectiva de aminoalcoholes

Históricamente, los procesos quimioenzimáticos han mostrado poseer un gran potencial como métodos catalíticos en la obtención de aminoalcoholes de manera estereoselectiva, especialmente a través de estrategias de resolución cinética.²³¹ En la actualidad, varias clases de enzimas han emergido como herramientas muy versátiles en la síntesis de esta familia de productos, entre las que destacan las transaminasas que han sido empleadas en combinación con otras reacciones, tanto químicas como enzimáticas.²³²

²²⁷ S. M. Lait, D. A. Rankic, B. A. Keay, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 767-796.

²²⁸ a) D. Ager, I. Prakash, D. R. Schaad, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 835-876; b) J. L. Vicario, D. Badia, L. Carrillo, E. Reyes, J. Etxebarria, *Curr. Org. Chem.* **2005**, *9*, 219-235.

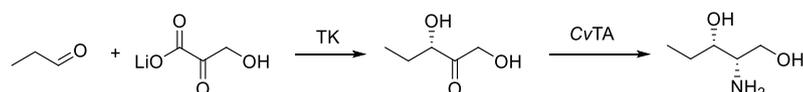
²²⁹ A. M. de Almeida, T. Nascimento, B. S. Ferreira, P. P. de Castro, V. L. Silva, C. G. Diniz, M. Le Hyaric, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 2883-2887

²³⁰ Y. Zheng, X. Qiang, R. Xu, Q. Song, C. Tian, H. Liu, W. Li, Z. Tan, Y. Deng, *Bioorg. Chem.* **2018**, *78*, 298-306.

²³¹ V. Gotor, R. Brieva, F. Rebolledo, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 957-958.

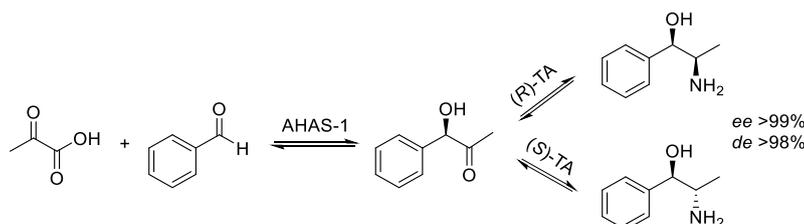
²³² P. Gupta, N. Mahajan, *New J. Chem.* **2018**, *42*, 12296-12327.

En este contexto, y gracias a la proliferación de los biocatalizadores capaces de formar enlaces C-C, cabe destacar el uso de distintos tipos de liasas que se han combinado eficientemente con transaminasas para desarrollar procesos multienzimáticos que permiten acceder a aminoalcoholes con excelente selectividad a través de la formación de hidroxicetonas quirales.²³³ Un ejemplo es la combinación de una transcetolasa (TK) y la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* (CvTA) para sintetizar el (2*S*,3*S*)-2-aminopetano-1,3-diol en una secuencia de dos pasos (Esquema 86).²³⁴



Esquema 86. Combinación de una transcetolasa y una transaminasa (*S*)-selectiva.

De forma similar, Rother y colaboradores han descrito la obtención de distintos estereoisómeros de compuestos adrenérgicos de la familia de las fenilpropanolaminas a través de un proceso en dos pasos de carboligación y transaminación enantioselectivas (Esquema 87),²³⁵ siendo posible reciclar el piruvato generado como coproducto en el proceso de biotransaminación, al emplear alanina y alaDH como sistema de desplazamiento del equilibrio.



Esquema 87. Síntesis de (1*R*,2*R*)-norpseudoefedrina y (1*R*,2*S*)-norefedrina en una cascada enzimática (AHAS-1: acetolactasa sintasa).

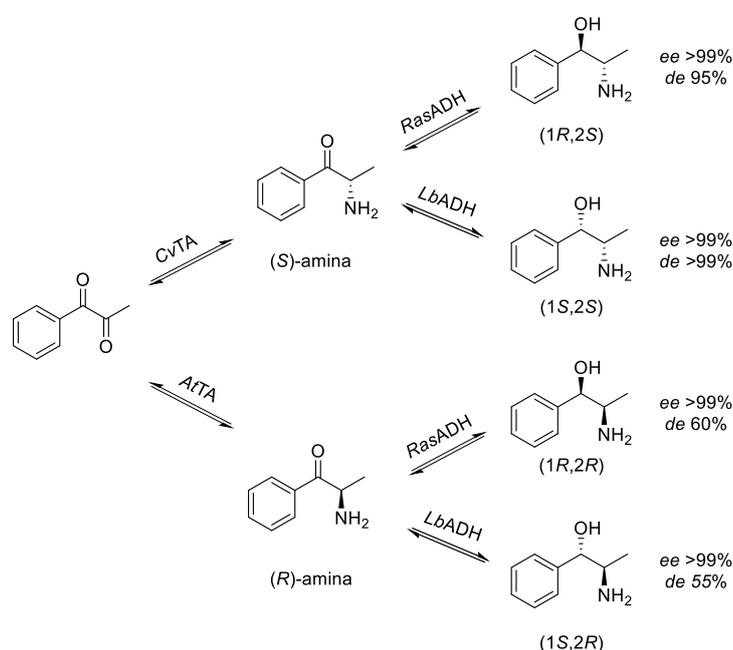
Este mismo grupo de investigación, ha descrito la obtención de los cuatro posibles estereoisómeros de la nor(pseudo)efedrina al acoplar una reacción de biotransaminación y una biorreducción. Así, partiendo de la 1-fenilpropan-1,2-diona se puede sintetizar de forma asimétrica y complementaria la aminocetona

²³³ N. G. Schmidt, E. Eger, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 4286-4311.

²³⁴ M. F. Villegas-Torres, R. J. Martínez-Torres, A. Cázares-Körner, H. Hailes, F. Baganz, J. Ward, *Enzyme Microb. Technol.* **2015**, *81*, 23-30.

²³⁵ T. Sehl, H. C. Hailes, J. M. Ward, R. Wardenga, E. von Lieres, E. Offermann, R. Westphal, M. Pohl, D. Rother, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6772-6775.

en un primer paso, bien utilizando la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* para lograr el enantiómero *S*, o bien con la transaminasa de *Aspergillus terreus* (*AfTA*) que da acceso a la amina de configuración *R*. Un segundo paso de biorreducción empleando dos ADHs complementarias, *RasADH* o *LbADH*, permite acceder a los cuatro estereoisómeros (Esquema 88).²³⁶



Esquema 88. Síntesis de los cuatro posibles estereoisómeros de la nor(pseudo)efedrina a través de dos pasos enzimáticos.

Debido a la reversibilidad del equilibrio en la reacción de transaminación, resultó indispensable añadir un tratamiento intermedio después de este paso, bien por un viraje del pH que inhibiese la transaminasa o mediante una filtración de la misma, logrando así conversiones de moderadas a excelentes en el proceso global. La selectividad de las ADHs empleadas se vio claramente influida por la estereoquímica de la aminocetona intermedia, dando lugar a moderados excesos diastereoméricos en el caso de poseer configuración *R*. Las (1*R*,2*S*)-norefedrina y (1*S*,2*S*)-norpseudoefedrina se obtuvieron con excelentes selectividades, siendo

²³⁶ T. Sehl, H. C. Hailes, J. Ward, U. Menyes, M. Pohl, D. Rother, *Green Chem.* **2014**, *16*, 3341-3348.

necesario emplear las enzimas purificadas y no como extractos o liofilizados de células.

4.2. Reacciones en cascada de alcohol deshidrogenasas y transaminasas

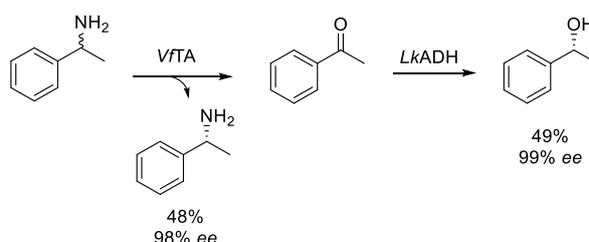
Además del ejemplo mostrado en el Esquema 88, que representa la única aplicación conocida hasta la fecha de la combinación de ADHs y TAs para fijar simultáneamente dos estereocentros, se han empleado estas cascadas con diferentes finalidades: (i) como método de desplazamiento del equilibrio en la síntesis de aminas con transaminasas, (ii) en una secuencia de oxidación-transaminación para transformar 1,2-dioles en β -aminoalcoholes y (iii) en la aminación de alcoholes.

Como se ha mostrado, la isopropilamina es uno de los donadores de amino más empleados para desplazar el equilibrio de las reacciones de biotransaminación, que se puede favorecer mediante la eliminación de la acetona generada como coproducto por reducción a isopropanol con la ADH de *Saccharomyces cerevisiae*.²³⁷ Esta enzima es muy selectiva a sustratos de cadena muy corta por lo que no compite con las transaminasas en la reacción de aminación de derivados de acetofenona.

En un proceso en cascada concurrente, se obtuvieron simultáneamente (*R*)-1-feniletanol y (*R*)-1-feniletilamina partiendo de esta amina racémica a través de una resolución cinética catalizada por la transaminasa de *Vibrio fluvialis* (*VfTA*) y la reducción con la alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus kefir* (*LkADH*) de la acetofenona generada (Esquema 89).²³⁸ De esta forma, se consigue además evitar la inhibición de la transaminasa por el producto de la resolución cuando se opera a elevadas concentraciones de sustrato.

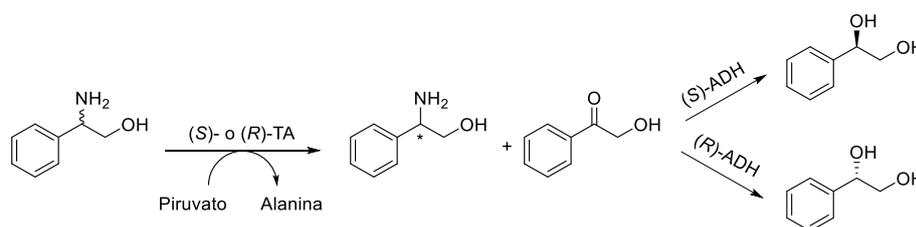
²³⁷ K. E. Cassimjee, C. Branneby, V. Abedi, A. Wells, P. Berglund, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5569-5571.

²³⁸ H. Yun, Y. H. Yang, B. K. Cho, B. Y. Hwang, B. G. Kim, *Biotechnol. Lett.* **2003**, 25, 809-814.



Esquema 89. Resolución catalizada por transaminasas y biorreducción simultánea.

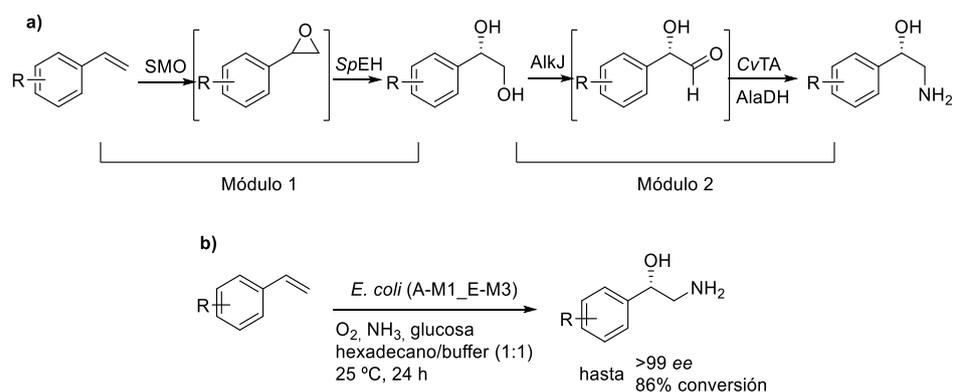
Con una estrategia similar, se combinaron una pareja de transaminasas y otra de alcohol deshidrogenasas con selectividades complementarias para obtener mezclas de dioles vecinales y β -aminoalcoholes enantiopuros, con rendimientos cercanos al 50% de cada compuesto, partiendo de la mezcla racémica del aminoalcohol (Esquema 90).²³⁹



Esquema 90. Obtención de los dos enantiómeros de un β -aminoalcohol y un diol vecinal a través de una cascada que implica una resolución cinética catalizada por una transaminasa y una biorreducción.

Un proceso en cascada que opera a través de dos módulos empleados de forma secuencial permite la transformación de alquenos terminales en β -aminoalcoholes, en este caso con la amina situada en la posición terminal. El primer módulo consiste en la monooxigenasa de *Pseudomonas* sp. VLB120 (SMO) y la epóxido hidrolasa de *Sphingomonas* sp. HXN-200 (*SpEH*), ambas expresadas en un mismo microorganismo, que dan acceso a los 1,2-dioles enantiopuros. En el segundo módulo, se incluyen la ADH de *Pseudomonas putida* GPo1 (AlkJ), la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* y la alaDH, empleada como sistema de desplazamiento del equilibrio, también contenidas en una misma cepa de *E. coli* (Esquema 91a).

²³⁹ J.-W. Zhao, H.-L. Wu, J.-D. Zhang, W.-C. Gao, X.-J. Fan, H.-H. Chang, W.-L. Wei, J.-H. Xu, *Biotechnol. Lett.* **2018**, *40*, 349-358.



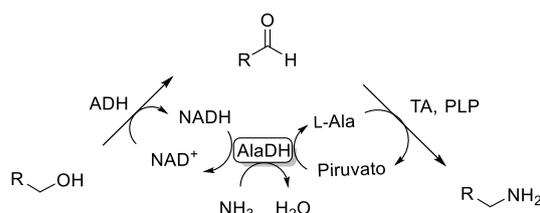
Esquema 91. Aminohidroxilación de derivados de estireno utilizando: **a)** dos microorganismos de forma secuencial o **b)** una única cepa de *E. coli*.

Además, lograron combinar con éxito los dos módulos, incluyendo todos los plásmidos necesarios para expresar las cinco enzimas involucradas en un único biocatalizador (*E. coli* A-M1_E-M3) que permite transformar diferentes derivados de estireno en los correspondientes aminoalcoholes con excelentes selectividades y conversiones elevadas (Esquema 91b).²⁴⁰

La transformación de alcoholes en aminas también se puede acometer a través de la oxidación del alcohol y la posterior biotransaminación del grupo carbonilo generado. Para lograr un proceso redox global neutro, Kroutil y colaboradores han propuesto distintos sistemas enzimáticos de desplazamiento del equilibrio de la reacción de transaminación que permiten la regeneración del cofactor utilizado por la ADH (Esquema 92). Inicialmente, se planteó la síntesis de aminas primarias no quirales utilizando ADHs que actúan sobre aldehídos y permiten elevadas conversiones en el proceso global.²⁴¹

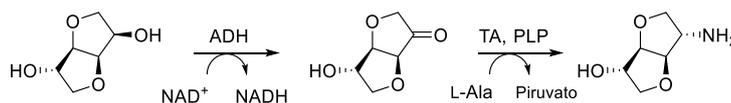
²⁴⁰ S. Wu, Y. Zhou, T. Wang, H.-P. Too, D. I. C. Wang, Z. Li, *Nat. Commun.* **2016**, 7, 11917-11930.

²⁴¹ J. H. Sattler, M. Fuchs, K. Tauber, F. G. Mutti, K. Faber, J. Pfeffer, T. Haans, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 9156-9159.



Esquema 92. Sistema neutral redox para la aminación de alcoholes primarios mediante una secuencia de oxidación y biotransaminación

En el caso de partir de alcoholes secundarios, la selectividad intrínseca de las ADHs impide la conversión efectiva del sustrato al actuar preferentemente sobre uno solo de los enantiómeros, limitando la aplicación de esta estrategia en síntesis asimétrica. Así, tan solo alcoholes secundarios simétricos, o bien alcoholes enantiopuros en combinación con una ADH con la selectividad adecuada, permitieron un adecuado funcionamiento de la estrategia enzimática.²⁴² Recientemente, se ha diseñado una proteína de fusión que contiene la levodiona reductasa de *Leifsonia aquatica* y la transaminasa de *Paracoccus denitrificans* y que se ha producido en *E. coli* para llevar a cabo la transformación mostrada en el Esquema 93.²⁴³



Esquema 93. Síntesis de un aminoalcohol con una proteína de fusión donde se han expresado las actividades de ADH y TA.

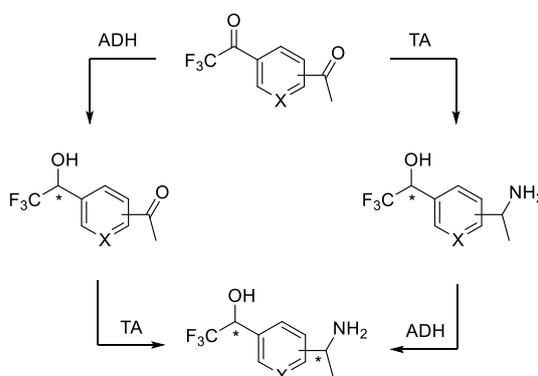
²⁴² K. Tauber, M. Fuchs, J. H. Sattler, J. Pitzer, D. Pressnitz, D. Koszelewski, K. Faber, J. Pfeffer, T. Haas, W. Kroutil, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4030-4035.

²⁴³ A. Lerchner, M. Daake, A. Jarasch, A. Skerra, *Protein Eng. Des. Sel.* **2016**, *29*, 557-562.

OBJETIVOS

Las ADHs y las TAs actúan sobre grupos carbonilo catalizando dos reacciones asimétricas como son la biorreducción y la biotransaminación. Aprovechando la especial reactividad que poseen las trifluorometil cetonas en los procesos de biorreducción mostrada en el *Capítulo 3*, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

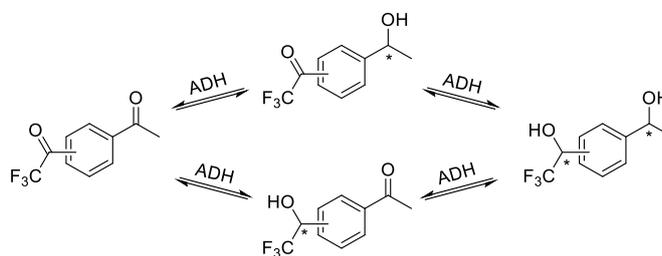
- Sintetizar mediante métodos químicos convencionales una serie de moléculas aromáticas o heteroaromáticas que posean en su estructura dos grupos carbonilos: trifluoroacetilo y acetilo.
- Estudiar la biorreducción de estos sustratos dicarbonílicos, estudiando la distinta reactividad que pueden otorgar los sustituyentes metilo (CH_3) y trifluorometilo (CF_3).
- Estudiar el proceso de biotransaminación con el fin de encontrar enzimas que puedan reconocer tanto dicetonas como hidroxicetonas como sustratos de partida.
- Optimizar las condiciones de reacción una vez seleccionados dos pares de ADHs y TAs con selectividades complementarias que den acceso a todos los posibles diastereoisómeros de esta familia de aminoalcoholes.
- Combinar las dos reacciones enzimáticas mediante estrategias en cascada, estudiando la viabilidad de los procesos secuenciales y concurrentes.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido a la importancia de los aminoalcoholes y los compuestos organofluorados en síntesis orgánica, en este capítulo nos hemos planteado la síntesis de una serie de dicetonas (hetero)aromáticas que contengan un grupo acetilo y uno trifluoroacetilo como sustituyentes de las cetonas. Esto nos permitiría estudiar la acción independiente de una ADH y de una TA con el fin de formar grupos hidroxilo o amino de forma estereoselectiva. De esta manera, se podrían obtener los cuatro estereoisómeros posibles de aminoalcoholes fluorados con un gran potencial como precursores de moléculas ópticamente activas más complejas como, por ejemplo, heterociclos fusionados que poseen un efecto antagonista sobre el receptor de prostaglandina E2 (EP4) y se emplean en el tratamiento de distintas patologías inflamatorias y autoinmunes, además de poseer una potencial actividad anticancerígena.²⁴⁴

La elección de los sustratos viene dada por los resultados mostrados en el *Capítulo 3*, debido a la excelente actividad que muestran las ADHs sobre derivados de trifluoroacetofenona, así como al trabajo desarrollado por Kosjek y colaboradores,²⁴⁵ donde la mono-biorreducción selectiva de acetofenonas con un grupo trifluoroacetilo en posición *para* o *meta* fue exitosamente desarrollada (Esquema 94). En este trabajo, a pesar de que muchas de las ADHs estudiadas conducían a mezclas de los tres posibles productos, varias de ellas catalizaron únicamente la biorreducción del grupo trifluoroacetilo, pudiendo sintetizar los dos enantiómeros complementarios. Por el contrario, tan solo se encontró una ADH, de selectividad *S*, capaz de catalizar la mono-reducción de la metilcetona.



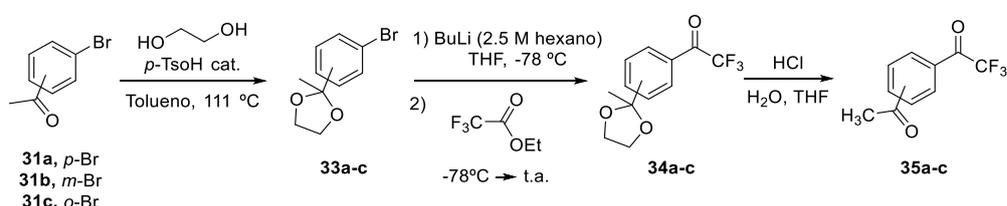
Esquema 94. Estudio de la selectividad de distintas ADHs en la biorreducción de grupos acetilo y trifluoroacetilo localizados en *meta* y *para*.

²⁴⁴ A. M. Deshpande, D. Barawkar, S. Patil, A. Panmand, D. Jadhav, Y. Waman, B. A. Kulkarni, T. Taniguchi, PCT Int. Appl. WO2016021742A1 20160211, **2016**.

²⁴⁵ B. T. Paul, P. N. Devine, L. N. DiMichele, B. Kosjek, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4951-4954.

4.3. Síntesis química de las dicetonas

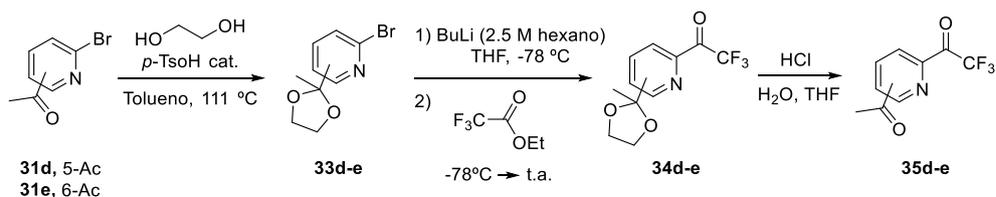
Inicialmente, se sintetizaron los derivados de acetofenona **35a-c** con el grupo trifluoroacetilo en las tres posibles posiciones del anillo siguiendo un procedimiento sintético descrito en la bibliografía (Esquema 95).^{245,246} En un primer paso, se protegieron las correspondientes acetofenonas monobromadas **31a-c** en forma de acetales, utilizando etilenglicol en presencia de cantidades catalíticas de ácido *para*-toluenosulfónico (*p*-TsOH) y empleando una trampa de Dean Stark. Los acetales **33a-c** obtenidos se sometieron a un proceso de intercambio halógeno-metal con BuLi seguido de una adición de trifluoroacetato de etilo para introducir el segundo grupo acilo, obteniendo de esta manera las trifluoroacetofenonas **34a-c**. Un último paso de desprotección del grupo acetal en medio ácido con una disolución acuosa de HCl permitió obtener las tres dicetonas arílicas **35a-c** con buenos rendimientos (42-63% en el proceso global) tras un proceso de purificación mediante cristalización.



Esquema 95. Síntesis de las dicetonas sustituidas en posiciones *para* (**35a**, 62%), *meta* (**35b**, 63%) y *orto* (**35c**, 42%).

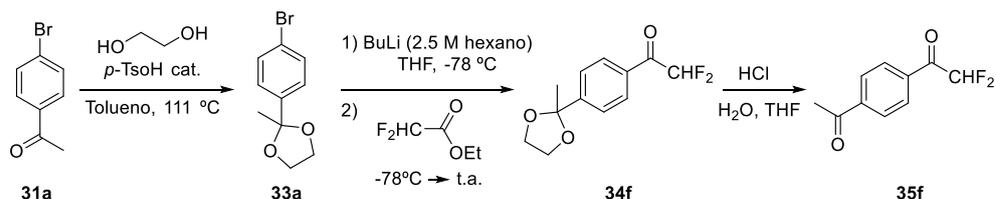
Siguiendo la misma ruta sintética (Esquema 96) pero partiendo, en este caso, de las 5-acetil-2-bromopiridina (**31d**) y 6-acetil-2-bromopiridina (**31e**), se pudieron obtener adicionalmente dos derivados de piridina con el grupo trifluoroacetilo en posición 2 y el grupo acetilo bien en posición C-5 (**35d**, 60%) o bien en C-6 (**35e**, 87%).

²⁴⁶ S. Sasaki, T. Yamauchi, H. Kubo, M. Kanai, A. Ishii, K. Higashiyama, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1497-1500.



Esquema 96. Síntesis de las 2-(trifluoroacetyl)acetilpiridinas **35d** y **35e**.

También fue posible llevar a cabo la preparación de un derivado de difluoroacetyl-acetofenona (**35f**, 57%) empleando difluoroacetato de etilo en lugar de trifluoroacetato de etilo en el segundo paso de la secuencia sintética (Esquema 97).

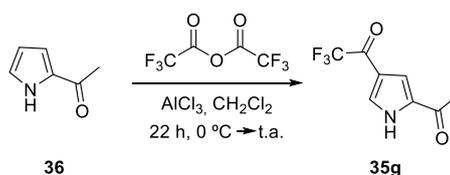


Esquema 97. Síntesis de 1-(4-acetilfenil)-2,2-difluoroetan-1-ona (**35f**).

Por último, se trataron de sintetizar estructuras heterocíclicas de cinco eslabones mediante reacciones de acilación de Friedel-Crafts²⁴⁷ que presentaran los grupos acetilo y trifluoroacetilo. Así, empleando un exceso de un ácido fuerte de Lewis (AlCl_3) y anhídrido trifluoroacético como electrófilo fue posible transformar el 2-acetilpirrol (**36**) en el producto **35g** con el grupo trifluoroacetilo en la posición 4 del anillo heteroaromático (Esquema 98).²⁴⁸ Desafortunadamente, cuando se intentó extender esta metodología a los derivados de furano y tiofeno en estas mismas condiciones de reacción se observó una nula reactividad en la reacción de sustitución electrófila aromática debido a la menor nucleofilia de los heterociclos considerados.

²⁴⁷ N. O. Calloway, *Chem. Rev.* **1935**, *17*, 327-392.

²⁴⁸ M. S. Watt, K. I. Booker-Milburn, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 5716-5719.



Esquema 98. Síntesis del 2-acetil-4-trifluoroacetil-1*H*-pirrol (**35g**).

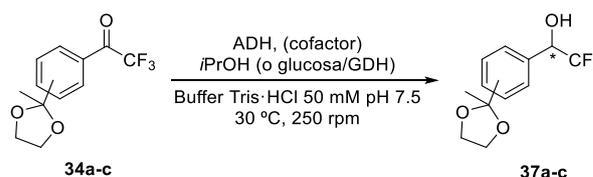
4.4. Estudios de biorreducción

Inicialmente, se evaluó la reactividad que presentaban las dicetonas **35a-c** derivadas del benceno, utilizando como punto de partida las condiciones de reacción y biocatalizadores empleados en el *Capítulo 3* para la biorreducción de trifluoroacetofenonas.

4.4.1. Biorreducción de los acetales intermedios de reacción **34a-c**

Aprovechando los intermedios generados en la ruta sintética empleada para la síntesis de las dicetonas **35a-c** (Esquema 95), se aislaron los derivados de trifluoroacetofenona **34a-c** con el grupo acetilo enmascarado en forma de acetal y se estudió su reducción catalizada por diversas ADHs, con la ADH-A, *RasADH* y *LbADH* sobreexpresadas en *E. coli* y la enzima comercial evo1.1.200 (Tabla 35). Con esta selección de enzimas, se obtuvieron excelentes resultados para los sustratos monosustituídos en *para* (**34a**) y en *meta* (**34b**), mientras que no se detectó formación del alcohol cuando se empleó el derivado sustituido en la posición *orto* (**34c**). La ADH-A y la evo-1.1.200 permitieron obtener los alcoholes (*R*)- y (*S*)-**37a,b**, respectivamente, con excelente selectividad y en tiempos de reacción cortos (4-5 h). Cabe destacar que la *RasADH* mostró una distinta estereopreferencia para la reducción de las cetonas **34a** y **34b**, obteniendo respectivamente los alcoholes (*R*)-**37a** (entrada 2) y (*S*)-**37b** (entrada 5).

Tabla 35. Biorreducción de las trifluoroacetofenas **34a-c** con el grupo acetilo protegido en forma de acetal.

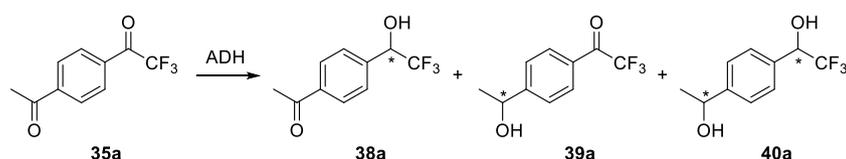


Entrada	Sustrato	Enzima	t (h)	c (%) ^a	ee (%) ^{b,c}
1	34a	<i>E. coli</i> /ADH-A	4	>99	>99 (<i>R</i>)
2	34a	<i>E. coli</i> /RasADH	4	>99	>99 (<i>R</i>)
3	34a	evo-1.1.200	4	>99	>99 (<i>S</i>)
4	34b	<i>E. coli</i> /ADH-A	5	>99	99 (<i>R</i>)
5	34b	<i>E. coli</i> /RasADH	5	>99	70 (<i>S</i>)
6	34b	evo-1.1.200	5	>99	98 (<i>S</i>)
7	34b	<i>E. coli</i> /LbADH	30	38	90 (<i>S</i>)
8	34c	<i>E. coli</i> /ADH-A	24	<1	n.m.
9	34c	<i>E. coli</i> /RasADH	24	<1	n.m.
10	34c	evo-1.1.200	24	<1	n.m.
11	34c	<i>E. coli</i> /LbADH	24	<1	n.m.

Condiciones de reacción: **34a-c** (0.012 mmol, 3.3 mg), ADH (3.3 mg células liofilizadas, 0.06 mg evo-1.1.200), sin adición externa de cofactor excepto con evo-1.1.200 (NAD⁺, 1 mM), *i*PrOH (25 μ L), excepto para RasADH que se utilizó glucosa (60 mM) y GDH (5 U), en buffer Tris·HCl (50 mM, pH 7.5, 600 μ L) a 30 °C y 250 rpm. ^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción; ^b excesos enantioméricos medidos mediante CG a partir del derivado acetilado con DMAP y anhídrido acético; n.m.: no medido; ^c enantiómero mayoritario entre paréntesis.

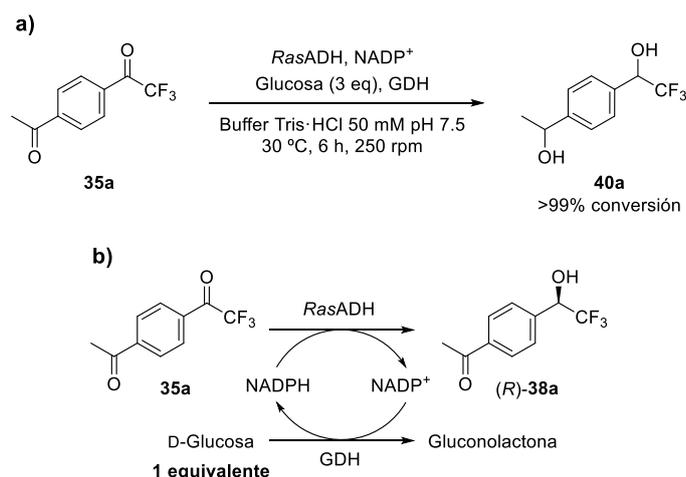
4.4.2. Biorreducción de la 1-(4-acetilfenil)-2,2,2-trifluoroetan-1-ona (**35a**)

El Esquema 99 ilustra los tres posibles productos que hipotéticamente se pueden obtener en la biorreducción de la dicetona **35a**. El monoalcohol deseado (**38a**) sería, *a priori*, el más sencillo de generar, al poseer una mayor electrofilia el grupo trifluoroacetilo, aunque podría darse una segunda reducción, obteniendo el diol **40a**, o que el centro activo de la enzima acepte preferentemente la metilcetona dando lugar al monoalcohol **39a**.



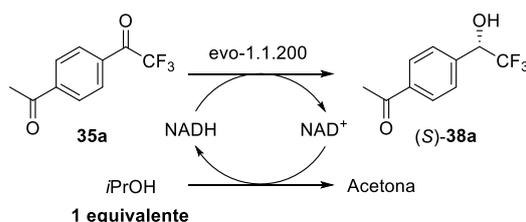
Esquema 99. Posibles productos en la biorreducción de **35a**.

Un primer estudio del proceso utilizando la *RasADH* mostró que, en las condiciones estándar empleadas para la biorreducción, esta enzima es capaz de reducir los dos grupos carbonilo, obteniendo el diol **40a** con conversión completa (Esquema 100a). Suponiendo que la reacción transcurre a través de la formación del monoalcohol **38a** como intermedio, debido al mayor potencial de reducción de la trifluorometil cetona, se trató de lograr una mono-biorreducción selectiva para lo que se empleó un solo equivalente del reactivo reductor. Al estar utilizando el sistema glucosa/GDH para regenerar el verdadero reductor, el cofactor NADPH (añadido en cantidades subestequiométricas y en su forma oxidada), el empleo de un equivalente de glucosa se traduciría en la generación de un solo equivalente del cofactor redox. Con esta estrategia, fue posible obtener el producto **38a** sin observarse formación del diol **40a** ni del alcohol **39a** por reducción sobre la metilcetona (Esquema 100b).



Esquema 100. Biorreducción de la cetona **35a** catalizada por *E. coli*/*RasADH* empleando: a) exceso del sistema de regeneración del cofactor (condiciones estándar) o b) empleando un único equivalente de glucosa como reactivo limitante.

La ADH de *Ralstonia* sp. dio acceso al enantiómero (*R*)-**38a** con un 97% *ee* mientras que, empleando una aproximación similar, con la evo-1.1.200 se obtuvo la (*R*)-hidroxicetona **38a** en forma enantiopura. En este último caso, fue posible emplear tanto el sistema de la enzima acoplada (glucosa/GDH) como el del sustrato acoplado empleando isopropanol, que es oxidado a acetona por la propia enzima (Esquema 101). En cambio, la biorreducción con la *E. coli*/ADH-A dio lugar a una mezcla de los alcoholes **38a** (19% de conversión) y **39a** (19% de conversión) sin detectarse la formación del diol **40a**.

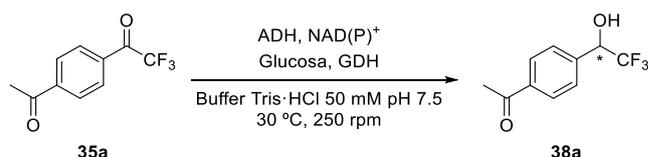


Esquema 101. Empleo de un equivalente del cosustrato reducido (isopropanol) para la biorreducción selectiva de la cetona **35a** empleando la evo-1.1.200.

Mediante el empleo de cosolventes fue posible acceder a los dos enantiómeros complementarios con conversión completa, encontrando que el empleo de dioxano en pequeñas proporciones (2.5% v/v) resulta altamente beneficioso en este tipo de procesos (Tabla 36).

La reacción fue fácilmente escalable, obteniendo un 97% de rendimiento en la síntesis de la hidroxicetona (*R*)-**38a** con la *Ras*ADH (1:2 en relación enzima:sustrato en peso) en una escala de 5 mL de volumen total para 21.6 mg de sustrato.

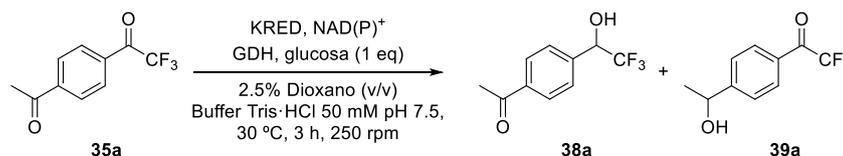
Tabla 36. Biorreducción del sustrato **35a** con un equivalente del sistema de regeneración del cofactor.



Entrada	Enzima	Cosolvente (% v/v)	t (h)	c (%) ^a	ee (%) ^{b,c}
1	<i>RasADH</i>	Tolueno (5%)	1	92	98 (<i>R</i>)
2	<i>RasADH</i>	Tolueno (5%)	2	>99	98 (<i>R</i>)
3	<i>RasADH</i>	Dioxano (2.5%)	1	>99	98 (<i>R</i>)
4	evo-1.1.200	---	24	50	>99 (<i>S</i>)
5	evo-1.1.200	Tolueno (10%)	24	32	>99 (<i>S</i>)
6	evo-1.1.200	TBME (10%)	24	60	>99 (<i>S</i>)
7	evo-1.1.200	DMSO (2.5%)	24	89	>99 (<i>S</i>)
8	evo-1.1.200	Dioxano (2.5%)	24	>99	>99 (<i>S</i>)
9 ^d	evo-1.1.200	Dioxano (2.5%)	2	>99	>99 (<i>S</i>)

Condiciones de reacción: **35a** (0.01 mmol, 2.2 mg), ADH (*E. coli*/*RasADH*: 1:1 en peso enzima:sustrato; evo-1.1.200: 0.06 mg), NAD(P)⁺ (1 mM), glucosa (20 mM) y GDH (5 U), en buffer Tris·HCl (50 mM, pH 7.5, 500 μ L) a 30 °C y 250 rpm. ^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción; ^b excesos enantioméricos medidos mediante CG a partir del derivado acetilado con DMAP y anhídrido acético; ^c enantiómero mayoritario entre paréntesis; ^d empleando isopropanol (20 mM) como sistema de regeneración del cofactor.

Adicionalmente, se realizó un *screening* de la reacción con un kit de ADHs comerciales de la empresa Codexis, Inc. (KREDs, Tabla 37) que incluye tanto enzimas modificadas mediante ingeniería de proteínas (entradas 1-19) como enzimas nativas (entradas 20-24), aunque su origen es desconocido. Utilizando las mismas condiciones empleadas anteriormente, la mayoría de las ADHs mostraron una elevada selectividad hacia la formación del alcohol (*S*)-**38a** (tipo anti-Prelog), mientras que tan solo en dos casos se obtuvo el enantiómero *R* con elevada enantioselectividad (KRED-NADH-101 y KRED-130). En todos los casos, la reducción del grupo trifluoroacetilo estuvo muy favorecida y tan solo en escasas excepciones se observó la reducción del grupo (entradas 17, 18 y 21).

Tabla 37. Biorreducción de la dicetona **35a** utilizando un kit comercial de ADHs.

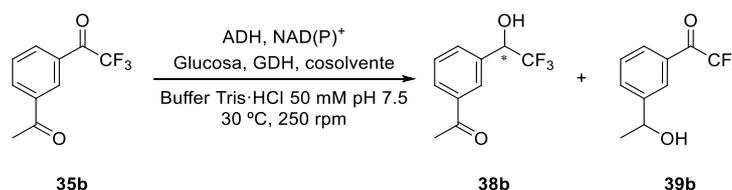
Entrada	ADH ^a	38a (%) ^b	39a (%) ^b	ee (%) ^{c,d}
1	KRED-P1-A04	>99	<1	99 (<i>S</i>)
2	KRED-P1-A12	99	<1	99 (<i>S</i>)
3	KRED-P1-B02	>99	<1	99 (<i>S</i>)
4	KRED-P1-B05	>99	<1	>99 (<i>S</i>)
5	KRED-P1-B10	>99	<1	>99 (<i>S</i>)
6	KRED-P1-B12	>99	<1	>99 (<i>S</i>)
7	KRED-P1-C01	>99	<1	>99 (<i>S</i>)
8	KRED-P1-H08	>99	<1	93 (<i>S</i>)
9	KRED-P2-B02	>99	<1	96 (<i>S</i>)
10	KRED-P2-C02	>99	<1	72 (<i>S</i>)
11	KRED-P2-C11	>99	<1	99 (<i>S</i>)
12	KRED-P2-D03	>99	<1	95 (<i>S</i>)
13	KRED-P2-D11	>99	<1	>99 (<i>S</i>)
14	KRED-P2-D12	>99	<1	>99 (<i>S</i>)
15	KRED-P2-G03	>99	<1	99 (<i>S</i>)
16	KRED-P2-H07	>99	<1	>99 (<i>S</i>)
17	KRED-P3-B03	66	17	n.m.
18	KRED-P3-G09	73	13	n.m.
19	KRED-P3-H12	91	1	52 (<i>S</i>)
20	KRED-101	99	<1	99 (<i>S</i>)
21	KRED-NADH-101	91	3	99 (<i>R</i>)
22	KRED-NADH-110	45	<1	96 (<i>S</i>)
23	KRED-119	96	<1	81 (<i>R</i>)
24	KRED-130	99	<1	99 (<i>R</i>)

Condiciones de reacción: **35a** (0.01 mmol, 2.2 mg), KRED (2.0 mg), NADP⁺ (1 mM, excepto entradas 21 y 22 donde se usó NAD⁺ 1 mM), MgSO₄ (2 mM), glucosa (20 mM) y GDH (2.5 U), dioxano (12.5 μL, 2.5% v/v) en buffer Tris·HCl (50 mM, pH 7.5, 500 μL) a 30 °C y 250 rpm durante 3 h. ^a Todas las KREDs son NADPH dependientes excepto aquellas que llevan indicado en su nombre “NADH” (entradas 21 y 22) ^b porcentajes de productos calculados mediante CG del crudo de reacción; ^c excesos enantioméricos medidos mediante CG a partir del derivado **38a** acetilado con DMAP y anhídrido acético; ^d enantiómero mayoritario entre paréntesis; n.m.: no medido.

4.4.3. Biorreducción de la 1-(3-acetilfenil)-2,2,2-trifluoroetan-1-ona (35b)

La biorreducción de la dicetona **35b** con los sustituyentes localizados en *meta* mostró una tendencia similar a la observada con **35a** e indicada en el Esquema 100. La ADH de *Ralstonia* sp. catalizó con conversión completa la formación del diol **40b** si se utiliza un exceso del sistema de regeneración del cofactor, pero es capaz de reducir exclusivamente la trifluorometil cetona empleando un único equivalente de glucosa (Tabla 38). Sin embargo, la hidroxicetona (*R*)-**38b** se obtuvo con un modesto 40% *ee* (entrada 1), por lo que fue necesaria la búsqueda de otras enzimas con selectividad Prelog que catalizaran esta reacción con una mayor estereopreferencia. Mientras que las enzimas procedentes de microorganismos conocidos sobreexpresadas en *E. coli* mostraron pobres resultados (entradas 2-4), se encontró que, entre las enzimas comerciales, la KRED-NADH-101 permitía obtener (*R*)-**38b** de manera cuantitativa y con un 98% de *ee* (entrada 11).

Por otro lado, la evo-1.1.200 también mostró un excelente comportamiento en la reducción de **35b**, permitiendo acceder al producto (*S*)-**38b** en forma enantiopura y con conversión completa cuando se empleó un 2.5% (v/v) de dioxano como cosolvente (entrada 6).

Tabla 38. Biorreducción de **35b** con un equivalente del sistema de regeneración del cofactor.

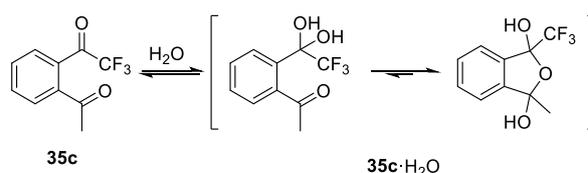
Entrada	Enzima	Cosolvente (%, v/v)	t (h)	38b (%) ^a	39b (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^{b,c}
1	<i>E. coli</i> /RasADH	Tolueno (5%)	2	>99	<1	40 (<i>R</i>)
2	<i>E. coli</i> /ADH-A	Tolueno (5%)	18	30	10	50 (<i>R</i>)
3	<i>E. coli</i> /SyADH	Tolueno (5%)	22	26	<1	66 (<i>R</i>)
4	<i>E. coli</i> /ADH-T	Tolueno (5%)	22	27	<1	78 (<i>R</i>)
5	evo-1.1.200	---	22	68	<1	99 (<i>S</i>)
6	evo-1.1.200	Dioxano (2.5%)	22	>99	<1	99 (<i>S</i>)
7	KRED-P1-B02	Dioxano (2.5%)	22	>99	<1	99 (<i>S</i>)
8	KRED-P1-B05	Dioxano (2.5%)	22	>99	<1	>99 (<i>S</i>)
9	KRED-P1-B10	Dioxano (2.5%)	22	>99	<1	97 (<i>S</i>)
10	KRED-101	Dioxano (2.5%)	22	>99	<1	>99 (<i>S</i>)
11	KRED-NADH-101	Dioxano (2.5%)	22	>99	<1	98 (<i>R</i>)
12	KRED-119	Dioxano (2.5%)	22	96	<1	50 (<i>S</i>)
13	KRED-130	Dioxano (2.5%)	22	>99	<1	75 (<i>R</i>)

Condiciones de reacción: **35b** (0.01 mmol, 2.2 mg), ADH (2.0 mg, excepto 0.06 mg para la evo-1.1.200), NAD(P)⁺ (1 mM), glucosa (20 mM) y GDH (2.5 U), [MgSO₄ (2 mM, solo para KREDs)], en buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7.5, 500 μL) a 30 °C y 250 rpm. ^a Porcentajes de productos calculados mediante CG del crudo de reacción; ^b excesos enantioméricos medidos mediante CG a partir del derivado **38b** acetilado con DMAP y anhídrido acético; ^c enantiómero mayoritario entre paréntesis.

4.4.4. Estudio enzimático de la 1-(2-acetilfenil)-2,2,2-trifluoroetan-1-ona (**35c**)

En el caso del derivado que posee los sustituyentes en posición *orto*, la generación del hidrato de la trifluorometil cetona (tendencia general observada en otros derivados de trifluoroacetilo que se encuentran en equilibrio entre el diol geminal y el carbonilo) evoluciona hacia un compuesto más estable al formarse un doble hemiacetal cíclico (Esquema 102). Esta estructura resultó ser

inerte frente a todas las enzimas probadas, tanto ADHs como TAs, por lo que se abandonó su estudio.



Esquema 102. Hidratación de la dicetona **35c** y formación de un hemiacetal cíclico más estable.

4.5. Estudios de biotransaminación

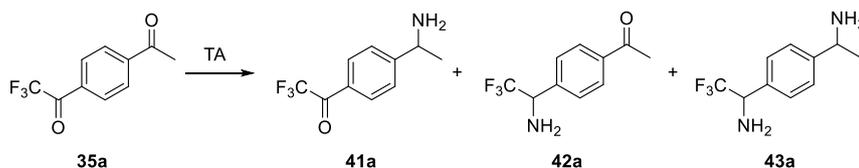
Tomando como sustrato modelo la dicetona **35a**, se estudió la reacción de biotransaminación empleando diversas amino transaminasas (Esquema 103). Por un lado, se emplearon cuatro enzimas sobreexpresadas en *E. coli* que, al igual que las ADHs, se utilizaron en forma de células enteras liofilizadas. Dos de ellas son (*S*)-selectivas, las provenientes de *Chromobacterium violaceum* (*CvTA*)²⁴⁹ y de *Arthrobacter citreus* (*ArSTA*);²⁵⁰ mientras que la transaminasa nativa de *Arthrobacter* sp. (*ArRTA*)²⁵¹ y la variante con 11 aminoácidos modificados (*ArRmut11*)²⁵² son (*R*)-selectivas. Además, se utilizó un kit de transaminasas comerciales de la casa comercial Codexis, Inc., cuyas secuencias de aminoácidos no son conocidas. En todos los casos, se seleccionó como donador de amino la isopropilamina, añadida en un gran exceso (1.0 M) para desplazar el equilibrio de la reacción.

²⁴⁹ U. Kaulman, K. Smithies, M. E. B. Smith, H. C. Hailes, J. M. Ward, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41*, 628-637.

²⁵⁰ S. Pannuri, S. V. Kamat, A. R. M. Garcia, PCT Int. Appl. WO 2006063336A2 20060615, **2006**.

²⁵¹ A. Iwasaki, Y. Yamada, N. Kizaki, Y. Ikenaka, J. Hasegawa, *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *69*, 499-505.

²⁵² C. K. Savile, J. M. Janey, E. M. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Georges, *Science*, **2010**, *329*, 305-309.



Esquema 103. Posibles productos de la biotransaminación de 35a.

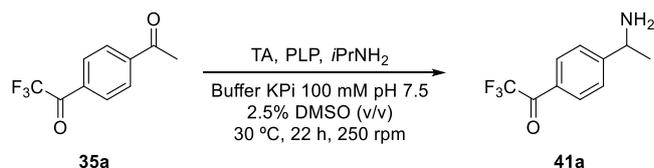
4.5.1. Examinación de las enzimas en la transaminación de 35a

Inicialmente, se estudió la biotransaminación de 35a en las condiciones de reacción previamente optimizadas en nuestro grupo de investigación para sustratos derivados de acetofenona (Tabla 39).²⁵³ Salvo en contadas excepciones, las TAs actuaron únicamente sobre la metilcetona al resultar el grupo trifluorometilo demasiado voluminoso para el centro activo de estas enzimas, formando la aminocetona 41a con excelentes selectividades.

En ninguno de los ensayos se logró la transformación completa del sustrato, logrando en varios casos conversiones superiores al 70% tanto para la obtención del enantiómero *S*, por ejemplo, con la enzima sobreexpresada *Ar*STA (entrada 2) o las comerciales ATA-238 (entrada 16) o TA-P1-G05 (entrada 28), como de la (*R*)-amina, donde la ATA-412 (entrada 23) condujo al mejor resultado con un 76% de conversión y una reacción completamente selectiva.

²⁵³ C. E. Paul, M. Rodríguez-Mata, E. Busto, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, S. García-Cerrada, J. Mendiola, Ó. de Frutos, I. Collado, *Org. Process Rev. Dev.* **2014**, *18*, 788-792.

Tabla 39. Biotransaminación de la dicetona **35a**.



