



Universidad de Oviedo

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica

Programa de doctorado: Síntesis y Reactividad Química

**ESTRATEGIAS BIOCATALÍTICAS PARA LA
PREPARACIÓN ENANTIOSELECTIVA DE
ESTRUCTURAS HETEROCÍCLICAS**

Tesis Doctoral

Carlos Pérez Martín

2023



Universidad de Oviedo

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica

Programa de doctorado: Síntesis y Reactividad Química

**ESTRATEGIAS BIOCATALÍTICAS PARA LA
PREPARACIÓN ENANTIOSELECTIVA DE
ESTRUCTURAS HETEROCÍCLICAS**

**Memoria presentada para optar al grado de
Doctor en Química por Carlos Pérez Martín**



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: ESTRATEGIAS BIOCATALÍTICAS PARA LA PREPARACIÓN ENANTIOSELECTIVA DE ESTRUCTURAS HETEROCÍCLICAS.	Inglés: BIOCATALYTIC STRATEGIES FOR THE ENANTIOSELECTIVE PREPARATION OF HETEROCYCLIC STRUCTURES.
2.- Autor	
Nombre: Carlos Pérez Martín	
Programa de Doctorado: Síntesis y Reactividad Química.	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

RESUMEN (en español)

Las estructuras heterocíclicas forman parte del esqueleto de numerosos productos naturales o precursores de interés para la industria farmacéutica. En su mayor parte, se trata de heterociclos (ej. piperidinas, piperazinas, furanos, pirrolidinas...) altamente funcionalizados que presentan carbonos asimétricos. Por ello, las rutas sintéticas para su preparación requieren de un elevado control de la regio-, quimio- y/o enantioselectividad.

En los últimos años, los avances en los métodos biocatalíticos han posibilitado la preparación de una amplia gama de productos de elevado valor añadido. Estos procesos se distinguen por su alta selectividad, bajo costo y respeto por el medio ambiente, alineándose con los principios de la denominada *Química Verde*. Estas cualidades son cruciales en el diseño de cualquier nuevo proceso químico.

Esta Memoria, para una mejor comprensión, se ha dividido en una Introducción general y tres capítulos en los que se han empleado tres de las clases de enzimas con mayor implementación en síntesis orgánica, como son las transaminasas, las alcohol deshidrogenasas y las ene-reductasas.

En la **Introducción** se muestra una visión global de la Biocatálisis, realizando un recorrido por algunos de los grandes hitos que han permitido el desarrollo de esta disciplina hasta el momento actual. Se ha hecho un resumen individual sobre las características más importantes de cada una de las familias de enzimas que han desempeñado un papel en el desarrollo de los capítulos.

En el **Capítulo 1** se ha llevado a cabo la síntesis de piperazinonas y 1,4-diazepanonas ópticamente activas mediante un enfoque biocatalítico empleando transaminasas en el paso clave del proceso. Se han utilizado una serie de ésteres de aminoácidos *N*-(2-oxopropilo), *N*-protegidos como sustratos de partida. La amina, formada tras el paso de transaminación, se cicla espontáneamente en el medio de reacción.

Los resultados se encuentran publicados en el siguiente artículo de investigación:

• “Amine Transaminase Mediated Synthesis of Optically Pure Piperazinones and 1,4-Diazepanones”. C. Pérez-Martín, F. Rebolledo, R. Brieva. *Adv. Synth. Catal.* **2022**, *364*, 1326–1336.

En el **Capítulo 2** se ha diseñado una estrategia quimioenzimática para la síntesis de estructuras de isobenzofuran-1(3*H*)-onas 3-sustituídas en una sola etapa. Como biocatalizadores se utilizaron alcohol deshidrogenasas obteniéndose los productos enantioméricamente enriquecidos. En todos los casos, se pudieron preparar ambos enantiómeros mediante la catálisis con enzimas enantiocomplementarias. La metodología se ha aplicado a un variado grupo de *cetoésteres* metálicos que tras el paso de bioreducción del carbonilo, se ciclan espontáneamente en el medio de reacción.

En el **Capítulo 3** se ha desarrollado una metodología diastereo- y enantioselectiva para sintetizar 3-hidroxipiperidinas con sustitución en la posición *C5* a partir de 1,6-dihidropiridin-3(2*H*)-onas. Para ello se empleó un sistema catalítico bi-enzimático formado por una ene-reductasa y una alcohol



deshidrogenasa en un solo recipiente. Se comprobó la compatibilidad de los biocatalizadores para diseñar las mejores aproximaciones posibles que permitieran acceder mediante cascadas concurrentes o secuenciales a las correspondientes 3-hidroxipiperidinas.