Entrada	TA	41a (%) ^a	42a (%) ^a	43a (%) ^a	ee (%) ^b
1	<i>E. coli</i> / CvTA	73	<1	<1	98 (S)
2	<i>E. coli</i> / ArSTA	76	<1	<1	>99 (S)
3	<i>E. coli</i> / ArRTA	23	<1	<1	>99 (R)
4	<i>E. coli</i> / ArRmut11	29	<1	<1	>99 (R)
5	ATA-007	7	1	1	n.m.
6	ATA-013	64	2	2	>99 (R)
7	ATA-024	53	4	13	>99 (R)
8	ATA-025	46	8	9	>99 (R)
9	ATA-033	43	10	9	>99 (R)
10	ATA-113	<1	<1	<1	n.m.
11	ATA-117	22	<1	<1	>99 (R)
12	ATA-200	32	<1	<1	>99 (S)
13	ATA-217	21	<1	<1	>99 (S)
14	ATA-234	25	5	<1	>99 (S)
15	ATA-237	37	8	4	>99 (S)
16	ATA-238	85	<1	<1	>99 (S)
17	ATA-251	78	<1	<1	>99 (S)
18	ATA-254	77	<1	<1	>99 (S)
19	ATA-256	70	<1	<1	>99 (S)
20	ATA-260	81	<1	<1	>99 (S)
21	ATA-301	33	<1	<1	>99 (R)
22	ATA-303	58	<1	<1	>99 (R)
23	ATA-412	76	<1	<1	>99 (R)
24	ATA-415	17	14	1	>99 (R)
25	TA-P1-A06	50	<1	<1	>99 (S)
26	TA-P1-B04	60	<1	<1	>99 (S)
27	TA-P1-F03	53	<1	<1	>99 (S)
28	TA-P1-G05	71	<1	<1	>99 (S)
29	TA-P1-G06	59	<1	<1	>99 (S)
30	TA-P2-A01	25	<1	<1	>99 (R)
31	TA-P2-A07	16	<1	5	>99 (R)
32	TA-P2-B01	53	2	<1	>99 (R)

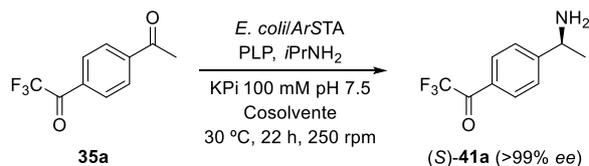
Condiciones de reacción: **35a** (0.01 mmol, 2.2 mg), DMSO (12.5 μ L, 2.5% v/v), TA (10.0 mg enzimas sobreexpresadas, 2.0 mg enzimas comerciales), PLP (1 mM), en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 μ L) que contiene isopropilamina (1.0 M) a 30 $^\circ$ C y 250 rpm durante 22 h. ^a Porcentajes de productos calculados mediante CG del crudo de reacción; ^b excesos enantioméricos medidos mediante CG a partir de la aminocetona **41a** acetilada con anhídrido acético (el enantiómero mayoritario se muestra entre paréntesis); n.m.: no medido.

4.5.2. Optimización del cosolvente en la biotransaminación de 35a con *ArSTA*

Con la finalidad de conseguir conversiones cuantitativas, se estudió la influencia de distintos cosolventes en el proceso de transaminación de **35a** catalizado por la *E. coli/ArSTA*, tratando de mejorar el valor de conversión de 76% alcanzada con un 2.5% (v/v) de DMSO (Tabla 39, entrada 2). Así, se probaron distintos disolventes tanto miscibles como inmiscibles con medios acuosos (DMSO, DMF, THF, MeCN, MeOH, dioxano, AcOEt, tolueno, y hexano) en distintas proporciones (1-10% v/v), sin lograr una clara mejoría, pero observando una buena tolerancia de la enzima a la mayoría cuando se empleaba hasta un 10% de proporción en volumen (Tabla 40).

La máxima conversión alcanzada fue de un 80% con 2.5% de dioxano (entrada 20), por lo que este disolvente resulta adecuado tanto para la reacción de biotransaminación como en la biorreducción previamente estudiada en la *Sección 4.4*. Otras pruebas, como aumentar la temperatura (entradas 4, 16 y 17), el tiempo de reacción a de un día a dos días, o incrementar la carga de enzima no mostraron efecto sobre el valor de conversión alcanzado (no se muestran en la tabla).

Tabla 40. Estudio de cosolventes en la transaminación del sustrato **35a** con *ArSTA*.



Entrada	Cosolvente	% (v/v) ^a	c (%) ^b
1	---	---	70
2		1	70
3	DMSO	2.5	76
4		2.5 (40 °C)	74
5		10	63
6		2.5	67
7	DMF	10	62
8	AcOEt	10	14
9	Tolueno	2.5	73
10	THF	2.5	69
11	MeCN	2.5	69
12	MeOH	2.5	71
13	Hexano	2.5	74
14		1	77
15		2.5	72
16	TBME	2.5 (40 °C)	74
17		2.5 (60 °C)	73
18		10	55
19		1	74
20	Dioxano	2.5	80
21		5	73

Condiciones de reacción: **35a** (0.01 mmol, 2.2 mg), DMSO (12.5 μ L, 2.5% v/v), *ArSTA* (10.0 mg del crudo liofilizado), PLP (1 mM), en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 μ L) que contiene isopropilamina (1.0 M) a 250 rpm durante 22 h. ^a Reacciones a 30 °C salvo que se indique entre paréntesis otra temperatura; ^b conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción; ^c se llevó a cabo la rehidratación de la enzima en la disolución reguladora durante 30 minutos.

4.5.3. Optimización de la biotransaminación de **35a**

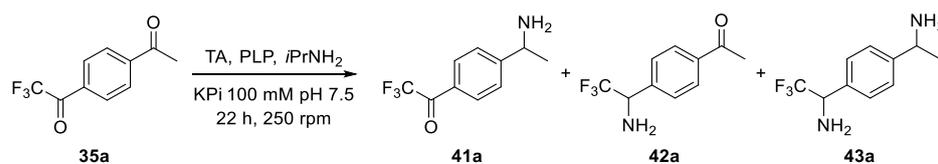
Seleccionando algunas de las transaminasas comerciales, se estudió la influencia de distintos parámetros de reacción, como el cosolvente, la temperatura y la carga de enzima, en la conversión y en la distribución de

productos. Para ello, se emplearon por un lado las enzimas (*R*)-selectivas ATA-024, ATA-025, ATA-033 y ATA-412 y, por otro, las transaminasas (*S*)-selectivas ATA-238 y TA-P1-G06 (Tabla 41).

Los mejores resultados para la obtención de la amina (*R*)-**41** se lograron con la ATA-412 donde fue posible alcanzar un 80% de conversión, observándose una cierta mejora al incrementar la carga de la enzima. Las otras enzimas estudiadas (ATA-024, ATA-025 y ATA-033) condujeron a conversiones muy altas, pero catalizando también la formación de la diamina **43a**, cuya proporción frente a **41a** aumentaba cuando se utilizaba una mayor carga de enzima o temperaturas más elevadas.

En el caso de las transaminasas (*S*)-selectivas, se observaron patrones de reactividad similares, destacando la formación exclusiva de (*S*)-**41a** con la TA-P1-G06, mientras que con la ATA-238 se obtenían una mezcla de productos en proporciones similares al aumentar la temperatura y/o la carga de enzima.

Tabla 41. Estudio de las condiciones de reacción utilizando transaminasas comerciales.

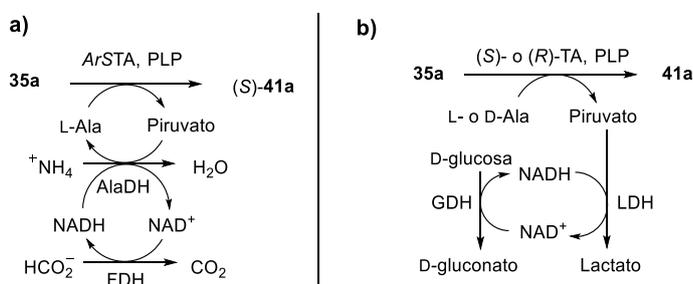


TA	Cosolvente (% v/v)	T (°C)	TA (mg)	41a (%) ^a	42a (%) ^a	43a (%) ^a
ATA-024	DMSO (2.5)	30	2.0	53	4	13
	---	30	2.0	68	4	10
	TBME (1.0)	30	2.0	57	7	14
	TBME (1.0)	30	4.0	55	5	21
	Dioxano (2.5)	30	4.0	56	8	16
	Dioxano (2.5)	40	2.0	64	6	14
	---	45	2.0	53	10	22
ATA-025	DMSO (2.5)	30	2.0	46	8	9
	---	45	2.0	36	14	24
	---	50	4.0	13	25	57
ATA-033	DMSO (2.5)	30	2.0	43	10	9
	---	45	2.0	36	17	32
ATA-412	DMSO (2.5)	30	2.0	76	<1	<1
	---	30	4.0	80	<1	<1
	--	45	2.0	72	<1	<1
	Dioxano (2.5)	30	4.0	80	<1	<1
	Dioxano (2.5)	45	4.0	80	<1	<1
ATA-238	DMSO (2.5)	30	2.0	85	<1	<1
	---	30	4.0	22	28	17
	Dioxano (2.5)	30	4.0	30	19	19
	Dioxano (2.5)	45	4.0	23	24	33
	---	50	4.0	32	20	17
TA-P1-G06	DMSO (2.5)	30	2.0	59	<1	<1
	---	30	4.0	83	<1	<1
	---	35	2.0	78	<1	<1

Condiciones de reacción: 35a (0.01 mmol, 2.2 mg), ATA comercial (2.0 - 4.0 mg), PLP (1 mM), en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 μ L) que contiene isopropilamina (1.0 M) a 250 rpm durante 22 h. ^a Porcentajes de productos calculados mediante CG del crudo de reacción.

4.5.4. Biotransaminación de 35a empleando otras estrategias de desplazamiento del equilibrio

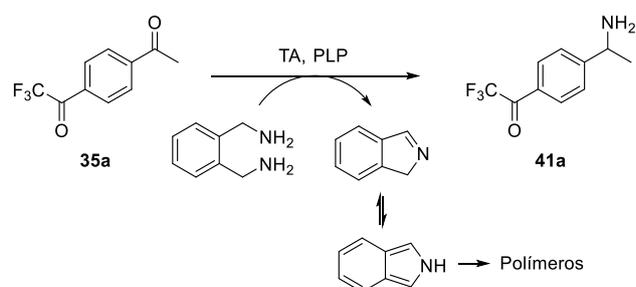
También se evaluaron otros métodos para desplazar el equilibrio hacia la formación de la amina utilizando como donador de amino L- o D-alanina, dependiendo de la selectividad de la transaminasa, junto con un sistema multienzimático de eliminación del piruvato formado. Así, por un lado, se puede emplear alaDH para (re)generar L-alanina, que se recicla en el caso de emplear una transaminasa (*S*)-selectiva (Esquema 104, a). Este sistema requiere además acoplar una segunda enzima auxiliar para regenerar el cofactor NADH en su forma reducida, requerido por la alaDH, para lo que se suele utilizar la formiato deshidrogenasa (FDH) de manera que el formiato amónico sirve como cosustrato en los dos procesos. Por otro lado, se puede emplear la lactato deshidrogenasa (LDH) que cataliza la transformación del piruvato en ácido láctico (Esquema 104, b).



Esquema 104. Estrategias multienzimáticas para desplazar el equilibrio de la biotransaminación de 35a eliminando el piruvato formado.

Por último, se empleó como donador de amino la *orto*-xililendiamina que, cuando reacciona con la TA para regenerar el cofactor PLP, forma una imina cíclica que puede tautomerizar en el 2*H*-isoindol que desplaza la reacción de aminación al polimerizar formando un precipitado insoluble (Esquema 105).²⁵⁴ Este tipo de sustratos, que han recibido la denominación de *smart cosubstrates*, presentan la ventaja de poder ser utilizados en cantidades cuasi-estequiométricas, logrando una mayor economía atómica.

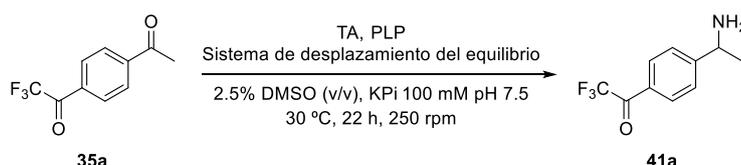
²⁵⁴ A. P. Green, N. J. Turner, E. O'Reilly, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10714-10717.



Esquema 105. Utilización de una diamina cuyo subproducto cicla espontáneamente.

Lamentablemente, ninguna de estas estrategias logró mejorar los resultados obtenidos usando grandes excesos de isopropilamina (Tabla 42). Entre las transaminasas probadas, tan solo las *ArSTA*, *CvTA* y *ArRTA* aceptaron la alanina como donador de amino, si bien el descenso en las conversiones fue muy significativo (entradas 1-3 y 5-6), exceptuando en el caso de la *ArRTA*, donde el uso del sistema D-Ala/alaDH condujo a un ligero aumento de la conversión (entradas 8 y 9).

En cambio, cuando se usaron 1.5 equivalentes de la *o*-xililendiamina todas las enzimas reconocieron este cosustrato, pero con un marcado descenso en la reactividad frente al uso de isopropilamina, siendo las TA-P1-A06 (entrada 21) y TA-P1-G06 (entrada 23) las únicas que mostraron una conversión moderada con este sistema.

Tabla 42. Comparativa entre los distintos métodos de desplazamiento del equilibrio en la biotransaminación del sustrato **35a**.

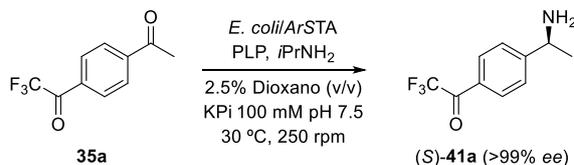
Entrada	Enzima	Sistema ^a	41a (%) ^b	42a+43a (%) ^b
1		<i>i</i> PrNH ₂	76	<1
2	ArSTA	L-Ala/AlaDH	24	<1
3		L-Ala/LDH	26	<1
4		<i>o</i> -Xililendiamina	5	<1
5		<i>i</i> PrNH ₂	73	<1
6	CvTA	L-Ala/AlaDH	28	<1
7		<i>o</i> -Xililendiamina	14	<1
8	ArRTA	<i>i</i> PrNH ₂	23	<1
9		D-Ala/AlaDH	34	<1
10		<i>i</i> PrNH ₂	53	17
11	ATA-024	D-Ala/AlaDH	<1	<1
12		D-Ala/LDH	<1	<1
13		<i>o</i> -Xililendiamina	7	11
14		<i>i</i> PrNH ₂	46	17
15	ATA-025	D-Ala/AlaDH	<1	<1
16		<i>o</i> -Xililendiamina	3	11
17		<i>i</i> PrNH ₂	43	19
18	ATA-033	D-Ala/AlaDH	<1	<1
19		<i>o</i> -Xililendiamina	3	8
20	TA-P1-A06	<i>i</i> PrNH ₂	50	<1
21		<i>o</i> -Xililendiamina	33	<1
22	TA-P1-G06	<i>i</i> PrNH ₂	59	<1
23		<i>o</i> -Xililendiamina	31	<1

Condiciones de reacción: **35a** (0.01 mmol, 2.2 mg), DMSO (12.5 μ L, 2.5% v/v), TA (10.0 mg de enzimas sobreexpresadas en *E. coli* o 2.0 mg de ATAs comerciales), PLP (1 mM) en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 μ L) a 250 rpm y 30 °C durante 22 h. ^a Sistema de desplazamiento del equilibrio: *i*PrNH₂: 1.0 M de isopropilamina contenida en el buffer fosfato; Ala/AlaDH: L- o D-alanina (100 mM), alaDH (5 μ L de L-alanina deshidrogenasa de *Bacillus subtilis*, 30 U/mg), HCO₂NH₄ (60 mM), FDH (5.5 U), NAD⁺ (1 mM); Ala/LDH: L- o D-alanina (60 mM), PRM-102 (15 mg, contiene LDH, NAD⁺, GDH y glucosa); *o*-xililendiamina: diclorohidrato de *orto*-xililendiamina (30 mM); ^b porcentajes de productos calculados mediante CG del crudo de reacción.

En vista de estos resultados, se designó a la isopropilamina como el donador de amino más adecuado, tanto por su simplicidad de uso y bajo coste, la fácil eliminación del coproducto (acetona), su aceptación por todas las enzimas y su alta eficacia.

Al formarse la acetona como subproducto, se contempló la opción de facilitar su evaporación *in situ* para conseguir el desplazamiento total del equilibrio. Así, se llevaron a cabo las reacciones en un sistema abierto que permitiera la progresiva eliminación de la acetona (Tabla 43). Además, se comprobó con experimentos de control que el incremento en la conversión no era debido al incremento de los tiempos de reacción (en sistemas cerrados no se produjeron avances a partir de las 24 horas) o por una mayor concentración del donador de amino al evaporarse parte del medio acuoso de la reacción (entrada 2). De hecho, se observó que se podía alcanzar una conversión elevada utilizando tan solo 100 mM de isopropilamina (5 equivalentes) si se permite la evaporación de la acetona (entrada 5).

Tabla 43. Biotransaminación de la dicetona **35a** con *ArSTA* en un sistema abierto.



Entrada	<i>iPrNH</i> ₂ (mM)	T (°C)	t (h)	<i>c</i> (%) ^a
1 ^b	1000	40	24	77
2 ^b	2000	30	24	66
3	1000	40	24	94
4	100	40	48	58
5	250	40	48	46
6	1000	30	48	>99

Condiciones de reacción: **35a** (0.02 mmol, 4.4 mg), dioxano (25 μ L, 2.5% v/v), *ArSTA* (20.0 mg de crudo liofilizado), PLP (1 mM), en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 1.0 mL) que contiene isopropilamina a 250 rpm. ^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción; ^b en sistema cerrado.

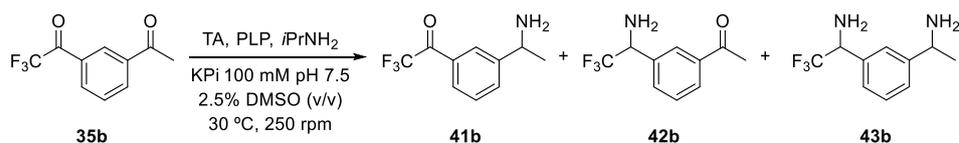
En estas condiciones se pudo obtener (*S*)-**41a** con conversión cuantitativa, requiriendo 48 h de reacción en un sistema abierto, si bien a las 24 h de reacción ya se observa la mejora. Inicialmente se consideró una temperatura de 40 °C para facilitar la evaporación (entradas 3-4), pero se consiguió el mismo efecto a 30 °C (entrada 6), sintetizando la amina deseada a una escala de 5 mL con rendimiento cuantitativo.

4.5.5. Biotransaminación de la 1-(3-acetilfenil)-2,2,2-trifluoroetan-1-ona (35b)

El estudio de biotransaminación se extendió a la dicetona **35b**, sustituida en *meta*, empleando algunas de las transaminasas que mejores actividades habían mostrado con el sustrato modelo **35a**, con sustitución en *para*. En todos los casos, la reacción transcurrió de manera preferente y casi exclusiva sobre la metilcetona, accediendo a la aminocetona **41b** en forma enantiopura (Tabla 44).

De nuevo la transaminasa de *Arthrobacter citreus* sobreexpresada en *E. coli* permitió acceder al enantiómero (*S*)-**41b** con elevada conversión (73%) y, complementariamente, con la ATA-303 se pudo sintetizar (*R*)-**41b** (62%), pudiendo mejorar esta conversión hasta un 68% al emplear dioxano como cosolvente y aumentar la carga de enzima.

Tabla 44. Biotransaminación de la dicetona **35b**.



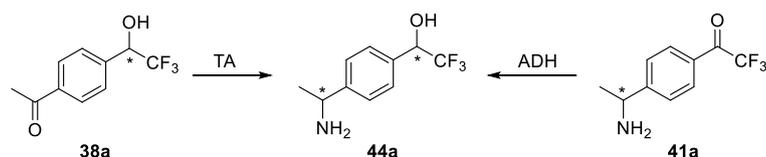
TA	41b (%) ^a	42b (%) ^a	43b (%) ^a	ee (%) ^b
<i>E. coli</i> /CvTA	54	<1	<1	>99 (S)
<i>E. coli</i> /ArSTA	71	<1	<1	>99 (S)
<i>E. coli</i> /ArSTA ^d	73	<1	<1	>99 (S)
ATA-024	23	<1	<1	>99 (R)
ATA-025	29	<1	<1	>99 (R)
ATA-251	67	3	11	>99 (S)
ATA-301	21	<1	<1	>99 (R)
ATA-303	62	<1	<1	>99 (R)
ATA-303 ^e	68	<1	<1	>99 (R)
ATA-412	12	<1	<1	>99 (R)
ATA-415	31	<1	<1	>99 (R)
TA-P1-A06	32	<1	<1	>99 (S)
TA-P1-G06	38	<1	<1	>99 (S)
TA-P2-B01	14	<1	<1	>99 (R)

Condiciones de reacción: **35b** (0.01 mmol, 2.2 mg), DMSO (12.5 μ L, 2.5% v/v), TA (10.0 mg enzimas sobreexpresadas, 2.0 mg enzimas comerciales), PLP (1 mM), en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 μ L) que contiene isopropilamina (1.0 M) a 30 °C y 250 rpm durante 22 h. ^a Porcentajes de productos calculados mediante CG del crudo de reacción; ^b excesos enantioméricos medidos mediante CG a partir de la aminocetona **41b** acetilada con anhídrido acético; ^c enantiómero mayoritario entre paréntesis; ^d utilizando 2.5% de dioxano (v/v) como cosolvente; ^e utilizando 2.5% de dioxano (v/v) y doble de carga de ATA-303 (4.0 mg).

4.6. Combinación de una ADH y una TA para la síntesis del 2,2,2-trifluoro-1-[4-(1-aminoetil)fenil]etan-1-ol

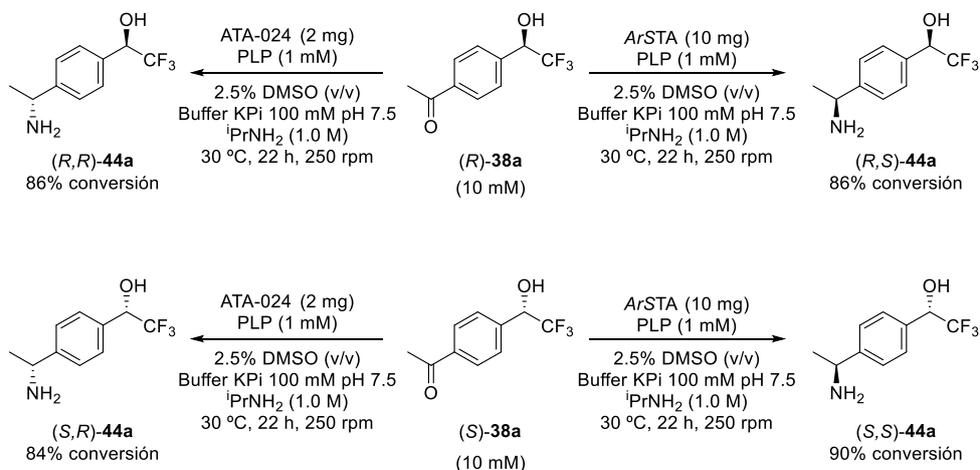
4.6.1. Obtención del aminoalcohol **44a** en dos pasos

Partiendo de la hidroxiacetofenona **38a** y la amino trifluoroacetilcetona **41a** ópticamente activas, sintetizadas usando ADHs y transaminasas respectivamente, se estudió el segundo paso enzimático para acceder a los distintos estereoisómeros del aminoalcohol **44a** (Esquema 106).



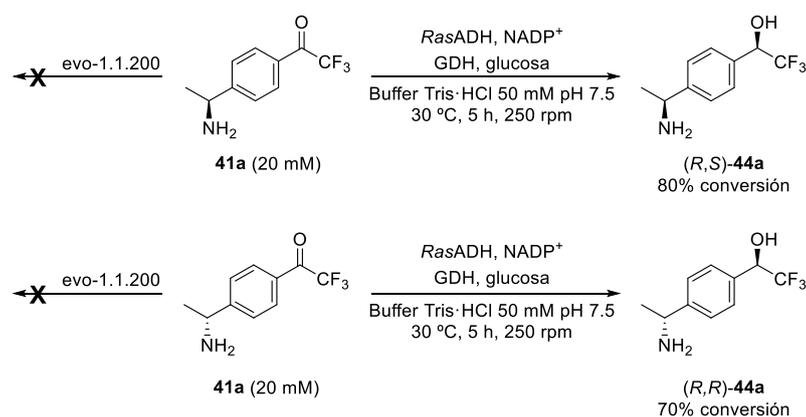
Esquema 106. Síntesis de **44a** a través de los dos posibles intermedios.

Así, partiendo de la hidroxiketona (*R*)-**38a** (sintetizada con *RasADH*) y utilizando las transaminasas *E. coli/ArSTA* y ATA-024 en las condiciones optimizadas previamente, se pudieron obtener los diastereoisómeros (*R,S*)-**44a** y (*R,R*)-**44a** (Esquema 107, arriba). Análogamente, a partir del enantiómero (*S*)-**38a**, obtenido con la evo-1.1.200, se accedió al otro par de diastereoisómeros usando la misma pareja de transaminasas (Esquema 107, abajo).



Esquema 107. Síntesis de los cuatro estereoisómeros de **44a** en dos pasos de reacción enzimáticos: 1° ADH para obtener la hidroxiketona **38a** ópticamente activa y 2° TA catalizando la biotransaminación estereoselectiva.

Invirtiendo el orden de los pasos, se pudieron obtener los dos diastereoisómeros con configuración *R* en el grupo hidroxilo por biorreducción de la aminocetona **41a** con la *RasADH*. Desafortunadamente, la evo-1.1.200 no mostró actividad alguna sobre el sustrato **41a**, por lo que no se pudo acceder a la pareja de diastereoisómeros complementaria (Esquema 108).



Esquema 108. Síntesis de (*R,R*)-**44a** y (*R,S*)-**44a** en dos pasos: 1° TA y 2° ADH.

Una vez obtenidos los cuatro estereoisómeros, se desarrolló y optimizó un método de separación analítica mediante HPLC, con distintas columnas de relleno quiral, para lo que fue necesario derivatizar *in situ* el compuesto **44a** con anhídrido acético y DMAP (Ilustración 2).

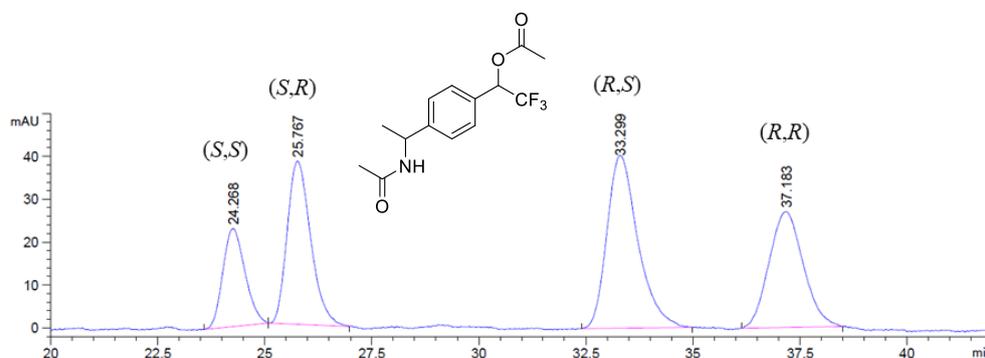


Ilustración 2. Separación analítica mediante HPLC de los 4 diastereoisómeros del aminoalcohol **44a** diacetilado.

4.6.2. Síntesis del aminoalcohol **44a** en cascada secuencial

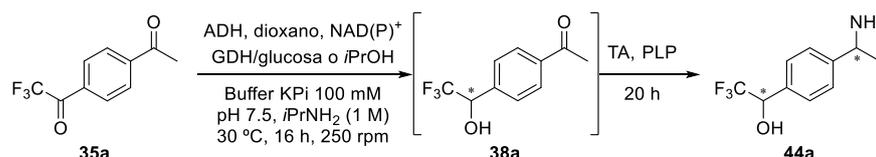
Dispuesto un método de análisis, se estudió el proceso en cascada a través de dos pasos enzimáticos desarrollados de manera secuencial donde, en vista de las actividades observadas en el segundo paso de reacción (Esquemas 107 y 108), se propuso un primer paso de biorreducción seguido de la segunda etapa de biotransaminación sobre la hidroxiketona **38a** intermedia.

Con este fin y en aras de una mayor simplicidad y evitar cambios en el pH, se empleó desde un inicio para todo el proceso secuencial la disolución reguladora de fosfatos que contiene la isopropilamina necesaria para el paso de transaminación. Así, una vez convertida la dicetona **35a** en la hidroxicetona **38a**, únicamente es necesaria la adición de la TA correspondiente y el cofactor PLP para que tenga lugar el paso de biotransaminación.

Se observó que la elevada concentración de *i*PrNH₂ tenía un impacto negativo en la actividad de las ADHs, pero, considerando tiempos más largos de reacción y utilizando mayor carga de enzima, se pudieron alcanzar conversiones cuantitativas de **35a** en **38a**, tanto con la *E. coli/RasADH* como con la evo-1.1.200. Así, se pudieron obtener los cuatro estereoisómeros de **44a** con excelentes diastereo- y enantioselectividades (Tabla 45).

Las conversiones de las transaminasas se vieron ligeramente afectadas por el enantiómero de la hidroxicetona: mientras que algunas mostraron una mayor actividad sobre (*R*)-**38a**, como la *ArSTA* y ATA-024 con conversiones cercanas al 80%, otras mostraron una mayor afinidad por el enantiómero (*S*)-**38a**, como es el caso de la TA-P1-A06. Esto muestra que, pese a que el centro quiral preformado se encuentra lejos espacialmente del grupo funcional sobre el que actúa la enzima, tiene una cierta influencia en el posicionamiento del sustrato en el centro activo de la misma.

Tabla 45. Cascada secuencial empleando ADHs y TAs para sintetizar el aminoalcohol **44a**.



ADH	TA	Aminoalcohol	<i>c</i> (%) ^a	<i>ed</i> (%) ^b	<i>ee</i> (%) ^b
<i>RasADH</i>	<i>ArSTA</i>		79	98 ^c	>99
	TA-P1-G05		68	98 ^c	>99
	TA-P1-A06	<i>R,S</i>	50	n.m.	>99
	TA-P1-G06		56	n.m.	>99
	ATA-238		44	n.m.	>99
	ATA-024		78	98 ^d	>99
	ATA-025	<i>R,R</i>	77	98 ^d	>99
	ATA-033		75	98 ^d	>99
evo-1.1200	ATA-412		57	n.m.	>99
	<i>ArSTA</i>		64	97 ^c	>99
	TA-P1-A06		71	97 ^c	>99
	TA-P1-G06	<i>S,S</i>	66	n.m.	>99
	ATA-251		66	n.m.	>99
	ATA-254		67	n.m.	>99
	ATA-260		61	n.m.	>99
	ATA-013		66	n.m.	>99
	ATA-024		68	>99	>99
	ATA-303	<i>S,R</i>	65	n.m.	>99
TA-P2-B01		65	99	>99	

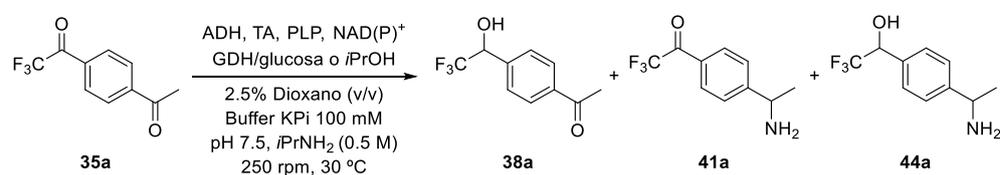
Condiciones de reacción: en un tubo Eppendorf se mezclan **35a** (0.01 mmol, 2.2 mg), dioxano (12.5 μ L, 2.5% v/v), ADH (2.0 mg de *RasADH* o 0.2 mg de evo-1.1.200), glucosa (20 mM), GDH (5 U) en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 μ L) que contiene isopropilamina (1.0 M) y se agita a 30 °C y 250 rpm durante 16 h; a continuación, se añaden la TA (10.0 mg *ArSTA* o 4.0 mg ATAs comerciales) y el PLP (1 mM) y se agita otras 20 h a 30 °C y 250 rpm. ^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción; ^b excesos enantioméricos medidos mediante HPLC a partir del aminoalcohol **44a** acetilado con anhídrido acético y DMAP y el crudo filtrado en gel de sílice; n.m.: no medido; ^c 1% de *S,S*; ^d 1% de *S,R*; ^e 1.5% de *S,R*.

4.6.3. Obtención del aminoalcohol 44a a través de un proceso en cascada concurrente

Los ensayos preliminares realizados utilizando una estrategia en cascada concurrente mostraron, en la mayoría de los casos, la acumulación de una gran cantidad de la aminocetona 41a (Tabla 46, 28-70%), que era lo esperable al no ser un sustrato aceptado por la evo-1.1.200 (entradas pares), mientras que la RasADH (entradas impares), pese a ser capaz de reducirla, presenta una cinética mucho más lenta que la exhibida frente a otras trifluorometil cetonas.

Por ello, para que este proceso transcurra de forma eficiente, sería necesario encontrar unas condiciones en las que la dicetona 35a sea transformada mayoritariamente en la hidroxicetona 38a, sobre la que posteriormente actuaría la correspondiente transaminasa.

Tabla 46. Pruebas del proceso en cascada concurrente partiendo de la dicetona 35a.



Entrada	ADH (mg)	TA (mg)	35a (%) ^a	38a (%) ^a	41a (%) ^a	44a (%) ^a
1	RasADH	ArSTA	<1	<1	49	51
2	evo-1.1.200	(10 mg)	4	2	52	42
3	RasADH	ATA-238	<1	<1	70	30
4	evo-1.1.200	(2 mg)	11	10	55	24
5	RasADH	ATA-024	2	9	28	61
6	evo-1.1.200	(4 mg)	4	7	28	60
7	RasADH	ATA-412	<1	<1	38	62
8	evo-1.1.200	(6 mg)	5	7	47	41

Condiciones de reacción: 35a (0.01 mmol, 2.2 mg), TA, ADH (10.0 mg RasADH o 0.05 mg evo-1.1.200), PLP (1 mM), NAD(P)⁺ (1 mM), dioxano (12.5 μL, 2.5% v/v), GDH (2 U), glucosa (25 mM) con RasADH o isopropanol (25 mM) con evo-1.1.200 en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 μL) que contiene isopropilamina (0.5 M) a 30 °C y 250 rpm durante 48 h. ^a Porcentajes de productos calculados mediante CG del crudo de reacción.

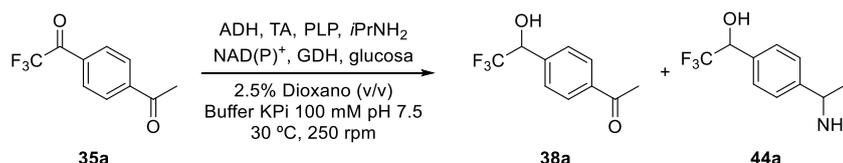
4.6.4. Optimización de los procesos en cascada para la síntesis asimétrica del aminoalcohol 44a

Con el fin de lograr una mayor eficiencia en la transformación de **35a** en **44a**, se llevó a cabo un estudio detallado de las condiciones de reacción de los procesos secuencial y concurrente.

En el caso de la cascada secuencial, el primer paso de biorreducción ya transcurría con conversión completa por lo que el estudio se enfocó exclusivamente en el segundo paso de transaminación. Para ello, se utilizó la estrategia descrita al final de la *Sección 4.5.4* consistente en llevar a cabo la reacción en un sistema abierto, permitiendo así la evaporación de la acetona y el desplazamiento del equilibrio en mayor medida hacia la formación de amina (Tabla 47, secuencial).

Por otro lado, la optimización de la cascada concurrente resultó más compleja, pero se lograron unas condiciones eficientes al reducir a la mitad la concentración de sustrato (de 20 mM a 10 mM) y de isopropilamina (de 1.0 M a 0.5 M). Además, fue necesario incrementar la carga de la ADH, de manera que se lograba favorecer que la biorreducción transcurriese mucho más rápidamente que la transaminación. Nuevamente, la transformación de la hidroxiketona en el aminoalcohol también se favoreció llevando a cabo el proceso en un sistema abierto, de manera análoga al diseño secuencial, y a un tiempo de reacción más largo (Tabla 47, concurrente).

Tabla 47. Procesos optimizados en cascada para obtener el aminoalcohol 44a.



Entrada	ADH	TA	Secuencial		Concurrente	
			38a (%) ^a	44a (%) ^a	38a (%) ^a	44a (%) ^a
1	<i>RasADH</i>	<i>ArSTA</i>	7	93	5	95
2	evo-1.1.200	<i>ArSTA</i>	10	90	3	97
3	<i>RasADH</i>	ATA-024	4	96	2	98
4	evo-1.1.200	ATA-024	4	96	<1	>99

Método secuencial: 35a (0.02 mmol, 4.4 mg), ADH (6.0 mg *RasADH* o 0.2 mg evo-1.1.200), NAD(P)⁺ (0.5 mM), GDH (5 U), glucosa (20 mM), dioxano (25 μ L, 2.5% v/v) en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 1.0 mL) que contiene isopropilamina (1.0 M) a 250 rpm durante 4 h, con *RasADH*, o 24 h, con evo-1.1.200; segundo paso: TA (20 mg de *ArSTA* o 10.0 mg de ATA-024) y PLP (1 mM) durante 24 h a 250 rpm y 30 °C con el sistema abierto.

Método concurrente: 35a (0.01 mmol, 2.2 mg), TA (10.0 mg *ArSTA* o 5.0 mg de ATA-024), ADH (10.0 mg *RasADH* o 1.0 mg evo-1.1.200), PLP (0.5 mM), NAD(P)⁺ (0.5 mM), GDH (5 U), glucosa (10 mM), isopropilamina (0.5 M), dioxano (25 μ L, 2.5% v/v) en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 1.0 mL) a 250 rpm y 30 °C durante 48 h con el sistema abierto.

^a Porcentajes de productos calculados mediante CG del crudo de reacción.

En los dos procesos se observó una completa desaparición de la dicetona 35a y no se detectó la amina 41a, obteniendo en distintas proporciones el aminoalcohol deseado 44a y la hidroxicetona 38a en función del avance de la biotransaminación.

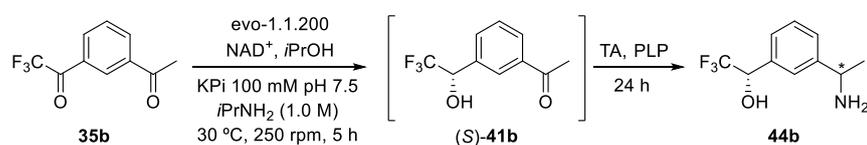
Satisfactoriamente, con sendas estrategias se pudieron sintetizar las dos parejas de diastereoisómeros del aminoalcohol 44a donde destaca un mejor rendimiento del proceso en cascada cuando se utiliza la evo-1.1.200 (entradas 2 y 4) mientras que los resultados son ligeramente superiores en el proceso secuencial con la *RasADH* (entradas 1 y 3).

4.7. Síntesis del 2,2,2-trifluoro-1-[3-(1-aminoetil)fenil]etan-1-ol (44b)

Basándonos en los excelentes resultados obtenidos en la transformación de la dicetona 35a en el aminoalcohol 44a, se extendió esta metodología al proceso

en cascada partiendo de la *meta*-dicetona **35b**. Así, se obtuvieron los diastereoisómeros (*S,S*)-**44b** y (*S,R*)-**44b** con la evo-1.1.200 y las transaminasas *E. coli*/ *ArSTA* y ATA-303, respectivamente (Tabla 48).

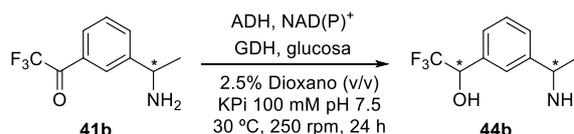
Tabla 48. Síntesis secuencial de **44b** utilizando la evo-1.1.200 y TAs.



TA	Aminoalcohol	41b (%) ^a	44b (%) ^a	ed (%) ^b	ee (%) ^b
<i>ArSTA</i>	<i>S,S</i>	33	67	>99	>99
ATA-303	<i>S,R</i>	38	62	>99	>99

Condiciones de reacción: en un tubo Eppendorf se mezclan **35b** (0.02 mmol, 4.3 mg), evo-1.1.200 (0.3 mg), NAD⁺ (1 mM) e isopropanol (20 mM) en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 1.0 mL) que contiene isopropilamina (1.0 M) y se agita a 30 °C y 250 rpm durante 5 h; a continuación, se añaden la TA (20 mg *ArSTA* o 10.0 mg ATA-303) y el PLP (1 mM) y se agita otras 22 h a 30 °C y 250 rpm. ^a Porcentajes de productos calculados mediante CG del crudo de reacción; ^b selectividades medidas mediante HPLC a partir del aminoalcohol **44b** acetilado con anhídrido acético y DMAP y el crudo filtrado en gel de sílice.

Pese a que la biorreducción (*R*)-selectiva de **35b** hacia la hidroxicetona intermedia (*R*)-**38b** tan solo fue posible mediante el empleo de KREDs comerciales (ver *Sección 4.4.3*, Tabla 38), se investigó cual era la diastereoselectividad mostrada por las ADHs sobreexpresadas en *E. coli* en la síntesis del aminoalcohol **44b** a partir de los dos enantiómeros de la aminocetona **41b** (Tabla 49). La ADH-A mostró una total selectividad en la reducción de ambos enantiómeros de la aminocetona **41b** hacia el alcohol *R* (frente a un 50% *ee* en la reducción de la dicetona **35b**), permitiendo acceder a los diastereoisómeros (*R,S*)-**44b** y (*R,R*)-**44b** en dos pasos de reacción que, sin embargo, no funcionó de manera secuencial al obtener conversiones inferiores al 10%.

Tabla 49. Biorreducción de la amino cetona **41b**.

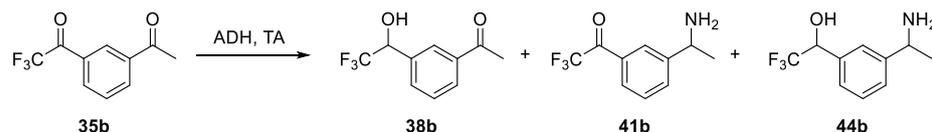
Entrada	Amina	ADH	c (%) ^a	rd (R:S) ^b
1	(S)- 41b	<i>E. coli</i> /RasADH	>99	40:60
2		<i>E. coli</i> /ADH-A	88	>99:1
3		<i>E. coli</i> /ADH-T	96	66:34
4		<i>E. coli</i> /TeSADH	79	6:94
5		<i>E. coli</i> /LbADH	86	8:92
6		<i>E. coli</i> /SyADH	97	75:25
7	(R)- 41b	<i>E. coli</i> /RasADH	>99	72:28
8		<i>E. coli</i> /ADH-A	88	>99:1

Condiciones de reacción: (S)- o (R)-**41b** (0.01 mmol, 2.2 mg, >99% ee), ADH (15 mg), NAD(P)⁺ (1 mM), glucosa (33 mM), GDH (5 U) y dioxano (12.5 μ L, 2.5% v/v) en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 1.0 mL) 30 °C y 250 rpm durante 24. ^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción; ^b relaciones diastereoméricas medidas mediante HPLC a partir del aminoalcohol **44b** acetilado con anhídrido acético y DMAP y el crudo filtrado en gel de sílice.

Resulta llamativa la distinta selectividad que muestra la RasADH dependiendo del enantiómero de la aminocetona **41b** (entradas 1 y 7), que vuelve a ejemplificar que el comportamiento de esta enzima se halla condicionado por el sustituyente en los derivados de trifluoroacetofenona con sustitución en posición *meta* (por ejemplo, Sección 4.4.1 con el sustrato **34b**).

Utilizando las condiciones optimizadas anteriormente con el sustrato **35b**, se sintetizaron los cuatro posibles diastereoisómeros del aminoalcohol **44b**, estudiando los procesos en cascada de forma secuencial y concurrente, mediante combinación de las ADHs evo-1.1.200 y KRED-NADH-101 y las TAs ArSTA (o ATA-251) y ATA-303 (Tabla 50). La diastereo- y enantioselectividad fue exquisita en todos los casos y no se detectaron trazas de isómeros minoritarios en el análisis mediante HPLC en ningún caso (>99 ed y >99 ee).

Tabla 50. Síntesis en cascada de los cuatro estereoisómeros del aminoalcohol **44b**.



Método	ADH	TA	35b (%) ^a	38b (%) ^a	41b (%) ^a	44b (%) ^{a,b}
Secuencial	KRED-NADH-101	<i>ArSTA</i>	<1	8	<1	92 (<i>R,S</i>)
	evo-1.1.200	<i>ArSTA</i>	<1	5	<1	95 (<i>S,S</i>)
	KRED-NADH-101	ATA-251	<1	<1	<1	>99 (<i>R,S</i>)
	evo-1.1.200	ATA-251	<1	3	<1	97 (<i>S,S</i>)
	KRED-NADH-101	ATA-303	<1	5	17	78 (<i>R,R</i>)
	evo-1.1.200	ATA-303	<1	8	<1	92 (<i>S,R</i>)
Cascada	KRED-NADH-101	<i>ArSTA</i>	<1	20	<1	80 (<i>R,S</i>)
	evo-1.1.200	<i>ArSTA</i>	5	20	13	62 (<i>S,S</i>)
	KRED-NADH-101	ATA-303	<1	10	<1	90 (<i>R,R</i>)
	evo-1.1.200	ATA-303	<1	4	<1	96 (<i>R,R</i>)

^a Porcentajes de productos calculados mediante CG del crudo de reacción; ^b estereoisómero obtenido entre paréntesis.

4.8. Extensión de la metodología al resto de dicetonas

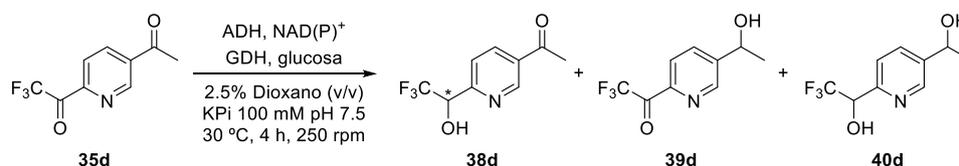
Encontradas unas condiciones adecuadas para la transformación de las trifluoroacetil/acetil dicetonas derivadas del benceno **35a** y **35b**, se amplió el estudio a los derivados de piridina **35d** y **35e**, la 4'-(difluoroacetil)acetofenona (**35f**) y al derivado de pirrol **35g**. Inicialmente, se estudiaron las reacciones de biorreducción y biotransaminación con cada uno de los sustratos, tratando de encontrar dos ADHs y dos TAs con enantioselectividad complementaria, para, finalmente, combinar los dos pasos en cascada.

4.8.1. 5-Acetil-2-(trifluoroacetil)piridina (**35d**)

La reactividad de la dicetona piridínica **35d** con ADHs y TAs muestra, por un lado, mezclas de productos entre los posibles alcoholes **38-40d** y, por otro, una excelente selectividad hacia la obtención de la trifluoroacetil amino piridina **44d**.

Analizando los datos de la biorreducción (Tabla 51), se encontraron ADHs que dan acceso a ambos enantiómeros del producto buscado: a (*R*)-**38d** con la *RasADH* (entrada 1, 87%) y a (*S*)-**38d** con las KRED-P2-D11 (entrada 14, 84%) o KRED-101 (entrada 18, 82%), entre otras. También se hallaron ADHs que actúan preferentemente sobre la metilcetona, como la *LbADH* (entrada 2) o la evo-1.1.200 (entrada 3).

Tabla 51. Biorreducción de la dicetona piridínica **35d** empleando ADHs.



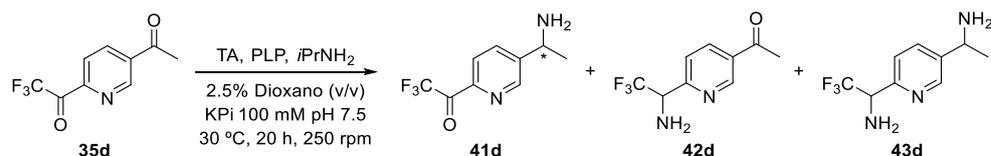
Entrada	ADH	35d (%) ^a	38d (%) ^a	39d (%) ^a	40d (%) ^a	ee (%) ^b
1	<i>E. coli/RasADH</i>	<1	87	2	11	>99 (<i>R</i>)
2	<i>E. coli/LbADH</i>	6	<1	88	6	n.m.
3	evo-1.1.200	10	3	61	26	n.m.
4	KRED-P1-A04	11	15	36	38	n.m.
5	KRED-P1-A12	16	19	28	37	n.m.
6	KRED-P1-B02	<1	78	<1	22	>99 (<i>S</i>)
7	KRED-P1-B05	<1	78	<1	22	>99 (<i>S</i>)
8	KRED-P1-B10	2	68	<1	30	>99 (<i>S</i>)
9	KRED-P1-H08	8	48	1	42	n.m.
10	KRED-P2-B02	4	70	<1	26	>99 (<i>S</i>)
11	KRED-P2-C02	8	55	5	32	n.m.
12	KRED-P2-C11	13	29	22	36	n.m.
13	KRED-P2-D03	6	64	1	30	>99 (<i>S</i>)
14	KRED-P2-D11	<1	84	<1	16	>99 (<i>S</i>)
15	KRED-P2-D12	9	57	3	31	n.m.
16	KRED-P2-G03	15	39	17	29	n.m.
17	KRED-P2-H07	14	26	26	35	n.m.
18	KRED-101	<1	82	<1	18	>99 (<i>S</i>)
19	KRED-NADH-101	8	4	67	20	n.m.
20	KRED-130	11	37	15	37	n.m.

Condiciones de reacción: **35d** (2.2 mg), ADH (6.0 mg sobreexpresadas en *E. coli*, 2.0 mg KREDs, 0.06 mg evo-1.1.200), NAD(P)⁺ (1 mM), glucosa (20 mM) y GDH (2.5 U), [MgSO₄ (2 mM, solo para KREDs)], en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 μL) a 30 °C y 250 rpm durante 4 h.

^a Porcentajes de productos calculados mediante CG del crudo de reacción; ^b exceso enantiomérico de **38d** determinado mediante HPLC, mostrando el enantiómero mayoritario entre paréntesis; n.m.: no medido.

La conversión en muchos casos sobrepasa los valores máximos posibles delimitados por el uso de un equivalente del sistema de regeneración del cofactor (observando una sobre-reducción de **38d** en el diol **40d**), debido al empleo de una menor concentración de sustrato de la calculada inicialmente, ya que la piridina se encontraría en forma de clorhidrato y la trifluorometil cetona en forma de diol geminal (peso molecular 271.6 g/mol en lugar de 217.2 g/mol).