RESUMEN (en Inglés)

Heterocyclic structures are part of the skeleton of many natural products or precursors of interest to the pharmaceutical industry. Most of them are highly functionalized heterocycles (e.g. piperidines, piperazines, furans, pyrrolidines...) with asymmetric carbons. Therefore, synthetic routes for their preparation require high control of the regio-, chemo- and/or enantioselectivity.

In recent years, advances in biocatalytic methods have made possible the preparation of a wide range of high value-added products. These processes are distinguished by their high selectivity, low cost and environmental friendliness, in line with the principles of the so-called *Green Chemistry*. These qualities are crucial in the design of any new chemical process.

This doctoral dissertation, for a better understanding, has been divided into a general Introduction and three chapters in which three of the classes of enzymes with the greatest implementation in organic synthesis have been used, such as transaminases, alcohol dehydrogenases and ene-reductases.

The Introduction provides a comprehensive overview of Biocatalysis, encompassing key milestones that have shaped the evolution of this discipline up to the present. A detailed summary is presented for each enzyme family integral to the chapters, highlighting their crucial characteristics and contributions to the field's advancement.

In **Chapter 1**, the synthesis of optically active piperazinones and 1,4-diazeponones has been carried out through a biocatalytic approach using transaminases in the key step of the process. A series of *N*-(2-oxopropyl), *N*-protected amino acid esters have been used as starting substrates. The amine, formed after the transamination step, spontaneously cyclizes in the reaction medium.

The results are published in the following research article:

- “Amine Transaminase Mediated Synthesis of Optically Pure Piperazinones and 1,4-Diazeponones”. C. Pérez-Martín, F. Rebolledo, R. Brieva. *Adv. Synth. Catal.* **2022**, 364, 1326–1336.

In **Chapter 2**, a chemoenzymatic strategy has been designed for the synthesis of 3-substituted isobenzofuran-1(3*H*)-ones structures in a single step. Alcohol dehydrogenases were used as biocatalysts, obtaining enantiomerically enriched products. In all cases, both enantiomers could be prepared by catalysis with enantiocomplementary enzymes. The methodology has been applied to a varied group of methyl *ketoesters* which, after the carbonyl bioreduction step, spontaneously cyclizes in the reaction medium.

In **Chapter 3**, a diastereo- and enantioselective methodology has been developed to synthesize 3-hydroxypiperidines with substitution in the *C5* position from 1,6-dihydropyridin-3(2*H*)-ones. For this, a bi-enzymatic catalytic system formed by an ene-reductase and an alcohol dehydrogenase in one pot was employed. The compatibility of the biocatalysts was checked to design the best possible approaches that would allow access through concurrent or sequential cascades to the corresponding 3-hydroxypiperidines.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Abreviaturas y Acrónimos

[α]	Rotación óptica específica
δ	Desplazamiento químico
λ	Longitud de onda
2-PrOH	2-Propanol
Ac₂O	Anhídrido acético
AcOEt	Acetato de etilo
AD	Resto de adenina dinucleótido
ADH/ADH's	Alcohol deshidrogenasa(s)
ADH-A	Alcohol deshidrogenasa de <i>Rhodococcus ruber</i>
ADH-T	Alcohol deshidrogenasa de <i>Thermoanaerobacter sp</i>
ADME	Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF*	Ácido fosfórico quiral
AlaDH	Alanina deshidrogenasa
AmDH	Amina deshidrogenasas
API/API's	<i>Active pharmaceutical ingredient</i> (Principios activos farmacéuticos)
ArRmut11	Variante de la transaminasa de <i>Arthrobacter sp.</i>
ArRTA	Transaminasa de <i>Arthrobacter sp.</i>
ArSTA	Transaminasa de <i>Arthrobacter citreus</i>
Asn	Asparagina
ATA/ATA's	Aminotransferasa(s) o transaminasa(s)
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> (Adenosín trifosfato)
BL21 (DE3)	Hacen referencia a una cepa específica de la bacteria <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)
Bn	Bencilo
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo
Boc₂O	Pirocarbonato de di(<i>tert</i> -butilo)
Bu	Butilo
BVE	<i>n</i> -Butil vinil éter
Bz	Benzoilo
c	Concentración
CAL-B	Lipasa B de <i>Candida Antarctica</i> .
CAR	Ácido carboxílico reductasa
CBS	Reducción de Corey-Bakshi-Shibata
Cbz	Benciloxicarbonilo
CDI	1,1-Carbonildiimidazol
CHP	Hidroperóxido de cumilo
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
Cv-ATA/ CvTA	Transaminasa de <i>Chromobacterium violaceum</i>
CYP/CYP's	Citocromo(s) P ₄₅₀
DAST	<i>Diethylaminosulfur trifluoride</i> (Trifluoruro de dietilaminoazufre)
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
de	<i>Diastereomeric excess</i> (Exceso diastereomérico)
DEAD	Diethyl azodicarboxylate (Azodicarboxilato de dietilo)