Por otro lado, en el proceso de biotransaminación (Tabla 52) ambos enantiómeros de la amina **41d** se pudieron obtener con elevadas conversiones utilizando, por un lado, las enzimas sobreexpresadas *CvTA* (entrada 1) o *ArSTA* (entrada 2) y, por otro, la TA-P2-B01 (entrada 24).

Tabla 52. Estudio de biotransaminación del sustrato **35d**.

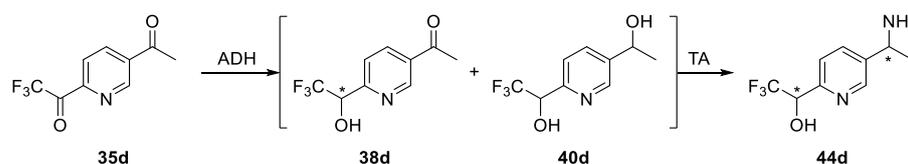
Entrada	TA	41d (%) ^a	42d (%) ^a	43d (%) ^a	ee (%) ^b
1	<i>E. coli</i> /CvTA	90	<1	<1	>99 (<i>S</i>)
2	<i>E. coli</i> /ArSTA	92	<1	<1	99 (<i>S</i>)
3	<i>E. coli</i> /ArRTA	10	<1	<1	n.m.
4	<i>E. coli</i> /ArRmut11	79	2	2	n.m.
5	ATA-024	89	1	1	95 (<i>R</i>)
6	ATA-025	45	<1	<1	n.m.
7	ATA-033	84	3	3	n.m.
8	ATA-237	65	<1	<1	>99 (<i>S</i>)
9	ATA-238	40	<1	<1	n.m.
10	ATA-251	81	<1	<1	90 (<i>S</i>)
11	ATA-254	23	<1	<1	n.m.
12	ATA-256	16	<1	<1	n.m.
13	ATA-260	9	<1	<1	n.m.
14	ATA-301	31	<1	<1	n.m.
15	ATA-303	43	<1	<1	n.m.
16	ATA-412	91	<1	<1	96 (<i>R</i>)
17	ATA-415	49	<1	<1	n.m.
18	TA-P1-A06	55	<1	<1	n.m.
19	TA-P1-B04	44	<1	<1	n.m.
20	TA-P1-F03	56	<1	<1	n.m.
21	TA-P1-G05	53	<1	<1	n.m.
22	TA-P1-G06	50	<1	<1	n.m.
23	TA-P2-A07	55	<1	<1	n.m.
24	TA-P2-B01	86	<1	<1	99 (<i>R</i>)

Condiciones de reacción: **35d** (0.01 mmol, 2.2 mg), dioxano (12.5 μ L, 2.5% v/v), TA (10.0 mg enzimas sobreexpresadas, 2.0 mg enzimas comerciales) y PLP (1 mM) en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 μ L) que contiene isopropilamina (1.0 M) a 30 °C y 250 rpm durante 20 h. ^a Porcentajes de productos calculados mediante CG del crudo de reacción; ^b excesos enantioméricos medidos mediante CG a partir de la aminocetona **41d** acetilada con anhídrido acético, mostrando el enantiómero mayoritario entre paréntesis; n.m.: no medido.

Para poder llevar a cabo su análisis, las dos parejas de diastereoisómeros del aminoalcohol **44d** se sintetizaron de manera secuencial con las transaminasas *ArSTA* y TA-P2-B01 a partir de los dos enantiómeros del alcohol **38d**, obtenidos con la *RasADH* y la KRED-101 (Tabla 53). El proceso global transcurre con completa enantio- y diastereoselectividad y se obtienen como subproductos una

pequeña cantidad de diol **40d** y de dicetona **35d** remanente, que no es transformada en la amina **41d** por la transaminasa.

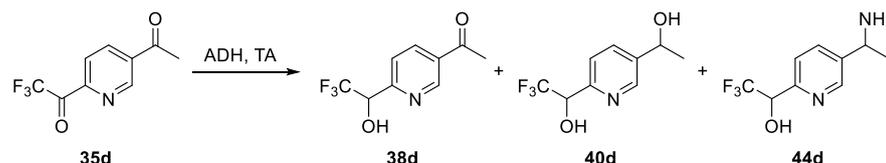
Tabla 53. Síntesis estereoselectiva del aminoalcohol **44d**.



ADH	TA	35d (%) ^a	38d (%) ^a	40d (%) ^a	44d (%) ^a	<i>ed</i> (%) ^b	<i>ee</i> (%) ^b
<i>Ras</i> ADH	<i>Ar</i> STA	7	14	6	73	98	>99
KRED-101	<i>Ar</i> STA	8	<1	4	88	97	>99
<i>Ras</i> ADH	<i>Cv</i> TA	7	30	5	58	n.m.	n.m.
KRED-101	<i>Cv</i> TA	<1	25	5	70	n.m.	n.m.
<i>Ras</i> ADH	TA-P2-B01	4	14	6	75	99	>99
KRED-101	TA-P2-B01	8	<1	5	87	>99	>99

Condiciones de reacción: **35d** (0.03 mmol, 8.2 mg), dioxano (50 μ L, 2.5% v/v), ADH (5.0 mg *Ras*ADH o 2.0 mg KRED-101), glucosa (20 mM), GDH (7.5 U), $MgSO_4$ (2 mM) en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 1.5 mL) durante 2 h a 30 $^{\circ}C$ y 250 rpm. A continuación, se mezclan 400 μ L del crudo de reacción con 400 μ L de un buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5) que contiene isopropilamina (1.0 M) y PLP (1 mM) y se añade la correspondiente TA (10.0 mg enzimas sobreexpresadas o 2.0 mg TA-P2-B01) y se agita 24 h a 30 $^{\circ}C$ y 250 rpm. ^a Porcentajes de productos calculados mediante CG del crudo de reacción; ^b selectividades medidas mediante HPLC a partir del aminoalcohol **44d** acetilado con anhídrido acético y DMAP; n.m.: no medido.

Empleando las condiciones optimizadas, y seleccionando las dos parejas de enzimas *Ras*ADH/KRED-101 y *Ar*STA/TA-P2-B01, se obtuvieron los resultados que se recogen en la Tabla 54 para la síntesis de los cuatro estereoisómeros de **44d**. Satisfactoriamente, la transformación de la dicetona **35d** fue completa y transcurrió con excelentes selectividades. Así, se obtuvieron los tres productos mostrados, sin detectarse en ningún caso la aminocetona **41d**, y observando solo trazas del diastereoisómero con el alcohol complementario (máximo 1.5%).

Tabla 54. Síntesis en cascada secuencial (A) y concurrente (B) del aminoalcohol **44d**.

Método	ADH	TA	38d (%) ^a	40d (%) ^a	44d (%) ^{a,b}	<i>ed</i> (%) ^c	<i>ee</i> (%) ^c
A	<i>RasADH</i>	<i>ArSTA</i>	11	<1	89 (<i>R,S</i>)	98	>99
	KRED-101	<i>ArSTA</i>	6	3	91 (<i>S,S</i>)	97	>99
	<i>RasADH</i>	TA-P2-B01	25	<1	75 (<i>R,R</i>)	99	>99
	KRED-101	TA-P2-B01	16	4	80 (<i>S,R</i>)	>99	>99
B	<i>RasADH</i>	<i>ArSTA</i>	20	1	79 (<i>R,S</i>)	98	>99
	KRED-101	<i>ArSTA</i>	14	4	82 (<i>S,S</i>)	97	>99
	<i>RasADH</i>	TA-P2-B01	14	<1	86 (<i>R,R</i>)	99	>99
	KRED-101	TA-P2-B01	6	<1	94 (<i>S,R</i>)	>99	>99

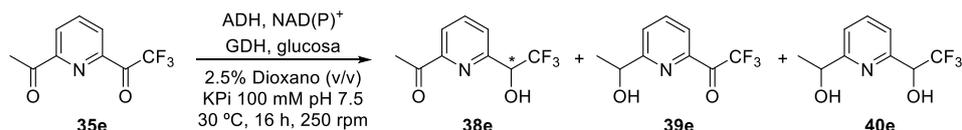
^a Porcentajes de productos calculados mediante CG del crudo de reacción; ^b estereoisómero obtenido entre paréntesis; ^c selectividades medidas mediante HPLC a partir del aminoalcohol **44d** acetilado con anhídrido acético y DMAP.

4.8.2. 6-Acetil-2-(trifluoroacetil)piridina (35e)

Cuando se emplea la piridina **35e**, con los dos grupos carbonilo en posición contigua al nitrógeno del heterociclo, se favorece termodinámicamente la transaminación al formarse en el producto **41e** un puente de hidrógeno intramolecular entre la amina formada y el nitrógeno de la piridina, efecto que ya se había observado en la transaminación de otros derivados de 2-acetilpiridina.²⁵⁵ En contrapartida, también se vería favorecida la reducción de la metilcetona, ya que el alcohol **39e** también puede formar el mismo puente de hidrógeno, lo que podría influir negativamente en la discriminación entre las dos cetonas por parte de la ADH.

²⁵⁵ M. López-Iglesias, D. González-Martínez, V. Gotor, E. Busto, W. Kroutil, V. Gotor-Fernández, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 4003-4009.

Tabla 55. Biorreducción de la dicetona **35e** con diversas ADHs.



Entrada	ADH	35e (%) ^a	38e (%) ^a	39e (%) ^a	40e (%) ^a	ee (%) ^{b,c}
1	<i>E. coli</i> /RasADH	<1	79	<1	21	50 (<i>S</i>)
2	<i>E. coli</i> /ADH-A	57	<1	43	<1	n.m.
3	evo-1.1.200	23	5	58	14	n.m.
4	KRED-P1-A04	14	65	6	14	97 (<i>S</i>)
5	KRED-P1-A12	30	27	13	29	n.m.
6	KRED-P1-B02	3	78	<1	19	>99 (<i>S</i>)
7	KRED-P1-B05	37	63	<1	<1	>99 (<i>S</i>)
8	KRED-P1-B10	6	71	2	21	90 (<i>S</i>)
9	KRED-P1-C01	7	64	3	26	8 (<i>S</i>)
10	KRED-P1-H08	19	53	5	22	58 (<i>S</i>)
11	KRED-P2-B02	7	71	3	19	<1
12	KRED-P2-C02	12	70	4	14	50 (<i>S</i>)
13	KRED-P2-C11	30	29	10	32	n.m.
14	KRED-P2-D03	17	52	9	22	<1
15	KRED-P2-D11	16	38	14	31	<1
16	KRED-P2-D12	21	41	13	24	62 (<i>S</i>)
17	KRED-P2-G03	26	39	11	25	n.m.
18	KRED-P2-H07	28	23	22	27	n.m.
19	KRED-P3-B03	31	9	50	9	n.m.
20	KRED-P3-G09	34	9	33	24	n.m.
21	KRED-P3-H12	24	4	61	12	n.m.
22	KRED-101	5	71	3	21	91 (<i>S</i>)
23	KRED-NADH-101 ^c	55	37	6	1	n.m.
24	KRED-NADH-110 ^c	31	15	35	19	n.m.
25	KRED-119	63	5	32	<1	n.m.
26	KRED-130 ^c	39	21	24	16	n.m.

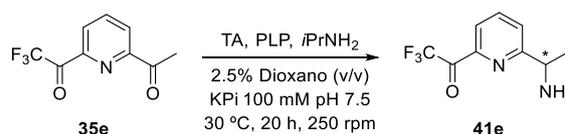
Condiciones de reacción: **35e** (2.2 mg), ADH (6.0 mg *E. coli*/RasADH, 2.0 mg KREDs, 0.06 mg evo-1.1.200), NAD(P)⁺ (1 mM), glucosa (20 mM), GDH (2.5 U) y MgSO₄ (2 mM) en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 μL) a 30 °C y 250 rpm durante 16 h. ^a Porcentajes de productos calculados mediante CG del crudo de reacción; ^b exceso enantiomérico de **38e** determinado mediante HPLC, se muestra el enantiómero mayoritario entre paréntesis; n.m.: no medido; ^c 6 h de reacción.

En la Tabla 55 se muestran los resultados obtenidos en la reducción de **35e** catalizada por ADHs, donde de nuevo la cantidad añadida de glucosa es ligeramente superior a la necesaria teóricamente para que la reacción se detenga en la mono-reducción ya que este sustrato también se aisló como clorhidrato

hidratado en forma de diol geminal. En la mayoría de los casos se obtienen mezclas de productos, al reducirse simultáneamente las dos cetonas, y solo se obtiene la hidroxiketona **38e** con configuración *S*. De nuevo, vuelve a observarse un cambio de selectividad de la *RasADH* (entrada 1) en un sustrato con los sustituyentes en posición relativa *meta*.

Por otro lado, las transaminasas mostraron una excelente selectividad y actividad (Tabla 56) encontrando varias enzimas que permitían obtener ambos enantiómeros de la aminocetona **41e** con conversión cuantitativa. Con dos de estos biocatalizadores, *E. coli*/*ArSTA* (entrada 2) y ATA-303 (entrada 7), se sintetizaron (*S*)-**41e** y (*R*)-**41e** a escala de 30 mg para, posteriormente, estudiar la obtención de los aminoalcoholes **44e** partiendo de estos sustratos. Se pudo reducir la cantidad de donador de amino a 250 mM de isopropilamina manteniendo los mismos valores de conversión y con rendimientos cuantitativos (para el aislamiento debe ajustarse a un pH ligeramente básico para lograr la extracción efectiva al disolvente orgánico).

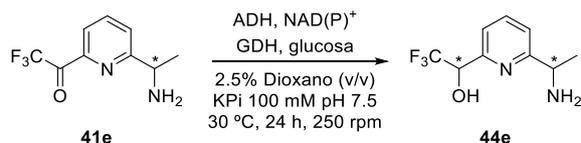
Tabla 56. Biotransaminación de la dicetona **35e** con diversas TAs.



Entrada	TA	<i>c</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^b
1	<i>E. coli</i> / <i>CvTA</i>	97	>99 (<i>S</i>)
2	<i>E. coli</i> / <i>ArSTA</i>	99	>99 (<i>S</i>)
3	ATA-024	>99	98 (<i>R</i>)
4	ATA-033	>99	99 (<i>R</i>)
5	ATA-237	>99	>99 (<i>S</i>)
6	ATA-251	>99	>99 (<i>S</i>)
7	ATA-303	>99	>99 (<i>R</i>)
8	ATA-412	>99	>99 (<i>R</i>)
9	TA-P1-A06	98	>99 (<i>S</i>)
10	TA-P2-B01	26	n.m.

Condiciones de reacción: **35e** (2.2 mg), dioxano (12.5 μ L, 2.5% v/v), TA (10.0 mg enzimas sobreexpresadas, 2.0 mg enzimas comerciales) y PLP (1 mM) en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 μ L) que contiene isopropilamina (1.0 M) a 30 °C y 250 rpm durante 20 h. ^a Porcentajes de productos calculados mediante CG del crudo de reacción; ^b excesos enantioméricos medidos mediante CG a partir de la aminocetona **41d** acetilada con anhídrido acético, se muestra el enantiómero mayoritario entre paréntesis; n.m.: no medido.

Tabla 57. Biorreducción de la amino trifluorometilcetona **41e**.



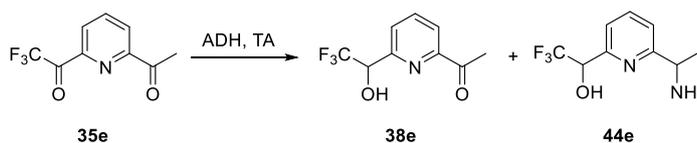
Entrada	Amina	ADH	c (%) ^a	ed (%) ^{b,c}
1		<i>E. coli</i> /RasADH	>99	34 (<i>R</i>)
2		<i>E. coli</i> /ADH-T	12	n.m.
3		<i>E. coli</i> /TesADH	21	n.m.
4		KRED-P1-B02	>99	>99 (<i>S</i>)
5		KRED-P1-B05	>99	98 (<i>S</i>)
6		KRED-P1-B10	>99	92 (<i>S</i>)
7		KRED-P1-C01	>99	92 (<i>S</i>)
8		KRED-P1-H08	>99	46 (<i>R</i>)
9		KRED-P2-B02	>99	86 (<i>S</i>)
10		KRED-P2-C02	>99	82 (<i>S</i>)
11		KRED-P2-C11	>99	82 (<i>S</i>)
12	(<i>S</i>)- 41e	KRED-P2-D03	76	6 (<i>S</i>)
13		KRED-P2-D11	>99	77 (<i>S</i>)
14		KRED-P2-D12	>99	87 (<i>S</i>)
15		KRED-P2-G03	92	89 (<i>S</i>)
16		KRED-P2-H07	72	93 (<i>S</i>)
17		KRED-P3-B03	10	n.m.
18		KRED-P3-G09	10	n.m.
19		KRED-P3-H12	14	n.m.
20		KRED-101	>99	>99 (<i>S</i>)
21		KRED-130	83	56 (<i>S</i>)
22		KRED-NADH-110	>99	>99 (<i>S</i>)
23		<i>E. coli</i> /RasADH	>99	82 (<i>R</i>)
24		evo-1.1.200	60	56 (<i>S</i>)
25		KRED-P1-H08	>99	72 (<i>R</i>)
26		<i>E. coli</i> /ADH-A	15	n.m.
27		<i>E. coli</i> /TeSADH	29	n.m.
28	(<i>R</i>)- 41e	<i>E. coli</i> /LbADH	17	n.m.
29		KRED-NADH-101	15	n.m.
30		KRED-119	32	n.m.
31		KRED-NADH-123	<1	n.m.
32		KRED-123	>99	30 (<i>S</i>)

Condiciones de reacción: 250 μ L del crudo de transaminación de **35e** que contiene el correspondiente enantiómero de **41e** (10 mM, >99% ee) en buffer de fosfatos [100 mM, pH 7.5 con 250 mM de *i*PrNH₂, 1 mM de PLP y 2.5% de dioxano (v/v)] se mezcla con 250 μ L de buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 μ L) que contiene glucosa (200 mM), GDH (2.5 U), NAD(P)⁺ (2 mM) y MgSO₄ (4 mM) y se añade la ADH (5.0 mg enzimas sobreexpresadas, 1.0 mg KREDs, 0.02 mg evo-1.1.200) a 30 °C y 250 rpm durante 24 h. ^a Conversiones medidas mediante cromatografía de gases del crudo de reacción; ^b excesos diastereoméricos medidos mediante CG de **44e** acetilado con anhídrido acético y DMAP; ^c configuración absoluta del alcohol del diastereoisómero mayoritario entre paréntesis; n.m.: no medido.

Dado que ninguna de las ADHs ensayadas permitía reducir la trifluorometilcetona con selectividad Prelog, se estudió la biorreducción de las aminocetonas **41e** enantiopuras buscando una ruta que permitiera acceder a los aminoalcoholes **44e** donde el grupo hidroxilo presente la configuración *R* (Tabla 57). Tan solo se encontraron dos ADHs, la *Ras*ADH (entradas 1 y 23) y la KRED-P1-H08 (entradas 8 y 25), que actuaran con selectividad Prelog y con resultados variables según el enantiómero de la amina sobre el que actuaban. Finalmente, los mejores resultados fueron una relación diastereomérica de 73:27 para (*R,S*)-**41e** empleando la KRED-P1-H08 (entrada 8) y de 91:9 para (*R,R*)-**41e** utilizando la *Ras*ADH (entrada 23).

En la Tabla 58 se muestran los resultados obtenidos con las estrategias en cascada optimizadas, modificando en este caso el orden de las enzimas en el proceso secuencial para acceder a los dos diastereoisómeros que poseen el grupo hidroxilo con configuración *R*. La conversión del sustrato **35e** fue completa en todos los casos.

Tabla 58. Síntesis en cascada secuencial y concurrente del aminoalcohol **44e**.



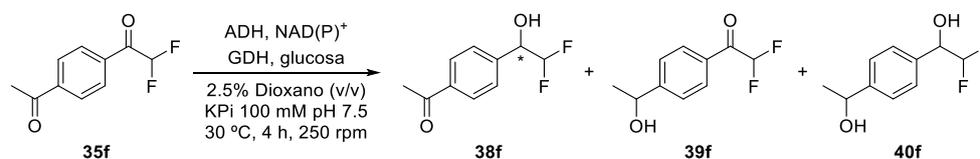
1° paso	2° paso	38e (%) ^a	44e (%) ^a	ed (%) ^b	ee (%) ^b
KRED-P1-B02	ATA-251	1	99	99	>99
KRED-P1-B02	ATA-024	1	99	98	>99
ATA-251	KRED-P1-H08	<1	>99	50	>99
ATA-412	RasADH	<1	>99	82	>99
RasADH + ArSTA		4	96	18 ^c	>99
RasADH + ATA-024		3	97	<1	92 ^d
KRED-P1-B02 + ArSTA		1	99	99	>99
KRED-P1-B02 + ATA-024		<1	>99	98	>99
KRED-P1-B05 + ATA-251		1	99	99	>99
KRED-P1-B05 + ATA-024		<1	>99	96	>99

^a Porcentajes de productos calculados mediante CG del crudo de reacción; ^b selectividades medidas mediante CG del derivado **44e** acetilado con anhídrido acético y DMAP; ^c se obtuvo en mayor proporción (*S,S*)-**44e** en lugar de (*R,S*)-**44e**; ^d exceso enantiomérico del diastereoisómero (*R,R*)-**44e**, >99% *ee* de (*S,R*)-**44e**.

4.8.3. 1-(4-acetilfenil)-2,2-difluoroacetofenona (35f)

A continuación, se evaluó el alcance de la metodología introduciendo un grupo difluoroacetilo en lugar de trifluoroacetilo en el sustrato dicarbonílico, estudiando la influencia en los procesos enzimáticos de biorreducción y biotransaminación sobre el derivado de acetofenona **35f** sustituido en *para*. El efecto de los dos átomos de flúor resultó lo suficientemente activante como para lograr alcanzar, de manera selectiva, conversiones cuantitativas en la obtención de la hidroxiketona **38f** al emplear un único equivalente del sistema glucosa/GDH con dos ADHs complementarias como son la *RasADH* y la evo-1.1.200 (Tabla 59).

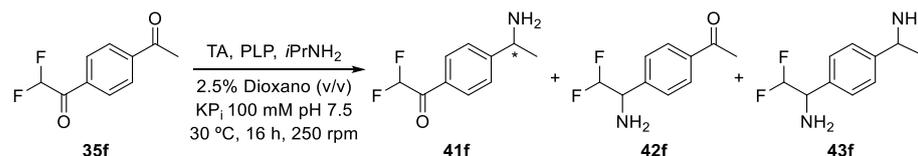
Tabla 59. Biorreducción de la dicetona **35f** con *RasADH* y evo-1.1.200.



ADH	38f (%) ^a	39f (%) ^a	40f (%) ^a	ee (%) ^b
<i>E. coli/RasADH</i>	>99	<1	<1	98 (<i>R</i>)
evo-1.1.200	99	<1	<1	99 (<i>S</i>)

Condiciones de reacción: **35f** (0.02 mmol, 4.0 mg), ADH (5.0 mg *E. coli/RasADH*, 0.06 mg evo-1.1.200), NAD(P)⁺ (1 mM), glucosa (20 mM), GDH (2.5 U), dioxano (25 μ L, 2.5% v/v) en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 1.0 mL) a 30 °C y 250 rpm durante 4 h. ^a Porcentajes de productos calculados mediante CG del crudo de reacción; ^b excesos enantioméricos medidos mediante CG del derivado **38f** derivatizado con anhídrido acético y DMAP mostrando el enantiómero mayoritario entre paréntesis; n.m.: no medido.

En cambio, el menor impedimento estérico del grupo difluorometilo permitió que la reactividad de muchas transaminasas se viera favorecida sobre la metilcetona, observando en algunos casos la conversión completa de la dicetona **35f** obteniendo dar mezclas de la amina **42f** y la diamina **43f** (Tabla 60). Resultó sorprendente la escasa actividad exhibida por algunas transaminasas con las que se habían obtenido buenos resultados con la dicetona análoga trifluorada **35a**, como las *CvTA* (entrada 1), *ArSTA* (entrada 2), o TA-P1-G06 (entrada 19), que podría deberse a la inhibición de la lisina catalítica del centro activo de la enzima, efecto que se ha descrito con derivados de α -fluoroacetofenona.⁴⁷

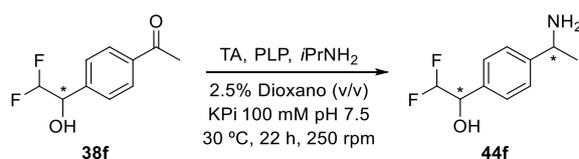
Tabla 60. Distribución de productos en la biotransaminación de **35f**.

Entrada	TA	41f (%) ^a	42f (%) ^a	43f (%) ^a
1	<i>E. coli</i> /CvTA	2	<1	<1
2	<i>E. coli</i> /ArSTA	3	<1	<1
3	ATA-024	<1	54	46
4	ATA-025	<1	66	34
5	ATA-033	<1	72	28
6	ATA-113	<1	<1	<1
7	ATA-217	<1	<1	<1
8	ATA-234	<1	<1	<1
9	ATA-237	<1	<1	<1
10	ATA-238	<1	<1	<1
11	ATA-251	35	15	23
12	ATA-254	15	<1	<1
13	ATA-256	24	<1	<1
14	ATA-260	13	<1	<1
15	ATA-303	5	46	3
16	ATA-412	37	16	4
17	TA-P1-A06	20	<1	<1
18	TA-P1-G05	9	<1	<1
19	TA-P1-G06	10	<1	<1
20	TA-P1-F03	<1	<1	<1
21	TA-P2-B01	2	30	<1

Condiciones de reacción: **35f** (0.01 mmol, 2.0 mg), dioxano (12.5 μ L, 2.5% v/v), TA (10.0 mg enzimas sobreexpresadas, 2.0 mg enzimas comerciales) y PLP (1 mM) en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 μ L) que contiene isopropilamina (1.0 M) a 30 °C y 250 rpm durante 16 h.
^a Porcentajes de productos calculados mediante CG del crudo de reacción.

Para acceder a los aminoalcoholes **44f** y poder analizar la enantioselectividad con la que actúan las TAs sobre estos sustratos, se sintetizaron y aislaron los alcoholes (*R*)- y (*S*)-**38f** con las ADHs de *Ralstonia* sp. y evo-1.1.200 para estudiar su transaminación. Las enzimas seleccionadas mostraron excelentes selectividades y se pudieron obtener los cuatro estereoisómeros con conversiones de entre el 50 y el 81% (Tabla 61).

Tabla 61. Síntesis de los estereoisómeros de **44f** mediante biotransaminación de la hidroxicetona **38f**.

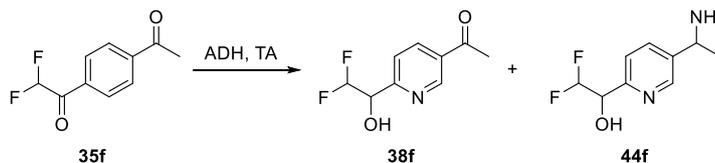


Sustrato	TA	<i>c</i> (%) ^a	<i>ed</i> (%) ^b	<i>ee</i> (%) ^b	44f
<i>(R)</i> - 38f	<i>E. coli</i> / <i>ArSTA</i>	75	>99	>99	<i>(R,S)</i>
	ATA-251	77	>99	>99	<i>(R,S)</i>
	ATA-256	74	>99	>99	<i>(R,S)</i>
	TA-P1-A06	24	>99	>99	<i>(R,S)</i>
	ATA-024	50	>99	>99	<i>(R,R)</i>
<i>(S)</i> - 38f	ATA-251	77	>99	>99	<i>(S,S)</i>
	ATA-024	81	>99	>99	<i>(S,R)</i>

Condiciones de reacción: **38f** (0.01 mmol, 2.0 mg), dioxano (12.5 μL , 2.5% v/v), TA (10.0 mg *E. coli*/*ArSTA*, 2.0 mg enzimas comerciales) y PLP (1 mM) en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 μL) que contiene isopropilamina (1.0 M) a 30 $^\circ\text{C}$ y 250 rpm durante 22 h en sistema cerrado.

^a Porcentajes de productos calculados mediante CG del crudo de reacción; ^b excesos enantioméricos determinados mediante HPLC del derivado **44f** derivatizado con anhídrido acético y DMAP.

En las condiciones optimizadas, ambos procesos en cascada mostraron la desaparición completa de la dicetona **35f** y, mientras que en la estrategia secuencial el paso de transaminación fue incompleto, especialmente cuando se partía del alcohol *(R)*-**38f**, en el proceso concurrente se obtuvieron los cuatro estereoisómeros del aminoalcohol **44f** con conversión cuantitativa (Tabla 62).

Tabla 62. Síntesis en cascada secuencial (A) y concurrente (B) del aminoalcohol **44f**.

Método	ADH	TA	38f (%) ^a	44d (%) ^{a,b}	<i>ed</i> (%) ^c	<i>ee</i> (%) ^c
A	<i>RasADH</i>	ATA-251	34	66 (<i>R,S</i>)	>99	>99
	evo-1.1.200	ATA-251	13	87 (<i>S,S</i>)	>99	>99
	<i>RasADH</i>	ATA-024	35	65 (<i>R,R</i>)	>99	>99
	evo-1.1.200	ATA-024	11	89 (<i>S,R</i>)	>99	>99
B	<i>RasADH</i>	ATA-251	<1	>99 (<i>R,S</i>)	>99	>99
	evo-1.1.200	ATA-251	<1	>99 (<i>S,S</i>)	>99	>99
	<i>RasADH</i>	ATA-024	<1	>99 (<i>R,R</i>)	96 ^d	>99
	evo-1.1.200	ATA-024	<1	>99 (<i>S,R</i>)	96 ^e	>99

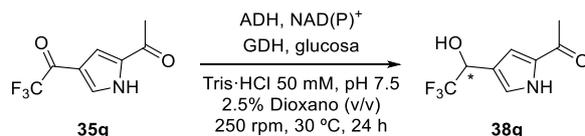
^a Porcentajes de productos calculados mediante CG del crudo de reacción; ^b estereoisómero obtenido entre paréntesis; ^c selectividades medidas mediante HPLC a partir del aminoalcohol **44f** acetilado con anhídrido acético y DMAP; ^d 2% de (*R,S*)-**44f**; ^e 2% de (*R,R*)-**44f**.

4.8.4. 2-Acetil-4-trifluoroacetil-1*H*-pirrol (**35g**)

Como excepción a la tendencia observada con el resto de trifluoroacetil/acetil dicetonas, no se pudieron obtener los aminoalcoholes derivados del pirrol **35g** por la falta de actividad mostrada por la metilcetona situada en la posición 2 del anillo. Utilizando ADHs, se obtuvieron los dos enantiómeros de la hidroxicetona **38g** (Tabla 63), sin detectar la formación de otros productos ni siquiera utilizando varios equivalentes de glucosa para regenerar el cofactor.

Como en otros casos estudiados previamente, la ADH de *Ralstonia* sp. (entrada 1) mostró una selectividad contraria a la esperada, de nuevo con un sustrato que posee los grupos carbonilos en posición relativa *meta*. Cabe destacar que se obtuvieron con conversiones cuantitativas y completa enantioselectividad, tanto cuando se empleó la evo-1.1.200 (entrada 2) como la ADH-A (entrada 3).

Tabla 63. Biorreducción de la dicetona **35g** derivada de pirrol.



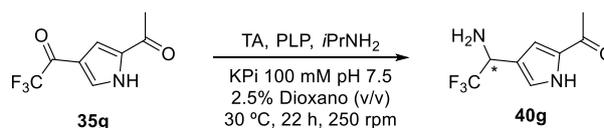
Entrada	ADH	<i>c</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^{b,c}
1	<i>E. coli</i> / <i>RasADH</i>	>99	68 (<i>S</i>)
2	evo-1.1.200	>99	>99 (<i>S</i>)
3	<i>E. coli</i> / ADH-A	>99	>99 (<i>R</i>)

Condiciones de reacción: **35g** (0.01 mmol, 2.1 mg), dioxano (12.5 μ L, 2.5% v/v), ADH (10.0 mg enzimas sobreexpresadas en *E. coli*, 0.06 mg evo-1.1.200), glucosa (20 mM) y GDH (2.5 U) en buffer Tris-HCl (50 mM, pH 7.5, 500 μ L) a 30 °C y 250 rpm durante 24 h. ^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción; ^b excesos enantioméricos determinados mediante HPLC; ^c enantiómero mayoritario entre paréntesis.

En la biotransaminación de la dicetona **35g** (Tabla 64), únicamente cuatro enzimas mostraron actividad (entradas 3-5 y 21) y, sorprendentemente, catalizando de manera exclusiva la reacción sobre la trifluorometilcetona para dar la aminocetona **40g**.

En el caso de las ATAs-024, 025 y 033 (entradas 3-5) se alcanzó una conversión cuantitativa hacia el enantiómero *S* (por el cambio en la prioridad los sustituyentes en las reglas CIP), mientras que la TA-P1-B04 permitió acceder al otro enantiómero de la aminocetona **40g** con una conversión moderada (47%, entrada 21). En este último caso, se pudieron optimizar las condiciones de reacción hasta lograr un 86% de conversión cuando se dobló la carga de transaminasa.

Adicionalmente, tratando de acceder al aminoalcohol, se partió de la hidroxicetona **38g** obtenida mediante biorreducción y se sometió a la reacción biotransaminación, sin observar tampoco reactividad alguna sobre el grupo acetilo con ninguna de las 25 TAs probadas.

Tabla 64. Biotransaminación de la dicetona **35g**.

Entrada	TA	<i>c</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^{b,c}
1	<i>E. coli</i> / CvTA	<1	n.m.
2	<i>E. coli</i> / ArSTA	<1	n.m.
3	ATA-024	>99	97 (<i>S</i>)
4	ATA-025	>99	98 (<i>S</i>)
5	ATA-033	>99	>99 (<i>S</i>)
6	ATA-103	<1	n.m.
7	ATA-113	<1	n.m.
8	ATA-200	<1	n.m.
9	ATA-217	<1	n.m.
10	ATA-224	<1	n.m.
11	ATA-234	<1	n.m.
12	ATA-237	1	n.m.
13	ATA-238	<1	n.m.
14	ATA-251	<1	n.m.
15	ATA-254	<1	n.m.
16	ATA-256	<1	n.m.
17	ATA-260	<1	n.m.
18	ATA-303	<1	n.m.
19	ATA-412	<1	n.m.
20	TA-P1-A06	<1	n.m.
21	TA-P1-B04	45	97 (<i>R</i>)
22	TA-P1-F03	1	n.m.
23	TA-P1-G05	<1	n.m.
24	TA-P1-G06	<1	n.m.
25	TA-P2-B01	<1	n.m.

Condiciones de reacción: **35g** (0.01 mmol, 2.0 mg), dioxano (12.5 μL , 2.5% v/v), TA (10.0 mg enzimas sobreexpresadas, 2.0 mg enzimas comerciales) y PLP (1 mM) en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 μL) que contiene isopropilamina (1.0 M) a 30 $^\circ\text{C}$ y 250 rpm durante 22 h. ^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción; ^b excesos enantioméricos determinados mediante CG del derivado **40g** derivatizado con anhídrido acético; ^c enantiómero mayoritario entre paréntesis.

4.9. Procesos en cascada

En la Tabla 65 se muestra, a modo de resumen, la comparación en términos de conversión global y selectividad entre los procesos secuenciales y concurrentes optimizados para la síntesis en cascada de los cuatro estereoisómeros de los aminoalcoholes **44a-f** (exceptuando el derivado sustituido en *orto* **44c** por su completa inactividad).

La elección de las enzimas se trató de normalizar utilizando:

- las ADHs de *Ralstonia* sp. y evo-1.1.200, con selectividad Prelog y anti-Prelog, respectivamente,

- las TAs de *Arthrobacter citreus* (*S* selectiva) y ATA-024 (*R* selectiva).

Como excepciones, se tuvieron que emplear:

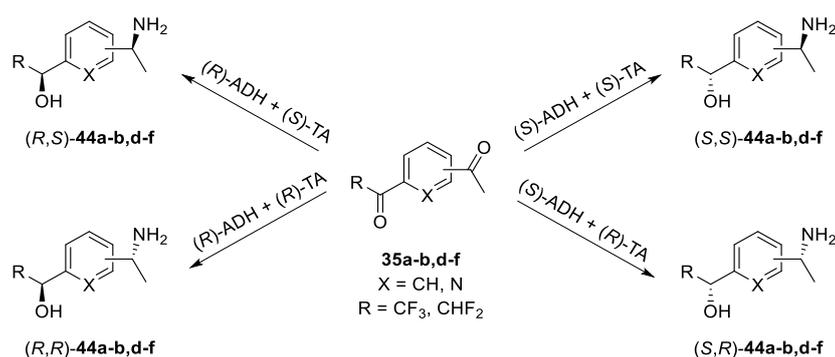
- las KRED-101 y KRED-P1-B02 con las piridinas **35d** y **35e**, respectivamente, para obtener los (*S*)-alcoholes (la evo-1.1.200 reaccionaba preferentemente con la metilcetona),

- la KRED-NADH-101 se utilizó en lugar de la *Ras*ADH con el sustrato **35b**, ya que esta no actúa con buena selectividad con los derivados sustituidos en *meta*,

- la TA (*S*)-selectiva utilizada con el sustrato **35f** fue la ATA-251, que no presentó problemas de inhibición,

- la TAs (*R*)-selectivas seleccionadas fueron la ATA-303 para el sustrato **35b**, por su mayor actividad, y la TA-P2-B01 con la piridina **35d**, ya que muestra una mejor selectividad.

Tabla 65. Comparativa de los procesos en cascada secuencial o concurrente para la síntesis de los aminoalcoholes **44a-b,d-f**.



Sustrato	44	Secuencial			Concurrente		
		<i>c</i> (%) ^a	<i>ed</i> (%) ^b	<i>ee</i> (%) ^b	<i>c</i> (%) ^a	<i>ed</i> (%) ^b	<i>ee</i> (%) ^b
35a	(<i>R,S</i>)	93	98	>99	95	98	>99
	(<i>R,R</i>)	96	98	>99	98	98	>99
	(<i>S,S</i>)	90	97	>99	97	97	>99
	(<i>S,R</i>)	96	>99	>99	>99	>99	>99
35b	(<i>R,S</i>)	92	>99	>99	80	>99	>99
	(<i>R,R</i>)	78	>99	>99	90	>99	>99
	(<i>S,S</i>)	95	>99	>99	62	>99	>99
	(<i>S,R</i>)	92	>99	>99	96	>99	>99
35d	(<i>R,S</i>)	89	98	>99	79	98	>99
	(<i>R,R</i>)	75	97	>99	86	97	>99
	(<i>S,S</i>)	91	99	>99	82	99	>99
	(<i>S,R</i>)	80	>99	>99	94	>99	>99
35e	(<i>R,S</i>)	>99	8	>99	96	-18	>99
	(<i>R,R</i>)	>99	82	>99	97	<1	>99
	(<i>S,S</i>)	99	99	>99	99	99	>99
	(<i>S,R</i>)	99	98	>99	>99	98	>99
35f	(<i>R,S</i>)	66	>99	>99	>99	>99	>99
	(<i>R,R</i>)	65	>99	>99	>99	>99	>99
	(<i>S,S</i>)	87	>99	>99	>99	96	>99
	(<i>S,R</i>)	89	>99	>99	>99	96	>99

^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción; ^b selectividades determinadas mediante HPLC o CG del derivado **44a-b,d-f** acetilado con anhídrido acético y DMAP.

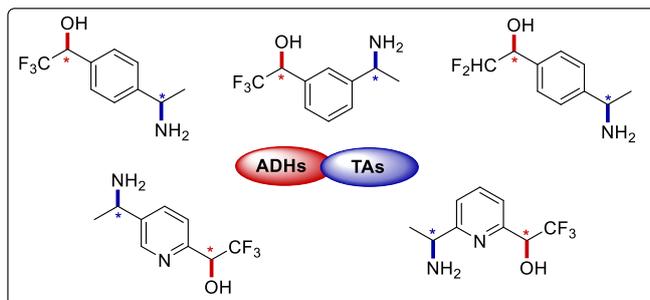
CONCLUSIONES

✓ Se ha sintetizado una familia de acetofenonas con un sustituyente trifluoroacetilo en las tres posibles posiciones del anillo, las 5-acetil- y 6-acetil-2-(trifluoroacetil)piridinas y la 4-(difluoroacetil)acetofenona.

✓ Utilizando como sustrato modelo la 4-(trifluoroacetil)acetofenona:

- se ha logrado la reducción selectiva de la cetona activada empleando ADHs, gracias al empleo del sistema de regeneración del cofactor como limitante para lograr la mono-reducción. Así, se ha accedido a los dos enantiómeros de la hidroxi-metilcetona con elevada enantioselectividad.
- Las TAs han mostrado una superior actividad sobre la metilcetona y se han podido sintetizar los cuatro posibles diastereoisómeros de los aminoalcoholes partiendo de los productos de biorreducción.
- Las dos reacciones enzimáticas se han combinado en procesos en cascada, optimizados tanto de manera secuencial como concurrente, permitiendo la síntesis de los aminoalcoholes con excelente selectividad (>99% de y >99% ee).

✓ El estudio se ha extendido al resto de dicetonas, estudiando los procesos enzimáticos en primer lugar individualmente y, posteriormente, en cascada.



PARTE EXPERIMENTAL

4.10. General

La procedencia de los reactivos químicos, disolventes, cofactores y alcohol deshidrogenasas es común a lo establecido en los capítulos anteriores. Además, los kits de KREDs y ATAs comerciales fueron adquiridos a Codexis, Inc. y la alaDH a Sigma-Aldrich (procedente del microorganismo *Bacillus subtilis*). Las cepas de las transaminasas de *Chromobacterium violaceum*, *Arthrobacter citreus*, *Arthrobacter* sp. y su mutante (*ArRmut11*) fueron cedidas por el grupo del profesor Wolfgang Kroutil de la Universidad de Graz y sobreexpresadas en células de *E. coli*.

4.11. Técnicas de análisis

Las técnicas de cromatografía en gel de sílice, RMN, HRMS, punto de fusión y rotación óptica específica se realizaron según se ha descrito en capítulos anteriores.

4.11.1. Cromatografía de gases (CG)

El seguimiento de las reacciones se efectuó mediante análisis por cromatografía de gases empleando la columna aquiral HP-1 y el programa de temperaturas: 90 °C durante 2 min, rampa de 10 °C/min hasta 180 °C, rampa de 20 °C/min hasta 240 °C. Los tiempos de retención de los sustratos y productos empleados o detectados aparecen recogidos en la Tabla 66.

Tabla 66. Separación analítica mediante CG utilizando la columna aquiral HP-1.

Compuesto	<i>t_R</i> (min)						
	a	b	c	d	e	f	g
31	6.4	6.3	5.8	7.0	5.7		
33	8.6	8.6	8.5	9.6	9.5		
34	7.6	7.2	6.6	8.3	7.8		
35	5.1	4.9	5.6	5.4	4.4	6.0	6.6
37	9.4	9.3					
38	7.8	7.6		6.8	5.6	8.7	7.6
39	6.2	5.8		7.1	5.2	8.6	
40	7.8	7.6		7.8	6.5	8.7	
41	5.9	5.5		7.0	5.7	5.9	
42	7.5	7.3		7.2		7.0	7.2
43	7.4	7.1		7.8		7.2	
44	7.5	7.3		7.5	6.4	8.4	

En los casos donde la separación entre las señales de los alcoholes o amino alcoholes no fue suficiente para su correcta medición, se realizó la derivatización *in situ* de los crudos de reacción con DMAP y anhídrido acético y sus correspondientes tiempos de retención aparecen recogidos en la Tabla 67.

Tabla 67. Separación analítica de derivados acetilados.

Compuesto ^a	Programa de temperaturas ^b	<i>t_R</i> (min)
38a	90/2/10/180/0/40/300	8.0
40a	90/2/10/180/0/40/300	9.5
44a	90/2/10/180/0/40/300	12.2
38b	90/2/10/180/0/40/300	7.6
40b	90/2/10/180/0/40/300	8.9
44b	90/2/10/180/0/40/300	11.7
38f	90/2/10/180/0/40/300	9.6
39f	90/2/10/180/0/40/300	10.5
40f	90/2/10/180/0/40/300	12.6

^a Derivatizados acetilados con anhídrido acético y DMAP ^b T_{inicial} (°C)/tiempo (min)/rampa (°C/min)/T (°C)/tiempo (min)/rampa (°C/min)/T_{final} (°C).

La determinación de excesos enantioméricos y/o diastereoméricos se realizó utilizando la columna CP-Chirasil-Dex CB, las condiciones y tiempos de retención se recogen en la Tabla 68.

Tabla 68. Separación analítica quiral en CG.

Compuesto ^a	Programa de temperaturas ^b	<i>t_R</i> (min)
37a	150/10/1/160/2	11.8 (<i>R</i>) y 12.3 (<i>S</i>)
38a	120/10/1/130/0/20/200	21.9 (<i>R</i>) y 22.1 (<i>S</i>)
38a	130/10/1/140/0/20/180	16.5 (<i>R</i>) y 17.1 (<i>S</i>)
41a	120/10/2/200	36.4 (<i>S</i>) y 37.5 (<i>R</i>)
38b	120/10/1/130/0/20/200	16.9 (<i>R</i>) y 17.7 (<i>S</i>)
41b	100/10/1/120/0/20/200	24.5 (<i>R</i>) y 25.0 (<i>S</i>)
44b ^c	140/5/3/200	19.9 (<i>R</i> , ±) y 20.2 (<i>S</i> , ±)
41d	120/10/2/200	42.7 (<i>S</i>) y 43.5 (<i>R</i>)
41e	120/10/2/170	37.0 (<i>S</i>) y 37.7 (<i>R</i>)
44e	100/5/2/170/20/200	38.4 (<i>R,S</i>), 38.9 (<i>S,S</i>), 39.5 (<i>S,R</i>) y 39.8 (<i>R,R</i>)
38f	130/10/1/160/0/5/200	24.9 (<i>R</i>) y 25.8 (<i>S</i>)
42g	130/10/2/180/0/20/200	27.4 (<i>S</i>) y 28.4 (<i>R</i>)

^a Derivatizando *in situ* las correspondientes amidas y/o ésteres con anhídrido acético; ^b T_{inicial} (°C)/tiempo (min)/rampa (°C/min)/T (°C)/tiempo (min)/rampa (°C/min)/T_{final} (°C); ^c determinación de la relación diastereomérica.

4.11.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Los análisis de HPLC se realizaron en un cromatógrafo Agilent 1260 Infinity con detector visible-ultravioleta (a longitudes de onda de 210, 215 y 254 nm), con las columnas Chiralcel OJ-H, Chiralpak AD-H, Chiralpak IA, Chiralpak IC y Chiralpak ID (25 cm x 4.6 mm, tamaño de partícula de 5 µm). Se emplearon mezclas de hexano e isopropanol o hexano y etanol con flujo isocrático de 0.8 mL/min.

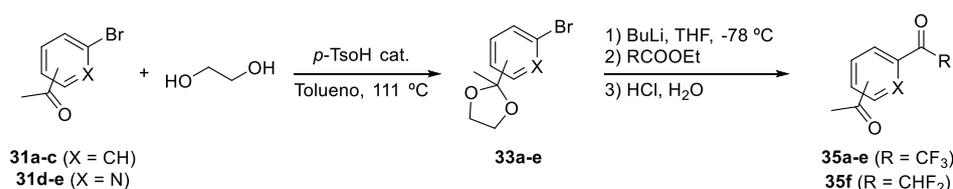
Tabla 69. Separación analítica quiral en HPLC.

Compuesto	Columna	Eluyente	T (°C)	t_R (min)
44a ^a	Chiralcel OJ-H	Hexano/EtOH 97:3	40	23.8 (<i>S,S</i>), 25.4 (<i>S,R</i>), 32.3 (<i>R,S</i>) y 37.4 (<i>R,R</i>)
44b ^a	Chiralpak IC	Hexano/EtOH 98:2	20	48.6 (<i>S,S</i>), 51.0 (<i>R,R</i>), 54.2 (<i>S,R</i>) y 58.3 (<i>R,S</i>)
38d	Chiralpak IC	Hexano/IPA 95:5	30	14.6 (<i>R</i>) y 17.3 (<i>S</i>)
44d ^a	Chiralpak AD-H	Hexano/IPA 95:5	30	29.7 (<i>R,S</i>), 34.4 (<i>S,R</i>), 39.0 (<i>R,R</i>) y 44.2 (<i>S,S</i>)
38e	Chiralpak ID	Hexano/IPA 95:5	40	10.7 (<i>R</i>) y 11.4 (<i>S</i>)
44f ^a	Chiralcel OJ-H	Hexano/EtOH 95:5	40	27.1 (<i>S,S</i>), 29.6 (<i>S,R</i>), 33.0 (<i>R,S</i>) y 36.3 (<i>R,R</i>)
38g	Chiralpak IA	Hexano/EtOH 95:5	40	28.2 (<i>S</i>) y 34.4 (<i>R</i>)

^a Aminoalcoholes derivatizados con anhídrido acético y DMAP y, posteriormente, filtrados a través de gel de sílice.

4.12. Procedimientos sintéticos

4.12.1. Síntesis de las dicetonas 35a-f



Una disolución de la correspondiente bromocetona **31a-e** (5.0 mmol, 1.0 g), etilenglicol (25 mmol, 1.4 mL) y *p*-TsOH (10 mg) en tolueno (30 mL) se calienta a reflujo con un sistema de Dean Stark hasta obtener la transformación completa en el acetal **33a-e** (medido por CG). Se deja enfriar a temperatura ambiente, la fase orgánica se lava con una disolución acuosa saturada de NaCl (5 x 10 mL), se seca con Na₂SO₄, se filtra y el disolvente se evapora a presión reducida. Los fenil-acetales **33a** (99%), **33b** (99%) y **33c** (77%) se aíslan en forma de aceites amarillos, mientras que las acetal-piridinas **33d** (99%) y **33e** (96%) se obtuvieron como sólidos blancos.

El correspondiente bromo-acetal (**33a-e**, 5.0 mmol) se disuelve en THF (12.5 mL) bajo atmósfera de argón, se enfría a -78 °C y se añade, gota a gota, una disolución de BuLi (2.5 M en hexano, 5.5 mmol, 2.2 mL). La disolución se agita a -78 °C durante 20-30 minutos, formándose una disolución amarilla-anaranjada, y se añade el correspondiente éster de etilo:

- trifluoroacetato de etilo (6.0 mmol, 714 µL) para obtener **35a-e**;
- difluoroacetato de etilo (6.0 mmol, 631 µL) para sintetizar **35f**.

La reacción se agita durante otras 2 h y se deja que alcance temperatura ambiente, tras lo cual se desprotege el acetal por adición de una disolución acuosa de HCl 2 M (15 mL) agitando a temperatura ambiente. Para los derivados *meta* y *orto* **35b-c** y las piridinas **35d-e** fue necesario calentar a reflujo de THF para lograr la desprotección. La mezcla se extrae con TBME (2 x 20 mL), las fases orgánicas combinadas se lavan con una disolución saturada de NaCl (20 mL). La fase orgánica resultante se seca con Na₂SO₄, se filtra y se concentra en el rotavapor para obtener un sólido ceroso.

Este crudo se redissuelve en la mínima cantidad de AcOEt y se añade heptano para la cristalización del producto obteniendo en forma de sólido blanco las (trifluoroacetyl)acetofenonas *para* (**35a**, 62%), *meta* (**35b**, 63%) y *orto* (**35c**, 42%), mientras que la 5-acetil-2-(trifluoroacetyl)piridina se aisló como un sólido gris (**35d**, 60%). Los compuestos restantes no precipitan en las condiciones empleadas y se aislaron eliminando los disolventes a presión reducida, obteniendo la 6-acetil-2-(trifluoroacetyl)piridina (**35e**, 83%) como un sólido anaranjado y la *para*-(difluoro)acetofenona (**35f**, 57%) como un sólido blanco.

4.12.2. Síntesis del 2-acetil-4-trifluoroacetyl-1*H*-pirrol (**35g**)

El 2-acetil-1*H*-pirrol (5.5 mmol, 0.60 g) se disuelve en CH₂Cl₂ (11 mL) y se añade una suspensión de AlCl₃ (33.0 mmol, 4.40 g) en CH₂Cl₂ (11 mL). La mezcla se enfría a 0 °C, se adiciona anhídrido trifluoroacético (11 mmol, 1.53 mL) y se agita durante 22 horas a temperatura ambiente. Una vez finalizada la reacción, se añade cuidadosamente agua (20 mL), se extrae con CH₂Cl₂ (2 x 20 mL), las fases orgánicas se combinan y se secan con Na₂SO₄. Tras filtrar, el

disolvente se evapora a presión reducida, aislando la dicetona **35g** como un sólido marrón (68%).

4.12.3. Procedimiento general para los ensayos de biorreducción de las dicetonas **35a-g**

En un tubo Eppendorf, se disuelve la dicetona **35a-g** (0.01 mmol) en dioxano (12.5 μ L, 2.5% v/v) y se añaden el buffer fosfato (100 mM, pH 7.5, 500 μ L), glucosa (20 mM), GDH (2.5 U), NAD(P)⁺ (1 mM) y la correspondiente ADH (6.0 mg enzimas sobreexpresadas en *E. coli*, 0.06 mg evo-1.1.200 o 2.0 mg KREDs). La mezcla se incuba en un agitador orbital a 250 rpm y 30 °C durante el tiempo especificado (ver Tablas 36-38, 51, 55, 57, 59 y 63). La reacción se detiene y se extrae con AcOEt (3 x 500 μ L), se lavan las fases orgánicas con agua (500 μ L), se secan con Na₂SO₄ y se analiza mediante cromatografía de gases y/o HPLC.

4.12.4. Procedimiento general para los ensayos de biotransaminación de las dicetonas **35a-g** y las hidroxicetonas **38a-f**

En un tubo Eppendorf, se disuelve la dicetona (**35a-g**, 0.01 mmol) o la hidroxicetona (**38a-f**, 0.01 mmol) en dioxano (12.5 μ L, 2.5% v/v), se añade buffer fosfato (100 mM, pH 7.5, 500 μ L) que contiene *i*PrNH₂ (1.0 M) y PLP (1 mM) y se adiciona la correspondiente TA (10.0 mg sobreexpresadas en *E. coli* o 2.0 mg ATAs). La mezcla se incuba en un agitador orbital durante 24 h a 250 rpm y 30 °C. La reacción se detiene añadiendo una disolución acuosa de NaOH 4 M (200 μ L) y se extrae con AcOEt (3 x 500 μ L), se lavan las fases orgánicas con agua (500 μ L), se secan con Na₂SO₄ y se analiza mediante cromatografía de gases y/o HPLC (ver Tablas 39, 44, 52, 56, 60, 61 y 64).

4.12.5. Síntesis de las hidroxicetonas **38a-g** mediante biorreducción

Para la síntesis de los dos enantiómeros de **38a**, como ejemplo representativo, se disuelve la *para*-(trifluoroacetil)acetofenona (**35a**, 0.1 mmol, 21.6 mg) en dioxano (125 μ L, 2.5% v/v) y se añade la disolución reguladora de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 4.9 mL). Se adicionan GDH (5 U), glucosa (20 mM, 18.0 mg) y la ADH y el cofactor: *E. coli*/RasADH (5.0 mg) y NADP⁺ (1 mM) o

evo-1.1.200 (1.0 mg) y NAD⁺ (1 mM), para acceder a los enantiómeros de configuración *R* o *S*, respectivamente. La mezcla se incuba en un agitador orbital a 250 rpm y 30 °C durante 2 h, tras lo cual se extrae con AcOEt (3 x 5 mL), las fases orgánicas combinadas se lavan con agua (5 mL), se secan con Na₂SO₄ y se filtran. El disolvente se evapora a presión reducida para obtener las hidroxicetonas (*R*)-**38a** o (*S*)-**38a** como sólidos amarillentos (99%).

4.12.6. Síntesis de aminocetonas **41a-f** y **42g** por biotransaminación

A modo de ejemplo, para la síntesis de los dos enantiómeros de **40a** se disuelve la dicetona **35a** (0.14 mmol, 30.2 mg) en dioxano (175 µL, 2.5% v/v) en un tubo Falcon y se añade una disolución de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 7.0 mL) que contiene *i*PrNH₂ (1.0 M) y PLP (1 mM). Se adiciona la correspondiente TA, *E. coli*/ArSTA (50 mg) para acceder a (*S*)-**40a** o ATA-024 (20 mg) para (*R*)-**40a**, y se incuba en un agitador orbital a 30 °C durante 48 h sin cerrar el tubo (tapado con un algodón). La reacción se detiene por adición de una disolución acuosa de NaOH 10 M (0.5 mL) y se extrae con AcOEt (3 x 5 mL), las fases orgánicas combinadas se lavan con agua (5 mL) y se secan con Na₂SO₄. Tras filtrar, el disolvente se evapora a presión reducida para obtener en forma de sólidos amarillentos las aminocetonas (*S*)-**41a** (93%) o (*R*)-**41a** (85%).

4.12.7. Método general para la síntesis de los aminoalcoholes (**44a-f**) de manera secuencial

Sobre una disolución de la correspondiente dicetona (**35a-f**, 0.02 mmol) en dioxano (25 µL, 2.5% v/v) y buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 1.0 mL) que contiene *i*PrNH₂ (1.0 M) se adicionan una ADH (6.0 mg enzimas sobreexpresadas en *E. coli*, 0.06 mg evo-1.1.200 o 2.0 mg KREDs), MgSO₄ (2 mM), NAD(P)⁺ (0.5 mM), GDH (5 U) y glucosa (20 mM) y se incuba durante 24 h en un agitador orbital a 30 °C y 250 rpm. A continuación, se adiciona el PLP (1 mM) y una transaminasa (20 mg de *E. coli*/ArSTA o 10.0 mg de ATAs) y se incuba durante otras 24 horas a 250 rpm y 30 °C, manteniendo el sistema de reacción abierto para los sustratos **35a-b,f**. La reacción se detiene añadiendo una disolución acuosa de NaOH 4 M (200 µL para **35a-b,f**; 1 M, 100 µL para **35d-e**) y se extrae con AcOEt (3 x 500 µL), se lavan las fases orgánicas con agua

(500 μ L), se secan con Na_2SO_4 , se filtran y se analiza mediante cromatografía de gases y/o HPLC (ver Tablas 45, 48, 50, 54, 58, 62 y 65).

4.12.8. Método general para la síntesis de los aminoalcoholes (44a-f) de modo concurrente

Sobre una suspensión de la ADH (10.0 mg *E. coli/RasADH* o 1.0 mg *ev-1.1.200*) en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 0.5 mL) que contiene glucosa (20 mM), GDH (5 U), MgSO_4 (2 mM) y NAD(P)^+ (1 mM) se adiciona una disolución del correspondiente sustrato **35a-f** (0.01 mmol) en dioxano (25 μ L, 2.5% v/v), la TA (10.0 mg *E. coli/ArSTA* o 5.0 mg de ATAs) y una disolución reguladora de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 0.5 mL) con *iPrNH*₂ (1.0 M) y PLP (1 mM). La reacción se incuba en un agitador orbital a 250 rpm y 30 °C durante 48 h, manteniendo el sistema de reacción abierto para los sustratos **35a-b,f**. La reacción se detiene por adición de una disolución acuosa de NaOH (4 M, 200 μ L para **35a-b,f**; 1 M, 100 μ L para **35d-e**) y se extrae con AcOEt (3 x 500 μ L), se lavan las fases orgánicas con agua (500 μ L), se secan con Na_2SO_4 , se filtran y se analiza mediante cromatografía de gases y/o HPLC (ver Tablas 46, 47, 50, 54, 58, 62 y 65).

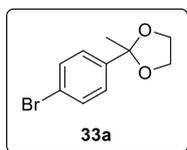
4.12.9. Síntesis enzimática en cascada de aminoalcoholes (44a-f) a mayor escala

Como ejemplo representativo, para la síntesis de (*R,R*)-**44a** se disuelve la *para*-trifluoroacetofenona (**35a**, 0.14 mmol, 30 mg) en dioxano (175 μ L) y se añaden buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 3.0 mL), glucosa (0.14 mmol, 25 mg), GDH (5 U), NADP^+ (2.5 mM) y *E. coli/RasADH* (15 mg). Tras incubar la mezcla a temperatura ambiente durante 15 minutos, se añade la ATA-024 (30 mg) y un buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 7.0 mL) que contiene *iPrNH*₂ (1.0 M) y PLP (1 mM). La mezcla se incuba durante 48 h a 250 rpm y 30 °C manteniendo el sistema abierto. La reacción se detiene por adición de una disolución acuosa de NaOH 4 M (1 mL) y se extrae en AcOEt (3 x 5 mL), las fases orgánicas se combinan y se añade una disolución de HCl 1 N (10 mL). Se realizan dos extracciones con AcOEt (2 x 10 mL) y la fase acuosa se alcaliniza por adición de una disolución acuosa de NaOH 10 M (2 mL), que se extrae con

AcOEt (3 x 10 mL), se seca con Na₂SO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida, obteniendo el aminoalcohol (*R,R*)-**44a** como un sólido blanco (30 mg, 99%).

4.13. Datos experimentales

2-(4-Bromofenil)-2-metil-1,3-dioxolano (33a)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₁BrO₂

Peso molecular: 243.10 g/mol

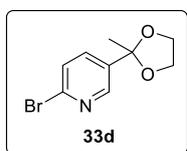
Aspecto: aceite amarillento

Rendimiento: 99%

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.62 (s, 3H), 3.69-3.82 (m, 2H), 3.96-4.09 (m, 2H), 7.33-7.38 (m, 2H), 7.44-7.49 (m, 2H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 27.7 (CH₃), 64.6 (2CH₂), 108.6 (C), 122.0 (C), 127.3 (2CH), 131.5 (2CH), 142.6 (C) ppm

2-Bromo-5-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)piridina (33d)



Fórmula empírica: C₉H₁₀BrNO₂

Peso molecular: 244.09 g/mol

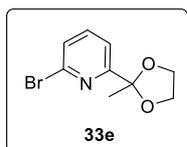
Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 99%

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.64 (s, 3H), 3.70-3.83 (m, 2H), 3.99-4.13 (m, 2H), 7.45 (dd, *J*_{HH} = 8.2, 0.7 Hz, 1H), 7.63 (dd, *J*_{HH} = 8.2, 2.5 Hz, 1H), 8.48 (dd, *J*_{HH} = 2.5, 0.7 Hz, 1H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 27.7 (CH₃), 64.8 (2CH₂), 107.4 (C), 122.7 (CH), 136.1 (CH), 138.4 (C), 141.8 (C), 147.9 (CH) ppm

2-Bromo-6-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)piridina (33e)



Fórmula empírica: C₉H₁₀BrNO₂

Peso molecular: 244.09 g/mol

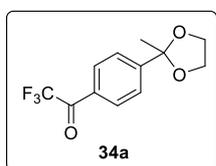
Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 96%

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.71 (s, 3H), 3.82-3.94 (m, 2H), 4.02-4.15 (m, 2H), 7.40 (dd, *J*_{HH} = 7.0, 1.8 Hz, 1H), 7.47-7.57 (m, 2H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 25.2 (CH₃), 65.2 (2CH₂), 108.1 (C), 118.3 (CH), 127.6 (CH), 138.9 (CH), 142.1 (C), 162.6 (C) ppm

2,2,2-Trifluoro-1-[4-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)fenil]etan-1-ona (34a)



Fórmula empírica: C₁₂H₁₁F₃O₃

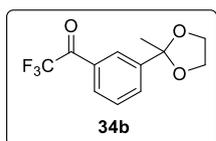
Peso molecular: 260.21 g/mol

Aspecto: aceite amarillo

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.65 (s, 3H), 3.70-3.84 (m, 2H), 4.00-4.13 (m, 2H), 7.63-7.70 (m, 2H), 8.01-8.09 (m, 2H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 27.5 (CH₃), 64.8 (2CH₂), 108.4 (C), 116.8 (q, ¹*J*_{CF} = 291.4 Hz, C), 126.3 (2CH), 129.6 (C), 130.4 (q, ⁴*J*_{CF} = 2.0 Hz, 2CH), 151.5 (C), 180.3 (q, ²*J*_{CF} = 35.1 Hz, C) ppm

2,2,2-Trifluoro-1-[3-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il)fenil]etan-1-ona (34b)



Fórmula empírica: C₁₂H₁₁F₃O₃

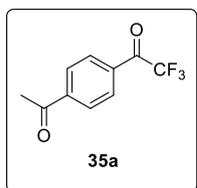
Peso molecular: 260.21 g/mol

Aspecto: aceite amarillo

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.66 (s, 3H), 3.70-3.84 (m, 2H), 4.00-4.14 (m, 2H), 7.53 (t, *J*_{HH} = 7.8 Hz, 1H), 7.84 (dt, *J*_{HH} = 7.7, 1.4 Hz, 1H), 7.96-8.03 (m, 1H), 8.20 (s, 1H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 27.6 (CH₃), 64.8 (2CH₂), 108.3 (C), 116.8 (q, ¹*J*_{CF} = 291.4 Hz, C), 127.1 (CH), 129.3 (CH), 129.7 (q, ⁴*J*_{CF} = 2.2 Hz, CH), 130.1 (C), 132.7 (CH), 145.2 (C), 180.6 (q, ²*J*_{CF} = 34.9 Hz, C) ppm

1-(4-Acetilfenil)-2,2,2-trifluoroetan-1-ona (35a)



Fórmula empírica: C₁₀H₇F₃O₂

Peso molecular: 216.16 g/mol

Aspecto: sólido blanco

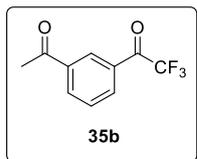
Rendimiento: 62% **Pf:** 82-84 °C

RMN-¹H (THF-d₈, 300.13 MHz): forma diol (35a·H₂O) δ 2.55 (s, 3H), 6.87 (sa, 2H), 7.81 (d, *J*_{HH} = 8.2 Hz, 2H), 7.98 (d, *J*_{HH} = 8.4 Hz, 2H) ppm

RMN-¹³C (THF-d₈, 75.5 MHz): forma diol (35a·H₂O) δ 26.7 (CH₃), 93.8 (q, ²*J*_{CF} = 31.9 Hz, C), 124.5 (q, ¹*J*_{CF} = 287.6 Hz, C), 128.5 (2CH), 128.7 (2CH), 138.9 (C), 144.4 (C), 197.2 (C) ppm

RMN-¹⁹F (THF-d₈, 282.35 MHz): forma diol (35a·H₂O) δ -84.93 ppm

1-(3-Acetilfenil)-2,2,2-trifluoroetan-1-ona (35b)



Fórmula empírica: C₁₀H₇F₃O₂

Peso molecular: 216.16 g/mol

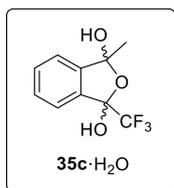
Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 63% **Pf:** 82-83 °C

RMN-¹H (THF-d₈, 300.13 MHz): forma diol (35b·H₂O) δ 2.56 (s, 3H), 6.88 (sa, 2H), 7.49 (t, *J*_{HH} = 7.7 Hz, 1H), 7.91 (d, *J*_{HH} = 7.7 Hz, 1H), 8.00 (d, *J*_{HH} = 7.7 Hz, 1H), 8.31 (s, 1H) ppm

RMN-¹³C (THF-d₈, 75.5 MHz): forma diol (35b·H₂O) δ 26.6 (CH₃), 93.6 (q, ²*J*_{CF} = 31.9 Hz, C), 124.6 (q, ¹*J*_{CF} = 288.1 Hz, C), 128.1 (CH), 128.8 (CH), 129.7 (CH), 132.8 (CH), 138.1 (C), 140.6 (C), 196.9 (C) ppm

1-Metil-3-(trifluorometil)-1,3-dihidroisobenzofuran-1,3-diol (35c·H₂O)



Fórmula empírica: C₁₀H₉F₃O₃

Peso molecular: 234.17 g/mol

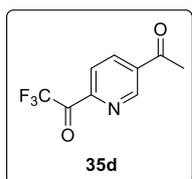
Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 42% **Pf:** 108-110 °C

RMN-¹H (THF-d₈, 300.13 MHz): diastereoisómero mayoritario (70%) δ 1.68 (s, 3H), 6.11 (sa, 1H), 7.04 (sa, 1H), 7.35-7.55 (m, 4H) ppm; diastereoisómero minoritario (30%) 1.72 (s, 3H), 5.87 (sa, 1H'), 6.79 (sa, 1H), 7.35-7.55 (m, 4H) ppm

RMN-¹³C (THF-d₈, 75.5 MHz): diastereoisómero mayoritario: δ 27.6 (CH₃), 102.5 (q, ²*J*_{CF} = 33.2 Hz, C), 109.0 (C), 123.0 (CH), 124.2 (CH), 124.4 (q, ¹*J*_{CF} = 285.9 Hz, C), 130.1 (CH), 131.5 (CH), 137.1 (C), 146.0 (C) ppm; diastereoisómero minoritario (señales detectadas) 29.4 (CH₃), 109.1 (C), 124.2 (CH), 131.4 (CH), 137.4 (C) ppm

1-(5-acetilpiridin-2-il)-2,2,2-trifluoroetan-1-ona (35d)



Fórmula empírica: C₉H₆F₃NO₂

Peso molecular: 217.15 g/mol

Aspecto: sólido gris

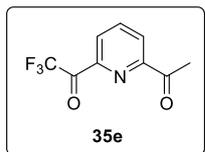
Rendimiento: 60% **Pf:** 115-116 °C

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): forma diol (**35d**·H₂O) δ 2.69 (s, 3H), 3.75 (sa, 2H), 7.92 (d, *J*_{HH} = 8.2, 1H), 8.41 (dd, *J*_{HH} = 8.3, 2.1 Hz, 1H), 9.11 (s, 1H) ppm; forma ceto (**35d**) 2.72 (s, 3H), 8.27 (d, *J*_{HH} = 8.2, 1H), 8.44 (dd, *J*_{HH} = 8.2, 2.0 Hz, 1H), 9.32 (d, *J*_{HH} = 2.0, 1H) ppm

RMN-¹³C (THF-d₈, 75.5 MHz): forma diol (**35d**·H₂O) δ 25.6 (CH₃), 93.2 (q, ²*J*_{CF} = 32.0 Hz, C), 122.8 (CH), 124.5 (q, ¹*J*_{CF} = 288.7 Hz, C), 126.7 (CH), 139.5 (CH), 153.0 (C), 156.4 (C), 198.5 (C) ppm; forma ceto (**35d**) 25.3 (CH₃), 117.9 (q, ¹*J*_{CF} = 291.4 Hz, C), 126.8 (CH), 128.6 (CH), 139.9 (CH), 148.8 (C), 154.1 (C), 180.6 (q, ²*J*_{CF} = 33.6 Hz, C), 198.2 (C) ppm

RMN-¹⁹F (CDCl₃, 282.35 MHz): forma diol (**35d**·H₂O) δ -84.08 ppm; forma ceto (**35d**) -72.16 ppm

1-(6-acetilpiridin-2-il)-2,2,2-trifluoroetan-1-ona (35e)



Fórmula empírica: C₉H₆F₃NO₂

Peso molecular: 217.15 g/mol

Aspecto: sólido anaranjado

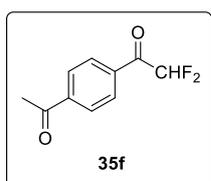
Rendimiento: 87% **Pf:** 70-73 °C

RMN-¹H (THF-d₈, 300.13 MHz): forma diol (**35d**·H₂O) δ 2.63 (s, 3H), 6.91 (sa, 2H), 7.92 (d, *J*_{HH} = 8.2, 1H), 8.41 (dd, *J*_{HH} = 8.2, 2.2 Hz, 1H), 9.13 (d, *J*_{HH} = 2.3, 1H) ppm; forma ceto (**35d**) 2.70 (s, 3H), 7.97-8.10 (m, 3H) ppm

RMN-¹³C (THF-d₈, 75.5 MHz): forma diol (**35d**·H₂O) δ 26.9 (CH₃), 93.2 (q, ²*J*_{CF} = 32.1 Hz, C), 123.2 (CH), 124.4 (q, ¹*J*_{CF} = 288.8 Hz, C), 137.8 (CH), 148.7 (CH), 159.9 (C), 196.3 (C) ppm; forma ceto (**35d**) δ 25.6 (CH₃), 124.3 (q, ¹*J*_{CF} = 287.8 Hz, C), 122.8 (CH), 126.7 (CH), 139.5 (CH), 152.9 (C), 156.4 (C), 198.6 (C) ppm

RMN-¹⁹F (THF-d₈, 282.35 MHz): forma diol (**35d**·H₂O) δ -84.43 ppm; forma ceto (**35d**) -84.36 ppm

1-(4-Acetilfenil)-2,2-difluoroetan-1-ona (35f)



Fórmula empírica: C₁₀H₈F₂O₂

Peso molecular: 198.17 g/mol

Aspecto: sólido blanco

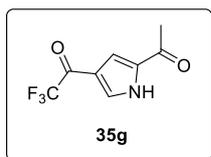
Rendimiento: 60% **Pf:** 78.0-80.2 °C

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.67 (s, 3H), 6.29 (t, $J_{\text{HH}} = 53.2$ Hz, 2H), 8.08 (d, $J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 2H), 8.17 (d, $J_{\text{HH}} = 8.3$ Hz, 2H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 27.0 (CH₃), 111.2 (t, $^1J_{\text{CF}} = 253.8$ Hz, C), 128.7 (2CH), 130.0 (t, $^4J_{\text{CF}} = 2.2$ Hz, 2CH), 134.5 (C), 141.4 (C), 187.3 (t, $^2J_{\text{CF}} = 25.9$ Hz, C), 197.4 (C) ppm

RMN-¹⁹F (CDCl₃, 282.35 MHz): δ -121.91 (d, $^2J_{\text{HF}} = 53.2$ Hz) ppm

1-(5-Acetil-1H-pirrol-3-il)-2,2,2-trifluoroetan-1-ona (35g)



Fórmula empírica: C₈H₆F₃NO₂

Peso molecular: 205.14 g/mol

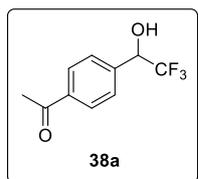
Aspecto: sólido marrón

Rendimiento: 68% **Pf:** 148-149 °C

RMN-¹H (THF-d₈, 300.13 MHz): δ 2.42 (s, 3H), 7.47 (s, 1H), 7.87 (s, 1H), 12.23 (sa, 1H) ppm

RMN-¹³C (THF-d₈, 75.5 MHz): δ 25.7 (CH₃), 117.0 (q, $^4J_{\text{CF}} = 1.3$ Hz, CH), 118.0 (q, $^1J_{\text{CF}} = 290.0$ Hz, C), 119.8 (C), 132.1 (q, $^4J_{\text{CF}} = 3.1$ Hz, CH), 135.5 (C), 175.8 (q, $^2J_{\text{CF}} = 35.1$ Hz, C), 188.4 (C) ppm

1-[4-(2,2,2-Trifluoro-1-hidroxietil)fenil]etan-1-ona (38a)



Fórmula empírica: C₁₀H₉F₃O₂

Peso molecular: 218.18 g/mol

Aspecto: aceite incoloro

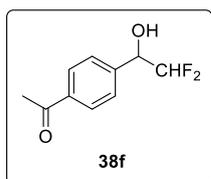
Rendimiento: 99%

RMN-¹H (THF-d₈, 300.13 MHz): δ 2.34 (s, 3H), 4.93 (qd, $J_{\text{HF}} = 7.0$ Hz, $J_{\text{HH}} = 5.0$ Hz, 1H), 5.89 (d, $J_{\text{HH}} = 5.1$ Hz, 1H), 7.41 (d, $J_{\text{HH}} = 7.7$ Hz, 2H), 7.75-7.80 (m, 2H) ppm

RMN-¹³C (THF-d₈, 75.5 MHz): δ 26.5 (CH₃), 72.3 (q, $^2J_{\text{CF}} = 31.1$ Hz, CH), 125.9 (q, $^1J_{\text{CF}} = 282.6$ Hz, C), 128.7 (2CH), 129.0 (2CH), 138.9 (C), 141.7 (C), 196.9 (C) ppm

RMN-¹⁹F (THF-d₈, 282.35 MHz): δ -78.94 (d, $^3J_{\text{HF}} = 7.0$ Hz) ppm

1-[4-(2,2-Difluoro-1-hidroxietil)fenil]etan-1-ona (38f)



Fórmula empírica: C₁₀H₉F₃O₂

Peso molecular: 200.18 g/mol

Aspecto: aceite incoloro

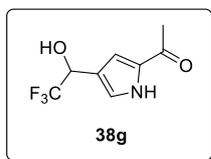
Rendimiento: 95%

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.59 (s, 3H), 3.50 (sa, 1H), 4.90 (td, $J_{\text{HF}} = 10.3$ Hz, $J_{\text{HH}} = 4.5$ Hz, 1H), 5.77 (td, $J_{\text{HF}} = 55.8$ Hz, $J_{\text{HH}} = 4.5$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J_{\text{HH}} = 8.2$ Hz, 2H), 7.94 (d, $J_{\text{HH}} = 8.4$ Hz, 2H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 26.8 (CH₃), 73.2 (t, $^2J_{\text{CF}} = 24.6$ Hz, CH), 115.6 (t, $^1J_{\text{CF}} = 246.0$ Hz, CH), 127.5 (2CH), 128.7 (2CH), 137.4 (C), 141.2 (C), 198.4 (C) ppm

RMN-¹⁹F (CDCl₃, 282.35 MHz): δ -128.01 (ddd, $^2J_{\text{FF}} = 285.2$ Hz, $^2J_{\text{HF}} = 55.6$ Hz, $^3J_{\text{HF}} = 9.7$ Hz), -126.79 (ddd, $^2J_{\text{FF}} = 285.1$ Hz, $^2J_{\text{HF}} = 56.1$ Hz, $^3J_{\text{HF}} = 10.8$ Hz) ppm

1-[4-(2,2,2-Trifluoro-1-hidroxietil)-1H-pirrol-2-il]etan-1-ona (38g)



Fórmula empírica: C₈H₈F₃NO₂

Peso molecular: 207.15 g/mol

Aspecto: sólido blanco

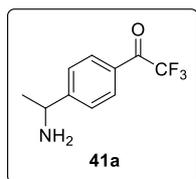
Rendimiento: 99%

RMN-¹H (THF-d₈, 300.13 MHz): δ 2.31 (s, 3H), 4.94 (q, $J_{\text{HF}} = 7.2$ Hz, 1H), 5.54 (sa, 1H), 6.94 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 11.22 (sa, 1H) ppm

RMN-¹³C (THF-d₈, 75.5 MHz): δ 25.6 (CH₃), 68.1 (q, $^2J_{\text{CF}} = 32.3$ Hz, CH), 115.7 (CH), 121.4 (C), 124.4 (CH), 126.4 (q, $^1J_{\text{CF}} = 282.3$ Hz, C), 133.7 (C), 187.4 (C) ppm

RMN-¹⁹F (THF-d₈, 282.35 MHz): δ -79.88 (d, $^3J_{\text{HF}} = 7.7$ Hz) ppm

1-[4-(1-Amino-2,2,2-trifluoroetil)fenil]etan-1-ona (41a)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₀F₃NO

Peso molecular: 217.19 g/mol

Aspecto: sólido amarillento

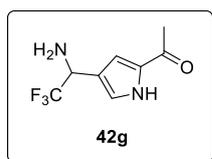
Rendimiento: 93%

RMN-¹H (THF-d₈, 300.13 MHz): δ 1.41 (d, q, $J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, 3H), 3.18 (sa, 2H), 4.23 (q, $J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, 2H), 8.03 (d, $J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, 2H) ppm

RMN-¹³C (THF-d₈, 75.5 MHz): δ 25.3 (CH₃), 51.3 (CH), 116.8 (q, $^1J_{\text{CF}} = 291.5$ Hz, C), 126.7 (2CH), 128.8 (C), 130.7 (2CH), 155.3 (C), 180.2 (q, $^2J_{\text{CF}} = 35.3$ Hz, C) ppm

RMN-¹⁹F (THF-d₈, 282.35 MHz): δ -71.40 ppm

1-[4-(1-Amino-2,2,2-trifluoroetil)-1H-pirrol-2-il]etan-1-ona (42g)



Fórmula empírica: C₈H₉F₃N₂O

Peso molecular: 206.17 g/mol

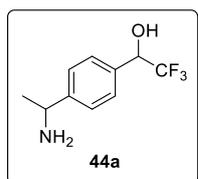
Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 99%

RMN-¹H (THF-d₈, 300.13 MHz): δ 1.86 (sa, 2H), 2.43 (s, 3H), 4.38 (q, $J_{\text{HF}} = 7.3$ Hz, 1H), 6.97 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 10.23 (sa, 1H) ppm

RMN-¹³C (THF-d₈, 75.5 MHz): δ 25.6 (CH₃), 52.0 (q, $^2J_{\text{CF}} = 30.7$ Hz, CH), 115.6 (CH), 120.4 (C), 123.4 (CH), 125.9 (q, $^1J_{\text{CF}} = 280.0$ Hz, C), 132.4 (C), 188.5 (C) ppm

1-[4-(1-Aminoetil)fenil]-2,2,2-trifluoroetan-1-ol (44a)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₂F₃NO

Peso molecular: 219.21 g/mol

Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 99% **Pf:** 149-150 °C (*R,R*); 152-154 °C (*R,S*)

RMN-¹H (THF-d₈, 300.13 MHz): δ 1.36 (d, *J*_{HH} = 6.6 Hz, 3H), 4.05 (sa, 3H), 4.12 (q, *J*_{HH} = 6.6 Hz, 1H), 4.98 (q, *J*_{HF} = 7.2 Hz, 1H), 7.42 (s, 4H) ppm

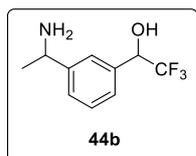
RMN-¹³C (THF-d₈, 75.5 MHz): δ 25.5 (CH₃), 52.2 (CH), 72.6 (q, ²*J*_{CF} = 30.9 Hz, CH), 126.3 (q, ¹*J*_{CF} = 282.4 Hz, C), 126.8 (2CH), 128.6 (2CH), 135.8 (C), 148.7 (C) ppm

RMN-¹⁹F (THF-d₈, 282.35 MHz): δ -79.02 (d, ³*J*_{HF} = 7.2 Hz) ppm

Rotación óptica específica: [α]_D²⁰ = -14.4 (*c* 1, MeOH, >99% *ee* (*R,R*)-**44a**);

-38.9 (*c* 0.4, MeOH, >99% *ee* (*R,S*)-**44a**)

1-[3-(1-Aminoetil)fenil]-2,2,2-trifluoroetan-1-ol (44b)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₂F₃NO

Peso molecular: 219.21 g/mol

Aspecto: sólido amarillento

Rendimiento: 95% **Pf:** 86-98 °C

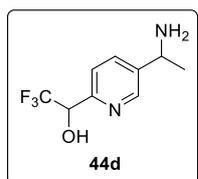
RMN-¹H (THF-d₈, 300.13 MHz): δ 1.28 (d, $J_{\text{HH}} = 6.7$ Hz, 3H), 1.29 (sa, 2H), 3.10 (sa, 1H), 4.06 (q, $J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 1H), 4.97 (q, $J_{\text{HF}} = 7.2$ Hz, 1H), 7.22-7.41 (m, 3H), 7.50 (s, 1H) ppm

RMN-¹³C (THF-d₈, 75.5 MHz): δ 26.5 (CH₃), 52.3 (CH), 72.9 (q, $^2J_{\text{CF}} = 30.9$ Hz, CH), 126.2 (q, $^1J_{\text{CF}} = 283.1$ Hz, C), 126.2 (CH), 126.6 (CH), 127.1 (CH), 128.8 (CH), 137.0 (C), 149.6 (C) ppm

RMN-¹⁹F (THF-d₈, 282.35 MHz): δ -78.99 (d, $^3J_{\text{HF}} = 7.3$ Hz) ppm

Rotación óptica específica: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +23.3$. (c 0.4, MeOH, >99% ee (S,R)-44b)

1-[5-(1-Aminoetil)piridin-2-il]-2,2,2-trifluoroetan-1-ol (44d)



Fórmula empírica: C₉H₁₁F₃N₂O

Peso molecular: 220.20 g/mol

Aspecto: sólido viscoso amarillo

Rendimiento: 88%

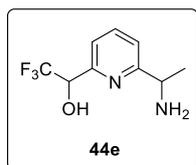
RMN-¹H (THF-d₈, 300.13 MHz): δ 1.33 (d, $J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 3H), 3.40 (sa, 3H), 4.15 (q, $J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 1H), 5.05 (q, $J_{\text{HF}} = 7.1$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J_{\text{HH}} = 8.1$ Hz, 1H), 7.85 (dd, $J_{\text{HH}} = 8.2, 2.3$ Hz, 1H), 8.55 (d, $J_{\text{HH}} = 2.3$ Hz, 1H) ppm

RMN-¹³C (THF-d₈, 75.5 MHz): δ 26.1 (CH₃), 49.8 (CH), 73.2 (q, $^2J_{\text{CF}} = 30.7$ Hz, CH), 122.7 (CH), 125.9 (q, $^1J_{\text{CF}} = 283.0$ Hz, C), 135.1 (CH), 144.9 (C), 147.9 (CH), 153.7 (C) ppm

RMN-¹⁹F (THF-d₈, 282.35 MHz): δ -78.53 (d, $^3J_{\text{HF}} = 7.1$ Hz) ppm

Rotación óptica específica: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +21.8$. (c 0.4, MeOH, >99% ee (S,R)-**44d**)

1-[6-(1-Aminoetil)piridin-2-il]-2,2,2-trifluoroetan-1-ol (44e)



Fórmula empírica: C₉H₁₁F₃N₂O

Peso molecular: 220.20 g/mol

Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 90% **Pf:** 92-94 °C

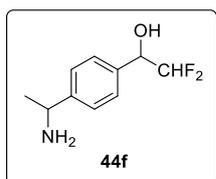
RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.46 (d, $J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 3H), 3.92 (sa, 3H), 4.24 (q, $J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 1H), 5.02 (q, $J_{\text{HF}} = 6.8$ Hz, 1H), 7.29 (d, $J_{\text{HH}} = 7.7$ Hz, 1H), 7.33 (dd, $J_{\text{HH}} = 7.8$ Hz, 1H), 7.72 (t, $J_{\text{HH}} = 7.7$ Hz, 1H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 24.0 (CH₃), 52.0 (CH), 71.1 (q, $^2J_{\text{CF}} = 31.2$ Hz, CH), 121.0 (CH), 121.1 (CH), 124.3 (q, $^1J_{\text{CF}} = 283.2$ Hz, C), 138.1 (CH), 151.3 (CH), 163.4 (C) ppm

RMN-¹⁹F (CDCl₃, 282.35 MHz): δ -77.82 (d, $^3J_{\text{HF}} = 6.7$ Hz) ppm

Rotación óptica específica: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +14.4$ (*c* 0.5, MeOH, >99% *ee* (*S,R*)-44e)

1-[4-(1-Aminoetil)fenil]-2,2-difluoroetan-1-ol (44f)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₃F₂NO

Peso molecular: 201.22 g/mol

Aspecto: sólido blanco

Rendimiento: 75%

Pf: 115.7-117.2 °C

RMN-¹H (THF-d₈, 300.13 MHz): δ 1.30 (d, $J_{\text{HH}} = 6.5$ Hz, 3H), 3.36 (sa, 3H), 4.06 (q, $J_{\text{HH}} = 6.6$ Hz, 1H), 4.66 (ddd, $J_{\text{HF}} = 11.4, 9.9$ Hz, $J_{\text{HH}} = 4.7$ Hz, 1H), 5.71 (td, $J_{\text{HF}} = 56.4$ Hz, $J_{\text{HH}} = 4.7$ Hz, 1H), 7.28-7.43 (m, 4H) ppm

RMN-¹³C (THF-d₈, 75.5 MHz): δ 26.3 (CH₃), 52.2 (CH), 73.8 (t, $^2J_{\text{CF}} = 24.3$ Hz, CH), 117.9 (t, $^1J_{\text{CF}} = 245.0$ Hz, CH), 126.6 (2CH), 128.2 (2CH), 137.5 (C), 149.2 (C) ppm

RMN-¹⁹F (THF-d₈, 282.35 MHz): δ -128.42 (ddd, $^2J_{\text{FF}} = 280.6$ Hz, $^2J_{\text{HF}} = 56.0$ Hz, $^3J_{\text{HF}} = 9.9$ Hz), -126.91 (ddd, $^2J_{\text{FF}} = 280.6$ Hz, $^2J_{\text{HF}} = 56.9$ Hz, $^3J_{\text{HF}} = 11.6$ Hz) ppm

Rotación óptica específica: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +4.0$ (c 0.4, CHCl₃, >99% *ee* (*R,R*)-44f)

CAPÍTULO 5

SÍNTESIS ASIMÉTRICA DE 1-ARILPROPAN-2-AMINAS
A TRAVÉS DE UNA CASCADA SECUENCIAL
QUIMIOENZIMÁTICA: OXIDACIÓN DE
WACKER-TSUJI Y BIOTRANSAMINACIÓN

ANTECEDENTES

Una de las principales aplicaciones de los métodos biocatalíticos involucra la síntesis asimétrica de ingredientes farmacéuticos activos, o de moléculas precursoras de los mismos, aprovechando la elevada estereoespecificidad que presentan las enzimas y la menor toxicidad de estos catalizadores comparada con los métodos tradicionales.²⁵⁶ En este contexto, destaca la preparación estereoselectiva de aminas biológicamente activas empleando diversas clases de biocatalizadores.²⁵⁷ Una de las familias de aminas quirales más estudiadas y empleadas son las 1-arilpropan-2-aminas, conocidas como anfetaminas, cuya síntesis enantioselectiva será descrita en el presente capítulo mediante una cascada secuencial quimioenzimática combinando una oxidación de Wacker-Tsuji y una biotransaminación.

5.1. Relevancia de las anfetaminas

Dentro de la familia de los derivados de la 2-feniletilamina existen una gran variedad de compuestos que presentan diversas actividades farmacológicas. Entre ellas, se encuentran algunas moléculas producidas por el propio organismo de forma natural, como los neurotransmisores monoamina clásicos dopamina, norepinefrina y epinefrina (Figura 8), o las denominadas aminas traza,²⁵⁸ entre las que se encuentra la propia β -feniletilamina o la triptamina, que actúan sobre receptores acoplados a proteínas G.²⁵⁹ Estos receptores constituyen una de las principales dianas terapéuticas en el tratamiento de multitud de patologías y trastornos.²⁶⁰

²⁵⁶ J. Albarrán-Velo, D. González-Martínez, V. Gotor-Fernández, *Biocatal. Biotransf.* **2018**, *36*, 102-130.

²⁵⁷ D. Ghislieri, N. J. Turner, *Top. Catal.* **2014**, *57*, 284-300.

²⁵⁸ B. Borowsky, N. Adham, K. A. Jones, R. Raddatz, R. Artymyshyn, K. L. Ogozalek, M. M. Durkin, P. P. Lakhani, J. A. Bonini, S. Pathirana, N. Boyle, X. Pu, E. Kouranova, H. Lichtblau, F. Y. Ochoa, T. A. Branchek, C. Gerald, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*, 8966-8971.

²⁵⁹ M. D. Thompson, D. E. Cole, V. Capra, K. A. Siminovitch, G. E. Rovati, W. M. Burnham, B. K. Rana, *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1175*, 189-242.

²⁶⁰ A. S. Hauser, S. Chavali, I. Masuho, L. J. Jahn, K. A. Martemyanov, D. E. Gloriam, M. M. Babu, *Cell*, **2018**, *172*, 41-54.

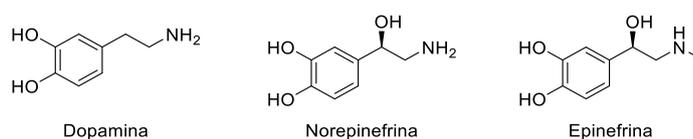


Figura 8. Neurotransmisores que poseen la subestructura de feniletilamina.

Las 1-arilpropan-2-aminas, conocidas como anfetaminas, presentan un elevado interés farmacológico por su similitud estructural con las feniletilaminas endógenas que les dota de un efecto muy potente sobre el sistema nervioso central al actuar sobre los mismos receptores específicos de los neurotransmisores o de las aminas traza. Son escasos los ejemplos de derivados de origen natural, si bien es cierto que se pueden encontrar en organismos vegetales, como la efedrina o pseudoefedrina en las plantas del género *Ephedra* (Figura 9).²⁶¹ Sin embargo, existen incontables análogos sintéticos con muy diversas propiedades farmacológicas fruto de variaciones de grupos funcionales sobre la estructura de la 1-fenilpropan-2-amina, entre las que destacan sus efectos estimulantes, entactógenos o alucinógenos. Además, la estereoquímica de la amina quiral (o de otros centros quirales próximos que pueda poseer el fármaco) tienen una influencia crucial sobre el tipo y la potencia del efecto terapéutico.



Figura 9. Estructuras de la anfetamina y sus derivados de origen natural.

La anfetamina (1-fenilpropan-2-amina) es un agonista indirecto que actúa en las neuronas productoras de catecolaminas sobre los transportadores de dopamina, norepinefrina y, en menor medida, serotonina, induciendo la liberación de estos neurotransmisores de las vesículas sinápticas. Además, tiene un efecto cardiovascular paralelo ya que actúa como liberador de norepinefrina en el sistema nervioso periférico simpático. Se ha descrito que la dexanfetamina (o dextroanfetamina, correspondiente al enantiómero de configuración *S*) tiene una potencia alrededor de cinco veces superior a la levoanfetamina como

²⁶¹ J. M. Hagel, R. Krizevski, F. Marsolais, E. Lewinsohn, P. J. Facchini, *Trends Plant Sci.* **2012**, *17*, 404-412.

liberador de dopamina y serotonina, mientras que su efecto en la liberación de norepinefrina es ligeramente inferior.²⁶²

El uso recreacional o como sustancia dopante, tanto a nivel físico como mental, de la anfetamina ha sido motivo de una histórica controversia que ha provocado un restrictivo control legal a su distribución. Por encima de las dosis terapéuticas, los efectos secundarios y a largo plazo en su uso continuado pueden llegar a provocar cuadros psicóticos, siendo especialmente notable el caso de la metanfetamina (*N*-metilamfetamina) por su alto potencial adictivo.²⁶³ Actualmente, su uso se encuentra restringido al tratamiento del trastorno hiperactivo de déficit de atención (THDA)²⁶⁴ y a la narcolepsia, aunque también tiene indicaciones en el tratamiento de la obesidad o la depresión.

Hoy en día, se comercializan diferentes preparados de sales de anfetamina enriquecidas en el enantiómero *S* (como la marca Aderall utilizada tratamiento del THDA o narcolepsia)²⁶⁵ o en forma de profármacos que liberan la dextroanfetamina al ser metabolizados en el organismo. Entre los más comunes se encuentra la benzfetamina, que libera (*S*)-anfetamina y (*S*)-metanfetamina y se emplea en el tratamiento de la obesidad,²⁶⁶ o la lisdexanfetamina, la cual sufre una hidrólisis enzimática cuando se encuentra en los glóbulos rojos liberando dextroanfetamina y L-lisina, que actualmente se prescribe para el tratamiento del THDA en niños y adultos o desórdenes alimenticios en adultos (Esquema 109).²⁶⁷

²⁶² D. J. Heal, S. L. Smith, J. Gosden, D. J. Nutt, *J. Psychopharmacol.* **2013**, *27*, 479-496.

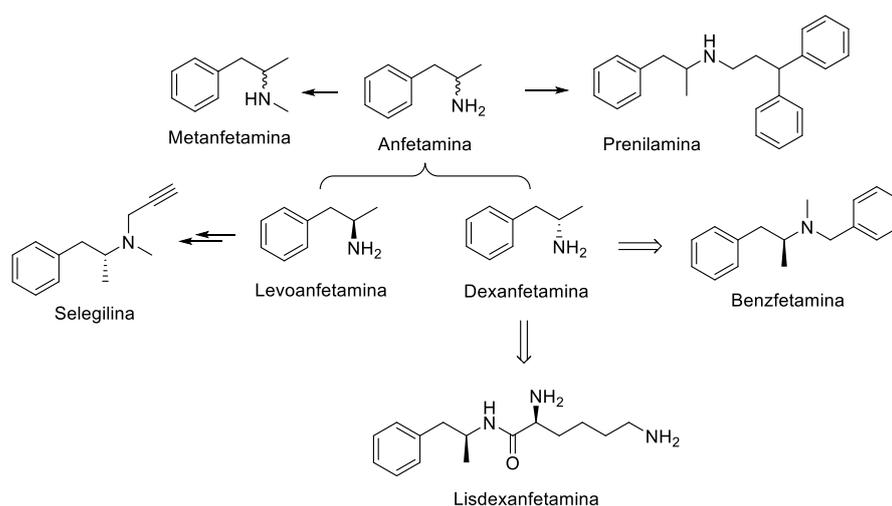
²⁶³ Y. Shaobin, L. Zhu, Q. Shen, X. Bai, X. Di, *Behav. Neurol.* **2015**, 1-11.

²⁶⁴ Y.-S. Huang, M.-H. Tsai, *CNS Drugs*, **2011**, *25*, 539-554.

²⁶⁵ B. M. Joyce, P. E. Glaser, G. A. Gerhardt, *Psychopharmacology (Berl.)*, **2007**, *191*, 669-677.

²⁶⁶ J. T. Cody, S. Valtier, *J. Anal. Toxicol.* **1998**, *22*, 299-309.

²⁶⁷ a) P. H. Hutson, M. Pennick, R. Secker, *Neuropharmacology*, **2014**, *87*, 41-50; b) K. Ward, L. Citrome, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2018**, *14*, 229-238.



Esquema 109. Anfetaminas sin modificaciones en el esqueleto de 1-fenilpropan-2-amina con uso terapéutico.

Al margen de su principal efecto sobre el sistema nervioso central, la anfetamina también se ha empleado como vasodilatador en el tratamiento de la angina de pecho (en forma de prenilamina, fármaco actualmente en desuso por sus efectos secundarios)²⁶⁸ al actuar sobre el sistema nervioso periférico simpático. Por otro lado, la selegilina, un derivado de la *R*-metanfetamina, actúa selectiva e irreversiblemente inhibiendo la monoamina oxidasa tipo B y se emplea en el tratamiento del Parkinson en fases tempranas y del trastorno depresivo mayor.²⁶⁹

5.1.1. Actividad biológica de derivados de anfetamina con grupos éter en el anillo aromático

Al introducir cambios en la estructura arílica o en la cadena alquílica se abre un abanico muy amplio de posibles derivados que pueden mostrar diferentes actividades biológicas de interés. La estructura química de algunos ejemplos representativos se detalla en la Figura 10 y, a continuación, se describen sus aplicaciones en detalle.

²⁶⁸ R. R. Shash, P. D. Stonier, *Ther. Adv. Drug Saf.* **2018**, *9*, 475-493.

²⁶⁹ a) E. Heinonen, V. Myllylä, *Drug Saf.* **1998**, *19*, 11-22; b) D. S. Robinson, J. D. Amsterdam, *J. Affect. Disord.* **2008**, *105*, 15-23.

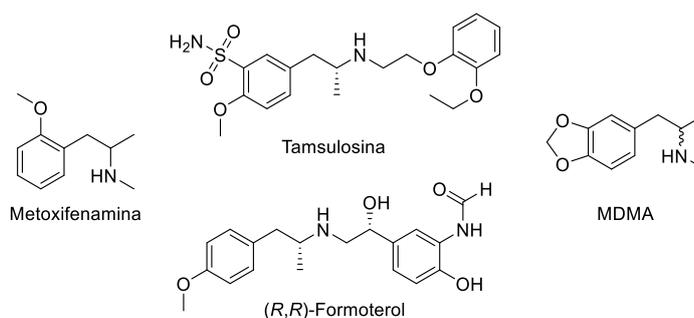


Figura 10. Derivados de anfetamina oxigenados en el anillo aromático con uso terapéutico.

El derivado de metanfetamina con un grupo metoxilo en posición *orto*, denominado metoxifenamina, es un agonista de los receptores adrenérgicos β que provoca un efecto broncodilatador, por lo que se ha empleado históricamente en el tratamiento del asma como alternativa a la efedrina.²⁷⁰ En contraste con ésta última, la metoxifenamina se administra como mezcla racémica y no se han publicado estudios farmacológicos comparativos entre ambos enantiómeros.²⁷¹

El formoterol es otro broncodilatador que se emplea para tratar el asma, el broncoespasmo o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y es un derivado de la 4-metoxianfetamina. Posee un efecto prolongado sobre los receptores adrenérgicos β_2 y, aunque tradicionalmente se ha utilizado como mezcla racémica, se ha demostrado que la potencia del enantiómero (*R,R*) es unas 1000 veces superior a su antípoda (*S,S*), aunque este no produce efectos nocivos.²⁷² Actualmente, se ha comercializado el fármaco en forma ópticamente pura, conocido como arformoterol, indicado para el tratamiento del COPD.²⁷³

También sintetizada a partir de la (*R*)-4-metoxianfetamina, la tamsulosina actúa como antagonista de los receptores adrenérgicos α_1 y se administra exclusivamente en forma enantioméricamente pura. Se utiliza como tratamiento

²⁷⁰ a) I. W. Schiller, F. C. Lowell, *N. Eng. J. Med.* **1949**, *241*, 231-233; b) S. Gertreen, B. C. Foster, D. L. Wilson, T. D. Cyr, W. Casley, *Xenobiotica*, **1995**, *25*, 895-906.