Abreviaturas y Acrónimos

DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DKR	<i>Dynamic kinetic resolution</i> (Resolución cinética dinámica)
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>dr</i>	<i>Diastereomeric ratio</i> (Proporción diastereomérica)
DROC	<i>Domino ring-opening cyclization</i> (Ciclización dominó de apertura de anillo)
EC	<i>Enzyme Commission</i> (Comisión de enzimas)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>ee</i>	Exceso enantiomérico
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> (Agencia de Protección del Medioambiente)
E-PLP	Complejo covalente enzima-PLP
E·PMP	Complejo unido no covalentemente enzima-PLP
eQNu	<i>epi-Quinine derived urea</i> (urea derivada de quinina)
<i>er</i>	<i>Enantiomeric ratio</i> (Proporción enantiomérica)
ERED/ ERED's	ene-reductasa(s)
ESI	<i>Electrospray ionization</i> (Ionización por electrospray)
Et	Etilo
Et₃N	Trietilamina
EtOH	Etanol
EWG	<i>Electron Withdrawing Group</i> (Grupo aceptor de electrones)
FBDD	<i>Fragment Based Drug Desing</i> (Descubrimiento de fármacos basados en fragmentos)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de Alimentos y Medicamentos)
FDH	Formiato deshidrogenasa
FMN/FMNH₂	Flavín mononucleótido o riboflavina-5'-fosfato/forma reducida
GDH	Glucosa deshidrogenasa
GOasa	Galactosa oxidasa
GP	Grupo protector
Glu	Glucosa
HAT	<i>Hydrogen atom transfer</i> (Transferencia del átomo de hidrógeno)
His	Histidina
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMPA	<i>Hexamethylphosphoramide</i> (Hexametilfosforamida)
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficacia)
HRMS	<i>High-resolution mass spectrometry</i> (Espectros de masas de alta resolución)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HTS	<i>High-Throughput Screening</i> (Cribado masivo de alto rendimiento)
IPA	Isopropilamina (2-propilamina)

Abreviaturas y Acrónimos

IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
IRED	Imino reductasa
IUB	<i>International Union of Biochemistry</i> (Unión Internacional de Bioquímica)
IUBMB	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i> (Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular)
KPi	<i>Potassium phosphate inorganic</i> (Fosfato de potasio)
KR	<i>Kinetic resolution</i> (resolución cinética)
KRED	<i>Ketoreductase</i> (cetoreductasa)
LB	<i>Luria broth</i>
LbADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Lactobacillus brevis</i>
LDA	<i>Lithium diisopropylamide</i> (Diisopropilamida de litio)
LDH	Lactato deshidrogenasa
L-selectride®	Tri- <i>sec</i> -butilborohidruro de litio
Lys	Lisina
MAO-N	Monoamino oxidasa
Mbs	4-Metoxibencenosulfonilo
MDR	<i>Medium-chain dehydrogenases/reductases</i> (ADH's de cadena media)
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
Ms	Mesilo
MTBE	Metil <i>tert</i> -butil éter o <i>tert</i> -butil-metil-éter
MVK	<i>Methyl vinyl ketone</i> (Butenona)
NAD(P)(H)	Dinucleótido de nicotinamina adenina (fosfato) en su forma oxidada/(reducida)
NBP	3-butilisobenzofuran-1(3 <i>H</i>)-ona
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimida
NCS	<i>N</i> -Clorosuccinimida
n.d.	No determinado
NH₄Cl	Nitrilo hidratasa
NMM	N-metilmorfolina
nOe	<i>nuclear Overhauser enhancement</i> (Efecto Overhauser nuclear)
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
OD	<i>Optical density</i> (densidad óptica)
OMe	Metoxilo
OEt	Etoxilo
OYE/ OYE's	<i>Old Yellow Enzyme(s)</i>
PCC	<i>Pyridinium chlorochromate</i> (Clorocromato de piridinio)
Pf	Punto de fusión
Ph	Fenilo
PLP	<i>Pyridoxal 5'-phosphate</i> (Piridoxal-5'-fosfato)