²⁷¹ N. R. Srinivas, J. W. Hubbard, E. M. Hawes, G. McKay, K. K. Midha, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **1988**, *487*, 61-72.

²⁷² D. Schmidt, B.-L. Källström, B. Waldeck, B. Branscheid, H. Magnussen, K. F. Rabe, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2000**, *361*, 405-409.

²⁷³ C H. Loh, J. F. Donohue, J. A. Ohar, *Expert Opin. Drug Saf.* **2015**, *14*, 463-472.

de los síntomas de la hiperplasia prostática benigna, la prostatitis crónica o para facilitar la eliminación de cálculos renales.²⁷⁴

La 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) es un potente entactógeno que, a través de varios mecanismos, incrementa los niveles de serotonina, dopamina y norepinefrina en el cerebro. En contraste con la dextroanfetamina y otros derivados, es especialmente potente su efecto como inhibidor de los transportadores de serotonina frente a los de dopamina.²⁷⁵ Su popularización en la década de 1970 como droga recreativa provocó un rechazo social y legislativo que actuó en detrimento de su estudio y empleo farmacológico en psicoterapia, no teniendo ningún uso médico aprobado en la actualidad.²⁷⁶ Sin embargo, en los últimos años se ha producido un cambio en el paradigma sobre las terapias para enfermedades mentales que ha propiciado varias investigaciones acerca del uso terapéutico del MDMA.²⁷⁷ Actualmente, se están llevando a cabo distintos estudios clínicos de psicoterapias asistidas con esta sustancia, la más avanzada de ellas se encuentra en fase clínica III para el tratamiento del trastorno de estrés postraumático.²⁷⁸ Aunque generalmente se emplea en forma racémica, los datos preclínicos disponibles parecen indicar una potencial ventaja terapéutica del (*R*)-MDMA por su menor neurotoxicidad y reducción de otros efectos secundarios. En todo caso, la utilización clínica del MDMA, y el desarrollo de análogos más eficaces, requiere un estudio pormenorizado del efecto de sus dos enantiómeros en seres humanos.²⁷⁹

5.1.2. Síntesis estereoselectiva de derivados de anfetamina

Las variadas rutas sintéticas disponibles para obtener moléculas que poseen el fragmento estructural de 1-arilpropan-2-amina han ido evolucionando con el

²⁷⁴ a) G. Franco-Salinas, J. J. M. C. H. de la Rosette, M. C. Michel, *Clin. Pharmacokinet.* **2010**, *49*, 177-188; b) Z. Ye, G. Zeng, H. Yang, K. Tang, X. Zhang, H. Li, W. Li, Z. Wu, L. Chen, X. Chen, X. Liu, Y. Deng, T. Pan, J. Xing, S. Wang, Y. Cheng, X. Gu, W. Gao, J. Yang, Y. Zhang, Q. Mi, L. Qi, J. Li, W. Hu, P. Liang, Z. Sun, C. Xu, Y. Long, Y. Liao, S. Liu, G. Liu, X. Xu, W. He, Z. Chen, H. Xu, *Eur. Urol.* **2018**, *73*, 385-391.

²⁷⁵ L. E. Dunlap, A. M. Andrews, D. E. Olson, *ACS Chem. Neurosci.* **2018**, *9*, 2408-2427.

²⁷⁶ D. E. Nichols, R. Oberlender, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1990**, *600*, 613-623.

²⁷⁷ B. D. Heifets, R. C. Malenka, *Cell*, **2016**, *166*, 269-272.

²⁷⁸ a) A. A. Feduccia, J. Holland, M. C. Mithoefer, *Psychopharmacology*, **2018**, *235*, 561-571; b) S. B. Thal, M. J. J. Lommen, *J. Contemp. Psychother.* **2018**, *48*, 99-108.

²⁷⁹ E. G. Pitts, D. W. Curry, K. N. Hampshire, M. B. Young, L. L. Howell, *Psychopharmacology*, **2017**, *235*, 377-392.

paso de los años paralelamente al desarrollo de nuevas metodologías, especialmente enfocadas a su síntesis asimétrica.²⁸⁰ Generalmente, los métodos químicos tradicionales involucran reacciones de reducción de distinta índole, tendencia que se ha mantenido en los últimos años en el diseño de las versiones asimétricas introduciendo ligandos quirales. En la Figura 11 se muestran algunos de los precursores más comunes empleados en los últimos años para acceder a este tipo de estructuras de forma asimétrica.

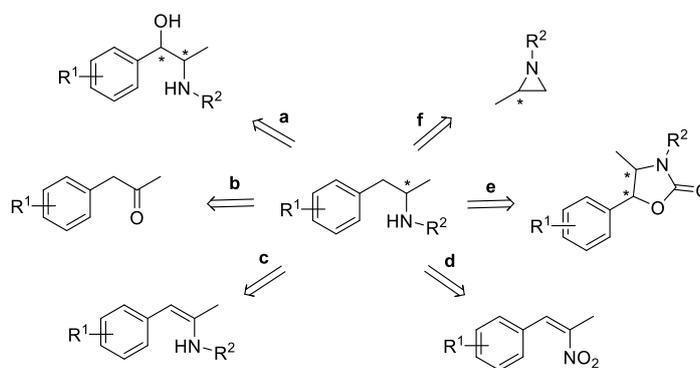


Figura 11. Precursores comúnmente empleados en la síntesis asimétrica de derivados de anfetamina.

Entre los métodos basados en reacciones de reducción, la hidrogenación de aminoalcoholes vecinales quirales (Figura 11a) es uno de los más empleados tradicionalmente, debido a la accesibilidad de los precursores a partir de fuentes naturales. Sin embargo, existen métodos químicos asimétricos para su síntesis como, por ejemplo, el recientemente descubierto acoplamiento radicalario entre benzaldehídos y nitronas empleando una catálisis dual, metálica y fotocatalítica.²⁸¹ La aminación reductiva de arilpropan-2-onas (Figura 11b) utilizando hidrógeno como reductor y catalizado por complejos de iridio y ligandos fosforamidito quirales permite acceder a las (*R*)-anfetaminas con excelente enantioselectividad.²⁸² De forma similar, es posible hidrogenar la (*E*)-enamina *N*-acetilada preformada (Figura 11c), empleando en este caso complejos quirales de Rh con ligandos fosfina bidentados, obteniendo las (*S*)-

²⁸⁰ T. C. Nugent, *Chiral Amine Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2009**.

²⁸¹ C.-X. Ye, Y. Y. Melcamu, H.-H. Li, J.-T. Cheng, T.-T. Zhang, Y.-P. Ruan, X. Zheng, X. Lu, P.-Q. Huang, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 410-419.

²⁸² a) H. Huang, X. Liu, L. Zhou, M. Chang, X. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5309-5312; b) H. Huang, Y. Zhao, Y. Yang, L. Zhou, M. Chang, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 1942-1945.

anfetaminas con >97% *ee*.²⁸³ Además, la hidrogenación catalizada por complejos quirales de Rh de nitroalquenos, para dar los correspondientes nitroalcanos quirales (Figura 11d), permite acceder a las (*S*)-anfetaminas tras una posterior reducción del grupo nitro.²⁸⁴ Por último, la hidrogenación de 1,3-oxazolidin-2-onas es un método viable para la síntesis industrial de diversas feniletilaminas utilizando unas condiciones suaves de reacción, evitando la formación de productos secundarios, y de forma enantioselectiva aprovechando la quiralidad de los productos de partida (Figura 11e).²⁸⁵

Existen otros procesos no reductivos aplicables a nivel industrial como, por ejemplo, la adición nucleófila regioselectiva de cupratos de arilo a aziridinas quirales protegidas en forma de fosforamidas, con la que se puede sintetizar la dexanfetamina y otros derivados de interés (Figura 11f).²⁸⁶

La Biocatálisis también ha demostrado su versatilidad con prometedores resultados en la obtención de anfetaminas empleando hidrolasas, oxidorreductasas o transferasas.

Inicialmente, la resolución cinética catalizada por hidrolasas se postuló como la alternativa más adecuada a los métodos de resoluciones diastereoméricas empleados tradicionalmente.²⁸⁷ En el primer estudio publicado, nuestro grupo de investigación demostró la elevada actividad y selectividad de la CAL-B en la resolución de anfetaminas mediante procesos de acetilación con acetato de etilo, que puede ser empleado como donador de acilo y disolvente al mismo tiempo (Esquema 110a).²⁸⁸ La utilización de otros donadores de acilo no activados, como el metoxiacetato de etilo, mostró un efecto positivo en la velocidad de la resolución pero sin una clara mejoría en la enantioselectividad. Sorprendentemente, los autores encontraron que la anfetamina con un grupo hidroxilo en posición *para*, 1-(4-hidroxifenil)propan-2-amina, experimentaba una lenta racemización espontánea dando lugar a un

²⁸³ G. Liu, X. Liu, Z. Cai, G. Jiao, G. Xu, W. Tang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4235-4238.

²⁸⁴ S. Li, K. Huang, X. Zhang, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 8878-8881.

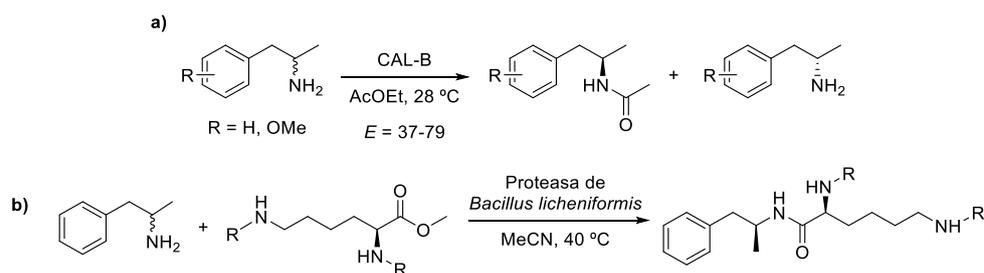
²⁸⁵ P. L. Fishbein, J. J. Mencil, WO2010058206A1 20100527, **2010**.

²⁸⁶ K. Popp, H. Meckler, WO2017147375A1 20170831, **2017**.

²⁸⁷ J. Van Dijk, V. G. Keizer, J. F. Peelen, H. D. Moed, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1965**, *84*, 521-539.

²⁸⁸ J. González-Sabín, V. Gotor, F. Rebolledo, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**, *13*, 1315-1320.

proceso de DKR, alcanzando una conversión de 71% tras 4 días con un 95% *ee* en su enantiómero de configuración *R*.²⁸⁹



Esquema 110. Resoluciones cinéticas de 1-arylpropan-2-aminas catalizadas por hidrolasas.

Recientemente, se ha patentado un sistema biocatalítico para la obtención de lisdexanfetamina y derivados utilizando distintos preparados de la proteasa de *Bacillus licheniformis* para acoplar los dos fragmentos del fármaco partiendo de diferentes derivados *N*-protegidos de L-lisina, realizando una resolución cinética con la anfetamina racémica al catalizar la formación del enlace amida, obteniendo el estereoisómero deseado con excelente diastereoselectividad (Esquema 110b).²⁹⁰

Recientemente, enzimas redox y transferasas han demostrado su potencial para catalizar la transformación de 1-arylpropan-2-onas en derivados quirales de anfetamina (Esquema 111), ya sea a través de:

- la reacción de aminación reductiva de la imina formada *in situ*, utilizando oxidorreductasas como amino deshidrogenasas (AmDHs), imino reductasas (IREDs) o aminosas reductivas (RedAms),

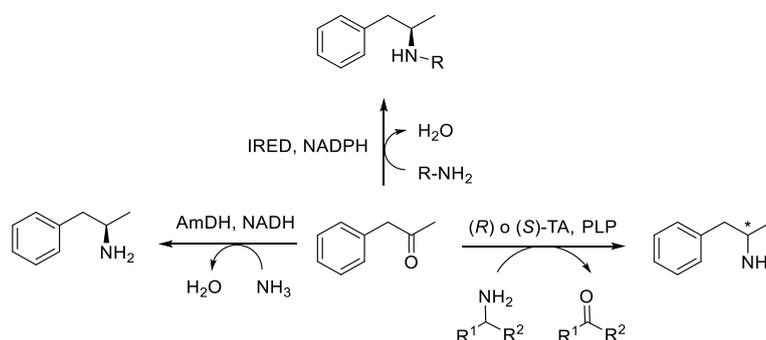
- o bien, por un proceso de transferencia del grupo amino utilizando transaminasas.

Además, las TAs también pueden catalizar la resolución cinética de las anfetaminas racémicas, generalmente se han empleado en la aminación de cetonas empleando un sistema de desplazamiento del equilibrio, que permite un

²⁸⁹ L. Muñoz, A. M. Rodríguez, G. Rosell, M. P. Bosch, A. Guerrero, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 8171-8177.

²⁹⁰ P. E. Goudriaan, J. Kaiser, H. Ibrahim, G. A. Verspui, D. P. Cox, WO2017003721A1 20170105, **2017**.

rendimiento teórico del 100%, siendo posible la obtención de los dos enantiómeros de las anfetaminas dependiendo de la selectividad de la transaminasa escogida.²⁹¹



Esquema 111. Rutas biocatalíticas para la síntesis asimétrica de 1-fenilpropan-2-amina empleando oxidoreductasas y transferasas.

Adicionalmente, se han descrito procesos en cascada secuenciales para la síntesis quimioenzimática de anfetaminas. Así, se ha empleado un sistema formado por NaOCl y cantidades catalíticas de AZADO, un oxidante de tipo radical nitroxilo, para la oxidación de arilpropan-2-oles y se ha combinado con un posterior paso de biotransaminación, permitiendo acceder de esta manera a los dos enantiómeros de las aminas deseadas en forma enantiopura (Esquema 112).²⁹²

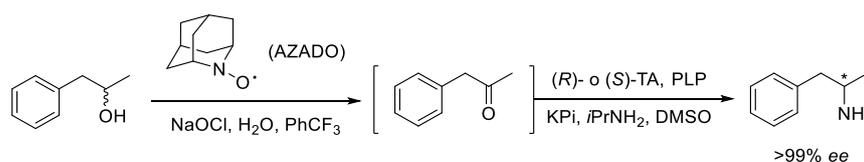
Como se ha mostrado en la introducción, esta transformación también se puede lograr acoplando una oxidación del alcohol con ADHs selectivas seguida de la aminación reductiva en un proceso redox autosuficiente, con la principal desventaja de que, en la mayoría de los casos, solo es posible acceder al enantiómero de configuración *R*.²⁹³ Por otro lado, la utilización de IREDs o RedAms presenta la ventaja de obtener directamente aminas secundarias, o incluso terciarias, que, por ejemplo, permitiría introducir el fragmento propargílico en la síntesis de la selegilina mediante aminación reductiva, aunque

²⁹¹ a) I. Lavandera, D. Koszelewski, W. Kroutil, AT507050A1 20100115, **2010**; b) A. G. Swaminathan, S. V. Joshi, US20140099682A1 20140410, **2014**.

²⁹² E. Liardo, N. Ríos-Lombardía, F. Morís, F. Rebolledo, J. González-Sabín, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 4768-4774.

²⁹³ K.-U. Baldenius, M. Breuer, K. Ditrich, V. Navickas, F. Mutti, T. Knaus, N. Turner, US20170145451A1 20170525, **2017**.

requeriría el desarrollo de biocatalizadores (*S*)-selectivos eficaces con este tipo de sustratos.^{191,294}



Esquema 112. Combinación de una oxidación organocatalizada y una transaminasa para sintetizar anfetaminas ópticamente activas a partir de 1-fenilpropan-2-ol racémico.

5.2. Oxidación de Wacker-Tsuji

El proceso Wacker para la obtención de acetaldehído a partir de etileno catalizado por dicloruro de paladio, con dicloruro de cobre como cocatalizador redox y oxígeno molecular como oxidante terminal es uno de los primeros y más relevantes ejemplos de catálisis organometálica homogénea aplicada a nivel industrial y supuso un hito en el campo de la catálisis con paladio (Esquema 113a).²⁹⁵ La generalización de esta transformación a nivel de laboratorio, para la transformación de olefinas terminales en compuestos carbonílicos mediante catálisis de paladio(II), se conoce como oxidación de Wacker-Tsuji.²⁹⁶ La principal aplicación de esta reacción es la síntesis de metilcetonas, ya que suele exhibir una regioselectividad de tipo Markovnikov, donde el derivado aldehído puede aparecer como producto minoritario (Esquema 113b), si bien es cierto que es posible ajustar los parámetros de la reacción o introducir grupos directores en el sustrato que dirijan hacia el producto de regioselectividad anti-Markovnikov.²⁹⁷ En el caso de los alquenos internos, las oxidaciones tipo Wacker suelen transcurrir muy lentamente y con bajas regioselectividades.²⁹⁸

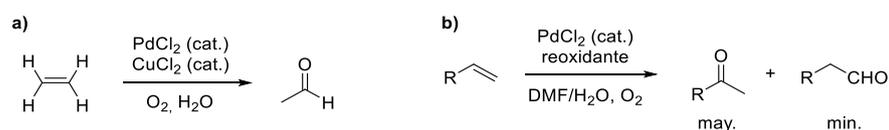
²⁹⁴ P. Matzel, M. Gand, M. Höhne, *Green Chem.* **2017**, *19*, 385-389.

²⁹⁵ a) J. Smidt, W. Hafner, R. Jira, J. Sedlmeier, R. Sieber, H. Kojer, R. Rüttinger, *Angew. Chem.* **1959**, *71*, 176-186; b) R. Jira, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *49*, 9034-9037.

²⁹⁶ a) J. Tsuji, *Synthesis*, **1984**, 369-384; b) J. J. Li, E. J. Corey, *Name Reactions for Functional Group Transformations*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken (Estados Unidos), **2007**, pp. 309-326.

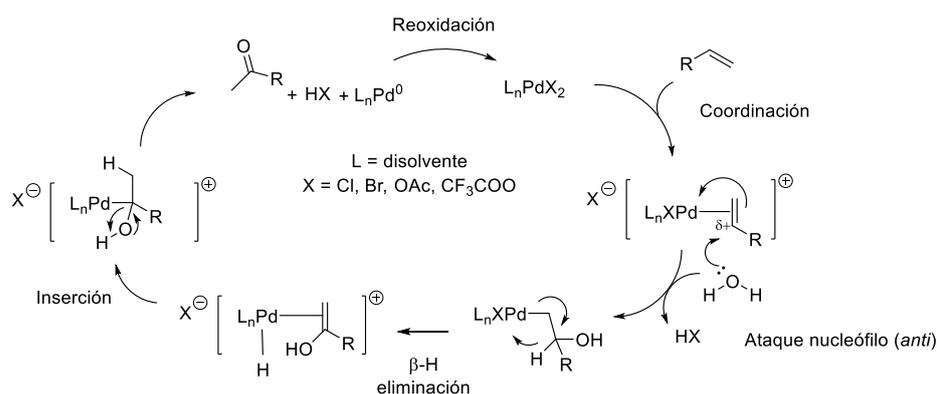
²⁹⁷ a) J. J. Dong, W. R. Browne, B. L. Feringa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *54*, 734-744; b) K.-F. Hu, X.-S. Ning, J.-P. Qu, Y.-B. Kang, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 11327-11332.

²⁹⁸ T. Mitsudome, K. Mizumoto, T. Mizugaki, K. Jitsukawa, K. Kaneda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1238-1240.



Esquema 113. a) Proceso Wacker y b) oxidación Wacker-Tsuji con regioselectividad tipo Markovnikov.

Distintos autores han estudiado minuciosamente la compleja mecánica de la oxidación de Wacker utilizando estudios cinéticos, isotópicos y estereoquímicos, así como, recientemente, mediante cálculos teóricos.²⁹⁹ Tras la coordinación inicial del sustrato, el ataque nucleófilo de una molécula de agua al complejo η^2 puede ocurrir desde la esfera de coordinación del paladio, ataque *syn*, o desde el lado externo en una *anti*-hidroxipaladación (Esquema 114). Esta dicotomía *syn/anti* existe en todas las adiciones nucleófilas a complejos alqueno-paladio y no es exclusiva de la reacción de Wacker. Aunque ha mostrado ser muy dependiente de las condiciones de reacción, los datos experimentales y teóricos indican que la adición *anti* parece ser el mecanismo preferido en las reacciones intermoleculares, mientras que en las intramoleculares la adición *syn* puede estar favorecida según la naturaleza del nucleófilo.³⁰⁰



Esquema 114. Mecanismo general para la oxidación de Wacker-Tsuji.

Además, los experimentos de marcaje con deuterio han demostrado que, tras la β -eliminación de hidrógeno, no se produce la disociación del enol y su posterior tautomería, sino que hay una inserción de hidrógeno que genera un

²⁹⁹ J. A. Keith, P. M. Henry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9038-9049

³⁰⁰ P. Kočovský, J.-E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 36-56.

nuevo intermedio que puede sufrir la β -eliminación sobre el enlace O-H (y una posterior eliminación reductiva de HCl) o bien la expulsión del complejo de paladio como grupo saliente para generar la metilcetona.³⁰¹

La especie activa de Pd^{2+} se regenera por mediación del CuCl_2 en el proceso tradicional, pero, a lo largo de los años, muy variadas estrategias oxidativas han mostrado ser sistemas eficaces, como el empleo de 1,4-benzoquinona (en cantidad estequiométrica),³⁰² peróxido de hidrógeno,³⁰³ reactivos de yodo hipervalente,³⁰⁴ o sales de hierro(III)³⁰⁵ como oxidantes terminales, o usando únicamente el oxígeno molecular en disolventes fuertemente coordinantes, como DMSO, DMF o *N,N*-dimetilanilina (DMA).³⁰⁶

La oxidación de alilarenos empleando esta estrategia resulta especialmente problemática ya que, en las condiciones ácidas y en presencia del catalizador de paladio, se produce la isomerización del doble enlace y se obtiene el β -metilestireno, más estable (Esquema 115a).³⁰⁷ Aunque se trata de un equilibrio, este intermedio puede seguir otros caminos de reacción y dar lugar a la formación de ariletilcetonas, al oxidarse la posición contigua al fenilo, o de benzaldehídos si se produce la ruptura radicalaria oxidativa de la olefina.³⁰⁸ Utilizando hidroperóxido de *tert*-butilo como oxidante terminal se han podido transformar distintos alil(hetero)arenos en las correspondientes (hetero)ariletilcetonas con elevada quimioselectividad (Esquema 115b).³⁰⁹

³⁰¹ J. A. Keith, R. J. Nielsen, J. Oxgaard, W. A. Goddard, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12342-12343.

³⁰² W. H. Clement, C. M. Selwitz, *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 241-243.

³⁰³ X. Xia, X. Gao, J. Xu, C. Hu, X. Peng, *Synlett*, **2017**, *28*, 607-610.

³⁰⁴ a) M. A. Bigi, M. C. White, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7831-7834; b) D. A. Chaudhari, R. A. Fernandes, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 2113-2121.

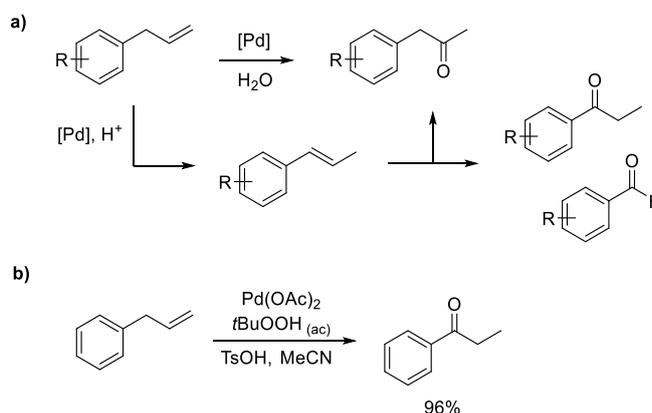
³⁰⁵ R. A. Fernandes, D. A. Chaudhari, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 5787-5793.

³⁰⁶ b) T. Mitsudome, T. Umetani, N. Nosaka, K. Mori, T. Mizugaki, K. Ebitani, K. Kaneda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 481-485; c) Y.-F. Wang, Y.-R. Gao, S. Mao, Y.-L. Zhang, D.-D. Guo, Z.-L. Yan, S.-H. Guo, Y.-Q. Wang, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1610-1613.

³⁰⁷ a) H. A. Zahalka, K. Januszkiewicz, H. Alper, *J. Mol. Catal.* **1986**, *35*, 249-253; b) E. A. Karakhanov, A. L. Maximov, B. N. Tarasevich, V. A. Skorkin, *Mol. Catal. A: Chem.* **2009**, *297*, 73-79.

³⁰⁸ H. Jiang, Q.-D. Qiao, H. Gong, *Pet. Sci. Technol.* **1999**, *17*, 955-965.

³⁰⁹ J. Zhao, L. Liu, S. Xiang, Q. Liu, H. Chen, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 5613-5616.



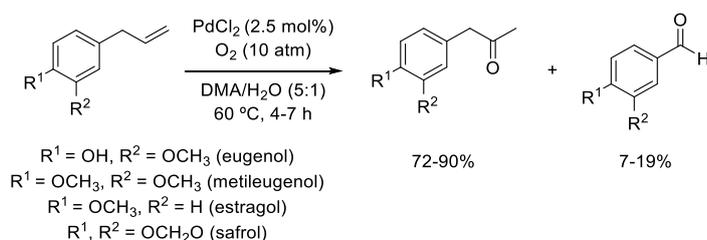
Esquema 115. a) Posibles productos en la oxidación Wacker-Tsuji de alilarenos por isomerización del doble enlace; b) isomerización-oxidación de Wacker selectiva.

La mayoría de los sistemas oxidativos que mostraron moderadas o buenas selectividades para la obtención de la 1-fenilpropan-2-ona utilizan elevadas presiones de O_2 como único reoxidante. Por ejemplo, en una mezcla DMA/ H_2O (6:1) con 6 atmósferas de O_2 y $PdCl_2$ (5 mol%) a $80\text{ }^\circ\text{C}$ tras 40 h se obtiene la cetona buscada en un 85% de rendimiento.^{307a} Utilizando un procedimiento similar, se han oxidado alilbencenos oxigenados naturales de origen vegetal en las correspondientes metilcetonas con elevados rendimientos, obteniendo como productos minoritarios los derivados de benzaldehído (Esquema 116).³¹⁰

Es destacable que en las metodologías que emplean oxígeno a presión atmosférica la productividad en la transformación de alilbenzeno en 1-fenilpropan-2-ona decrece, ya que requiere cargas de catalizador muy elevadas (5-10 mol%) y se obtienen menores rendimientos.³¹¹

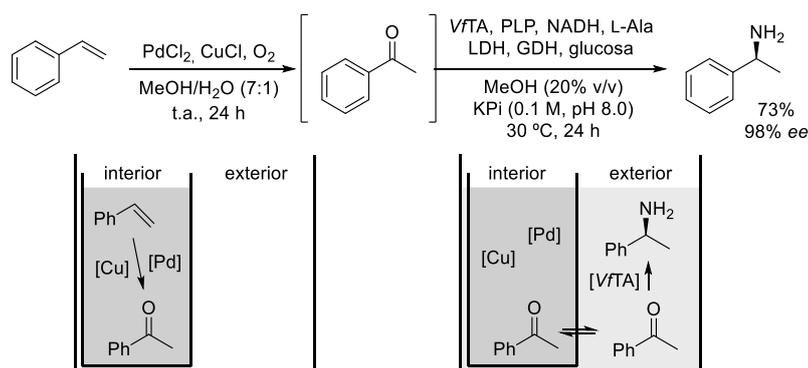
³¹⁰ L. A. Parreira, L. Menini, J. C. C. Santos, E. V. Gusevskaya, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, 352, 1533-1538.

³¹¹ Y.-F. Wang, Y.-R. Gao, S. Mao, Y.-L. Zhang, D.-D. Guo, Z.-L. Yan, S.-H. Guo, Y.-Q. Wang, *Org. Lett.* **2014**, 16, 1610-1613.



Esquema 116. Oxidación de alilbencenos naturales.

En la introducción del *Bloque II* se han mostrado dos ejemplos de procesos en cascada secuencial acoplando reacciones de Wacker-Tsuji con alcohol deshidrogenasas para transformar estirenos en derivados del (*R*)-1-feniletanol.^{173,174} En una aproximación similar, Gröger y colaboradores han descrito la síntesis de la (*S*)-1-feniletilamina utilizando la *VfTA*, a través de un proceso global de hidro-aminación de olefinas empleando una estrategia de compartimentación para separar los catalizadores metálico y enzimático (Esquema 117). Tras la formación de la metilcetona intermedia en el interior de la membrana, se añade el medio acuoso con el sistema biocatalítico que cataliza el segundo paso de la reacción ya que la membrana permite la difusión del sustrato, pero no de las sales metálicas que provocarían la inhibición enzimática.³¹²



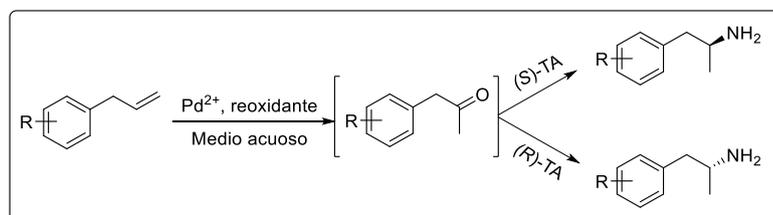
Esquema 117. Cascada secuencial de oxidación de Wacker-Tsuji y biotransaminación utilizando una estrategia de compartimentación.

³¹² F. Uthoff, H. Sato, H. Gröger, *ChemCatChem*, **2017**, *9*, 555-558.

OBJETIVOS

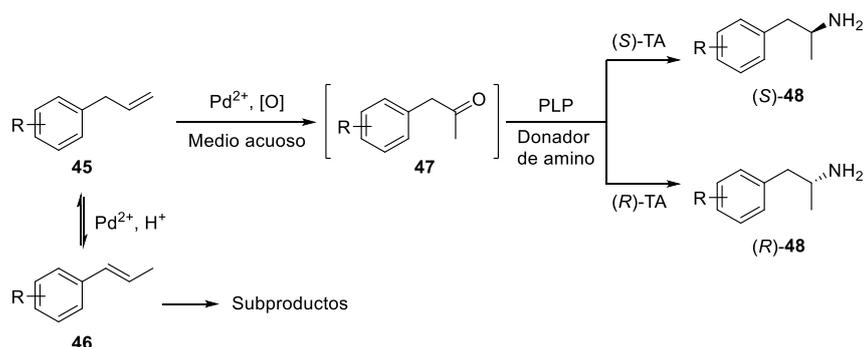
En los antecedentes, se ha puesto de manifiesto la necesidad de desarrollar métodos sintéticos asimétricos que permitan la obtención de los enantiómeros de diferentes anfetaminas, ya que la configuración del estereocentro ejerce una influencia crucial en la actividad farmacológica de estos compuestos. Aprovechando que las 1-arylpropan-2-onas, uno de sus precursores más utilizados, son potenciales sustratos en reacciones de biotransaminación, nos planteamos los siguientes objetivos:

- Estudiar la oxidación de Wacker-Tsuji de alilbencenos catalizada por paladio, empleando disoluciones acuosas como medio de reacción y tratando de optimizando los diferentes parámetros de reacción para lograr una conversión eficiente en los productos de oxidación con selectividad tipo Markovnikov.
- Identificar una serie de transaminasas con selectividades complementarias que permitan sintetizar los dos enantiómeros de las anfetaminas a partir de las 1-arylpropan-2-onas.
- Desarrollar un método quimioenzimático en cascada combinando la oxidación de Wacker-Tsuji y la biotransaminación para transformar los derivados de alilbenceno en 1-arylpropan-2-aminas ópticamente activas.
- Explorar la generalidad tanto del método oxidante, utilizando otras olefinas terminales, como la compatibilidad del proceso en cascada con otros biocatalizadores.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La importancia actual y el potencial futuro de los derivados de anfetamina en distintos ámbitos de la medicina requieren el diseño de rutas altamente estereoselectivas que cumplan los estándares modernos de sostenibilidad. Como se ha mostrado hasta el momento en esta Tesis Doctoral, las estrategias (quimio)enzimáticas ofrecen interesantes alternativas a los métodos clásicos, donde se han identificado las 1-arylpropan-2-onas como precursores ideales. Por ello, nos hemos planteado estudiar un proceso de oxidación de alilbencenos en 1-arylpropan-2-onas, que opere en unas condiciones compatibles con el uso de transaminasas, enzimas que podrían ser aplicadas potencialmente en una cascada para la transformación enantioselectiva de estas cetonas en 1-arylpropan-2-aminas (Esquema 118).



Esquema 118. Planteamiento del proceso en cascada de oxidación-transaminación de derivados de alilbenceno.

5.3. Oxidación del alilbenceno (45a)

Aunque la reacción de Wacker-Tsuji requiere agua como reactivo, generalmente se utilizan mezclas acuosas de disolventes polares (DMSO, DMA, MeCN, MeOH, etc.) con contenidos de en torno al 10-25% v/v en agua. *A priori*, estas condiciones que resultarían incompatibles con la mayoría de los biocatalizadores no inmovilizados, en concreto con las transaminasas a estudiar en este capítulo. Además, como se ha resaltado en la *Sección 5.2*, este tipo de sustratos presentan el problema de la reacción secundaria de isomerización del doble enlace que compete con la oxidación.

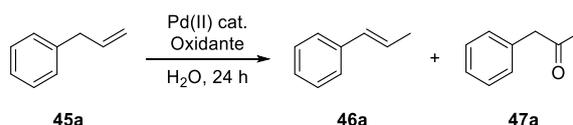
Inicialmente, se ha estudiado la oxidación de Wacker-Tsuji del alilbenceno (**45a**) utilizando diferentes sistemas oxidantes para regenerar el catalizador de Pd(II) y empleando agua como disolvente. Se seleccionaron dos catalizadores: el dicloruro de paladio, empleado en las condiciones clásicas, y el diacetato de paladio, que también ha mostrado elevada actividad en este tipo de oxidaciones (Tabla 70). Por otro lado, la presencia de ligandos fosfina inhibe drásticamente la actividad de las especies de Pd²⁺, ya que al utilizar el catalizador PdCl₂(PPh₃)₂ no se detectó formación de productos ni de oxidación (**47a**) ni de isomerización (**46a**).

El sistema oxidante formado por la lacasa de *Trametes versicolor* (LTV) y el TEMPO como mediador se ha empleado en nuestro grupo de investigación para oxidar distintos compuestos orgánicos, como alcoholes, dioles y aminoalcoholes.³¹³ Además, el TEMPO ha mostrado ser capaz de oxidar las especies de Pd(0) en reacciones tipo Wacker,³¹⁴ sin embargo, al tratar de oxidar el alqueno **45a** se obtuvieron conversiones muy bajas (<15%, entradas 1 y 2) por lo que se descartó esta metodología y se estudiaron condiciones no enzimáticas.

La utilización de oxígeno molecular como oxidante terminal sin mediadores requirió cantidades muy elevadas del catalizador de paladio para obtener conversiones significativas (entradas 3-6), mientras que la adición de CuCl₂ en cantidades subestequiométricas como reoxidante mostró un efecto negativo en la reacción (entradas 7 y 8). Por ello, se buscaron otros oxidantes que habían sido recientemente descritos en la bibliografía, como los compuestos de yodo hipervalente^{305b} o las sales de Fe(III).³⁰⁶ Así, el peryodinano de Dess-Martin (DMP) mostró una elevada actividad pero una baja selectividad en la oxidación (entrada 9), mientras que el uso de dos sales de Fe(III), cloruro férrico o nitrato férrico, llevaron a unos prometedores resultados en términos de conversión y selectividad (entradas 10-15).

³¹³ a) A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, S. Kanbak-Aksu, R. A. Sheldon, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 3405-3408; b) A. Díaz-Rodríguez, L. Martínez-Montero, I. Lavandera, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 2321-2329.

³¹⁴ K. Mitsudo, T. Kaide, E. Nakamoto, K. Yoshida, H. Tanaka, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2246-2247.

Tabla 70. Estudio preliminar de las condiciones para la oxidación de **45a** (50 mM) en agua (1.0 mL).

Entrada	Pd(II) (mol%)	Oxidante (eq)	T (°C)	45a (%) ^a	46a (%) ^a	47a (%) ^a
1 ^b	PdCl ₂ (5.0)	LT _v y TEMPO (0.3)	30	90	2	6
2 ^b	Pd(OAc) ₂ (5.0)	LT _v y TEMPO (0.3)	30	87	2	11
3	PdCl ₂ (5.0)	O ₂ (1 atm)	40	70	9	18
4	Pd(OAc) ₂ (2.5)	O ₂ (1 atm)	40	65	6	26
5	Pd(OAc) ₂ (5.0)	O ₂ (1 atm)	40	51	6	41
6	Pd(OAc) ₂ (15.0)	O ₂ (1 atm)	40	11	3	81
7	Pd(OAc) ₂ (10.0)	O ₂ (1 atm)	30	35	7	45
8	Pd(OAc) ₂ (10.0)	CuCl ₂ (0.2) O ₂ (1 atm)	30	67	11	20
9	Pd(OAc) ₂ (5.0)	DMP (1.5)	45	9	4	60
10	PdCl ₂ (2.5)	FeCl ₃ (1.0)	45	14	50	29
11	PdCl ₂ (2.5)	FeCl ₃ (1.0)	60	21	24	48
12	Pd(OAc) ₂ (2.5)	FeCl ₃ (1.0)	60	17	19	58
13	Pd(OAc) ₂ (2.5)	FeCl ₃ (1.0)	80	7	6	80
14	Pd(OAc) ₂ (2.5)	Fe(NO ₃) ₃ (1.0)	80	19	<1	71
15 ^b	Pd(OAc) ₂ (2.5)	FeCl ₃ (1.0)	60	3	<1	92

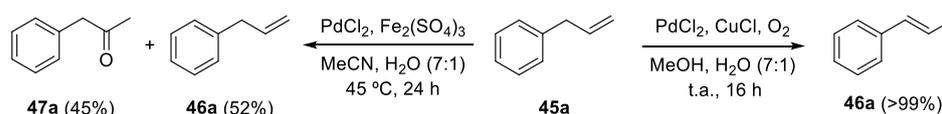
^a Porcentajes de productos determinados mediante CG del crudo de reacción utilizando anisol como patrón interno; ^b reacción en buffer NaOAc 50 mM a pH 5.5 y 10 U/mL de lacasa; ^c 25 mM de **45a**.

Entre los dos catalizadores, el Pd(OAc)₂ mostró una mayor actividad, sin afectar a la distribución de productos (entradas 3 y 5, 11 y 12) y, como oxidante terminal, el FeCl₃ mostró una mayor selectividad que el Fe(NO₃)₃·9H₂O (entradas 13 y 14).

Además, se hicieron diversas pruebas tratando de utilizar las sales de Fe(III) en cantidades subestequiométricas y O₂ como oxidante terminal (resultados no mostrados), pero dieron lugar a bajas conversiones que sugieren una nula reoxidación de las especies de hierro reducidas en las condiciones empleadas.

Por otro lado, la solubilidad del Fe³⁺ es altamente dependiente de la acidez del medio, ya que precipita a pHs superiores a 3.5 y pierde su función oxidante en la reacción. La adición de cualquiera de las sales de hierro(III) utilizadas ya genera un pH suficientemente ácido para su completa disolución y resulta compatible con aditivos como sales de fosfato o acetato, siempre y cuando su concentración no sea lo suficientemente elevada como para provocar una disminución de la acidez. Sin embargo, otras sales utilizadas en reguladoras, como las de citrato o Tris, o las de isopropilamonio, necesario para el segundo paso de transaminación, inhiben al catalizador de paladio, como se ha mostrado en el *Capítulo 3*. Por tanto, el proceso en cascada solo es factible de manera secuencial, adicionando el donador de amino y neutralizando el pH previa adición del biocatalizador, para no provocar su inhibición irreversible.

En este punto, se probaron las condiciones descritas por Uthoff y colaboradores en la cascada enzimática compartimentalizada,³¹³ obteniendo con conversión completa y como único producto la olefina interna **46a** resultante de la isomerización del doble enlace carbono-carbono (Esquema 119, derecha), por lo que esta aproximación no resulta aplicable para este tipo de sustratos. Por otro lado, en caso de emplear oxidantes de Fe(III) en una mezcla de MeCN con un bajo contenido en agua, como habían descrito Fernandes y colaboradores,³⁰⁶ se genera una mezcla de **46a** y **47a** prácticamente equimolar (Esquema 119, izquierda).



Esquema 119. Oxidación del alilbenceno en las condiciones encontradas en la bibliografía.

Se eligió, por tanto, el sistema Pd(II)/Fe(III) acuoso para el estudio pormenorizado de las condiciones de reacción, y su influencia en la distribución

de productos (Tabla 71). En este estudio, además de los reactivos evaluados previamente, se incluyeron:

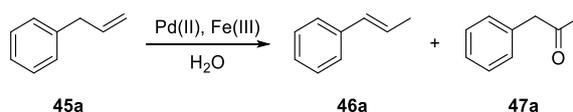
- el trifluoroacetato de paladio(II) [Pd(TFA)₂], catalizador más activo por la facilidad de disociación de sus aniones ya que poseen mayor estabilidad,
- la sal de sulfato de hierro(III), comercializada en forma hidratada con un número no determinado de moléculas de agua, por lo que se calcularon los equivalentes en función del peso molecular anhidro.³¹⁵

A tiempos cortos de reacción (1 h) y 60 °C se alcanzaron conversiones moderadas en la metilcetona **47a** con cargas bajas de Pd(OAc)₂ (1.0-2.5 mol%, entradas 1-3), observando un efecto positivo cuando se incrementaban los equivalentes de la sal de Fe(III) o se disminuía la cantidad de catalizador, al reducirse la isomerización del doble enlace. El problema de utilizar el catalizador de paladio(II) en cantidades de 1 mol% es la progresiva pérdida de la especie catalítica activa, al formarse precipitados de Pd⁰, que provoca un descenso en la velocidad de reacción tras la primera hora (resultados no mostrados).

Las sales de sulfato de hierro(III) mostraron resultados equiparables a los obtenidos con FeCl₃, aunque requiere mayor cantidad del oxidante (entradas 4-7). Por último, la adición de trifluoroacetato sódico Na(TFA), que generaría ácido trifluoroacético en el medio de reacción, parece mostrar una pequeña mejoría en el proceso (entradas 9-11), alcanzando una conversión del 87% en **47a** tras 14 h a 60 °C.

³¹⁵ En el artículo de Fernandes y Chaudhari se identificó la sal de sulfato como el mejor reactivo oxidante, pero los autores calculan erróneamente los equivalentes utilizando el doble de cantidad de Fe(III) que con las otras sales estudiadas (considerando el peso molecular del compuesto anhidro).

Tabla 71. Estudio de las condiciones de reacción Wacker-Tsuji en agua con el sistema Pd(II)/Fe(III).



Entrada	[45a] (mM)	Pd(II) (mol%)	Fe(III) (eq)	T (°C)	t (h)	45a (%) ^a	46a (%) ^a	47a (%) ^a
1	50	Pd(OAc) ₂ (2.5)	FeCl ₃ (1.0)	60	1	49	15	31
2	50	Pd(OAc) ₂ (2.5)	FeCl ₃ (2.0)	60	1	60	<1	34
3	50	Pd(OAc) ₂ (1.0)	FeCl ₃ (1.0)	60	1	37	4	53
4	50	Pd(TFA) ₂ (5.0)	Fe ₂ (SO ₄) ₃ (6.0)	45	24	9	4	77
5	50	Pd(TFA) ₂ (5.0)	Fe ₂ (SO ₄) ₃ (4.0)	45	24	29	<1	59
6	50	Pd(TFA) ₂ (2.5)	Fe ₂ (SO ₄) ₃ (4.0)	60	24	16	11	68
7	50	Pd(TFA) ₂ (2.5)	Fe ₂ (SO ₄) ₃ (2.0)	60	24	9	1	83
8	25	Pd(TFA) ₂ (2.5)	FeCl ₃ (1.1)	60	1	28	32	36
9 ^b	25	Pd(TFA) ₂ (2.5)	FeCl ₃ (1.1)	60	1	32	18	46
10 ^b	25	Pd(TFA) ₂ (2.5)	FeCl ₃ (1.1)	60	4	3	15	74
11 ^b	25	Pd(TFA) ₂ (2.5)	FeCl ₃ (1.1)	60	14	3	3	87

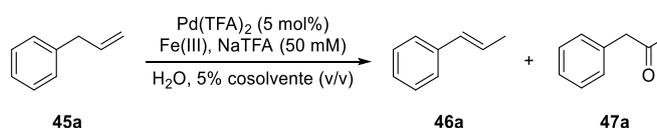
^a Porcentajes de productos determinados mediante CG del crudo de reacción utilizando anisol como patrón interno; ^b 50 mM de trifluoroacetato de sodio.

Al tratar de escalar las reacciones en las mejores condiciones halladas, surgió un problema adicional debido a la baja solubilidad y volatilidad de las olefinas **45a** y **46a**, que provocaban grandes pérdidas de masa si la reacción se llevaba a cabo en un sistema abierto y, además, dificultaba el seguimiento de las reacciones y daba lugar a oxidaciones más lentas y poco reproducibles. Por ello, se decidió introducir un cosolvente orgánico que contribuyese a mantener los sustratos en el medio acuoso, pero en una cantidad lo suficientemente baja como para no ser un impedimento para una posterior reacción enzimática secuencial.

Tomando como punto de partida un cosolvente polar como es el acetonitrilo, que era el disolvente empleado originariamente con este método

oxidativo (aunque en proporción 7:1 con el agua), se emplearon diversos disolventes en proporción 5% v/v tanto miscibles (MeCN, MeOH y dioxano) como inmiscibles (TBME, tolueno y hexano) con el medio acuoso (Tabla 72). En general, la oxidación fue más rápida con los disolventes polares, seleccionando el MeCN como el más adecuado (83-87% de **47a**, entradas 1-3), aunque con MeOH se favorece mucho la isomerización (40% de **46a**, entrada 5) y con dioxano disminuye el rendimiento por formación de productos secundarios (entrada 6). Por otro lado, el hexano permitió acceder a la metilcetona **47a** con buen rendimiento, aunque presenta una cinética más lenta y requiere una mayor temperatura (entradas 9 y 10).

Tabla 72. Oxidación tipo Wacker-Tsuji de **45a** (25 mM) en medio acuoso (2.5 mL) con cosolventes orgánicos (5% en volumen/volumen).



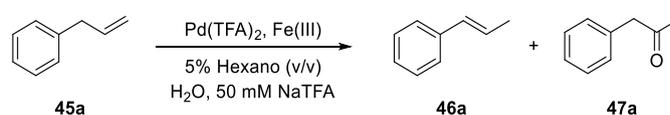
Entrada	Cosolvente	Fe(III) (eq)	T (°C)	t (h)	45a (%) ^a	46a (%) ^a	47a (%) ^a
1	MeCN	FeCl ₃ (1.1)	45	4	2	6	87
2	MeCN	FeCl ₃ (1.1)	60	4	8	4	83
3	MeCN	Fe ₂ (SO ₄) ₃ (2.0)	45	4	5	6	84
4	TBME	Fe ₂ (SO ₄) ₃ (2.0)	60	16	1	14	80
5	MeOH	FeCl ₃ (1.1)	60	1	4	40	50
6	Dioxano	FeCl ₃ (1.1)	60	3	1	3	77
7	Tolueno	FeCl ₃ (1.1)	60	4	23	29	42
8	Tolueno	FeCl ₃ (2.0)	60	16	29	<1	59
9	Hexano	FeCl ₃ (1.1)	60	4	2	14	79
10	Hexano	FeCl ₃ (1.1)	60	16	9	1	83

^a Porcentajes de productos determinados mediante CG del crudo de reacción utilizando anisol como patrón interno.

Como el uso de pequeñas proporciones de hexano (5%, v/v) no mostró un efecto importante en el proceso de oxidación, pero si evitaba la pérdida de materia del medio de reacción y mejoraba la reproducibilidad, se empleó como cosolvente en un nuevo estudio de optimización (Tabla 73). La temperatura se

pudo rebajar hasta los 30 °C obteniendo excelentes conversiones utilizando la sal de sulfato férrico (90% en **47a**, entrada 7), mientras que con cloruro férrico fueron necesarias temperaturas de 45-60 °C para obtener la metilcetona **47a** con rendimientos de hasta el 84%, si bien con una peor selectividad (entradas 1-5).

Tabla 73. Optimización de las condiciones de oxidación de **45a** con hexano como cosolvente.



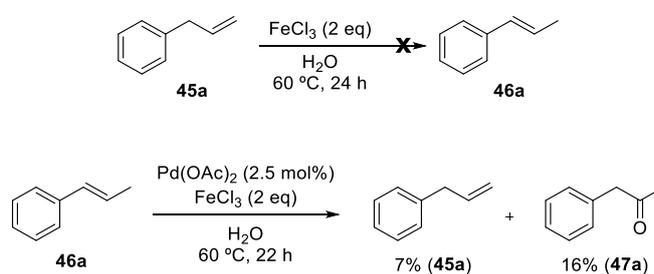
Entrada	Pd(TFA) ₂ (mol%)	Fe(III) (eq)	T (°C)	t (h)	45a (%) ^a	46a (%) ^a	47a (%) ^a
1	5	FeCl ₃ (1.1)	60	16	11	7	82
2	5	FeCl ₃ (2.0)	60	16	10	8	82
3	5	FeCl ₃ (2.0)	45	16	8	13	79
4	5	FeCl ₃ (1.1)	45	24	17	6	77
5	5	FeCl ₃ (1.5)	45	24	6	10	84
6	5	Fe ₂ (SO ₄) ₃ (3.0)	45	24	15	2	82
7	5	Fe ₂ (SO ₄) ₃ (3.0)	30	24	8	2	90
8	5	Fe ₂ (SO ₄) ₃ (4.0)	30	24	11	1	88
9	5	FeCl ₃ (1.5)	30	24	15	18	62
10	5	FeCl ₃ (3.5)	30	24	38	8	52
11	5	FeCl ₃ (4.0)	30	24	36	7	53
12	5	Fe ₂ (SO ₄) ₃ (2.0)	30	24	20	3	77
13	5	Fe ₂ (SO ₄) ₃ (1.5)	30	24	47	4	48
14	5	Fe ₂ (SO ₄) ₃ (1.0)	30	24	50	4	46
15	2.5	Fe ₂ (SO ₄) ₃ (3.0)	30	24	19	3	78

^a Porcentajes de productos determinados mediante CG del crudo de reacción utilizando anisol como patrón interno.