Abreviaturas y Acrónimos

PMP	<i>Pyridoxamine 5'-phosphate</i> (Piridoxamina 5'-fosfato)
ⁱPr	Isopropilo
ⁿPr	<i>n</i> -Propilo
PTSA	<i>p-Toluenesulfonic acid</i> (Ácido <i>p</i> -toluenosulfónico)
<i>p/v</i>	Relación peso/volumen
<i>rac</i>	Racémico
Ras-ADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Ralstonia sp.</i>
RCM	<i>Ring-closing metathesis</i> (Metátesis de cierre de anillo)
RedAm/RedAm's	Aminasa(s) reductiva(s)
Rf	<i>Retardation factor</i> (Factor de retención)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SDR	<i>Short-chain dehydrogenases/reductases</i> (ADH's de cadena corta)
S_N2	Sustitución nucleofílica bimolecular
T	Temperatura
t.a.	Temperatura ambiente
TBHP	<i>tert-Butyl hydroperoxide</i> . (Hidroperóxido de <i>tert</i> -butilo)
TBSOTf	<i>tert-Butyldimethylsilyl trifluoromethanesulfonate</i> . (Trifluorometanosulfonato de <i>tert</i> -butildimetilsililo)
TEMPO	<i>2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxy</i> , (<i>free radical</i>). Radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidin- <i>N</i> -oxilo
TeS-ADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i> (Ácido trifluoroacético)
TFAA	<i>Trifluoroacetic anhydride</i> (Anhídrido trifluoroacético)
THF	Tetrahidrofurano
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> (Cromatografía en capa fina)
TMSCl	<i>Trimethylsilyl chloride</i> (Cloruro de trimetilsililo)
TOF	<i>Time-of-flight</i> (Tiempo de vuelo)
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Ts	Tosilo
Tyr	Tirosina
U	Unidades enzimáticas
uma	Unidad de masa atómica
UV	Ultravioleta
VIH	<i>Human immunodeficiency viruses</i> . (Virus de la inmunodeficiencia humana)
<i>v/v</i>	Relación volumen/volumen
WT	<i>Wild type</i> (tipo salvaje o natural)

INDEX

INTRODUCCIÓN	1
0.1. Biocatálisis: pasado, presente y futuro.....	3
0.2. Química sostenible, los Principios de la Química Verde.....	11
0.3. Los biocatalizadores en síntesis orgánica, la clasificación enzimática.....	14
0.3.1. Aminotransferasas/Transaminasas (ATA's).....	17
0.3.2. Alcohol deshidrogenasas/Cetoreductasas (ADH's/KRED's).....	25
0.3.3. Alqueno reductasas/Ene-reductasas (ERED's).....	33
0.4. Procesos multicatalíticos. Tipos de cascada.....	36
0.5. Biocatálisis, entre la industrial y la academia.....	41
OBJETIVOS GENERALES	45
CAPÍTULO 1. Síntesis de piperazinonas y 1,4-diazepanonas ópticamente puras empleando transaminasas.	
ANTECEDENTES	51
1.1. Importancia de los 1,4-diazoheterociclos.....	53
1.2. Estrategias para la síntesis de anillos de piperazin-2-onas quirales.....	56
1.3. Estrategias biocatalíticas para la síntesis de 1,4-diazo heterociclos.....	61
1.4. Aplicación de transaminasas en la preparación de estructuras relacionadas.....	64
OBJETIVOS	67
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
1.5. Preparación de los materiales de partida y los patrones de referencia.....	73
1.6. Cribado enzimático inicial y optimización de las condiciones de reacción.....	76
1.7. Experimentos en escala semipreparativa.....	88
1.8. Derivatizaciones, síntesis de la piperazina protegida ortogonalmente, (<i>R</i>)- 4a	89
1.9. Asignación de la configuración absoluta.....	90

CONCLUSIONES.....	93
SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	97
1.10. General.....	99
1.11. Técnicas de purificación y análisis.....	100
1.12. Crecimiento y semipurificación de la enzima <i>ArRmut11</i>	101
1.13. Procedimientos sintéticos.....	102
1.14. Procedimientos enzimáticos.....	105
1.15. Datos experimentales de los compuestos sintetizados en este Capítulo.....	108

CAPÍTULO 2. Síntesis enantioselectiva de ftalidas 3-sustituidas empleando alcohol deshidrogenasas.