5.3.1. Estudio del proceso competitivo de isomerización

Se verificó que la formación de la olefina interna a través del proceso de isomerización era un proceso catalizado por el paladio con una reacción de control en las condiciones oxidativas empleadas en ausencia de la sal de Pd(II),

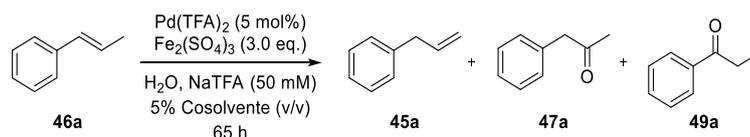
recuperando íntegramente el producto de partida **45a**. Además, partiendo del β -metilestireno (**46a**) se detectaron en el medio de reacción tanto el alilbenceno (**45a**) como la 1-fenilpropan-2-ona (**47a**), aunque en bajas concentraciones tras 22 h (Esquema 120).



Esquema 120. Estudio de la reacción de isomerización del doble enlace.

La formación de la metilcetona **47a** podría deberse a la oxidación de cualquiera de las dos olefinas (**45a** y **46a**), aunque teóricamente el proceso es más rápido con el alilbenceno, pudiendo también ser oxidada la olefina interna **46a** en la posición α al fenilo para formar la propiofenona (**49a**). Por ello, se estudió la distribución de productos en la oxidación de **46a** a tiempos muy largos (65 h) y diferentes temperaturas ($30\text{-}60\text{ }^\circ\text{C}$) utilizando dos de los cosolventes que habían mostrado mejores resultados (MeCN y hexano, Tabla 74). Tras 65 h, se observó la completa desaparición del producto de partida **46a**, obteniendo distintas proporciones de alilbenceno y de las cetonas **47a** y **49a**. En general, la formación de la propiofenona (**49a**) se vio favorecida a temperaturas más altas y con MeCN, mientras que en condiciones más suaves ($30\text{ }^\circ\text{C}$) y hexano como cosolvente se obtuvo la metilcetona **47a** con bastante selectividad (63%, entrada 2).

Tabla 74. Reacción de oxidación tipo Wacker de β -metilestireno (**46a**).



Entrada	Cosolvente	T (°C)	46a (%) ^a	45a (%) ^a	47a (%) ^a	49a (%) ^a
1	MeCN	30	<1	9	52	39
2	Hexano	30	<1	14	63	21
3	MeCN	45	<1	29	28	43
4	Hexano	45	<1	28	47	24
5	MeCN	60	<1	36	14	50
6	Hexano	60	<1	58	9	33

^a Porcentajes de productos determinados mediante CG del crudo de reacción.

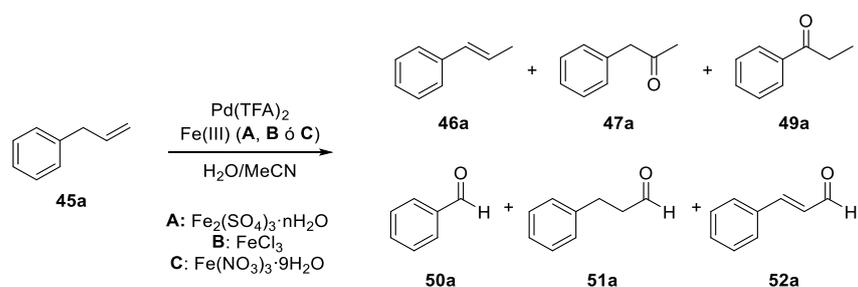
5.3.2. Identificación de los subproductos de la oxidación

Los diferentes subproductos minoritarios obtenidos en la oxidación de Wacker-Tsuji del alilbenceno (**45a**) se analizaron llevando a cabo los procesos a una escala mayor (en 10 mL de volumen de reacción en lugar de 2.5 mL como se había hecho hasta ahora) variando distintos parámetros del sistema Pd(II)/Fe(III) en ausencia de oxígeno y luz (Tabla 75). El estudio y la optimización de la reacción se realizó en mezclas de agua y MeCN, ya que este cosolvente resultó ser el más eficiente y su empleo fue indispensable para lograr una conversión eficaz de otros derivados de alilbenceno (ver *Sección 5.5.1*).

Junto a la metilcetona buscada (**47a**) y al producto de isomerización del doble enlace (**46a**) se encontraron, en pequeñas proporciones, la propiofenona (**49a**) y diferentes aldehídos. Además del benzaldehído (**50a**), se detectaron los productos de oxidación del carbono terminal al darse la adición anti-Markovnikov: 3-fenilpropanal (**51a**) y cinamaldehído (**52a**).

Coincidiendo con las observaciones anteriores, el empleo de un medio mayoritariamente acuoso favorece la transformación y la utilización de condiciones diluidas también es un requerimiento para que la conversión sea elevada. Tanto a 30 °C como a 45 °C se pueden lograr procesos muy eficientes, en el segundo caso permitiendo la reducción de la carga de catalizador a 1 mol% así como los equivalentes de reoxidante a un total de 2.0 utilizando $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ o 1.1 de FeCl_3 .

Tabla 75. Distribución de los productos detectados en la oxidación de **45a**.



[45a] (mM)	MeCN (v/v)	NaTFA (mM)	Pd(TFA) ₂ (mol%)	Fe (III) (eq.)	T (°C)	t (h)	45a (%)	46a (%)	47a (%)	49a (%)	50a (%)	51a (%)	52a (%)
	50%	---	2.5	3.0 (A)	30	20	5	32	53	2	2	3	1
	5%	---	2.5	3.0 (A)	30	20	2	6	81	4	1	4	2
	5%	5	2.5	3.0 (A)	30	20	<1	2	88	3	2	3	2
	5%	50	2.5	3.0 (A)	30	20	3	9	79	3	2	2	2
	5%	5	2.5	3.0 (A)	30	6	27	12	55	<1	<1	3	2
	5%	5	2.5	3.0 (A)	45	20	<1	<1	76	9	9	3	2
	5%	5	2.5	2.0 (A)	45	20	<1	6	83	3	2	4	2
	5%	5	1.0	2.0 (A)	45	20	<1	1	76	5	12	5	1
	5%	5	2.5	1.2 (A)	45	6	13	10	70	1	<1	4	2
	5%	5	2.5	1.6 (A)	45	6	6	6	78	3	1	4	2
	5%	5	2.5	1.1 (B)	45	6	3	6	83	<1	1	5	2
	5%	5	1.0	1.1 (B)	45	6	5	5	82	<1	1	4	3
	5%	5	1.0	2.0 (A)	30	3	72	11	15	<1	<1	1	1
	5%	5	1.0	2.0 (A)	45	3	3	2	86	2	1	4	2
	5%	5	1.0	1.1 (C)	45	3	5	3	82	1	2	4	2
	5%	5	1.0 ^b	2.0 (A)	45	3	20	5	65	1	2	3	5
	5%	5	1.0	2.0 (A)	45	3	25	4	64	<1	1	3	4
50	5%	50	2.5	3.0 (A)	30	24	33	18	42	2	n.d.	3	2
50	5%	50	2.5	3.0 (A)	45	24	29	12	50	3	n.d.	3	2
100	5%	100	2.5	3.0 (A)	45	24	24	11	58	2	n.d.	3	2
100	10%	100	2.5	3.0 (A)	45	60	19	18	54	3	n.d.	3	2
100	20%	100	2.5	3.0 (A)	30	24	15	33	45	2	n.d.	3	1
100	20%	100	2.5	1.2 (B)	45	24	12	36	33	1	n.d.	3	14

^a Porcentajes de productos determinados mediante CG del crudo de reacción; n.d.: no determinado; ^b utilizando Pd(OAc)₂.

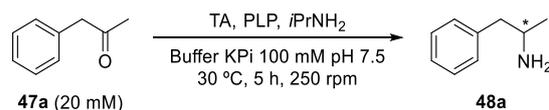
5.4. Síntesis asimétrica de 1-fenilpropan-2-amina (48a)

Para verificar la viabilidad del proceso secuencial, descartando una cascada concurrente por la incompatibilidad de los pHs necesarios para cada reacción, se midió la actividad de las TAs en presencia de los reactivos necesarios para la oxidación química de Wacker-Tsuji.

5.4.1. Transaminación de 1-fenilpropan-2-ona (47a)

En primer lugar, se estudió la transaminación del sustrato **47a** en las condiciones estándar optimizadas en el *Capítulo 4* para otro tipo de cetonas. Al no poseer el grupo carbonilo conjugado al grupo aromático, la transformación de 1-arilpropan-2-onas en derivados de anfetamina está más favorecida termodinámicamente, en general, que la de los derivados de acetofenona. Por ello, este estudio enzimático se llevó a cabo a tiempos más cortos (5 h), identificando varias transaminasas que permitieron obtener ambos enantiómeros de la amina **48a** en forma enantiopura y con conversiones superiores al 90% (Tabla 76). Así, destacaron las enzimas (*S*)-selectivas ATA-237 (entrada 13), ATA-251 (entrada 15), TA-P1-A06 (entrada 23) y TA-P1-G06 (entrada 28), y la TA-P1-B01 como (*R*)-selectiva (entrada 31).

Tabla 76. Estudio de biotransaminación de **47a** una concentración de 20 mM.



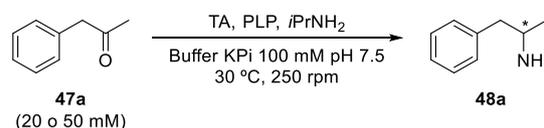
Entrada	TA	<i>c</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^b
1	<i>E. coli</i> /CvTA	92	96 (<i>S</i>)
2	<i>E. coli</i> /ArSTA	36	90 (<i>S</i>)
3	<i>E. coli</i> /ArRTA	1	n.m.
4	<i>E. coli</i> /ArRmut11	87	73 (<i>R</i>)
5	ATA-024	99	<1
6	ATA-025	99	<1
7	ATA-033	99	<1
8	ATA-113	98	90 (<i>S</i>)
9	ATA-117	7	n.m.
10	ATA-200	4	n.m.
11	ATA-217	7	n.m.
12	ATA-234	11	n.m.
13	ATA-237	92	>99 (<i>S</i>)
14	ATA-238	50	76 (<i>S</i>)
15	ATA-251	95	>99 (<i>S</i>)
16	ATA-254	37	>99 (<i>S</i>)
17	ATA-256	38	>99 (<i>S</i>)
18	ATA-260	64	>99 (<i>S</i>)
19	ATA-303	76	76 (<i>R</i>)
20	ATA-412	76	99 (<i>R</i>)
21	ATA-415	88	76 (<i>R</i>)
22	TA-P1-A01	92	97 (<i>S</i>)
23	TA-P1-A06	90	>99 (<i>S</i>)
24	TA-P1-B04	37	99 (<i>S</i>)
25	TA-P1-F03	41	99 (<i>S</i>)
26	TA-P1-F12	47	>99 (<i>S</i>)
27	TA-P1-G05	29	>99 (<i>S</i>)
28	TA-P1-G06	94	>99 (<i>S</i>)
29	TA-P2-A01	32	99 (<i>R</i>)
30	TA-P2-A07	75	99 (<i>R</i>)
31	TA-P2-B01	96	>99 (<i>R</i>)

Condiciones de reacción: **47a** (0.01 mmol, 1.3 μ L), TA (10.0 mg enzimas sobreexpresadas, 2.0 mg enzimas comerciales), PLP (1 mM), en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 μ L) que contiene isopropilamina (1.0 M) a 30 $^\circ$ C y 250 rpm durante 5 h. ^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción; ^b excesos enantioméricos medidos mediante HPLC a partir del derivado acetilado con anhídrido acético, mostrando el enantiómero mayoritario entre paréntesis; n.m.: no medido.

Tratando de encontrar un sistema más productivo, se estudiaron las reacciones a una concentración de cetona superior (50 mM en lugar de 20 mM)

con algunas de las enzimas que habían mostrado buenos valores de conversión anteriormente, incrementando el tiempo de reacción (de 5 a 14 h) pero sin modificar la cantidad de enzima añadida (Tabla 77). En algunos casos, la proporción de amina formada es equivalente entre los dos ensayos a diferentes concentraciones (entradas 1, 4-5, 7, 9 y 10), mientras que en otros se observa una inhibición muy significativa de la TA (entradas 2, 8 y 11).

Tabla 77. Estudio de biotransaminación a una concentración de **47a** de 50 mM.



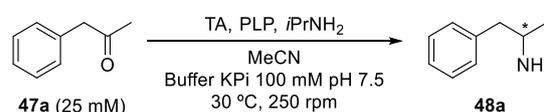
Entrada	TA	<i>c</i> (20 mM, %) ^a	<i>c</i> (50 mM, %) ^b	<i>ee</i> (%) ^c
1	<i>E. coli</i> / CvTA	92	92	96 (<i>S</i>)
2	<i>E. coli</i> / ArRmut11	87	40	73 (<i>R</i>)
3	ATA-113	98	73	90 (<i>S</i>)
4	ATA-237	92	85	>99 (<i>S</i>)
5	ATA-251	95	90	>99 (<i>S</i>)
6	ATA-412	76	56	99 (<i>R</i>)
7	ATA-415	88	90	76 (<i>R</i>)
8	TA-P1-A01	92	37	97 (<i>S</i>)
9	TA-P1-A06	90	91	>99 (<i>S</i>)
10	TA-P1-G06	94	90	>99 (<i>S</i>)
11	TA-P2-A07	75	14	>99 (<i>R</i>)
12	TA-P2-B01	96	81	>99 (<i>R</i>)

Condiciones de reacción: **47a** (0.025 mmol, 3.3 μ L), TA (10.0 mg enzimas sobreexpresadas, 2.0 mg enzimas comerciales), PLP (1 mM), en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 μ L) que contiene isopropilamina (1.0 M) a 30 $^\circ$ C y 250 rpm. ^a 5 h de reacción, conversiones medidas mediante CG; ^b 14 h de reacción, conversiones medidas mediante CG; ^c excesos enantioméricos medidos mediante HPLC a partir del derivado acetilado con anhídrido acético, mostrando el enantiómero mayoritario entre paréntesis.

Como el empleo de cosolventes ofreció mejoras en el paso de oxidación (ver Tabla 72), se estudió la síntesis de (*S*)-**48a** con la TA-P1-G06 adicionando pequeñas concentraciones de MeCN (2.5-10% v/v, Tabla 78). Por un lado, se observó que la presencia del cosolvente en bajas proporciones no afecta a la eficiencia de la enzima, aunque por encima de un 5% se ralentiza el proceso una vez alcanzado el equilibrio, alrededor de las 24 h, se obtienen unos valores de conversión similares (entradas 1-6). Por otro lado, se llevaron a cabo varios experimentos reduciendo progresivamente la cantidad de donador de amino hasta los 5 equivalentes (1.0-0.125 M de *i*PrNH₂, entradas 7-14). Con las tres

TAs (*S*) selectivas probadas, TA-P1-A06, TA-P1-G06 y ATA-251, las conversiones se mantuvieron en valores superiores al 70%, lo que está en concordancia con que la aminación de **47a** está termodinámicamente favorecida.

Tabla 78. Influencia de la proporción de cosolvente y concentración de isopropilamina en la transaminación de **47a**.



Entrada	TA	MeCN (%)	t (h)	[<i>i</i> PrNH ₂] (M)	<i>c</i> (%) ^a
1	TA-P1-G06	2.5	10	1.0	89
2		2.5	24	1.0	95
3		5.0	10	1.0	88
4		5.0	24	1.0	92
5		10.0	10	1.0	59
6		10.0	24	1.0	87
7	TA-P1-A06	5.0	12	1.0	95
8		5.0	12	0.5	93
9		5.0	12	0.25	86
10		5.0	12	0.125	77
11		5.0	24	0.125	75
12	TA-P1-G06	5.0	24	0.125	74
13	ATA-251	5.0	24	0.125	76
14	TA-P2-B01	5.0	24	0.125	34

Condiciones de reacción: **47a** (0.0125 mmol, 1.6 μ L), TA (2.0 mg), PLP (1 mM), en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 μ L) que contiene isopropilamina (0.125-1.0 M) a 30 °C y 250 rpm.

^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción.

5.4.2. Compatibilidad entre los dos pasos sintéticos

Encontradas varias transaminasas con excelente actividad y selectividad, ya sean tanto comerciales como de una colección propia y sobreexpresadas en *E. coli*, se estudió la influencia que tienen sobre la actividad enzimática los reactivos empleados en la oxidación de Wacker-Tsuji con el sistema Pd(II)/Fe(III). Inicialmente, se eligieron dos TAs con enantioselectividad complementaria, la TA-P1-G06 (*S*) y la TA-P2-B01 (*R*), y se compararon las conversiones alcanzadas en presencia de distintas concentraciones de sales de Fe(III) y de Pd(II). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12.

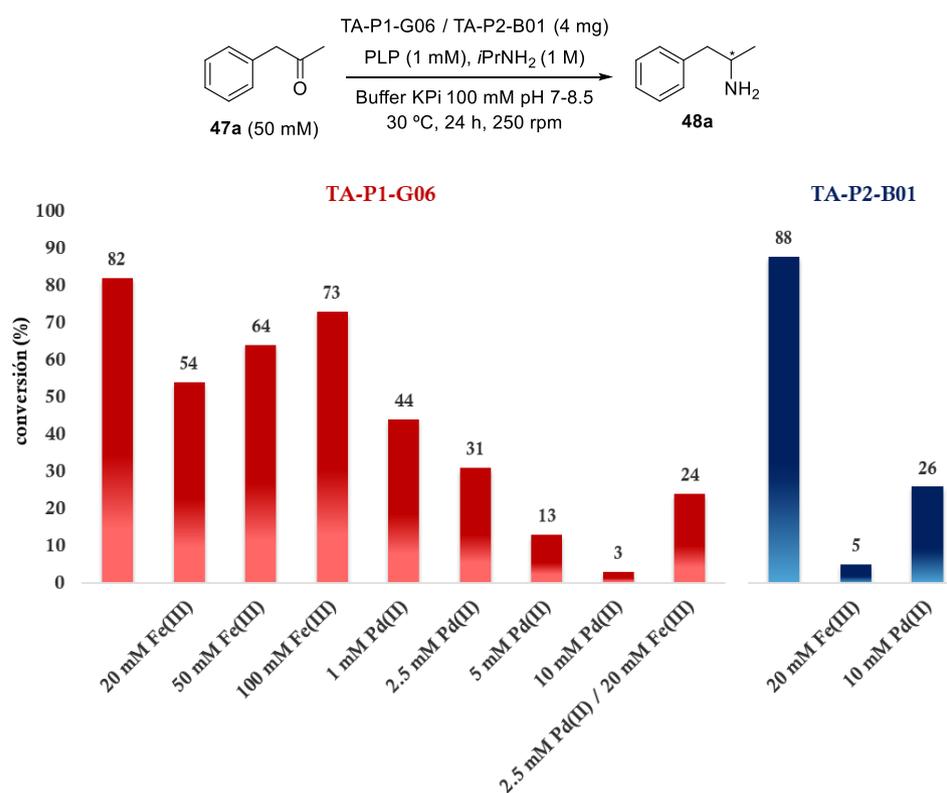


Figura 12. Influencia de los reactivos utilizados en la oxidación de Wacker-Tsuji en el proceso de transaminación con TA-P1-G06 (rojo) y TA-P2-B01 (azul).

Ajustando el pH a valores comprendidos entre 7-8.5 previa adición del biocatalizador, se encontró que concentraciones elevadas de Fe(III) provocaban, por un lado, un descenso significativo en la conversión con la TA-P1-G06 mientras que, por otro, una influencia mucho más drástica con la TA-P2-B01 produciendo una inactivación casi completa. Sin embargo, esta última mostró mayor robustez frente a concentraciones muy elevadas del catalizador de paladio (10 mM), aunque en ambos casos se produce una disminución de la conversión de **47a** al incrementar la concentración de Pd(II).

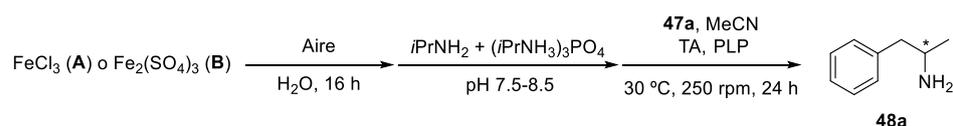
La inhibición provocada por los complejos de Fe(III) se estudió con otras enzimas, observando que las transaminasas *ArSTA* y *ArRmut11* sobreexpresadas en *E. coli*, así como la TA-P2-A07, perdían completamente su actividad. Sin embargo, las conversiones de **47a** en (*R*)-**48a** en el proceso catalizado por la

ATA-412 no se vieron afectadas, por lo que el efecto inhibitorio es muy diferente entre unas enzimas y otras.

Si bien es cierto que los resultados parecen ser determinantes a la hora de seleccionar que transaminasas pueden operar en el proceso en cascada, hay que tener en cuenta que en estas pruebas se añaden como aditivos los reactivos oxidantes de Fe(III), que deberían ser consumidos en el primer paso del proceso, por lo que, idealmente, las especies remanentes en el medio serían derivados de hierro en estados de oxidación inferiores. En el caso del catalizador de paladio, aunque podrían subsistir especies de Pd(II) la concentración esperada sería muy baja ya que, probablemente, la mayor parte se habría inactivado en forma de Pd(0).

Se diseñaron una serie de experimentos donde las sales de cloruro (método **A**) o sulfato férrico (método **B**) se disolvieron y se incubaron en presencia de aire para que, por acción del hidrógeno atmosférico, se redujesen. A continuación, se añadió el donador de amino, empleando mezclas de la sal de fosfato de isopropilamina y la amina libre para generar el pH del medio adecuado, tras lo cual se adicionaron el sustrato (**47a**), el PLP y se estudió el comportamiento de distintas transaminasas (Tabla 79). De esta forma, se obtuvieron buenos resultados con las transaminasas comerciales (entradas 1-4, 7-10) mientras que la *E. coli*/CvTA seguía mostrando una pérdida importante de actividad (entradas 5-6).

No se encontró un efecto en la reacción enzimática por parte de la naturaleza del catión de la sal de Fe(III), ni tampoco por la concentración más elevada de Fe cuando se emplea el $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (método **B**), pero el ajuste a un pH ligeramente más básico sí parece tener un efecto positivo en la actividad enzimática, especialmente en el caso de la TA-P2-B01 (Tabla 79, entradas 9 y 10).

Tabla 79. Transaminación de **47a** en presencia de sales de hierro.

Entrada	TA	Método ^a	pH ^b	c (%) ^b
1	TA-P1-G06	A	7.5	91
2		B	8.5	90
3	ATA-251	A	7.5	92
4		B	8.5	93
5	<i>E. coli</i> /CvTA	A	7.5	20
6		B	8.5	6
7	ATA-412	A	7.5	85
8		B	8.5	91
9	TA-P2-B01	A	7.5	57
10		B	8.5	88

Condiciones de reacción: **47a** (0.01 mmol, 1.3 μL) en MeCN (12.5 μL , 5% v/v), TA (10.0 mg enzimas sobreexpresadas, 2.0 mg enzimas comerciales), PLP (1 mM) y una mezcla de isopropilamina (0.15 M) y fosfato de isopropilamonio (0.25 M) en un medio acuoso que contiene sales de Fe (Método **A** o **B**, 500 μL) a 30 $^\circ\text{C}$ y 250 rpm durante 24 h. ^a Método **A**: disolución acuosa de FeCl_3 (37.5 mM) incubada durante 16 h al aire; método **B**: disolución acuosa de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (37.5 mM) incubada durante 16 h al aire; ^b valores de pH obtenidos al añadir el donador de amino al medio de reacción; ^c conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción.

Por último, el proceso en cascada secuencial se efectuó con las condiciones óptimas en sistema bifásico empleando hexano como cosolvente (ver Tabla 74), con un fácil ajuste y regulación del pH gracias al uso de la sal de fosfato de isopropilamonio. En la Figura 13, se representan los valores de conversión encontrados en la aminación de **47a** catalizada por 6 transaminasas seleccionadas para la obtención de los dos enantiómeros de la anfetamina (**48a**) en la cascada secuencial a partir de alilbenceno (**45a**), destacando la TA-P1-G06 y la ATA-251 para acceder a (*S*)-**48a** y la TA-P2-B01 en la síntesis de (*R*)-**48a**.

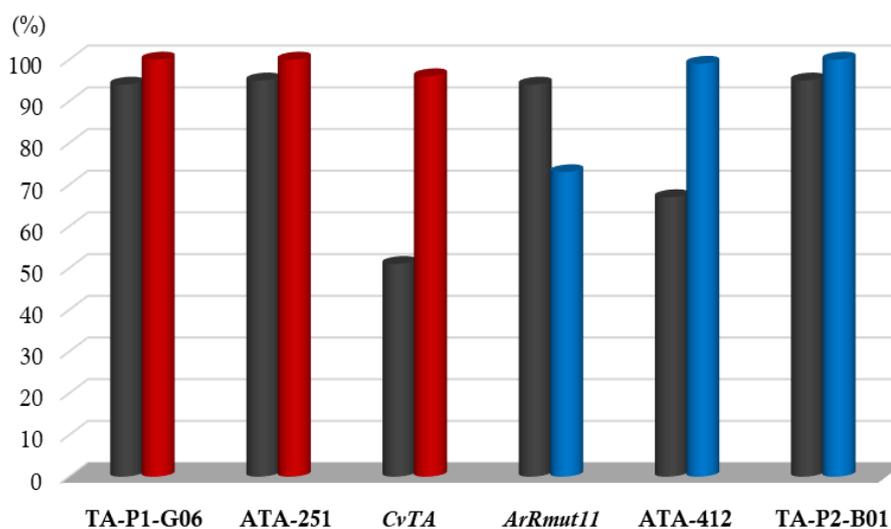
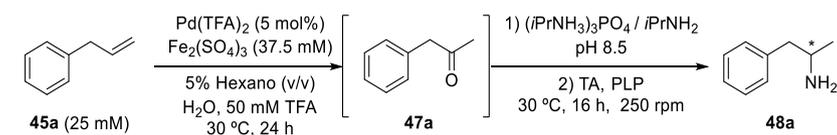


Figura 13. Resultados de la reacción en cascada donde se representan en negro los valores de conversión de **47a** en **48a**, mientras que los valores de *ee* aparecen en rojo (enantiómero *S*) o azul (enantiómero *R*).

5.5. Síntesis asimétrica de las 1-arilpropan-2-aminas **48b-i**

Para estudiar el ámbito de aplicación de esta metodología, se seleccionaron una serie de alilbencenos con diferentes sustituciones en el anillo aromático. Por un lado, los tres regioisómeros del aliltolueno, en *orto* (**45b**), *meta* (**45c**) y *para* (**45d**), que permitan comparar el efecto que pueda tener el sustituyente en las tres posibles posiciones, a los que se sumó el 1-alil-4-(trifluorometil)benceno (**45e**), introduciendo un grupo fuertemente electroattractor. Además, se incluyeron varios derivados oxigenados precursores de fármacos, como el 2-alilanisol (**45f**), el estragol o 4-alilanisol (**45g**) y 5-(2-alil)-1,3-benzodioxol, conocido como safrol (**45h**). Estos dos últimos, junto con el eugenol (4-alil-2-metoxifenol, **45i**) y su derivado metil eugenol (4-alil-1,2-dimetoxibenceno, **45j**), tienen origen natural y se extraen de los aceites esenciales de diferentes familias de organismos vegetales.

5.5.1. Oxidación en medio acuoso de alilarenos (45b-j)

Las arilpropan-2-onas **47b-j** se sintetizaron con el procedimiento oxidativo utilizado y optimizado previamente para el alilbenceno (**45a**), en una escala mayor para poder aislar las cetonas y estudiar el paso de biotransaminación con cada sustrato, como se detalla a continuación.

En la Tabla 80 se puede observar el efecto que provoca la presencia de un grupo metilo en el anillo aromático, y su posición relativa en el mismo, observando una menor reactividad que con el alilbenceno (**45a**) que decrece según la posición de la sustituyente en el orden *para* > *meta* > *orto*. Además, se detectó cierta formación de benzaldehídos **50c-d** al utilizar bajas concentraciones de hexano (2.5% v/v, entradas 5, 6, 8 y 9), subproductos problemáticos para el desarrollo de la estrategia en cascada ya que las transaminasas son capaces de catalizar su transformación en la correspondiente bencilamina, dificultando ostensiblemente el proceso de purificación la anfetamina deseada. Su formación se debería a una ruptura oxidativa del doble enlace de los derivados de β -metilestireno **46c-d** a través de un mecanismo de autooxidación radicalario. Estudiando la oxidación de Wacker-Tsuji de estireno a acetofenona, Jiang y colaboradores habían observado que la formación de benzaldehído como subproducto minoritario se reducía drásticamente al incluir compuestos inhibidores de radicales, concluyendo que el mecanismo que opera en su formación es alternativo e independiente a la adición nucleófila a complejos de coordinación.³⁰⁹

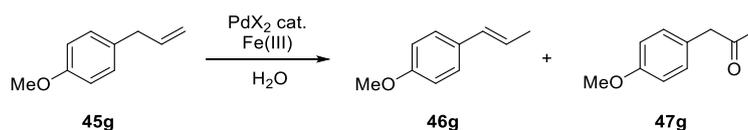
Tabla 80. Oxidación de Wacker-Tsuji de los aliltoluenos **45b-d** en sistema bifásico.



Entrada	Sustrato	Hexano (%, v/v)	T (°C)	45 (%) ^a	46 (%) ^a	47 (%) ^a	50 (%) ^a
1	45b (R = 2-Me)	5	30	38	4	58	<1
2		5	45	23	1	76	<1
3		2.5	30	13	2	85	<1
4	45c (R = 3-Me)	5	30	51	1	48	<1
5		2.5	30	17	4	70	3
6		2.5	45	23	7	65	5
7	45d (R = 4-Me)	5	30	55	2	43	<1
8		2.5	30	3	37	54	4
9		2.5	45	41	<1	50	7

^a Porcentajes de productos medidos mediante CG del crudo de reacción.

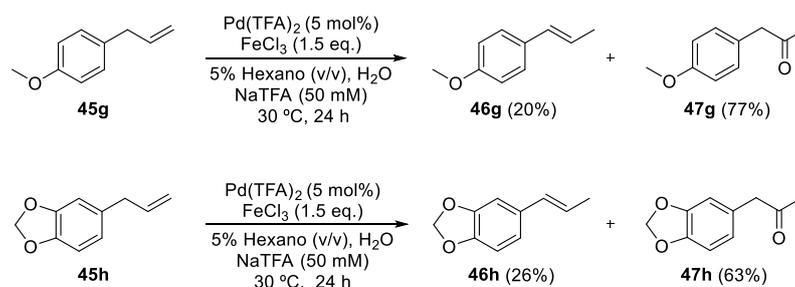
Paralelamente al estudio con **45a**, se había realizado la oxidación del estragol (**45g**) con el sistema Pd(II)/Fe(III) ya que este sustrato posee una menor volatilidad y mayor solubilidad en agua, por lo que resultaba más adecuado para el seguimiento de las reacciones en diferentes condiciones (Tabla 81). Así, se confirmó el efecto positivo que tiene sobre la reactividad el hecho de añadir una pequeña cantidad de MeCN como cosolvente (entradas 6-8) y, por otro lado, se seleccionó la sal de FeCl₃ para los sustratos oxigenados (entradas 6 y 8) en lugar del Fe₂(SO₄)₃, con el que se genera una mayor cantidad del isómero **46g** (entrada 7).

Tabla 81. Oxidación de Wacker-Tsuji del compuesto natural estragol (**45g**).

Entrada	[45g] (mM)	Pd(II) (mol%)	Fe(III) (eq)	T (°C)	t (h)	45e (%) ^a	46e (%) ^a	47e (%) ^a
1			Fe(NO ₃) ₃ (1.5)	60	24	14	7	57
2	50	Pd(OAc) ₂ (5.0)	FeCl ₃ (1.5)	45	24	4	35	40
3			FeCl ₃ (1.5)	60	4	30	9	47
4			FeCl ₃ (1.1)	60	24	<1	7	81
5			FeCl ₃ (1.5)	45	12	20	3	74
6 ^b	25	Pd(TFA) ₂ (2.5)	FeCl ₃ (1.5)	45	12	4	<1	92
7 ^b			Fe ₂ (SO ₄) ₃ (3.0)	45	24	4	18	71
8 ^c	25	Pd(TFA) ₂ (2.5)	FeCl ₃ (1.5)	45	24	1	4	87

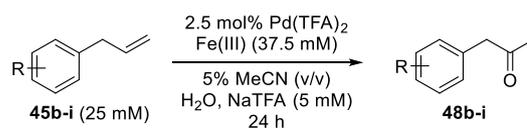
^a Porcentajes de productos determinados mediante CG del crudo de reacción utilizando anisol como patrón interno; ^b reacción con 5% MeCN (v/v); ^c escalado con 0.25 mmol de **45g** y un 5% MeCN (v/v).

La oxidación de los derivados oxigenados (**45f-j**) transcurrió con mayor eficacia, incluso con hexano (5%, v/v) como cosolvente las conversiones que se alcanzaron con los sustratos **45g-h** fueron casi cuantitativas (Esquema 121). Sin embargo, las olefinas internas **46g-h** que se van formando por isomerización son menos reactivas y no evolucionan hacia las correspondientes metilcetonas **47g-h** (la proporción de productos no varía si se agita durante 24 horas adicionales), lo que parece indicar que el equilibrio de la isomerización es irreversible a la temperatura de 30 °C empleada en estos casos.



Esquema 121. Oxidación de estragol (**45g**) y safrol (**45h**) con hexano como cosolvente.

Por lo tanto, en general es preferible utilizar MeCN como cosolvente (en proporción 5% v/v) para mejorar el rendimiento de la oxidación de Wacker-Tsuji y, en algunos casos, temperaturas más elevadas para evitar que se acumule el correspondiente β -metilestireno. Con estos parámetros, la formación de los benzaldehídos (**50a-j**) se detectó en cantidades muy variables y no reproducibles, llegando a obtener hasta un 25% en la oxidación del *para*-aliltolueno (**45d**). Considerando la hipótesis del mencionado mecanismo autooxidante radicalario, se llevaron a cabo las reacciones en ausencia de luz, para evitar procesos radicalarios indeseados, y bajo atmósfera inerte, evitando la presencia de oxígeno molecular que pueda promover este proceso. De esta forma, se consiguió reducir la cantidad de aldehído formada a niveles inferiores al 3%, obteniendo las metilcetonas, en la mayoría de los casos, con rendimientos superiores al 90% con tan solo 2.5 mol% del catalizador de paladio. Los mejores resultados obtenidos se resumen en la Tabla 82.

Tabla 82. Condiciones óptimas para la oxidación de Wacker-Tusji de **45b-i**.

Sustrato		Fe(III)	T (°C)	c (%) ^a	48 (%) ^b
	45b	Fe ₂ (SO ₄) ₃	30	>99	96
	45c	Fe ₂ (SO ₄) ₃	30	97	95
	45d	Fe ₂ (SO ₄) ₃	30	98	94
	45e	Fe ₂ (SO ₄) ₃	45	94	87
	45f	FeCl ₃	60	97	95
	45g	FeCl ₃	30	93	92
	45h	FeCl ₃	60	98	91
	45i	FeCl ₃	60	87	77
	45j	FeCl ₃	45	89	83

^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción relativas a la formación de **48** respecto a la suma de **45** y **46**; ^b selectividad medida por CG.

5.5.2. Transaminación de las 1-arilpropan-2-onas 47b-j

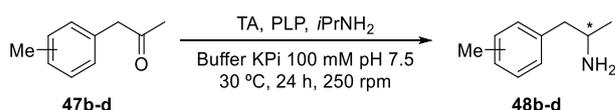
Las pruebas de transaminación con cada sustrato se llevaron a cabo seleccionando las enzimas que habían mostrado los mejores resultados con el sustrato modelo **47a**. A continuación, aparecen recogidos los datos obtenidos en la biotransaminación de las diferentes 1-arilpropan-2-onas:

- las 1-tolilpropan-2-onas **47b-d** en la Tabla 83,
- la 1-[*para*-(trifluorometil)fenil]propan-2-ona (**45e**) en la Tabla 84,
- las 1-metoxifenilpropan-2-onas **47f-g** (Tabla 85),
- y, finalmente, en la Tabla 86, las arilpropan-2-onas derivadas del safrol (**47h**), eugenol (**47i**) y metil eugenol (**47j**).

En general, entre las transaminasas (*S*)-selectivas destacan, por un lado, la ATA-251 como mejor biocatalizador para los sustratos con sustitución en posición *orto* (**47b** y **47f**), y por otro, la familia de las TA-P1-XXX que mostraron excelentes selectividades y, en general, elevadas conversiones. Por otro lado, la obtención de (*R*)-anfetaminas estuvo favorecida con la ATA-412 o la TA-P2-B01. Con esta selección de transaminasas se pudieron obtener ambos enantiómeros de todos los compuestos estudiados, a excepción del eugenol (**47i**), con el que solo mostró actividad la ATA-024 conduciendo a la amina **48i** en forma racémica (Tabla 86).

La posición de un sustituyente metilo en el anillo aromático (Tabla 83) tiene un efecto tanto en la actividad de las transaminasas, tendiendo a mayores conversiones cuando está en posición *para* o *meta*, como sobre su enantioselectividad, observando la tendencia contraria, con excelentes valores de *ee* en el derivado *orto*. Este patrón también se repite cuando el sustituyente es un grupo metoxilo (Tabla 85). Por ejemplo, las ATA-237 y ATA-251, que actuaban como total selectividad con el alilbenceno, hacen lo propio con el derivado **47b** pero su selectividad decae al pasar a **47c-d** y, especialmente, cuando los sustituyentes son grupos metoxilo, en lugar de metilo, en posiciones *meta* o *para* (Tablas 85 y 86).

Tabla 83. Biotransaminación de 1-tolilpropan-2-onas (47b-d).



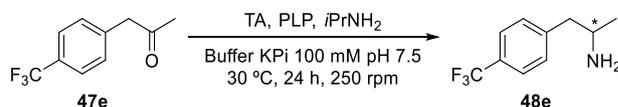
Sustrato	TA	<i>c</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^b
 47b	ATA-113	92	97 (<i>S</i>)
	ATA-237	76	>99 (<i>S</i>)
	ATA-251	93	>99 (<i>S</i>)
	ATA-412	88	>99 (<i>R</i>)
	ATA-415	91	97 (<i>R</i>)
	TA-P1-A06	75	>99 (<i>S</i>)
	TA-P1-B04	23	>99 (<i>S</i>)
	TA-P1-F03	62	>99 (<i>S</i>)
	TA-P1-G05	25	>99 (<i>S</i>)
	TA-P1-G06	62	>99 (<i>S</i>)
TA-P2-B01	74	>99 (<i>R</i>)	
 47c	ATA-113	96	95 (<i>S</i>)
	ATA-237	95	97 (<i>S</i>)
	ATA-251	98	88 (<i>S</i>)
	ATA-412	96	98 (<i>R</i>)
	ATA-415	98	78 (<i>R</i>)
	TA-P1-A06	72	>99 (<i>S</i>)
	TA-P1-G06	92	>99 (<i>S</i>)
TA-P2-B01	74	>99 (<i>R</i>)	
 47d	ATA-113	96	95 (<i>S</i>)
	ATA-237	98	84 (<i>S</i>)
	ATA-251	99	87 (<i>S</i>)
	ATA-412	5	n.m.
	ATA-415	39	<1
	TA-P1-A06	96	99 (<i>S</i>)
	TA-P1-B04	69	98 (<i>S</i>)
	TA-P1-F03	78	99 (<i>S</i>)
	TA-P1-G06	97	99 (<i>S</i>)
TA-P2-B01	99	>99 (<i>R</i>)	

Condiciones de reacción: 47b-d (0.01 mmol, 1.5 mg), TA (2.0 mg), PLP (1 mM), en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 μ L) que contiene isopropilamina (1.0 M) a 30 $^\circ$ C y 250 rpm durante 24 h. ^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción; ^b excesos enantioméricos medidos mediante HPLC a partir del derivado acetilado con anhídrido acético, mostrando el enantiómero mayoritario entre paréntesis; n.m.: no medido.

Además de las TAs comerciales, la CvTA sobreexpresada en *E. coli* posee un gran potencial como biocatalizador *S* selectivo ya que generó diferentes anfetaminas de interés con excesos enantioméricos superiores al 97% en conversiones >70%, pese a utilizarse el biocatalizador en forma de células

enteras. Posee la ventaja de tener una secuencia y estructura proteica conocida,³¹⁶ que permite una comprensión racional de su mecanismo de actuación y puede utilizarse en el diseño de variantes del biocatalizador más adecuadas para cada caso.

Tabla 84. Biotransaminación de 1-[*para*-(trifluorometil)fenil]propan-2-ona (**47e**).

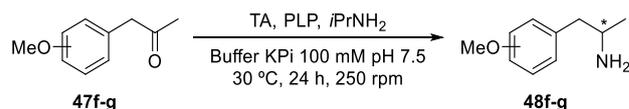


TA	<i>c</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^b
<i>E. coli</i> /CvTA	93	97 (<i>S</i>)
ATA-113	24	n.m.
ATA-412	96	>99 (<i>R</i>)
TA-P1-A06	76	>99 (<i>S</i>)
TA-P1-B04	75	>99 (<i>S</i>)
TA-P1-F03	96	>99 (<i>S</i>)
TA-P1-G05	67	>99 (<i>S</i>)
TA-P1-G06	90	99 (<i>S</i>)
TA-P2-A07	78	98 (<i>R</i>)
TA-P2-B01	42	91 (<i>R</i>)

Condiciones de reacción: **47e** (0.01 mmol, 2-0 mg), TA (2.0 mg enzimas comerciales, 10.0 mg *E. coli*/CvTA), PLP (1 mM), en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 μ L) que contiene isopropilamina (1.0 M) a 30 $^\circ$ C y 250 rpm durante 24 h. ^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción; ^b excesos enantioméricos medidos mediante CG a partir del derivado acetilado con anhídrido acético, mostrando el enantiómero mayoritario entre paréntesis; n.m.: no medido.

³¹⁶ M. S. Humble, K. E. Cassimjee, M. Håkansson, Y. R. Kimbung, B. Walse, V. Abedi, H.-J. Federsel, P. Berglund, D. T. Logan, *FEBS J.* **2012**, 279, 779–792.

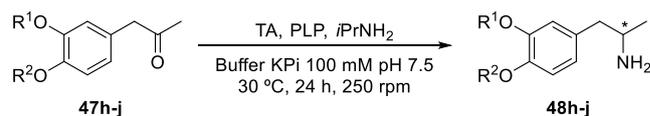
Tabla 85. Biotransaminación de 1-metoxifenilpropan-2-onas (47f-g).



Sustrato	TA	c (%) ^a	ee (%) ^b
 47f	<i>E. coli</i> / CvTA	73	>99 (S)
	ATA-113	9	n.m.
	ATA-237	65	99 (S)
	ATA-251	95	>99 (S)
	ATA-412	93	>99 (R)
	TA-P1-A06	32	>99 (S)
	TA-P1-B04	7	n.m.
	TA-P1-F03	64	>99 (S)
	TA-P1-G05	43	>99 (S)
	TA-P1-G06	58	>99 (S)
	TA-P2-B01	16	n.m.
	 47g	<i>E. coli</i> / CvTA	99
<i>E. coli</i> / ArRmut11		99	12 (R)
ATA-007		16	52 (R)
ATA-013		98	13 (R)
ATA-024		99	14 (R)
ATA-025		99	9 (R)
ATA-033		98	6 (R)
ATA-113		98	>99 (S)
ATA-117		19	n.m.
ATA-237		94	60 (S)
ATA-251		98	51 (S)
ATA-301		94	40 (R)
ATA-303		99	21 (R)
ATA-412		80	80 (R)
ATA-415		99	23 (R)
TA-P1-A06		96	98 (S)
TA-P1-G06		97	>99 (S)
TA-P2-A01		58	86 (R)
TA-P2-A07	90	>99 (R)	
TA-P2-B01	98	>99 (R)	

Condiciones de reacción: 47f-g (0.01 mmol, 1.6 mg), TA (2.0 mg enzimas comerciales, 10.0 mg enzimas sobreexpresadas), PLP (1 mM), en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 μ L) que contiene isopropilamina (1.0 M) a 30 °C y 250 rpm durante 24 h. ^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción; ^b excesos enantioméricos medidos mediante HPLC a partir del derivado acetilado con anhídrido acético, mostrando el enantiómero mayoritario entre paréntesis; n.m.: no medido.

Tabla 86. Biotransaminación de las 1-arylpropan-2-onas producto de la oxidación de safrol (**47h**), eugenol (**47i**) y metil eugenol (**47j**).



Sustrato	TA	<i>c</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^b
<p style="text-align: center;">47h</p>	<i>E. coli</i> / CvTA	97	97 (<i>S</i>)
	ATA-237	93	96 (<i>S</i>)
	ATA-251	98	>99 (<i>S</i>)
	ATA-412	45	71 (<i>R</i>)
	ATA-415	52	70 (<i>R</i>)
	TA-P1-A06	95	96 (<i>S</i>)
	TA-P1-B04	95	98 (<i>S</i>)
	TA-P1-F03	94	99 (<i>S</i>)
	TA-P1-G05	95	>99 (<i>S</i>)
	TA-P1-G06	96	96 (<i>S</i>)
	TA-P2-B01	97	>99 (<i>R</i>)
	<p style="text-align: center;">47i</p>	ATA-024	94
ATA-113		1	n.m.
TA-P1-A06		3	n.m.
TA-P1-G06		1	n.m.
TA-P1-G05		9	n.m.
TA-P2-A07		3	n.m.
TA-P2-B01		10	n.m.
<p style="text-align: center;">47j</p>		<i>E. coli</i> / CvTA	70
	ATA-113	52	23 (<i>S</i>)
	ATA-237	96	<1
	ATA-251	94	<1
	ATA-412	91	>99 (<i>R</i>)
	ATA-415	87	90 (<i>R</i>)
	TA-P1-A06	5	n.m.
	TA-P1-A06	5	n.m.
	TA-P1-B04	21	n.m.
	TA-P1-F03	79	>99 (<i>S</i>)
	TA-P1-G05	64	>99 (<i>S</i>)
	TA-P1-G06	10	n.m.
TA-P2-B01	42	>99 (<i>R</i>)	

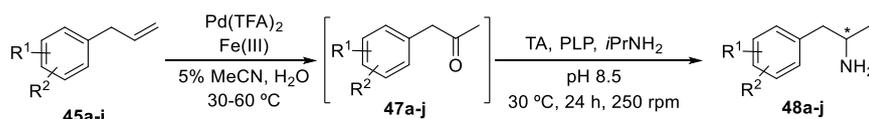
Condiciones de reacción: **47h-i** (0.01 mmol, 1.8-1.9 mg), TA (2.0 mg enzimas comerciales, 10.0 mg enzimas sobreexpresadas), PLP (1 mM), en buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 μ L) que contiene isopropilamina (1.0 M) a 30 $^\circ$ C y 250 rpm durante 24 h. ^a Conversiones medidas mediante CG del crudo de reacción; ^b excesos enantioméricos medidos mediante HPLC a partir del derivado acetilado con anhídrido acético, mostrando el enantiómero mayoritario entre paréntesis; n.m.: no medido.

Entre los compuestos naturales disustituidos (Tabla 86), la estructura bicíclica del derivado de safrol (**47h**) favoreció la catálisis enzimática frente al análogo dimetoxilado (**47j**). La presencia de un grupo funcional fenol impide que el sustrato **47i** sea transformado en el centro activo por lo que se protegió en forma de acetilo, pero no resultó estable en las condiciones de reacción de la transaminación, experimentando la hidrólisis del éster y obteniendo de nuevo el derivado fenólico.

5.5.3. Síntesis de anfetaminas en cascada secuencial

Finalmente, se estudió el desarrollo del proceso secuencial de transformación de los alilbencenos **45a-h,j** en las aminas **48a-h,j** ópticamente activas. Para ello, se combinó la oxidación de Wacker-Tsuji en las condiciones optimizadas con cada pareja de transaminasas complementarias seleccionadas para cada sustrato, siendo posible sintetizar cada par de enantiómeros de las aminas buscadas empleando la metodología en cascada secuencial (Tabla 87). Entre ellos, se puede destacar la síntesis de la dextroanfetamina [(*S*)-**48a**] y los precursores de metoxifenamina (**48f**), formoterol y tamsulosina (**48g**) y MDMA (**48h**) con excelentes rendimientos y en forma enantioméricamente pura.

Tabla 87. Proceso secuencial de oxidación de Wacker y biotransaminación para obtener los dos enantiómeros de derivados de anfetamina.



Sustrato	47 (%) ^a	TA	<i>c</i> (%) ^b	<i>ee</i> (%) ^c	48 (%) ^d
45a	88	TA-P1-G06	94	>99 (<i>S</i>)	83 (78)
		TA-P2-B01	94	>99 (<i>R</i>)	83
45b	97	ATA-251	89	>99 (<i>S</i>)	86 (85)
		ATA-412	81	>99 (<i>R</i>)	79
45c	95	TA-P1-G06	92	>99 (<i>S</i>)	87
		TA-P2-B01	97	>99 (<i>R</i>)	92 (92)
45d	94	TA-P1-G06	89	99 (<i>S</i>)	84
		TA-P2-B01	97	>99 (<i>R</i>)	92 (90)
45e	87	TA-P1-F03	85	>99 (<i>S</i>)	74
		ATA-412	92	>99 (<i>R</i>)	80 (70)
45f	95	ATA-251	94	>99 (<i>S</i>)	89 (87)
		ATA-412	92	>99 (<i>R</i>)	87 (82)
45g	92	TA-P1-G06	95	>99 (<i>S</i>)	87 (84)
		TA-P2-B01	96	>99 (<i>R</i>)	88 (86)
45h	91	TA-P1-G05	89	>99 (<i>S</i>)	81 (76)
		TA-P2-B01	95	>99 (<i>R</i>)	86 (85)
45j	83	TA-P1-F03	84	>99 (<i>S</i>)	75
		ATA-412	95	>99 (<i>R</i>)	79 (79)

Condiciones de reacción: **45a-j** (25 mM), Pd(TFA)₂ (2.5 mol%), Fe(III) (37.5 mM), Fe₂(SO₄)₃ **47a-e**, FeCl₃ **47f-j**), NaTFA (5 mM), MeCN (5% v/v) en agua se agitan durante 24 h bajo atmósfera inerte a 30 °C (excepto **45f** y **45h** 60 °C y **45j** 45 °C). A continuación, se añaden consecutivamente fosfato de isopropilamonio (0.25 M) e isopropilamina (0.15 M), PLP (0.5 mM) y la TA (1:1 peso con el sustrato) y se agita a 250 rpm a 30 °C durante 24 h. ^a Porcentajes de productos de oxidación de Wacker-Tusji calculados mediante CG; ^b conversiones del paso enzimático medidas mediante CG; ^c excesos enantioméricos medidos mediante HPLC o CG a partir del derivado acetilado con anhídrido acético, mostrando el enantiómero mayoritario entre paréntesis; ^d rendimientos globales calculados por cromatografía de gases, entre paréntesis se muestran los rendimientos aislados tras extracción ácido-base.