ANTECEDENTES.....	135
2.1. Importancia de las ftalidas.....	137
2.2. Estrategias no enzimáticas para la síntesis de ftalidas quirales.....	139
2.3. Estrategias enzimáticas para la síntesis de ftalidas quirales..	145
OBJETIVOS.....	149
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	153
2.4. Preparación de los materiales de partida y los patrones de referencia.....	155
2.5. Cribado enzimático inicial y optimización de las condiciones de reacción.....	161
2.6. Experimentos en escala semipreparativa.....	174
2.7. Síntesis de la ftalida (<i>S</i>)- 18m y asignación de la configuración absoluta de los productos.....	176
CONCLUSIONES.....	179
SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	183

2.8. General.....	185
2.9. Procedimientos sintéticos.....	185
2.10. Procedimientos enzimáticos.....	191
2.11. Datos experimentales de los compuestos sintetizados en este Capítulo.....	193

CAPÍTULO 3. Síntesis enantioselectiva de 3-hidroxipiperidinas mediante una cascada bi-enzimática utilizando ene-reductasas y alcohol deshidrogenasas.

ANTECEDENTES.....	217
3.1. Importancia de las piperidinas sustituidas.....	219
3.2. Estrategias no enzimáticas para la síntesis de piperidinas sustituidas.....	220
3.3. Estrategias enzimáticas para la síntesis asimétrica de piperidinas.....	223
3.4. Aplicación de procesos bi-enzimáticos en la preparación de estructuras análogas.....	225
OBJETIVOS.....	227
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	231
3.5. Preparación de los materiales de partida y los patrones de referencia.....	233
3.6. Cribado enzimático inicial y optimización de las condiciones de reacción.....	236
3.7. Experimentos en escala semipreparativa.....	247
3.8. Asignación de la configuración absoluta.....	248
CONCLUSIONES.....	255
SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	259
3.9. General.....	261
3.10. Procedimientos sintéticos.....	261
3.11. Procedimientos enzimáticos.....	266

3.12. Datos experimentales de los compuestos sintetizados en este Capítulo.....	269
CONCLUSIONES GENERALES.....	283

INTRODUCCIÓN

0.1. Biocatálisis: Pasado, Presente y Futuro.

La biocatálisis se ha consolidado, sin ninguna duda, como un área madura y altamente relevante dentro de la síntesis orgánica moderna, tanto en el entorno académico como en el ámbito industrial.

Esta afirmación, se evidencia fácilmente con los datos recopilados de distintas bases científicas, tal como ilustra la Figura 1. En esa gráfica se muestra el resultado de una búsqueda sencilla en SciFinder[®] sobre el término ‘*Biocatalysis*’, el cual arrojó más de 25000 resultados teniendo una tendencia rompedora, en particular, en los últimos 15 años.

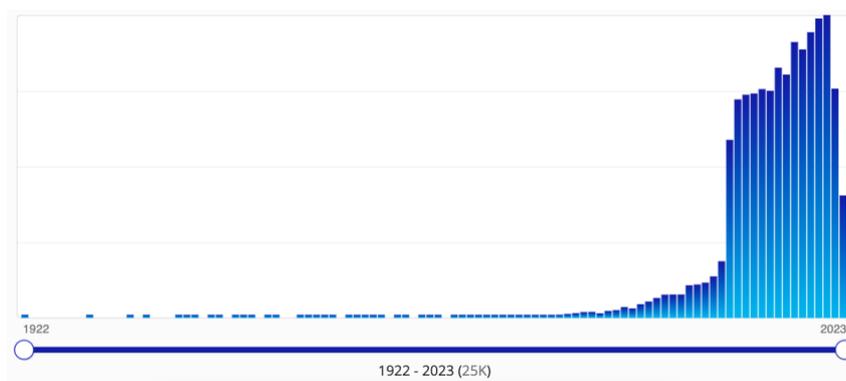


Figura 1. Búsqueda realizada en la base de datos SciFinder[®] (hasta agosto de 2023) en la que se refleja la evolución de la Biocatálisis en la comunidad científica.