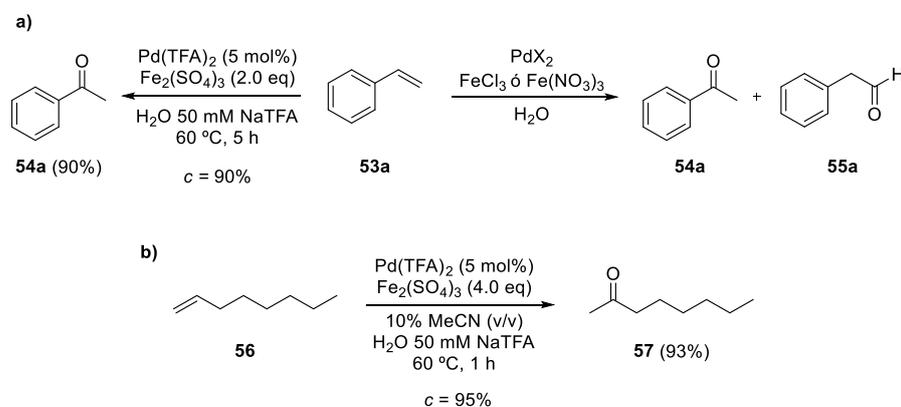
5.6. Oxidación de Wacker-Tsuji ampliada a otras olefinas terminales y combinada con otros procesos enzimáticos

Aunque el diseño del proceso quimioenzimático se había enfocado específicamente a la síntesis de anfetaminas a partir de derivados de alilbenceno, en esta última parte se han explorado conceptualmente otras posibles aplicaciones:

- la oxidación de Wacker de otras olefinas terminales, como estirenos (**53a-g**) o el 1-octeno (**56**),
- el empleo de sistemas multienzimáticos para el desplazamiento del equilibrio en reacciones de transaminación,
- la combinación con otras reacciones biocatalíticas usando ADHs o RedAms para transformar las metilcetonas intermedias generadas en el proceso de oxidación.

5.6.1. Extensión de la oxidación de Wacker-Tsuji de otras olefinas terminales

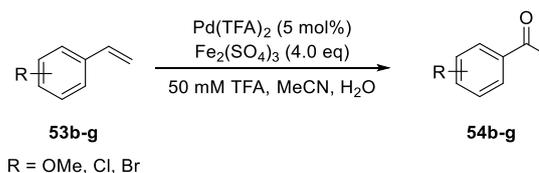
La oxidación del estireno (**53a**) en medio acuoso catalizada por Pd(II) con sales de hierro produjo mezclas de acetofenona (**54a**) y fenilacetaldehído (**55a**), por la adición del nucleófilo en las dos posibles posiciones. La selección de la sal adecuada resulta crucial ya que, utilizando la sal de sulfato férrico se obtuvo la metilcetona (**54**) con un 95% de conversión y 90% de rendimiento, mientras que las sales de cloruro o nitrato dieron mezclas, más o menos equimolares, de los productos **54a** y **55a** (Esquema 122a). Por otro lado, la oxidación de una olefina alifática, como es el 1-octeno (**56**), transcurre con un excelente rendimiento, pero requirió la adición de un cosolvente (10% de MeCN) para conseguir solubilizar el producto de partida y evitar su evaporación (Esquema 122b).



Esquema 122. Oxidación de Wacker-Tsuji de (a) estireno y (b) 1-octeno.

Diferentes derivados de estireno de interés con sustituyentes metoxilo en posiciones *orto* y *para* (**53b-c**) o cloro en posición *para* (**53d**) mostraron excelente reactividad, alcanzando conversiones cuantitativas y distribuciones de cetona/aldehído superiores a 9:1 (Tabla 88, entradas 1-6). Con los análogos bromados (**53e-g**) pueden existir otras reacciones secundarias debidas a la reactividad halógeno-metal que, en el caso del derivado *orto*, dieron lugar a un pobre rendimiento (**53e**). Sin embargo, las oxidaciones del 3-bromoestireno (**53f**) y 4-bromoestireno (**54f**) en las condiciones adecuadas permiten una buena selectividad hacia las correspondientes acetofenonas bromadas (Tabla 88, entradas 10 y 12).

Tabla 88. Reacción de Wacker-Tsuji de derivados de estireno.



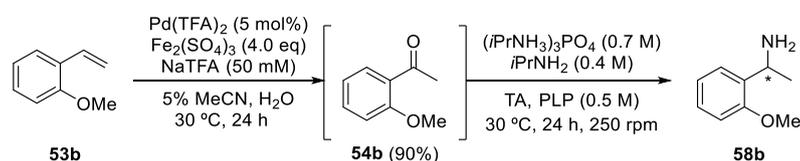
Entrada	Sustrato	MeCN (% v/v)	T (°C)	t (h)	c (%) ^a	54 (%) ^a
1	53b (R = 2-OMe)	---	60	4	>99	88
2		5	30	24	>99	90
3	53c (R = 4-OMe)	---	60	1.5	>99	95
4		5	30	24	>99	95
5	53d (R = 4-Cl)	---	40	3	>99	85
6		5	60	24	>99	94
7	53e (R = 2-Br)	10	30	5	87	51
8	53f (R = 3-Br)	5	30	24	54	51
9		5	30	70	74	68
10		10	45	5	92	84
11	53g (R = 4-Br)	5	30	70	30	26
12		10	45	16	82	75

^a Conversiones y porcentajes de productos medidos mediante CG del crudo de reacción utilizando anisol como patrón interno.

Se seleccionó el 2-metoxiestireno para combinar secuencialmente la oxidación con la transaminación, aprovechando la mayor reactividad de los

sustratos derivados de acetofenona que poseen sustituyentes aceptores de enlaces de hidrógeno en posición *orto*.²⁵³ En la Tabla 89 se muestran los resultados de la transaminación de **54b** a partir del crudo de reacción de la oxidación de Wacker-Tsuji de **53b**, que permite obtener los dos enantiómeros de **58b** con conversiones superiores al 95%.

Tabla 89. Síntesis en cascada secuencial de (*R*)- y (*S*)-**58b**.



Entrada	TA	<i>c</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^b
1	ATA-024	97	96 (<i>R</i>)
2	ATA-033	97	98 (<i>R</i>)
3	ATA-251	97	>99 (<i>S</i>)
4	TA-P1-G06	98	95 (<i>S</i>)

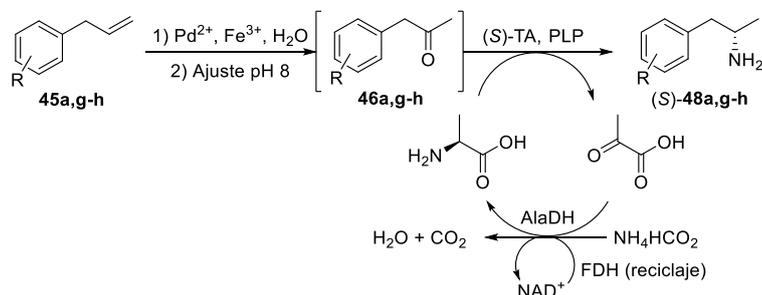
^a Conversiones del paso enzimático medidas mediante CG del crudo de reacción; ^b excesos enantioméricos medidos mediante HPLC a partir del derivado acetilado con anhídrido acético, indicando el enantiómero mayoritario entre paréntesis.

5.6.2. Combinación de la oxidación de Wacker-Tsuji con otros sistemas enzimáticos

En la síntesis de anfetaminas catalizada por transaminasas se ha usado isopropilamina como donador de amino, ya que mostró excelentes resultados y resulta un método muy sencillo y que, como se ha mostrado, facilita el ajuste del pH. En ciertos casos, puede ser preferible emplear otro tipo de estrategias para desplazar el equilibrio que incluyen otros biocatalizadores actuando simultáneamente a la transaminasa. Una de las más empleadas es el reciclaje de la L-alanina con alaDH que requiere, a su vez, la regeneración del cofactor NADH para lo que se suele utilizar la FDH, consumiendo únicamente formiato amónico en el proceso. El sistema de reciclado del donador de amino solo funciona con transaminasas (*S*)-selectivas, que aceptan como sustrato la L-alanina, sin embargo, la estrategia de desplazamiento del equilibrio es también válida para las (*R*)-TAs si se utiliza D-alanina (que es transformada en L-alanina por la alaDH).

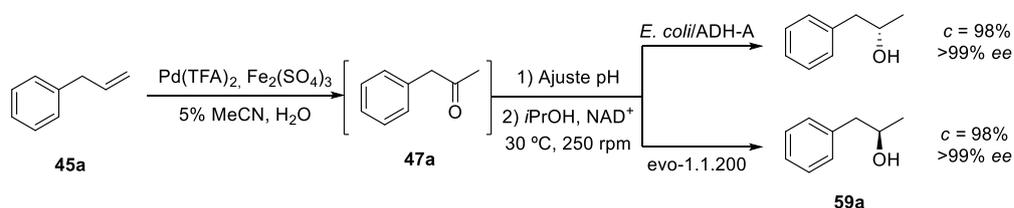
Este sistema también se pudo acoplar de manera secuencial con la oxidación de Wacker-Tsuji, ajustando el pH antes de añadir las enzimas, mostrando que tanto la alaDH como la FDH retienen su actividad en este medio de reacción (Esquema 123). Así, se obtuvo la dextroanfetamina [(*S*)-**48a**] con un 97% de conversión utilizando la TA-P1-G06 donde, al adicionar los diferentes reactivos y cofactores del sistema en forma de disoluciones madre, el pH del medio se ajustaba a 7.5 y la concentración final del sustrato en la reacción quedaba reducida a la mitad (concentración teórica de **47a** de 12.5 mM).

De modo similar, se sintetizaron (*S*)-**48g** con la TA-P1-G06 (92% de conversión) y (*S*)-**48h** con la TA-P1-G05 (87% de conversión) ajustando el pH por medio de una disolución acuosa de NaOH y operando a concentraciones similares a las de la oxidación de Wacker (concentración teórica de **47g-h** ~20 mM).



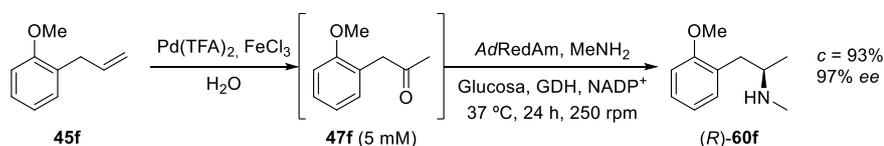
Esquema 123. Proceso secuencial utilizando L-alanina como donador de amino y un sistema multienzimático para desplazar el equilibrio.

Estudiando otro tipo de transformaciones enzimáticas, la reducción asimétrica del grupo carbonilo en alcohol fue posible a través de la biorreducción catalizada por ADHs. Así, los dos enantiómeros del 1-fenilpropan-2-ol (**59a**) se obtuvieron con >99 *ee* a partir del alilbenceno en cascada secuencial empleando dos enzimas con selectividad complementaria (Esquema 124).



Esquema 124. Combinación en cascada secuencial de oxidación de Wacker-Tsuji y biorreducción.

Por último, se estudió la compatibilidad de las RedAms con esta estrategia secuencial que permitirían obtener directamente anfetaminas secundarias como, por ejemplo, los derivados de metanfetamina (*N*-metil-1-fenilpropan-2-aminas) con configuración *R*. Así, utilizando la aminsasa reductiva de *Ajellomyces dermatitidis* (*AdRedAm*), se obtuvo el enantiómero *R* del fármaco metoxifenamina (**60f**) con un 97% de *ee* partiendo de 2-alilanisol (**45f**), diluyendo el crudo de la reacción de oxidación con una disolución reguladora para llevar a cabo el segundo paso a concentración 5 mM de sustrato y a pH 9.



Esquema 125. Combinación de oxidación de Wacker-Tsuji y aminación reductiva asimétrica catalizada por una RedAm.

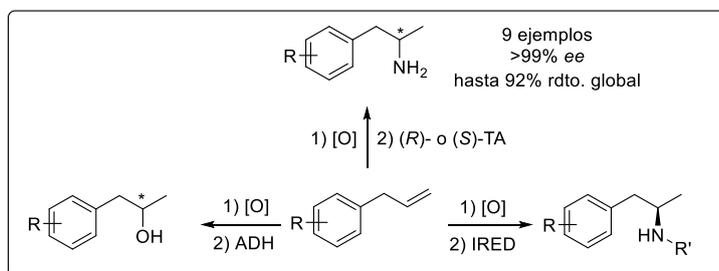
CONCLUSIONES

✓ Se ha optimizado minuciosamente la reacción de Wacker-Tsuji de alilbencenos catalizada por complejos de Pd(II) y utilizando sales de Fe(III) como oxidante terminal en medios acuosos, prestando especial atención a la detección e identificación de todos los subproductos generados en la oxidación.

✓ El estudio de las reacciones de biotransaminación de 1-arylpropan-2-onas ha permitido identificar varias transaminasas que muestran una excelente actividad y selectividad para la obtención de los dos enantiómeros de las correspondientes anfetaminas.

✓ Se ha examinado la compatibilidad entre los pasos de oxidación química y transaminación enzimática, observando que las TAs retienen su actividad en el medio de reacción resultante tras la oxidación, por lo que se ha podido diseñar una cascada secuencial eficiente que permite transformar alilbencenos en las correspondientes anfetaminas, varias de ellas utilizadas como fármacos o precursores inmediatos de compuestos biológicamente activos.

✓ Se ha demostrado la compatibilidad del método de oxidación químico con el uso de otros sistemas enzimáticos en estrategias de desplazamiento del equilibrio paralelas a la transaminasa, así como la posibilidad de realizar otro tipo de transformaciones enzimáticas, como biorreducciones catalizadas por ADHs o aminaciones reductivas utilizando RedAms.



PARTE EXPERIMENTAL

5.7. General

La procedencia de los reactivos químicos, disolventes, biocatalizadores y cofactores es común a lo detallado en los capítulos anteriores. La aminasa reductiva de *Ajellomyces dermatitidis* (AdRedAm) se sobreexpresó en células competentes de *E. coli* (BL21) y, tras la lisis celular por un proceso de sonicación, se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de Ni-NTA.

5.8. Técnicas de análisis

Las técnicas de cromatografía en gel de sílice, RMN, HRMS, punto de fusión y rotación óptica específica se realizaron según se ha descrito en capítulos anteriores.

5.8.1. Cromatografía de gases (CG)

Los análisis por cromatografía de gases se realizaron según lo descrito en capítulos anteriores utilizando las columnas:

- HP-1 y HP-5 quirales para el seguimiento de las reacciones de oxidación y biotransaminación (Tablas 90-92),
- CP-Chirasil-Dex CB para la determinación de los excesos enantioméricos de las aminas obtenidas (Tabla 93).

Tabla 90. Identificación y cuantificación de los subproductos en la oxidación del alilbenceno mediante CG.

Compuesto	HP-1 t_R (min) ^a	HP-5 t_R (min) ^a
Alilbenceno (45a)	4.3	4.5
<i>trans</i> - β -Metilestireno (46a)	6.5	6.8
1-Fenilpropan-2-ona (47a)	8.6	9.3
Propiofenona (49a)	9.4	10.0
Benzaldehído(50a)	4.3	4.9
3-Fenilpropanal (51a)	9.3	10.0
Cinamaldehído (52a)	10.5	12.0

^a Programa de temperaturas: 90/2/10/160/0/40/240 [T_{inicial} (°C)/tiempo (min)/rampa (°C/min)/T (°C)/tiempo (min)/rampa (°C/min)/T_{final} (°C)].

Tabla 91. Separación analítica mediante CG utilizando la columna aquiral HP-1 para las medidas de conversiones en la oxidación/biotransaminación de alilbencenos.

Compuesto	Programa de temperaturas ^a	<i>t_R</i> (min)
45a		4.3
46a		6.5
47a	60/5/10/100/40/200	8.6
48a		8.8
59a		8.9
45b		3.2
46b	90/2/10/160/40/240	4.0
47b		5.1
48b		5.4
45c		3.0
46c	90/2/10/160/40/240	4.0
47c		5.1
48c		5.3
45d		3.1
46d	90/2/10/160/40/240	4.1
47d		5.2
48d		5.3
45e		2.5
46e	90/2/10/160/40/240	3.2
47e		4.3
48e		4.5
45f		4.4
46f	90/2/10/160/40/240	5.7
47f		6.7
60f		7.5
47f	60/2/5/160/40/240	13.5
48f		13.7
45g		5.4
46g	90/2/10/160/40/240	6.1
47g		7.2
48g		7.4
45h		6.1
46h	90/2/10/180/40/300	7.3
47h		8.5
48h		8.7
45i		7.1
46i	90/2/10/180/40/300	9.1
47i		9.3
48i		9.5
45j		8.4
46j	90/2/10/180/40/300	8.9
47j		9.7
48j		9.9

^a T_{inicial} (°C)/tiempo (min)/rampa (°C/min)/T (°C)/tiempo (min)/rampa (°C/min)/T_{final} (°C).

Tabla 92. Separación analítica utilizando la columna HP-1 para el seguimiento de las reacciones de derivados de estireno **53a-g** y 1-octeno (**56**).

Compuesto	Programa de temperaturas ^a	<i>t_R</i> (min)
53a		1.9
54a	80/2/10/110/0/40/240	3.5
55a		2.3
53b		3.9
54b	90/2/10/160/40/240	6.0
55b		5.3
58b		5.8
53c		4.1
54c	90/2/10/160/40/240	6.8
55c		5.4
53d		3.2
54d	90/2/10/160/40/240	5.1
55d		3.7
53e		4.3
54e	90/2/10/160/40/240	5.9
55e		4.9
53f		4.3
54f	90/2/10/160/40/240	6.4
55f		4.8
53g		4.4
54g	90/2/10/160/40/240	6.4
55g		4.9
56	80/2/10/110/0/40/240	1.4
57		2.7

^a T_{inicial} (°C)/tiempo (min)/rampa (°C/min)/T (°C)/tiempo (min)/rampa (°C/min)/T_{final} (°C).

Tabla 93. Separación analítica quiral por CG utilizando la columna Chirasil-Dex CB

Compuesto	Programa de temperaturas ^a	<i>t_R</i> (min)
45e^b	100/10/2/165/15/200	39.9 (<i>S</i>) y 40.8 (<i>R</i>)
59a^c	60/5/3/130/20/180	27.3 (<i>S</i>) y 28.3 (<i>R</i>)

^a T_{inicial} (°C)/tiempo (min)/rampa (°C/min)/T (°C)/tiempo (min)/rampa (°C/min)/T_{final} (°C); ^b medidos a partir del derivado acetilado con anhídrido acético; ^c medidos a partir del derivado acetilado con anhídrido acético y DMAP.

5.8.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Los análisis mediante HPLC se realizaron en un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 con un detector visible-ultravioleta a longitudes de onda 210, 215 y 254 nm (Tabla 94). Se utilizaron las columnas Chiralcel OD, Chiralcel OJ-H,

Chiralpak AD-H, Chiralpak IC y Chiralpak ID (25 cm x 4.6 mm, tamaño de partícula de 5 μ m). Como fase móvil se emplearon mezclas de hexano e isopropanol a un flujo isocrático de 0.8 mL/min.

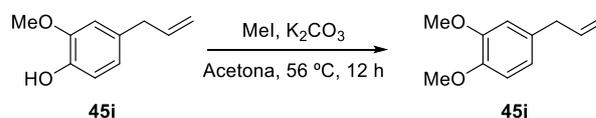
Tabla 94. Separación analítica quiral en HPLC.

Compuesto ^a	Columna	Hexano/ <i>i</i> PrOH	T (°C)	<i>t_R</i> (min)
48a	Chiralcel OD	97:3	40	25.7 (<i>S</i>) y 28.3 (<i>R</i>)
48b	Chiralcel OD	95:5	40	16.8 (<i>S</i>) y 18.5 (<i>R</i>)
48c	Chiralcel OD	95:5	40	14.3 (<i>S</i>) y 16.1 (<i>R</i>)
48d	Chiralcel OD	95:5	40	14.3 (<i>S</i>) y 16.0 (<i>R</i>)
48f	Chiralpak IC	90:10	40	28.5 (<i>S</i>) y 30.6 (<i>R</i>)
48g	Chiralcel OJ-H	95:5	40	24.1 (<i>S</i>) y 26.2 (<i>R</i>)
48h	Chiralpak IC	90:10	40	31.0 (<i>R</i>) y 33.7 (<i>S</i>)
48j	Chiralpak AD-H	95:5	40	27.9 (<i>R</i>) y 31.5 (<i>S</i>)
58b	Chiralpak AD-H	90:10	30	11.2 (<i>R</i>) y 15.2 (<i>S</i>)
60f	Chiralpak ID	95:5	40	35.3 (<i>S</i>) y 38.3 (<i>R</i>)

^b Medidas determinadas a partir de las correspondientes acetamidas obtenidas por acetilación con anhídrido acético.

5.9. Procedimientos sintéticos

5.9.1. Síntesis de 4-alil-1,2-dimetoxibenceno (45j)



A una disolución de eugenol (**45i**, 6.0 mmol, 929 μ L) en acetona (10 mL) se añaden K_2CO_3 (9.0 mmol, 1.24 g) y yoduro de metilo (12.0 mmol, 747 μ L). La mezcla se agita a reflujo durante 12 h y, a continuación, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (10% AcOEt/hexano), obteniendo **45j** como un aceite incoloro (995 mg, 93%).

5.9.2. Síntesis de las 1-arilpropan-2-onas 47a-j

En un matraz tipo Schlenk que contiene una mezcla de Pd(TFA)₂ (2.5 mol%, 2.0 mg), NaTFA (0.05 mmol, 7.0 mg) y la correspondiente sal de hierro(III) (37.5 mM, 150 mg Fe₂(SO₄)₃·H₂O para **47a-e**, 61 mg FeCl₃ para **47f-j**) en agua (9.5 mL) bajo atmósfera de nitrógeno, se añade una disolución del derivado de alilbenceno **45a-j** (0.25 mmol) en acetonitrilo (0.5 mL, 5% v/v). La reacción se agita a 30-60 °C durante 16 h, en ausencia de luz y con el matraz cerrado con un tapón de vidrio. Finalizado este tiempo, la mezcla se extrae con AcOEt (2 x 10 mL), se combinan las fases orgánicas se combinan, se secan con Na₂SO₄ y se filtran. El disolvente se destila en el rotavapor y el crudo de reacción se filtra a través de gel de sílice (10% AcOEt/hexano), obteniendo las cetonas **47a-j** en forma de aceites.

5.9.3. Procedimiento general para los ensayos de biotransaminación de las 1-arilpropan-2-onas 47a-j

En un tubo Eppendorf, se mezcla la correspondiente 1-arilpropan-2-ona (**47a-j**, 0.01 mmol) con un buffer de fosfatos (100 mM, pH 7.5, 500 µL) que contiene *i*PrNH₂ (1.0 M) y PLP (1 mM). A continuación, se adiciona la TA (10.0 mg sobreexpresadas en *E. coli* o 2.0 mg ATAs) y se incuba la mezcla en un agitador orbital durante 24 h a 250 rpm y 30 °C. La reacción se detiene añadiendo una disolución acuosa de NaOH 4 M (200 µL) y se extrae con AcOEt (3 x 500 µL). Finalmente, se lavan las fases orgánicas con agua (500 µL), se secan con Na₂SO₄ y se analizan mediante cromatografía de gases y/o HPLC.

5.9.4. Síntesis de las anfetaminas 48a-j en cascada quimioenzimática secuencial utilizando *i*PrNH₂ como donador de amino

Una disolución del correspondiente alilbenceno **45a-j** (0.0625 mmol) en MeCN (125 µL) se añade sobre una mezcla de Pd(TFA)₂ (2.5 mol%, 0.5 mg), NaTFA (0.0125 mmol, 1.7 mg) y Fe(III) (37.5 mM) en agua (2.4 mL) bajo atmósfera inerte. La reacción se agita a la temperatura adecuada durante el tiempo indicado, tras lo cual se añaden fosfato de isopropilamonio (0.25 M, 172 mg) e isopropilamina (0.15 M, 31 µL), obteniendo una concentración final del

donador de amino 0.9 M y un pH 8.5, PLP (1 mM) y la TA (1:1 en peso respecto al sustrato). La suspensión formada se incuba durante 24 h a 30 °C y 250 rpm, tras lo cual se acidifica con una disolución acuosa de HCl 0.5 M (0.5 mL) y se extrae con AcOEt (2 x 2.5 mL). La fase acuosa se alcaliniza con una disolución acuosa de NaOH 4 M (1 mL) y se extrae con AcOEt (3 x 2.5 mL), se combinan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄ y se filtran. El disolvente se evapora a presión reducida para obtener las anfetaminas **48a-j** en forma de aceites incoloros.

5.9.5. Proceso secuencial de oxidación de Wacker y transaminación utilizando el sistema L-alanina/alaDH para la síntesis de las aminas 48a,g,h

Al correspondiente medio de reacción de la oxidación de Wacker con Pd(II)/Fe(III) que contiene la 1-irilpropan-2-ona (**47a,g,h**, 0.075 mmol, 3.0 mL), se añaden L-alanina (180 mM, 48.1 mg) y formiato amónico (110 mM, 20.8) y se alcaliniza el pH del medio hasta un valor de alrededor de 8 utilizando disoluciones acuosas de NaOH. A continuación, se añaden los cofactores PLP (1 mM), NAD⁺ (1 mM) y las enzimas FDH (15 mg), alaDH (15 µL) y TA (20 mg). La reacción se incuba en un agitador orbital durante 24 h a 30 °C y 250 rpm, tras lo cual se detiene por adición de una disolución acuosa de NaOH 4 M (0.5 mL). Se extrae con AcOEt (2 x 5 mL) y, en caso de ser necesario, se realiza una purificación por extracción ácido-base, tras lo cual se secan las fases orgánicas con Na₂SO₄ y el disolvente se evapora a presión reducida para aislar la correspondiente anfetamina **48a,g,h**.

5.9.6. Cascada secuencial de oxidación de Wacker y biorreducción para la síntesis de 1-fenilpropan-2-ol (59a)

El medio de reacción de la oxidación de alilbenceno en 1-fenilpropan-2-ona (**47a**, 0.025 mmol, 1.0 mL) se neutraliza con una disolución acuosa de NaOH y se añaden NAD⁺ (1 mM), *i*PrOH (25 µL) y la ADH (15 mg de *E. coli*/ADH-A o 0.2 mg de evo-1.1.200 para acceder al alcohol *R* o *S*, respectivamente). La reacción se incuba en un agitador orbital a 30 °C y 250 rpm durante 22 h, tras lo cual se extrae con AcOEt (2 x 1 mL), se seca con Na₂SO₄ y el crudo de reacción se analiza por CG.

5.9.7. Síntesis química de *N*-metil-1-(2-metoxifenil)propan-2-amina racémica (**60f**)

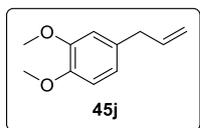
A una disolución de la 1-(2-metoxifenil)propan-2-ona (**47f**, 0.3 mmol, 49 mg) y el clorhidrato de metilamina (3.0 mmol, 203 mg) en MeOH (1 mL) bajo atmósfera de nitrógeno, se añade NaBH₃CN (0.6 mmol, 38 mg) y se agita durante 12 h a temperatura ambiente. La reacción se detiene añadiendo agua (1 mL) y se extrae con CH₂Cl₂ (2 x 5 mL). Las fases orgánicas se combinan y se añade una disolución acuosa de HCl 0.5 M (5 mL), se realizan dos extracciones con CH₂Cl₂ (2 x 5 mL). Se recoge la fase acuosa y se alcaliniza por adición de una disolución acuosa de NaOH 10 M (1 mL). Esta se extrae con CH₂Cl₂ (2 x 5 mL), las fases orgánicas combinadas se secan con Na₂SO₄, se filtran y se evapora el disolvente a presión reducida para obtener **60f** como un aceite incoloro (13 mg, 25%).

5.9.8. Síntesis en cascada de (*R*)-**60f** con RedAms

El medio de reacción de la oxidación de **45f** (100 µL, 0.0025 mmol teóricos de **47f**) se diluye con una reguladora de fosfatos que contiene MeNH₂ (1.5 M, 270 µL), glucosa (15 mM), GDH (5 U), NADP⁺ (1 mM) y se ajusta a pH 9 para un volumen final de 500 µL (concentración final de sustrato 5 mM). Se añade la *Ad*RedAm purificada por columna de Ni (10 µL, 1 mg/mL) y se incuba a 37 °C en un agitador orbital durante 24 h a 250 rpm. La reacción se detiene por adición de una disolución acuosa de NaOH 10 M (20 µL), se extrae con AcOEt (3 x 500 µL), se combinan las fases orgánicas y se secan con Na₂SO₄. El crudo de reacción se analiza mediante CG y HPLC.

5.10. Datos experimentales

4-Alil-1,2-dimetoxibenceno (45j)



Fórmula empírica: C₁₁H₁₄O₂

Peso molecular: 178.23 g/mol

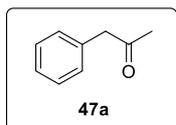
Aspecto: aceite incoloro

Rendimiento: 93% R_f (10% AcOEt/hexano): 0.65

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 3.34 (d, ³J_{HH} = 6.6 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 5.03-5.13 (m, 2H), 5.96 (ddt, ³J_{HH} = 16.8 Hz, ³J_{HH} = 10.1 Hz, ³J_{HH} = 6.7 Hz, 1H), 6.69-6.88 (m, 3H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 39.9 (CH₂), 55.9 (CH₃), 56.1 (CH₃), 111.4 (CH), 112.0 (CH), 115.7 (CH), 120.5 (CH₂), 132.7 (C), 137.8 (CH), 147.5 (C), 149.0 (C) ppm

1-Fenilpropan-2-ona (47a)



Fórmula empírica: C₉H₁₀O

Peso molecular: 134.18 g/mol

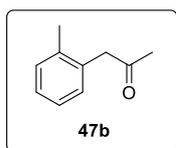
Aspecto: aceite incoloro

Rendimiento: 85% R_f (20% AcOEt/hexano): 0.45

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.15 (s, 3H), 3.70 (s, 2H), 7.17-7.24 (m, 2H), 7.26-7.38 (m, 3H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 29.3 (CH₃), 51.1 (CH₂), 127.1 (CH), 128.8 (2CH), 129.5 (2CH), 134.3 (C), 206.7 (C) ppm

1-(2-Metilfenil)propan-2-ona (47b)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₂O

Peso molecular: 148.21 g/mol

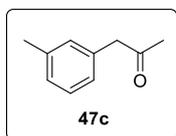
Aspecto: aceite incoloro

Rendimiento: 96% *R_f* (20% AcOEt/hexano): 0.42

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.14 (s, 3H), 2.25 (s, 3H), 3.71 (s, 2H), 7.09-7.23 (m, 4H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 19.8 (CH₃), 29.4 (CH₃), 49.3 (CH₂), 126.4 (CH), 127.5 (CH), 130.5 (CH), 130.6 (CH), 133.3 (C), 137.0 (C), 206.6 (C) ppm

1-(3-Metilfenil)propan-2-ona (47c)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₂O

Peso molecular: 148.21 g/mol

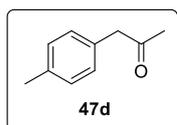
Aspecto: aceite incoloro

Rendimiento: 95% *R_f* (20% AcOEt/hexano): 0.40

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.16 (s, 3H), 2.35 (s, 3H), 3.67 (s, 2H), 6.98-7.12 (m, 2H), 7.09 (d, *J_{HH}* = 7.5 Hz, 1H), 7.23 (t, *J_{HH}* = 7.4 Hz, 1H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 21.5 (CH₃), 29.4 (CH₃), 51.1 (CH₂), 126.5 (CH), 128.0 (CH), 128.8 (CH), 130.3 (CH), 134.1 (C), 138.6 (C), 207.5 (C) ppm

1-(4-Metilfenil)propan-2-ona (47d)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₂O

Peso molecular: 148.21 g/mol

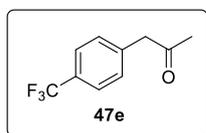
Aspecto: aceite incoloro

Rendimiento: 94% R_f (20% AcOEt/hexano): 0.48

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.14 (s, 3H), 2.34 (s, 3H), 3.65 (s, 2H), 7.06-7.19 (m, 4H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 21.2 (CH₃), 29.3 (CH₃), 50.8 (CH₂), 129.4 (2CH), 129.6 (2CH), 131.3 (C), 136.8 (C), 206.9 (C) ppm

1-[4-(Trifluorometil)fenil]propan-2-ona (47e)



Fórmula empírica: C₁₀H₉F₃O

Peso molecular: 202.18 g/mol

Aspecto: aceite incoloro

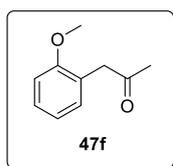
Rendimiento: 78% R_f (20% AcOEt/hexano): 0.43

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.20 (s, 3H), 3.78 (s, 2H), 7.31 (d, ³J_{HH} = 8.0 Hz, 2H), 7.60 (d, ³J_{HH} = 8.1 Hz, 2H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 29.7 (CH₃), 50.4 (CH₂), 125.7 (q, ³J_{CF} = 3.8 Hz, 2CH), 124.2 (q, ¹J_{CF} = 271.7 Hz, C), 129.6 (q, ²J_{CF} = 32.6 Hz, C), 130.0 (2CH), 138.1 (C), 206.2 (C) ppm

RMN-¹⁹F (282.35 MHz, CDCl₃): δ -62.57 ppm

1-(2-Metoxifenil)propan-2-ona (47f)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₂O₂

Peso molecular: 164.20 g/mol

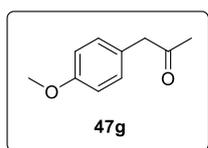
Aspecto: aceite incoloro

Rendimiento: 94% **R_f** (20% AcOEt/hexano): 0.35

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.14 (s, 3H), 3.67 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 6.88 (d, *J*_{HH} = 8.1 Hz, 1H), 6.93 (td, *J*_{HH} = 7.4, 1.0 Hz, 1H), 7.13 (dd, *J*_{HH} = 7.3, 1.6 Hz, 1H), 7.26 (td, *J*_{HH} = 7.8, 1.8 Hz, 1H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 29.4 (CH₃), 45.6 (CH₂), 55.4 (CH₃), 110.5 (CH), 120.8 (CH), 123.7 (C), 128.7 (CH), 131.2 (CH), 157.4 (C), 207.2 (C) ppm

1-(4-Metoxifenil)propan-2-ona (47g)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₂O₂

Peso molecular: 164.20 g/mol

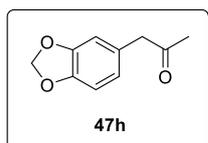
Aspecto: aceite incoloro

Rendimiento: 92% **R_f** (20% AcOEt/hexano): 0.32

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.15 (s, 3H), 3.65 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 6.83-6.90 (m, 2H), 7.08-7.15 (m, 2H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 29.2 (CH₃), 50.2 (CH₂), 53.4 (CH₃), 114.3 (2CH), 126.4 (C), 130.5 (2CH), 158.8 (C), 207.1 (C) ppm

1-(3,4-Metilendioxfenil)propan-2-ona (47h)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₀O₃

Peso molecular: 178.19 g/mol

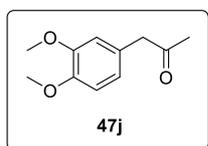
Aspecto: aceite incoloro

Rendimiento: 91% **R_f** (20% AcOEt/hexano): 0.28

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.15 (s, 3H), 3.61 (s, 2H), 5.95 (s, 2H), 6.66 (m, 2H), 6.78 (d, *J*_{HH} = 7.9 Hz, 1H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 29.2 (CH₃), 50.6 (CH₂), 101.1 (CH₂), 108.5 (CH), 109.8 (CH), 122.6 (CH), 127.9 (C), 146.7 (C), 148.0 (C), 206.6 (C) ppm

1-(3,4-Dimetoxifenil)propan-2-ona (47j)



Fórmula empírica: C₁₁H₁₄O₃

Peso molecular: 194.23 g/mol

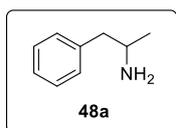
Aspecto: aceite incoloro

Rendimiento: 83% **R_f** (10% AcOEt/hexano): 0.34

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.12 (s, 3H), 3.60 (s, 2H), 3.84 (s, 6H), 6.68 (d, *J*_{HH} = 2.0 Hz, 1H), 6.72 (dd, *J*_{HH} = 8.1, 2.0 Hz, 1H), 6.81 (d, *J*_{HH} = 8.1 Hz, 1H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 29.1 (CH₃), 50.6 (CH₂), 55.9 (CH₃), 55.9 (CH₃), 111.4 (CH), 112.4 (CH), 121.6 (CH), 126.7 (C), 148.2 (C), 149.1 (C), 206.9 (C) ppm

1-Fenilpropan-2-amina (48a)



Fórmula empírica: C₉H₁₃N

Peso molecular: 135.21 g/mol

Aspecto: aceite amarillo

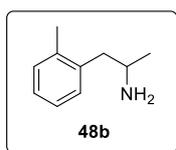
Rendimiento: 78%

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.12 (d, $J_{\text{HH}} = 6.2$ Hz, 3H), 1.54 (sa, 2H), 2.44 (dd, $J_{\text{HH}} = 13.5, 8.0$ Hz, 1H), 2.65 (dd, $J_{\text{HH}} = 13.5, 5.4$ Hz, 1H), 3.10-3.23 (m, 1H), 7.14-7.35 (m, 5H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 23.5 (CH₃), 46.6 (CH₂), 48.6 (CH), 126.3 (CH), 128.5 (2CH), 129.3 (2CH), 139.7 (C) ppm

Rotación óptica específica: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +45.0$ (c 0.2, CHCl₃, >99% *ee* (*S*)-48a); bibliografía $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +31.0$ (c 0.95, CHCl₃, 73% *ee*)²⁸⁹

1-(2-Metilfenil)propan-2-amina (48b)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₅N

Peso molecular: 149.24 g/mol

Aspecto: aceite incoloro

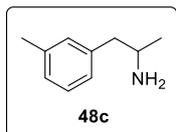
Rendimiento: 85%

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.16 (d, $J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, 3H), 2.32 (s, 3H), 2.42 (sa, 2H), 2.62 (dd, $J_{\text{HH}} = 13.5, 7.8$ Hz, 1H), 2.74 (dd, $J_{\text{HH}} = 13.5, 6.0$ Hz, 1H), 3.14-3.27 (m, 1H), 7.08-7.23 (m, 4H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 19.7 (CH₃), 23.2 (CH₃), 43.4 (CH₂), 47.6 (CH), 126.0 (CH), 126.5 (CH), 130.2 (CH), 130.5 (CH), 136.5 (C), 137.6 (C) ppm

Rotación óptica específica: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +23.3$ (c 0.35, MeOH, >99% *ee* (*S*)-48b)

1-(3-Metilfenil)propan-2-amina (48c)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₅N

Peso molecular: 149.24 g/mol

Aspecto: aceite incoloro

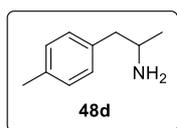
Rendimiento: 92%

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.13 (d, $J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, 3H), 1.83 (sa, 2H), 2.33 (s, 3H), 2.49 (dd, $J_{\text{HH}} = 13.3, 8.1$ Hz, 1H), 2.69 (dd, $J_{\text{HH}} = 13.3, 5.3$ Hz, 1H), 3.10-3.24 (m, 1H), 6.95-7.06 (m, 3H), 7.19 (t, $J_{\text{HH}} = 7.4$ Hz, 1H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 21.5 (CH₃), 23.5 (CH₃), 46.5 (CH₂), 48.6 (CH), 126.4 (CH), 127.1 (CH), 128.4 (CH), 130.1 (CH), 138.1 (C), 139.6 (C) ppm

Rotación óptica específica: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +29.4$ (*c* 0.2, MeOH, >99% *ee* (S)-48c)

1-(4-Metilfenil)propan-2-amina (48d)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₅N

Peso molecular: 149.24 g/mol

Aspecto: aceite incoloro

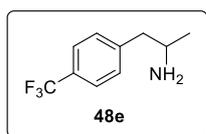
Rendimiento: 90%

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.11 (d, $J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, 3H), 1.50 (sa, 2H), 2.32 (s, 3H), 2.47 (dd, $J_{\text{HH}} = 13.3, 8.1$ Hz, 1H), 2.68 (dd, $J_{\text{HH}} = 13.2, 5.2$ Hz, 1H), 3.06-3.21 (m, 1H), 7.03-7.16 (m, 4H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 19.4 (CH₃), 22.9 (CH₃), 42.0 (CH₂), 49.6 (CH), 129.3 (2CH), 129.5 (2CH), 133.8 (C), 136.7 (C) ppm

Rotación óptica específica: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +37.3$ (*c* 0.2, MeOH, >99% *ee* (S)-48d); bibliografía $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +35.0$ (*c* 1.6, MeOH, 95% *ee*)²⁹⁰

1-[4-(Trifluorometil)fenil]propan-2-amina (48e)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₂F₃N

Peso molecular: 203.21 g/mol

Aspecto: aceite incoloro **Rendimiento:** 70%

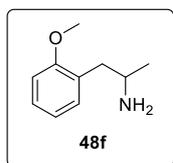
RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.18 (d, $J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, 3H), 2.79 (d, $J_{\text{HH}} = 6.8$ Hz, 2H), 3.29 (hex, $J_{\text{HH}} = 6.5$ Hz, 1H), 3.64 (sa, 2H), 7.32 (d, $J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, 2H), 7.56 (d, $J_{\text{HH}} = 8.0$ Hz, 2H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 22.2 (CH₃), 45.0 (CH₂), 48.6 (CH), 125.5 (q, $^3J_{\text{CF}} = 3.9$ Hz, 2CH), 124.3 (q, $^1J_{\text{CF}} = 271.9$ Hz, C), 128.9 (q, $^2J_{\text{CF}} = 32.5$ Hz, C), 129.7 (2CH), 143.0 (C) ppm

RMN-¹⁹F (282.35 MHz, CDCl₃): δ -62.41 ppm

Rotación óptica específica: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +33.5$ (*c* 0.4, CHCl₃, >99% *ee* (S)-**48d**); bibliografía $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +22.2$ (*c* 1.2, CHCl₃, 90% *ee*)²⁹⁰

1-(2-Metoxifenil)propan-2-amina (48f)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₅NO

Peso molecular: 165.24 g/mol

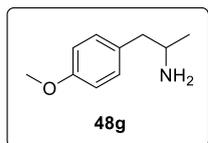
Aspecto: aceite incoloro **Rendimiento:** 87%

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.17 (d, $J_{\text{HH}} = 6.4$ Hz, 3H), 2.44 (dd, $J_{\text{HH}} = 13.1, 7.6$ Hz, 1H), 2.78 (dd, $J_{\text{HH}} = 13.0, 5.8$ Hz, 1H), 2.79 (sa, 2H), 3.23-3.36 (m, 1H), 3.83 (s, 3H), 6.85 (d, $J_{\text{HH}} = 7.8$, 1H), 6.90 (td, $J_{\text{HH}} = 7.4, 1.2$ Hz, 1H), 7.15 (dd, $J_{\text{HH}} = 7.3, 1.6$ Hz, 1H), 7.23 (td, $J_{\text{HH}} = 7.8, 1.7$ Hz, 1H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 22.7 (CH₃), 40.4 (CH₂), 47.4 (CH), 55.4 (CH₃), 110.5 (CH), 120.5 (CH), 127.5 (C), 127.9 (CH), 131.3 (CH), 157.8 (C) ppm

Rotación óptica específica: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +38.8$ (*c* 0.4, CHCl₃, >99% *ee* (S)-**48f**); bibliografía $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +31.8$ (*c* 1.0, CHCl₃, 93% *ee*)²⁸⁹

1-(4-Metoxifenil)propan-2-amina (48g)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₅NO

Peso molecular: 165.24 g/mol

Aspecto: aceite incoloro

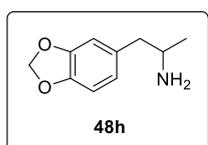
Rendimiento: 84%

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.10 (d, $J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, 3H), 1.75 (sa, 2H), 2.52 (dd, $J_{\text{HH}} = 13.3, 8.1$ Hz, 1H), 2.71 (dd, $J_{\text{HH}} = 13.2, 5.2$ Hz, 1H), 3.04-3.18 (m, 1H), 3.79 (s, 3H), 6.80-6.89 (m, 2H), 7.06-7.13 (m, 2H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 23.7 (CH₃), 45.9 (CH₂), 48.8 (CH), 55.5 (CH₃), 114.0 (2CH), 130.4 (2CH), 132.0 (C), 158.3 (C) ppm

Rotación óptica específica: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +35.3$ (c 0.4, CHCl₃, >99% *ee* (S)-48g); bibliografía $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +35.2$ (c 0.95, CHCl₃, 99% *ee*)²⁸⁹

1-(3,4-Metilendioxfenil)propan-2-amina (48h)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₃NO₂

Peso molecular: 179.22 g/mol

Aspecto: aceite incoloro

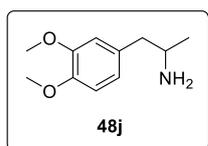
Rendimiento: 85%

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.12 (d, $J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, 3H), 2.41 (sa, 2H), 2.49 (dd, $J_{\text{HH}} = 13.4, 7.8$ Hz, 1H), 2.64 (dd, $J_{\text{HH}} = 13.4, 5.7$ Hz, 1H), 3.07-3.20 (m, 1H), 5.92 (s, 2H), 6.63 (dd, $J_{\text{HH}} = 7.8, 1.5$ Hz, 1H), 6.68 (d, $J_{\text{HH}} = 1.4$ Hz, 1H), 6.74 (d, $J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, 1H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 22.9 (CH₃), 45.7 (CH₂), 48.7 (CH), 100.9 (CH₂), 108.3 (CH), 109.6 (CH), 122.2 (CH), 133.1 (C), 146.1 (C), 147.7 (C) ppm

Rotación óptica específica: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +16.3$ (c 0.4, CHCl₃, >99% *ee* (S)-48h)

1-(3,4-Dimetoxifenil)propan-2-amina (48j)



Fórmula empírica: C₁₁H₁₇NO₂

Peso molecular: 195.26 g/mol

Aspecto: aceite incoloro

Rendimiento: 79%

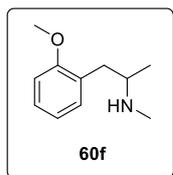
RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.14 (d, $J_{\text{HH}} = 6.3$ Hz, 3H), 2.22 (sa, 2H), 2.51 (dd, $J_{\text{HH}} = 13.3, 8.0$ Hz, 1H), 2.68 (dd, $J_{\text{HH}} = 13.3, 5.5$ Hz, 1H), 3.11-3.24 (m, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 6.70-6.76 (m, 2H), 6.80 (d, $J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz, 1H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 22.1 (CH₃), 44.8 (CH₂), 48.9 (CH), 55.9 (CH₃), 56.0 (CH₃), 111.3 (CH), 112.5 (CH), 121.3 (CH), 131.3 (C), 147.7 (C), 148.9 (C) ppm

Rotación óptica específica: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +31.1$ (*c* 0.2, CHCl₃, >99% *ee* (*S*)-**48j**); bibliografía $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +31.6$ (*c* 2.14, CHCl₃, >99% *ee*)³¹⁷

³¹⁷ A. Iwasaki, Y. Yamada, Y. Ikenaka, J. Hasegawa, *Biotechnol. Lett.* **2003**, *25*, 1843-1846.

N-Metil-1-(2-metoxifenil)propan-2-amina (60f)



Fórmula empírica: C₁₁H₁₇NO

Peso molecular: 179.26 g/mol

Aspecto: aceite incoloro

Rendimiento: 25%

RMN-¹H (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.12 (d, $J_{\text{HH}} = 6.0$ Hz, 3H), 2.48 (s, 3H), 2.64 (dd, $J_{\text{HH}} = 12.4, 6.5$ Hz, 1H), 2.89-3.06 (m, 2H), 3.11-3.24 (m, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.85 (sa, 2H), 6.81-6.93 (m, 2H), 7.13 (dd, $J_{\text{HH}} = 7.3, 1.8$ Hz, 1H), 7.21 (td, $J_{\text{HH}} = 7.8, 1.7$ Hz, 1H) ppm

RMN-¹³C (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 19.0 (CH₃), 33.1 (CH), 37.0 (CH₂), 55.2 (CH₃), 55.4 (CH₃), 110.5 (CH), 120.5 (CH), 127.1 (C), 127.9 (CH), 131.3 (CH), 157.7 (C) ppm

CONCLUSIONES GENERALES

En esta Tesis Doctoral se han desarrollado y optimizado diferentes procesos quimioenzimáticos con una elevada eficiencia mediante el empleo de tres de las clases de enzimas con mayor relevancia en síntesis orgánica: lipasas, alcohol deshidrogenasas y transaminasas.

En el primer capítulo, se ha estudiado la reacción de Baeyer-Villiger de cetonas cíclicas alifáticas a través de un proceso oxidativo mediado por la lipasa de *Candida antarctica* B. En este sistema, la enzima en combinación con el complejo urea-peróxido de hidrógeno cataliza la perhidrólisis del acetato de etilo empleado como disolvente, generando en el medio de reacción el perácido intermedio que lleva a cabo la oxidación química para acceder a las correspondientes lactonas.

En el segundo capítulo, se ha examinado la promiscuidad catalítica que muestran las hidrolasas en mezclas eutécticas de bajo punto de fusión (DES) como disolventes. La lipasa de páncreas porcino ha exhibido una remarcable actividad para catalizar reacciones aldólicas en DES compuestos por cloruro de colina y glicerol, que ha permitido optimizar una metodología sintética eficiente para la adición aldólica de distintas cetonas alifáticas simétricas a derivados de benzaldehído con sustituyentes electroattractores.

En el tercer capítulo, se ha desarrollado una cascada secuencial aplicada a la síntesis de un precursor quirál del fármaco odanacatib basada en un primer paso de acoplamiento cruzado catalizado por paladio, seguido de una biorreducción utilizando la alcohol deshidrogenasa de *Ralstonia* sp. Los dos pasos se han optimizado y combinado consiguiendo un proceso altamente eficiente, completamente enantioselectivo y que puede operar a concentraciones muy elevadas de sustrato.

En el cuarto capítulo, se han sintetizado una serie de aminoalcoholes de forma diástereo- y enantioselectiva en proceso en cascada utilizando ADHs y TAs. Partiendo de varias dicetonas (hetero)arílicas con los dos grupos carbonilo electrónicamente diferenciados se han podido obtener los cuatro posibles estereoisómeros con excelentes rendimientos y selectividades empleando enzimas con enantioselectividades complementarias, estudiando la eficiencia de la cascada quimioenzimática tanto de modo secuencial como concurrente.

Finalmente, en el quinto capítulo se ha desarrollado un proceso *one-pot* secuencial para la síntesis asimétrica de anfetaminas a partir de alilbencenos, algunos obtenidos de fuentes naturales. La oxidación de los sustratos por reacción de Wacker-Tsuji catalizada por Pd(II) se ha optimizado en medio acuoso utilizando sales de Fe(III) como oxidante terminal, obteniendo las correspondientes 1-arilpropan-2-onas intermedias que, sin requerir su aislamiento, se han sometido a un segundo paso de biotransaminación. Utilizando TAs con selectividades complementarias, ha sido posible acceder a los dos enantiómeros de las anfetaminas con excelente selectividad, algunas de ellas con importantes aplicaciones farmacológicas.

REFERENCIAS

1. C. G. Brundtland, *Our common future, the world commission on environmental development*, **1987**, Oxford University Press, Oxford (Reino Unido).
2. R. A. Sheldon, *C. R. Acad. Sci. Paris, Serie IIC, Chimie/Chemistry*, **2000**, *3*, 541-551.
3. R. A. Sheldon, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1437-1451.
4. P. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301-312.
5. R. A. Sheldon, J. M. Woodley, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 801-838.
6. K. Rosenthal, S. Lütz, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2018**, *11*, 58-64.
7. D. L. Hughes, *Org. Process. Res. Dev.* **2018**, *22*, 1063-1080.
8. a) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature*, **2012**, *485*, 185-194; b) R. E. Cobb, R. Chao, H. Zhao, *AIChE J.* **2013**, *59*, 1432-1440; c) M. Höning, P. Sondermann, N. J. Turner, E. M. Carreira, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 8942-8973.
9. R. A. Sheldon, D. Brady, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 6088-6104.
10. J. Zdarta, A. S. Meyer, T. J. Jesionowski, M. Pinelo, *Catalysts*, **2018**, *8*, 92.
11. K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook, 7th Edition*, Springer Nature, Cham (Suiza), **2018**.
12. A. Zaks, A. M. Klivanov, *Science*, **1984**, *224*, 1249-1251.
13. L. Hedstrom, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501-4523.
14. A. M. Klivanov, *Nature*, **2001**, *409*, 241-246; b) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3998-4035.
15. V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *40*, 111-120.
16. R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665.
17. G. de Gonzalo, R. Brieva, V. M. Sánchez, M. Bayod, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8947-8953.
18. J. González-Sabín, V. Gotor, F. Rebolledo, *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 5788-5794.
19. M. López-Iglesias, E. Busto, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 8049-8055.
20. a) E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 313-354; b) E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, PR110-PR180.
21. I. M. Fellows, D. E. Kaelin, S. F. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10781-10787.
22. L. Moni, L. Banfi, A. Basso, L. Carcone, M. Rasparini, R. Riva, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 3411-3428.
23. C. M. Sapu, J.-E. Bäckvall, J. Deska, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9731-9734.

Referencias

24. M. Hall, A. S. Bommarius, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4088-4110.
25. J. Lalonde, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *42*, 152-158.
26. K. Goldberg, K. Schroer, S. Lutz, A. Liese, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 237-248.
27. V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*, 119-130
28. S. K. Ma, J. Gruber, C. Davis, L. Newman, D. Gray, A. Wang, J. Grate, G. W. Huisman, R. A. Sheldon, *Green Chem.* **2010**, *12*, 81-86.
29. J. Liang, J. Lalonde, B. Borup, V. Mitchell, E. Mundorff, N. Trinh, D. A. Kochrekar, R. N. Cherat, G. G. Pai, *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14*, 193-198.
30. G. A. Applegate, D. B. Berkowitz, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1619-1632.
31. F. Xu, J. Y. Chung, J. C. Moore, Z. Liu, N. Yoshikawa, R. S. Hoerrner, J. Lee, M. Royzen, E. Cleator, A. G. Gibson, R. Dunn, K. M. Maloney, M. Alam, A. Goodyear, J. Lynch, N. Yasuda, P. N. Devine, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 1342-1345.
33. P. K. Mehta, T. I. Hale, P. Christen, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *214*, 549-561.
34. a) I. Slabu, J. L. Galman, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 8263-8284; b) S. A. Kelly, S. Pohle, S. Wharry, S. Mix, C. C. R. Allen, T. S. Moody, B. F. Gilmore, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 349-367.
35. A. C. Eliot, J. F. Kirsch, *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 383-415.
36. K. E. Cassimjee, B. Manta, F. A. Himo, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 8453-8464.
37. P. Tufvesson, M. Nordblad, U. Krühne, M. Schürmann, A. Vogel, R. Wohlgemuth, J. M. Woodley, *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 652-660.
38. P. Kelefiotis-Stratidakis, T. Tyrikos-Ergas, I. V. Pavlidis, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 1634-1642.
39. a) A. P. Green, N. J. Turner, E. O'Reilly, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10714-10717; b) L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 1618-1624.
40. C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science*, **2010**, *329*, 305-309.
41. I. V. Pavlidis, M. S. Weiß, M. Genz, P. Spurr, S. P. Hanlon, B. Wirz, H. Iding, U. T. Bornscheuer, *Nat. Chem.* **2016**, *8*, 1076-1082.
42. Z. Peng, J. W. Wong, E. C. Hansen, A. L. Puchlopek-Dermenci, H. J. Clarke, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 860-863.
43. a) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6032-6040; b) I. Nobeli, A. D. Favia, J. M. Thornton, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 157-167; c) O. Khersonsky, D. S. Tawfik, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 471-505.
44. R. D. Gupta, *Sustain. Chem. Process.* **2016**, *4*, 2.

45. K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231-238.
46. Y. Miao, M. Rahimi, E. M. Geertsema, G. J. Poelarends, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2015**, *25*, 115-123.
47. A. Cuetos, M. García-Ramos, E.-M. Fischereeder, A. Díaz-Rodríguez, G. Grogan, V. Gotor, W. Kroutil, I. Lavandera, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3144-3147.
48. M. A. Emmanuel, N. R. Greenberg, D. G. Oblinsky, T. K. Hyster, *Nature*, **2016**, *540*, 414-417.
49. K. F. Biegasiewicz, S. J. Cooper, M. A. Emmanuel, D. C. Miller, T. K. Hyster, *Nat. Chem.* **2018**, *10*, 770-775.
50. B. A. Sandoval, A. J. Meichan, T. K. Hyster, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 11313-11316.
51. a) L. Jiang, E. A. Althoff, F. R. Clemente, L. Doyle, D. Röthlisberger, A. Zanghellini, J. L. Gallaher, J. L. Betker, F. Tanaka, C. F. Barbas, D. Hilvert, K. N. Houk, B. L. Stoddard, D. Baker, *Science*, **2008**, *319*, 1387-1391; b) L. Giger, S. Caner, R. Obexer, P. Kast, D. Baker, N. Ban, D. Hilvert, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 494-498.
52. X. Garrabou, B. I. M. Wicky, D. Hilvert, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 6972-6974.
53. X. Garrabou, T. Beck, D. Hilvert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 5609-5612.
54. X. Garrabou, D. S. Macdonald, B. I. M. Wicky, D. Hilvert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 5288-5291.
55. I. Drienovská, C. Mayer, C. Dulson, G. Roelfes, *Nat. Chem.* **2018**, *10*, 946-952.
56. E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504-4523.
57. C. Branneby, P. Carlqvist, A. Magnusson, K. Hult, T. Brinck, P. Berglund, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 874-875.
58. Z. Guan, L.-Y. Li, Y.-H. He, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 16801-16814.
59. C. Li, X.-W. Feng, N. Wang, Y.-J. Zhou, X.-Q. Yu, *Green Chem.* **2008**, *10*, 616-618.
60. M. Svedendahl, K. Hult, P. Berglund, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17988-17989.
61. M. Svedendahl, B. Jovanovic, L. Fransson, P. Berglund, *ChemCatChem*, **2009**, *1*, 252-258.
62. Z.-G. Le, L.-T. Guo, G.-F. Jiang, X.-B. Yiang, H.-Q. Liu, *Green Chem. Lett. Rev.* **2013**, *6*, 277-281.
63. Y.-F. Lai, H. Zheng, S.-J. Chai, P.-F. Zhang, X.-Z. Chen, *Green Chem.* **2010**, *12*, 1917-1918.
64. K. Li, T. He, C. Li, X.-W. Feng, N. Wang, X.-Q. Yu, *Green Chem.* **2009**, *11*, 777-779.
65. X.-W. Feng, C. Li, N. Wang, K. Li, W.-W. Zhang, Z. Wang, X.-Q. Yu, *Green Chem.* **2009**, *11*, 1933-1936.

Referencias

66. M. López-Iglesias, V. Gotor-Fernández, *Chem. Rec.* **2015**, *15*, 743-759.
67. O. Torre, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Commun.* **2004**, 1724-1725.
68. P. Steunenberg, M. Sijm, H. Zuilhof, J. P. M. Sanders, E. L. Scott, M. C. R. Franssen, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 3802-3813.
69. P. Carlqvist, M. Svedendahl, C. Branneby, K. Hult, T. Brinck, P. Berglund, *ChemBioChem*, **2005**, *6*, 331-336.
70. W.-B. Wu, J.-M. Xu, Q. Wu, D.-S. Lv, X.-F. Lin, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 487-492.
71. F.-W. Lou, B.-K. Liu, J.-L. Wang, Q. Pan, X.-F. Lin, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *60*, 64-68.
72. F.-W. Lou, B.-K. Liu, Q. Wu, D.-S. Lv, X.-F. Lin, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 1959-1962.
73. a) F. Björkling, S. E. Godtfredsen, O. Kirk, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1301-1303; b) F. Björkling, H. Frykman, S. E. Godtfredsen, O. Kirk *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 4587-4592; c) O. Kirk, M. W. Christensen, T. Dambus, S. E. Godtfredsen, *Biocatalysis*, **1994**, *11*, 65-71.
74. A. Timmins, S. P. de Visser, *Catalysts*, **2018**, *8*, 314-339.
75. B. Hofmann, S. Toelzer, I. Pelletier, J. Altenbuchner, K. H. van Pée, H. J. Hecht, *J. Mol. Biol.* **1998**, *279*, 889-900.
76. I. Pelletier, J. Altenbuchner, *Microbiology*, **1995**, *141*, 459-468.
77. M. Picard, J. Gross, E. Lübbert, S. Tölzer, S. Krauss, K.-H. van Pée, A. Berkessel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1196-1199.
78. O. Kirk, L. S. Conrad, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 977-979.
79. a) P. Bernhardt, K. Hult, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2742-2746; b) D. L. Yin, P. Bernhardt, K. L. Morley, Y. Jiang, J. D. Cheeseman, V. Purpero, J. D. Schrag, R. J. Kazlauskas, *Biochemistry*, **2010**, *49*, 1931-1942.
80. C. Z. Dinu, G. Zhu, S. S. Bale, G. Anand, P. J. Reeder, K. Sanford, G. Whited, R. S. Kane, J. S. Dordick, *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 392-398.
81. P. Domínguez de María, *ChemSusChem*, **2011**, *4*, 327-329.
82. S. Duncan, Q. Jing, A. Katona, R. J. Kazlauskas, J. Schilling, U. Tschirner, W. W. Aldajani, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *160*, 1637-1652.
83. a) L. C. Teixeira, J. C. Liden, H. A. Schroeder, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2000**, *84*, 111-127; b) H. R. Lee, R. J. Kazlauskas, T. H. Park, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 12216-12226.
84. Z. Wang, *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken (Estados Unidos), **2010**, pp. 2270-2274.
85. G.-J. ten Brink, I. W. C. E. Arends, R. A. Sheldon, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 4105-4124.

86. C. Carboni-Oerlemans, P. Domínguez de María, B. Tuin, G. Bargeman, A. van der Meer, R. van Gemert, *J. Biotechnol.* **2006**, *126*, 140-151.
87. M. Svedandahl, P. Carlqvist, C. Branneby, O. Allner, A. Frise, K. Hult, P. Berglund, T. Brinck, *ChemBioChem*, **2008**, *9*, 2443-2451.
88. U. K. Sharma, N. Sharma, R. Kumar, R. Kumar, A. K. Sinha, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4846-4848.
89. a) M. R. gen. Klass, S. Warwel, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1997**, *117*, 311-319; b) M. R. gen. Klass, S. Warwel, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1025-1026.
90. A. J. Kotlewska, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, I. W. C. E. Arends, *Green Chem.* **2011**, *13*, 2154-2160.
91. E. G. Ankudey, H. F. Olivo, T. L. Peebles, *Green Chem.* **2006**, *8*, 923-926.
92. E. Milchert, K. Malarczyk, M. Klos, *Molecules*, **2015**, *20*, 21481-21493.
93. a) C. Aouf, E. Durand, J. Lecomte, M. C. Figueroa-Espinoza, E. Dubreucq, H. Fulcrand, P. Villeneuve, *Green Chem.* **2014**, *16*, 1740-1754.
94. a) I. Hilker, D. Bothe, J. Prüss, H.-J. Warnecke, *Chem. Eng. Sci.* **2001**, *56*, 427-432; b) S. Kern, A. Himmelspach, K. Grammann, O. Thum, A. Liese, *Org. Process Res. Dev.* **2016**, *20*, 1930-1936.
95. M. R. gen. Klaas, M. Kunz, S. J. Warwel, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, *7*, 283-289.
96. a) K. Sarma, N. Bhati, N. Borthakur, A. Goswami, *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 8735-8741; b) K. Sarma, A. Goswami, B. C. Goswami, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, *20*, 1295-1300.
97. M. Renz, B. Meunier, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 737-750.
98. M. Y. Rios, E. Salazar, H. F. Olivo, *Green Chem.* **2007**, *9*, 459-462.
99. A. L. Flourat, A. A. M. Peru, A. R. S. Teixeira, F. Brunissen, F. Allais, *Green Chem.* **2015**, *17*, 404-412.
100. A. Drozd, A. Chrobok, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 1230-1233.
101. T. B. Bitencourt, M. da Graça Nascimento, *Green Chem.* **2009**, *11*, 209-214.
102. F. Yang, Z. Wang, X. Zhang, L. Jiang, Y. Li, L. Wang, *ChemCatChem*, **2015**, *7*, 3450-3453.
103. D. Méndez-Sánchez, I. Lavandera, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 3196-3201.
104. D. Méndez-Sánchez, N. Ríos-Lombardía, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Tetrahedron*, **2014**, *70*, 1144-1148.
106. G. Metha, P. S. H. Rao, *Synth. Commun.* **1985**, *15*, 991-1000.
107. a) F. Coelho, M. B. M. de Azevedo, R. Boschiero, P. Resende, *Synth. Commun.* **1997**, *27*, 2455-2465; b) B. M. Trost, J. Xie, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6231-6242.

Referencias

- 109.** C. J. Clark, W.-C. Tu, O. Levers, A. Bröhl, J. P. Hallett, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 747-800.
- 110.** J. S. A. Wilkes, *Green Chem.* **2002**, *4*, 73-80.
- 111.** a) V. Pace, P. Hoyos, L. Castoldi, P. Domínguez de María, A. R. Alcántara, *ChemSusChem*, **2012**, *5*, 1369-1379; b) A. Alcántara, P. Domínguez de María, *Curr. Green Chem.* **2018**, *5*, 85-102.
- 112.** a) J. Chen, S. K. Spear, J. G. Huddleston, R. D. Rogers, *Green Chem.* **2005**, *7*, 64-82; b) M. L. Harrell, T. Malinski, C. Torres-López, K. Gonzalez, J. Suriboot, D. E. Bergbreiter, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 14650-14657.
- 113.** a) C. A. Eckert, B. L. Knuston, P. G. Debenedetti, *Nature*, **1996**, *383*, 313-318; b) H. R. Hobbs, N. R. Thomas, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2786-2820.
- 114.** a) Q. Zhang, K. De Oliveira Vigier, S. Royer, F. Jérôme, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 7108-7416; b) D. A. Alonso, A. Baeza, R. Chinchilla, G. Guillena, I. M. Pastor, D. J. Ramon, *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, 612-632.
- 115.** O. S. Hammond, D. T. Brown, K. J. Edler, *Green Chem.* **2016**, *18*, 2736-2744.
- 116.** a) Y. Liu, J. B. Friesen, J. B. McAlpine, D. C. Lankin, S.-N. Chen, G. F. Pauli, *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 679-690; b) H. Vanda, Y. Dai, E. G. Wilson, R. Verpoorte, Y. H. Choi, *Compte Rendus Chimie*, **2018**, *21*, 628-638.
- 117.** a) Y. Dai, J. van Spronsen, G. J. Witkamp, R. Verpoorte, Y. H. J. Choi, *Nat. Prod.* **2013**, *76*, 2162-2173; b) F. Pena-Pereira, J. Namieśnik, *ChemSusChem*, **2014**, *7*, 1784-1800; c) M. Ruesgas-Ramón, M. C. Figueroa-Espinoza, E. Durand, *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 3591-3601.
- 118.** M. A. Fernández, J. Boiteux, M. Espino, F. J. V. Gomez, M. F. Silva, *Anal. Chim. Acta*, **2018**, *1038*, 1-10.
- 119.** Y. P. Mbous, M. Hayyan, A. Hayyan, W. F. Wong, M. A. Hashim, C. Y. Looi, *Biotechnol. Adv.* **2017**, *35*, 105-145.
- 120.** a) J. García-Álvarez, E. Hevia, V. Capriati, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 6779-6799; b) M. Obst, B. König, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, 4213-4232.
- 121.** a) M. J. Rodríguez-Álvarez, C. Vidal, J. Díez, J. García-Álvarez, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 12927-12929; b) C. Vidal, L. Merz, J. García-Álvarez, *Green Chem.* **2015**, *17*, 3870-3878.
- 122.** a) F. Illgen, B. König, *Green Chem.* **2009**, *11*, 848-854; b) J. Lu, X. T. Li, E. Q. Ma, L. P. Mo, Z. H. Zhang, *ChemCatChem*, **2014**, *6*, 2854-2859.
- 123.** J. García-Álvarez, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2015**, 5147-5157.
- 124.** N. Guajardo, C. R. Müller, R. Schrebler, C. Carlesi, P. Domínguez de María, *ChemCatChem*, **2016**, *8*, 1020-1027.
- 125.** D. Brenna, E. Massolo, A. Puglisi, S. Rossi, G. Celentano, M. Benaglia, V. Capriati, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 2620-2626.

126. C. Vidal, J. García-Álvarez, A. Hernán-Gómez, A. R. Kennedy, E. Hevia, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 5969-5973.
127. C. Vidal, J. García-Álvarez, A. Hernán-Gómez, A. R. Kennedy, E. Hevia, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 16145-16148.
128. V. Mallardo, R. Rizzi, F. C. Sassone, R. Mansueto, F. M. Perna, A. Salomone, V. Capriati, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 8655-8658.
129. F. C. Sassone, F. M. Perna, A. Salomone, S. Florio, V. Capriati, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 9459-9462.
130. X. Marse, J. M. Pérez, D. J. Ramón, *Green Chem.* **2016**, *18*, 826-833.
131. a) R. A. Sheldon, *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 12984-12999; b) P. Xu, G.-W. Zheng, M.-H. Zong, N. Li, W.-Y. Lou, *Bioresour. Bioprocess.* **2017**, *4*, 34-52; c) V. Gotor-Fernández, C. E. Paul, *J. Biotechnol.* **2019**, *293*, 24-35.
132. E. Durand, J. Lecomte, P. Villeneuve, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2013**, *115*, 379-385.
133. J. T. Gorke, F. Srienc, R. J. Kazlauskas, *Chem. Commun.* **2008**, 1235-1237
134. H. Monhemi, M. R. Housaindokht, A. A. Moosavi-Movahedi, M. R. Bozorgmehr, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2014**, *16*, 14882-14895.
135. H. Zhao, G. A. Baker, S. Holmes, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1908-1916.
136. Z. Maugeri, W. Leitner, P. Domínguez de María, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 4223-4228.
137. E. Durand, J. Lecomte, B. Barea, E. Dubreucq, R. Lortie, P. Villeneuve, *Green Chem.* **2013**, *15*, 2275-2282.
138. Z. Maugeri, P. Domínguez de María, *ChemCatChem*, **2014**, *6*, 1535-1537.
139. S. Mao, L. Yu, S. Ji, X. Liu, F. Lu, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2016**, *91*, 1099-1104.
140. B. N. Borse, V. S. Borude, S. R. Shukla, *Curr. Chem. Lett.* **2012**, *1*, 59-68.
141. X. Tian, S. Zhang, L. Zheng, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *26*, 80-88.
142. M. López-Iglesias, E. Busto, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2345-2353.
144. W. Kroutil, M. Rueping, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 2086-2087.
145. J. H. Schrittwieser, S. Velikogne, M. Hall, W. Kroutil, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 270-348.
146. R. C. Simon, N. Richter, E. Busto, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 129-143.
147. a) L. F. Tiede, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 115-136; b) S. F. Mayer, W. Kroutil, K. Faber, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *30*, 332-339. Tiede acuña el término dominó como diferenciador de cascada para procesos que ocurren de forma espontánea por acción simultánea de uno o varios catalizadores y/o reactivos. Faber y colaboradores diferencian, en el ámbito de la Biocatálisis, entre los procesos dominó o cascada,

Referencias

donde en una secuencia sintética espontánea iniciada por un biocatalizador se transforma un sustrato en un producto a través de intermedios muy reactivos, y tándem, donde se combina la acción de varios biocatalizadores que, en principio, podrían actuar por separado. Actualmente, se tiende a integrar todos los procesos que ocurren en un mismo reactor bajo el término cascada.

148. E. García-Junceda, I. Lavandera, D. Rother, J. H. Schrittwieser, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2015**, *114*, 1-6.

149. a) C. Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor, *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 2525-2541; b) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, K. Buehler, *ChemCatChem*, **2010**, *2*, 762-782; c) V. Uppada, S. Bhaduri, S. B. Noronha, *Curr. Sci.* **2014**, *106*, 946-957.

150. a) J.-S. Shin, B.-G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *65*, 206-211; b) D. Koeszelewski, I. Lavandera, D. Clay, D. Rozzell, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 2761-2766; c) D. Koszelewski, I. Lavandera, D. Clay, G. M. Guebitz, D. Rozzell, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9337-9340, d) M. Höhne, S. Köhl, K. Robins, U. T. Bornscheuer, *ChemBioChem*, **2010**, *2*, 73-77.

151. a) C. C. Gruber, I. Lavandera, K. Faber, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1789-1805; b) N. J. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 115-121, c) J. H. Schrittwieser, B. Groenendaal, V. Resch, D. Ghislieri, S. Wallner, E.-M. Fischereider, E. Fuchs, B. Grischek, J. H. Sattler, P. Macheroux, N. J. Turner, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3731-3734.

152. S. P. France, L. J. Hepworth, N. J. Turner, S. L. Flitsch, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 710-724.

153. H. Gröger, W. Hummel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2014**, *19*, 171-179.

154. H. Gröger, *Cooperative catalysis. Designing Efficient Catalysts for Synthesis*, Ed. R. Peters, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2015**, pp. 325-350.

155. S. Schmidt, K. Castiglione, R. Kourist, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 1755-1768.

156. a) O. Pàmies, M. Diéguez, J.-E. Bäckvall, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1567-1586; b) T. Heinisch, T. R. Ward, *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 1711-1721, c) F. Schwizer, Y. Okamoto, T. Heinisch, Y. Gu, M. M. Pellizzoni, V. Lebrun, R. Reuter, V. Köhler, J. C. Lewis, T. R. Ward, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 142-231.

157. V. Köhler, Y. M. Wilson, M. Dürrenberger, D. Ghislieri, E. Churakova, T. Quinto, L. Knörr, D. Häussinger, F. Hollmann, N. J. Turner, T. R. Ward, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 93-99.

158. M. Makkee, A. P. G. Kieboom, H. van Bekkum, J. A. Roels, *J. C. S. Chem. Commun.* **1980**, 930-931.

159. G. de Gonzalo, M. D. Mihovilovic, M. W. Fraaije, *ChemBioChem*, **2010**, *11*, 2208-2231.

160. M. J. Fink, M. Schön, F. Rudroff, M. Schnürch, M. D. Mihovilovic, *ChemCatChem*, **2013**, *5*, 724-727.

161. a) O. Pàmies, J.-E. Bäckvall, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3247-3261; b) O. Verho, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3996-4009; c) O. Långvik, T. Saloranta, D. Y. Murzin, R. Leino, *ChemCatChem*, **2015**, *7*, 4004-4015.
162. A. L. E. Larsson, B. A. Persson, J.-E. Bäckvall, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1211-1212.
163. E. Burda, W. Hummel, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9551-9554.
164. a) A. Prastaro, P. Ceci, E. Chiancone, A. Boffi, R. Cirilli, M. Colone, G. Fabrizi, A. Stringaro, S. Cacchi, *Green Chem.* **2009**, *11*, 1929-1932; b) V. Gauchot, W. Kroutil, A. R. Schmitzer, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 6748-6751; c) S. Borchert, E. Burda, J. Schatz, W. Hummel, H. Gröger, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *84*, 89-93.
165. a) M. Frese, C. Schnepel, H. Minges, H. Voß, R. Feiner, N. Sewald, *ChemCatChem*, **2016**, *8*, 1799-1803; b) L. J. Durak, J. T. Payne, J. C. Lewis, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 1451-1454.
166. J. Latham, J.-M. Henry, H. H. Sharif, B. R. K. Menon, S. A. Shepherd, M. F. Greaney, J. Micklefield, *Nat. Comm.* **2016**, *7*, 11873-11881.
167. A. Boffi, S. Cacchi, P. Ceci, R. Cirilli, G. Fabrizi, A. Prastaro, S. Niembro, A. Shafir, A. Vallribera, *ChemCatChem*, **2011**, *3*, 347-353.
168. C. K. Winkler, G. Tasnádi, D. Clay, M. Hall, K. Faber, *J. Biotechnol.* **2012**, *162*, 381-389.
169. Y. Wang, M. J. Bartlett, C. A. Denard, J. F. Hartwig, H. Zhao, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 2548-2552.
170. Z. Jane Wang, K. N. Clary, R. G. Bergman, K. N. Raymond, F. D. Toste, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 100-103.
171. N. Ríos-Lombardía, C. Vidal, E. Liardo, F. Morís, J. García-Álvarez, J. González-Sabín, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8691-8695.
172. N. Ríos-Lombardía, C. Vidal, M. Cocina, F. Morís, J. García-Álvarez, J. González-Sabín, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 10937-10940.
173. I. Schnapperelle, W. Hummel, H. Gröger, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 1073-1076.
174. H. Sato, W. Hummel, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 4488-4492.
175. T. M. Trnka, R. H. Grubbs, *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 18-29.
176. K. Tenbrink, M. Seßler, J. Schatz, H. Gröger, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2363-2367.
177. C. A. Denard, M. J. Bartlett, Y. Wang, L. Lu, J. F. Hartwig, H. Zhao, *ACS Catal.* **2015**, *5*, 3817-3822-
178. C. A. Denard, H. Huang, M. J. Bartlett, L. Lu, Y. Tan, H. Zhao, J. F. Hartwig, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 475-479.
179. A. G. Baraibar, D. Reichert, C. Mügge, S. Seger, H. Gröger, R. Kourist, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 14823-14827.

Referencias

180. N. J. Turner, E. O'Reilly, *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 285-288.
181. S. Galanie, K. Thodey, I. J. Trenchard, M. F. Interrante, C. D. Smoke, *Science*, **2015**, *349*, 1095-1100.
182. F. López-Gallego, C. Schmidt-Dannert, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 174-183.
183. E. Weber, A. Seifert, M. Antonovici, C. Geinitz, J. Pleiss, V. B. Urlacher, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 944-946.
184. S. Staudt, E. Burda, C. Giese, C. A. Müller, J. Marienhagen, U. Schwaneberg, W. Hummel, K. Drauz, H. Gröger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2359-2363.
185. A. Pennec, F. Hollmann, M. S. Smit, D. J. Opperman, *ChemCatChem*, **2015**, *7*, 236-239.
186. R. Karande, D. Salamanca, A. Schmid, K. Buehler, *Biotechnol. Bioeng.* **2018**, *115*, 312-320.
187. J. H. Sattler, M. Fuchs, F. G. Mutti, B. Grischek, P. Engel, J. Pfeffer, J. M. Woodley, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 14153-14157.
188. a) J. H. Sattler, M. Fuchs, K. Tauber, F. G. Mutti, K. Faber, J. Pfeffer, T. Haas, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9156-9159; b) K. Tauber, M. Fuchs, J. H. Sattler, J. Pitzer, D. Pressnitz, D. Koeszelweski, K. Faber, J. Pfeffer, T. Haas, W. Kroutil, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4030-4035; c) L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Green Chem.* **2017**, *19*, 471-480.
189. a) M. J. Abrahamson, E. Vázquez-Figueroa, N. B. Woodall, J. C. Moore, A. S. Bommarius, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 3969-3972; b) M. J. Abrahamson, J. W. Wong, A. S. Bommarius, *Adv. Synth. Catal.* **2013**, *355*, 1780-1786.
190. a) F. G. Mutti, T. Knauss, N. S. Scrutton, M. Breuer, N. J. Turner, *Science*, **2015**, *349*, 1525-1529; b) F.-F. Chen, Y.-Y. Liu, G.-W. Zheng, J.-H. Xu, *ChemCatChem*, **2015**, *7*, 3838-3841; c) W. Böhmer, T. Knaus, F. Mutti, *ChemCatChem*, **2018**, *10*, 731-735.
191. G. A. Aleku, S. P. France, H. Man, J. Mangas-Sánchez, S. Montgomery, M. Sharma, F. Leipold, S. Hussain, G. Grogan, N. J. Turner, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 961-969.
192. S. L. Montgomery, J. Mangas-Sánchez, M. P. Thompson, G. A. Aleku, B. Dominguez, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 10491-10494.
193. W. Finnigan, A. Thomas, H. Cromar, B. Gough, R. Snajdrova, J. P. Adams, J. A. Littlechild, N. J. Harmer, *ChemCatChem*, **2017**, *9*, 1005-1017.
194. a) T. Pesnot, M. C. Gershater, J. M. Ward, H. C. Hailes, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 2997-3008; b) B. R. Lichman, J. Zhao, H. C. Hailes, J. M. Ward, *Nat. Comm.* **2017**, *8*, 14883-14890.
195. V. Erdmann, B. R. Lichman, J. Zhao, R. C. Simon, W. Kroutil, J. M. Ward, H. C. Hailes, D. Rother, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 12503-12507.
196. B. Seisser, R. Zinkl, K. Gruber, F. Kaufmann, A. Hafner, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 731-736.

197. D. P. Pantaleone, A. M. Geller, P. P. Taylor, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2001**, *11*, 795-803.
198. H. Schütte, W. Hummel, M.-R. Kula, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1985**, *21*, 7-15.
199. E. Busto, R. C. Simon, N. Richter, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 2393-2397.
200. J. A. Kyndt, T. E. Meyer, M. A. Cusanovic, J. J. Von Beeumen, *FEBS Lett.* **2002**, *512*, 240-244.
201. C. Wuensch, S. M. Glueck, J. Gross, D. Koszelewski, M. Schober, K. Faber, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 1974-1977.
202. E. Busto, R. C. Simon, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 10899-10902.
203. D. L. Orsi, R. A. Altman, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 7168-7181.
204. E. P. Gillis, K. J. Eastman, M. D. Hill, D. J. Donnelly, N. A. Meanwell, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 8315-8359.
205. J. Wang, M. Sánchez-Roselló, J. L. Aceña, C. del Pozo, A. E. Sorochinsky, S. Fustero, V. A. Soloshonok, H. Liu, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 2432-2506.
206. J. Y. Gauthier, N. Chauret, W. Cromlish, S. Desmarais, L. T. Duong, J.-P. Falgueyret, D. B. Kimmel, S. Lamontagne, S. Léger, T. LeRiche, C. S. Li, F. Massé, D. J. McKay, D. A. Nicoll-Griffith, R. M. Oballa, J. T. Palmer, M. D. Percival, D. Riendeau, J. Robichaud, G. A. Rodan, S. B. Rodan, C. Seto, M. Thérien, V.-L. Truong, M. C. Venuti, G. Wesolowski, R. N. Young, R. Zamboni, W. C. Black, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 923-928.
207. K. Kassahun, I. McIntosh, K. Koeplinger, L. Sun, J. E. Talaty, D. L. Miller, R. Dixon, S. Zajic, S. A. Stoch, *Drug. Metab. Dispos.* **2014**, *42*, 818-827.
208. J. J. Vermeire, B. M. Suzuki, C. R. Caffrey, *Pharmaceuticals*, **2016**, *9*, 39-47.
209. P. D. O'Shea, C. Chen, D. Gauvreau, F. Gosselin, G. Hughes, C. Nadeau, R. P. Volante, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1605-1610.
210. J. Limanto, A. Shafiee, P. N. Devine, V. Upadhyay, R. A. Desmond, B. R. Foster, D. R. Gauthier, R. A. Reamer, R. P. Volante, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2372-2375.
211. M. D. Truppo, D. J. Pollard, J. C. Moore, P. N. Devine, *Chem. Eng. Sci.* **2008**, *63*, 122-130.
212. M. D. Truppo, G. Hughes, *Org. Process. Res. Dev.* **2011**, *15*, 1033-1035.
213. S. S. Ribeiro, C. Raminelli, A. L. M. Porto, *J. Fluorine Chem.* **2013**, *154*, 53-59.
214. R. O. Lopes, A. S. de Miranda, B. Reichart, T. Glasnov, C. O. Kappe, R. C. Simon, W. Kroutil, L. S. M. Miranda, I. C. R. Leal, R. O. M. A. de Souza, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2014**, *103*, 101-107.
215. C. Rodríguez, W. Borzęcka, J. H. Sattler, W. Kroutil, I. Lavandera, V. Gotor, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 673-681.

Referencias

216. K. Kędziora, F. R. Bisogno, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, J. Montejo-Bernardo, S. García-Granda, W. Kroutil, V. Gotor, *ChemCatChem*, **2014**, *6*, 1066-1072.
217. H. Man, K. Kędziora, J. Kulig, A. Frank, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, D. Rother, S. Hart, J. P. Turkenburg, G. Grogan, *Top Catal.* **2014**, *57*, 356-365.
218. H. G. Naik, B. Yeniad, C. E. Koning, A. Heise, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 4961-4967.
219. K. I. Ziegelmann-Fjeld, M. M. Musa, R. S. Phillips, J. G. Zeikus, C. Vieille, *Prot. Eng. Des. Sel.* **2007**, *20*, 47-55.
220. C. B. Kelly, M. A. Mercadante, N. E. Leadbeater, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11133-11148.
222. H. A. Schenck, P. W. Lenkoswki, I. Choudhury-Mukherjee, S.-H. Ko, J. P. Stables, M. K. Patel, M. L. Brown, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 979-993.
223. J. H. Wynne, C. T. Lloyd, S. D. Jensen, S. Boson, W. M. Stalick, *Synthesis*, **2004**, 2277-2282.
224. H. Zhao, B. Qin, X. Liu, X. Feng, *Tetrahedron*, **2007**, *63*, 6822-6826.
225. S. Wu, J. Guo, M. Sohail, C. Cao, F.-X. Chen, *J. Fluorine Chem.* **2013**, *148*, 19-29.
226. S. J. Dolman, F. Gosselin, P. D. O'Shea, I. W. Davies, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5092-5098.
227. S. M. Lait, D. A. Rankic, B. A. Keay, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 767-796.
228. a) D. Ager, I. Prakash, D. R. Schaad, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 835-876; b) J. L. Vicario, D. Badia, L. Carrillo, E. Reyes, J. Etxebarria, *Curr. Org. Chem.* **2005**, *9*, 219-235.
229. A. M. de Almeida, T. Nascimento, B. S. Ferreira, P. P. de Castro, V. L. Silva, C. G. Diniz, M. Le Hyaric, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 2883-2887
230. Y. Zheng, X. Qiang, R. Xu, Q. Song, C. Tian, H. Liu, W. Li, Z. Tan, Y. Deng, *Bioorg. Chem.* **2018**, *78*, 298-306.
231. V. Gotor, R. Brieva, F. Rebolledo, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 957-958.
232. P. Gupta, N. Mahajan, *New J. Chem.* **2018**, *42*, 12296-12327.
233. N. G. Schmidt, E. Eger, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 4286-4311.
234. M. F. Villegas-Torres, R. J. Martínez-Torres, A. Cázares-Körner, H. Hailes, F. Baganz, J. Ward, *Enzyme Microb. Technol.* **2015**, *81*, 23-30.
235. T. Sehl, H. C. Hailes, J. M. Ward, R. Wardenga, E. von Lieres, E. Offermann, R. Westphal, M. Pohl, D. Rother, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6772-6775.
236. T. Sehl, H. C. Hailes, J. Ward, U. Menyess, M. Pohl, D. Rother, *Green Chem.* **2014**, *16*, 3341-3348.
237. K. E. Cassimjee, C. Branneby, V. Abedi, A. Wells, P. Berglund, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5569-5571.

238. H. Yun, Y. H. Yang, B. K. Cho, B. Y. Hwang, B. G. Kim, *Biotechnol. Lett.* **2003**, *25*, 809-814.
239. J.-W. Zhao, H.-L. Wu, J.-D. Zhang, W.-C. Gao, X.-J. Fan, H.-H. Chang, W.-L. Wei, J.-H. Xu, *Biotechnol. Lett.* **2018**, *40*, 349-358.
240. S. Wu, Y. Zhou, T. Wang, H.-P. Too, D. I. C. Wang, Z. Li, *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11917-11930.
241. J. H. Sattler, M. Fuchs, K. Tauber, F. G. Mutti, K. Faber, J. Pfeffer, T. Haans, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 9156-9159.
242. K. Tauber, M. Fuchs, J. H. Sattler, J. Pitzer, D. Pressnitz, D. Koszelewski, K. Faber, J. Pfeffer, T. Haas, W. Kroutil, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 4030-4035.
243. A. Lerchner, M. Daake, A. Jarasch, A. Skerra, *Protein Eng. Des. Sel.* **2016**, *29*, 557-562.
244. A. M. Deshpande, D. Barawkar, S. Patil, A. Panmand, D. Jadhav, Y. Waman, B. A. Kulkarni, T. Taniguchi, PCT Int. Appl. WO2016021742A1 20160211, **2016**.
245. B. T. Paul, P. N. Devine, L. N. DiMichele, B. Kosjek, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4951-4954.
246. S. Sasaki, T. Yamauchi, H. Kubo, M. Kanai, A. Ishii, K. Higashiyama, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 1497-1500.
247. N. O. Calloway, *Chem. Rev.* **1935**, *17*, 327-392.
248. M. S. Watt, K. I. Booker-Milburn, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 5716-5719.
249. U. Kaulman, K. Smithies, M. E. B. Smith, H. C. Hailes, J. M. Ward, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41*, 628-637.
250. S. Pannuri, S. V. Kamat, A. R. M. Garcia, PCT Int. Appl. WO 2006063336A2 20060615, **2006**.
251. A. Iwasaki, Y. Yamada, N. Kizaki, Y. Ikenaka, J. Hasegawa, *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *69*, 499-505.
252. C. K. Savile, J. M. Janey, E. M. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Georges, *Science*, **2010**, *329*, 305-309.
253. C. E. Paul, M. Rodríguez-Mata, E. Busto, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, S. García-Cerrada, J. Mendiola, Ó. de Frutos, I. Collado, *Org. Process Rev. Dev.* **2014**, *18*, 788-792.
254. A. P. Green, N. J. Turner, E. O'Reilly, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10714-10717.
255. M. López-Iglesias, D. González-Martínez, V. Gotor, E. Busto, W. Kroutil, V. Gotor-Fernández, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 4003-4009.
256. J. Albarrán-Velo, D. González-Martínez, V. Gotor-Fernández, *Biocatal. Biotransf.* **2018**, *36*, 102-130.
257. D. Ghislieri, N. J. Turner, *Top. Catal.* **2014**, *57*, 284-300.

Referencias

258. B. Borowsky, N. Adham, K. A. Jones, R. Raddatz, R. Artymyshyn, K. L. Ogozalek, M. M. Durkin, P. P. Lakhiani, J. A. Bonini, S. Pathirana, N. Boyle, X. Pu, E. Kouranova, H. Lichtblau, F. Y. Ochoa, T. A. Branchek, C. Gerald, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, 98, 8966-8971.
259. M. D. Thompson, D. E. Cole, V. Capra, K. A. Siminovitch, G. E. Rovati, W. M. Burnham, B. K. Rana, *Methods Mol. Biol.* **2014**, 1175, 189-242.
260. A. S. Hauser, S. Chavali, I. Masuho, L. J. Jahn, K. A. Martemyanov, D. E. Gloriam, M. M. Babu, *Cell*, **2018**, 172, 41-54.
261. J. M. Hagel, R. Krizevski, F. Marsolais, E. Lewinsohn, P. J. Facchini, *Trends Plant Sci.* **2012**, 17, 404-412.
262. D. J. Heal, S. L. Smith, J. Gosden, D. J. Nutt, *J. Psychopharmacol.* **2013**, 27, 479-496.
263. Y. Shaobin, L. Zhu, Q. Shen, X. Bai, X. Di, *Behav. Neurol.* **2015**, 1-11.
264. Y.-S. Huang, M.-H. Tsai, *CNS Drugs*, **2011**, 25, 539-554.
265. B. M. Joyce, P. E. Glaser, G. A. Gerhardt, *Psychopharmacology (Berl.)*, **2007**, 191, 669-677.
266. J. T. Cody, S. Valtier, *J. Anal. Toxicol.* **1998**, 22, 299-309.
267. a) P. H. Hutson, M. Pennick, R. Secker, *Neuropharmacology*, **2014**, 87, 41-50; b) K. Ward, L. Citrome, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2018**, 14, 229-238.
268. R. R. Shash, P. D. Stonier, *Ther. Adv. Drug Saf.* **2018**, 9, 475-493.
269. a) E. Heinonen, V. Myllylä, *Drug Saf.* **1998**, 19, 11-22; b) D. S. Robinson, J. D. Amsterdam, *J. Affect. Disord.* **2008**, 105, 15-23.
270. a) I. W. Schiller, F. C. Lowell, *N. Eng. J. Med.* **1949**, 241, 231-233; b) S. Gertreen, B. C. Foster, D. L. Wilson, T. D. Cyr, W. Casley, *Xenobiotica*, **1995**, 25, 895-906.
271. N. R. Srinivas, J. W. Hubbard, E. M. Hawes, G. McKay, K. K. Midha, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **1988**, 487, 61-72.
272. D. Schmidt, B.-L. Källström, B. Waldeck, B. Branscheid, H. Magnussen, K. F. Rabe, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2000**, 361, 405-409.
273. C H. Loh, J. F. Donohue, J. A. Ohar, *Expert Opin. Drug Saf.* **2015**, 14, 463-472.
274. a) G. Franco-Salinas, J. J. M. C. H. de la Rosette, M. C. Michel, *Clin. Pharmacokinet.* **2010**, 49, 177-188; b) Z. Ye, G. Zeng, H. Yang, K. Tang, X. Zhang, H. Li, W. Li, Z. Wu, L. Chen, X. Chen, X. Liu, Y. Deng, T. Pan, J. Xing, S. Wang, Y. Cheng, X. Gu, W. Gao, J. Yang, Y. Zhang, Q. Mi, L. Qi, J. Li, W. Hu, P. Liang, Z. Sun, C. Xu, Y. Long, Y. Liao, S. Liu, G. Liu, X. Xu, W. He, Z. Chen, H. Xu, *Eur. Urol.* **2018**, 73, 385-391.
275. L. E. Dunlap, A. M. Andrews, D. E. Olson, *ACS Chem. Neurosci.* **2018**, 9, 2408-2427.
276. D. E. Nichols, R. Oberlender, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1990**, 600, 613-623.

277. B. D. Heifets, R. C. Malenka, *Cell*, **2016**, *166*, 269-272.
278. a) A. A. Feduccia, J. Holland, M. C. Mithoefer, *Psychopharmacology*, **2018**, *235*, 561-571; b) S. B. Thal, M. J. J. Lommen, *J. Contemp. Psychother.* **2018**, *48*, 99-108.
279. E. G. Pitts, D. W. Curry, K. N. Hampshire, M. B. Young, L. L. Howell, *Psychopharmacology*, **2017**, *235*, 377-392.
280. T. C. Nugent, *Chiral Amine Synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2009**.
281. C.-X. Ye, Y. Y. Melcamu, H.-H. Li, J.-T. Cheng, T.-T. Zhang, Y.-P. Ruan, X. Zheng, X. Lu, P.-Q. Huang, *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 410-419.
282. a) H. Huang, X. Liu, L. Zhou, M. Chang, X. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5309-5312; b) H. Huang, Y. Zhao, Y. Yang, L. Zhou, M. Chang, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 1942-1945.
283. G. Liu, X. Liu, Z. Cai, G. Jiao, G. Xu, W. Tang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4235-4238.
284. S. Li, K. Huang, X. Zhang, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 8878-8881.
285. P. L. Fishbein, J. J. Mencil, WO2010058206A1 20100527, **2010**.
286. K. Popp, H. Meckler, WO2017147375A1 20170831, **2017**.
287. J. Van Dijk, V. G. Keizer, J. F. Peelen, H. D. Moed, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1965**, *84*, 521-539.
288. J. González-Sabín, V. Gotor, F. Rebolledo, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**, *13*, 1315-1320.
289. L. Muñoz, A. M. Rodriguez, G. Rosell, M. P. Bosch, A. Guerrero, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 8171-8177.
290. P. E. Goudriaan, J. Kaiser, H. Ibrahim, G. A. Verspui, D. P. Cox, WO2017003721A1 20170105, **2017**.
291. a) I. Lavandera, D. Koszelewski, W. Kroutil, AT507050A1 20100115, **2010**; b) A. G. Swaminathan, S. V. Joshi, US20140099682A1 20140410, **2014**.
292. E. Liardo, N. Ríos-Lombardía, F. Morís, F. Rebolledo, J. González-Sabín, *ACS Catal.* **2017**, *7*, 4768-4774.
293. K.-U. Baldenius, M. Breuer, K. Ditrich, V. Navickas, F. Mutti, T. Knaus, N. Turner, US20170145451A1 20170525, **2017**.
294. P. Matzel, M. Gand, M. Höhne, *Green Chem.* **2017**, *19*, 385-389.
295. a) J. Smidt, W. Hafner, R. Jira, J. Sedlmeier, R. Sieber, H. Kojer, R. Rüttinger, *Angew. Chem.* **1959**, *71*, 176-186; b) R. Jira, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *49*, 9034-9037.
296. a) J. Tsuji, *Synthesis*, **1984**, 369-384; b) J. J. Li, E. J. Corey, *Name Reactions for Functional Group Transformations*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken (Estados Unidos), **2007**, pp. 309-326.

Referencias

297. a) J. J. Dong, W. R. Browne, B. L. Feringa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *54*, 734-744; b) K.-F. Hu, X.-S. Ning, J.-P. Qu, Y.-B. Kang, *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 11327-11332.
298. T. Mitsudome, K. Mizumoto, T. Mizugaki, K. Jitsukawa, K. Kaneda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 1238-1240.
299. J. A. Keith, P. M. Henry, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 9038-9049
300. P. Kočovský, J.-E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.* **2015**, *21*, 36-56.
301. J. A. Keith, R. J. Nielsen, J. Oxgaard, W. A. Goddard, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12342-12343.
302. W. H. Clement, C. M. Selwitz, *J. Org. Chem.* **1964**, *29*, 241-243.
303. X. Xia, X. Gao, J. Xu, C. Hu, X. Peng, *Synlett*, **2017**, *28*, 607-610.
304. a) M. A. Bigi, M. C. White, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7831-7834; b) D. A. Chaudhari, R. A. Fernandes, *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 2113-2121.
305. ¹ R. A. Fernandes, D. A. Chaudhari, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 5787-5793.
306. b) T. Mitsudome, T. Umetani, N. Nosaka, K. Mori, T. Mizugaki, K. Ebitani, K. Kaneda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 481-485; c) Y.-F. Wang, Y.-R. Gao, S. Mao, Y.-L. Zhang, D.-D. Guo, Z.-L. Yan, S.-H. Guo, Y.-Q. Wang, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1610-1613.
307. a) H. A. Zahalka, K. Januszkiewicz, H. Alper, *J. Mol. Catal.* **1986**, *35*, 249-253; b) E. A. Karakhanov, A. L. Maximov, B. N. Tarasevich, V. A. Skorkin, *Mol. Catal. A: Chem.* **2009**, *297*, 73-79.
308. H. Jiang, Q.-D. Qiao, H. Gong, *Pet. Sci. Technol.* **1999**, *17*, 955-965.
309. J. Zhao, L. Liu, S. Xiang, Q. Liu, H. Chen, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 5613-5616.
310. L. A. Parreira, L. Menini, J. C. C. Santos, E. V. Gusevskaya, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352*, 1533-1538.
311. Y.-F. Wang, Y.-R. Gao, S. Mao, Y.-L. Zhang, D.-D. Guo, Z.-L. Yan, S.-H. Guo, Y.-Q. Wang, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1610-1613.
312. F. Uthoff, H. Sato, H. Gröger, *ChemCatChem*, **2017**, *9*, 555-558.
313. a) A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, S. Kanbak-Aksu, R. A. Sheldon, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 3405-3408; b) A. Díaz-Rodríguez, L. Martínez-Montero, I. Lavandera, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 2321-2329.
314. K. Mitsudo, T. Kaide, E. Nakamoto, K. Yoshida, H. Tanaka, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2246-2247.
316. M. S. Humble, K. E. Cassimjee, M. Håkansson, Y. R. Kimbung, B. Walse, V. Abedi, H.-J. Federsel, P. Berglund, D. T. Logan, *FEBS J.* **2012**, *279*, 779-792.
317. A. Iwasaki, Y. Yamada, Y. Ikenaka, J. Hasegawa, *Biotechnol. Lett.* **2003**, *25*, 1843-1846.