La aplicación de enzimas en síntesis orgánica es la definición más sencilla que se puede hacer de *biocatálisis*, entendiendo por ‘*enzimas*’ cualquier tipo de preparación enzimática, ya sea empleando enzimas aisladas/purificadas, células vivas (microorganismos) o *en reposo* (*resting cells*) que contengan la proteína.¹

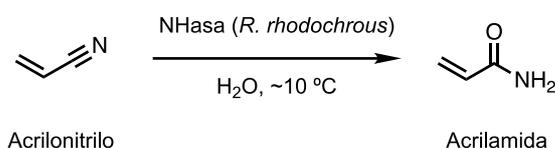
Las *enzimas* se han empleado en una amplia variedad de procesos químicos durante décadas. En la década de los 80, tenemos uno de los primeros ejemplos exitosos de una biotransformación industrial para la fabricación de un producto químico básico de producción masiva.² En él, se aplicó una nitrilo hidratasa (NHasa; EC 4.2.1.84) para la preparación de acrilamida, ya que las NHasas son capaces de catalizar, mediante una hidratación, la transformación de un grupo nitrilo en una amida.

¹ R. A. Sheldon, D. Brady, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 6088–6104.

² H. Yamada, M. Kobayashi, *Biosci. Biotech. Biochem.* **1996**, *60*, 1391–1400.

Introducción

La acrilamida es uno de los productos químicos más importantes, con un consumo mundial entorno a las 200.000 toneladas al año.³ Tiene una variedad amplia de aplicaciones, como la producción de polímeros, adhesivos, productos textiles, tratamiento de aguas (floculante), aditivos, etc.



Esquema 1. Preparación industrial de acrilamida mediante el uso de una NHasa.

En los métodos tradicionales, la regeneración del catalizador, así como la separación y purificación del producto eran procesos complejos debido a la tendencia de la acrilamida a formar polímeros. La biotransformación, por su parte, se lleva a cabo a baja temperatura y en condiciones suaves, lo que permite obtener el producto con una elevada pureza, además de reducir en gran medida los costes económicos del proceso.

Con el transcurso de los años, cada vez más enzimas, como por ejemplo lipasas o alcohol deshidrogenasas (ADH's), se han ido incorporando en la industria. Además, en los últimos años, se ha acelerado en gran medida el descubrimiento de nuevas fuentes de enzimas, lo que ha ampliado significativamente la gama de enzimas disponibles para los investigadores.⁴ Si a ello añadimos los continuos avances logrados en la evolución dirigida, aplicada a la ingeniería de enzimas,⁵ el resultado es una producción de enzimas *a la carta* mucho más rápida y en una escala que va desde los gramos a los kilogramos, mejorando notoriamente el acceso a estos nuevos biocatalizadores.

En este punto, convendría echar un vistazo atrás, recordando alguno de los hitos clave a lo largo de la historia dentro de los campos de la enzimología o la biotecnología (Figura 2), con el fin de comprender el camino que ha permitido el desarrollo de la biocatálisis y su gran relevancia en la actualidad.

Si bien es cierto que desde la antigüedad (alrededor del año 7000 a. C. aprox.),⁶ las civilizaciones más antiguas utilizaban enzimas en diversas prácticas, como la elaboración de cerveza, pan o vino, lo hacían sin un conocimiento consciente de estas moléculas. No fue

³ D. Vasic-Racki (2006). *Industrial Biotransformations*. (Editores: A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey). Wiley-VCH. Capítulo 1. pp. 1–36. ISBN: 9783527310012.

⁴ E. L. Bell, W. Finnigan, S. P. France, A. P. Green, M. A. Hayes, L. J. Hepworth, S. L. Lovelock, H. Niikura, S. Osuna, E. Romero, K. S. Ryan, N. J. Turner, S. L. Flitsch, *Nat. Rev. Methods Primers* **2021**, *1*, 46.

⁵ K. Chen, F. H. Arnold, *Nat. Catal.* **2020**, *3*, 203–213.

⁶ a) P. E. McGovern, J. Zhang, J. Tang, Z. Zhang, G. R. Hall, R. A. Moreau, A. Nuñez, E. D. Butrym, M. P. Richards, C. S. Wang, G. Cheng, Z. Zhao, C. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, *101*, 17593–17598. b) C. M. Heckmann, F. Paradisi, *ChemCatChem* **2020**, *12*, 6082–6102. c) J. B. Pyser, S. Chakrabarty, E. O. Romero, A. R. H. Narayan, *ACS Cent. Sci.* **2021**, *7*, 1105–1116.

sino hasta 1833 que Payen y Persoz descubrieron la diastasa (primera enzima) y la reconocieron como un fermento.⁷ Aunque al principio se creía que todo el microorganismo funcionaba como el catalizador, este descubrimiento cambió la perspectiva al evidenciar que las reacciones observadas estaban mediadas únicamente por componentes específicos del organismo.

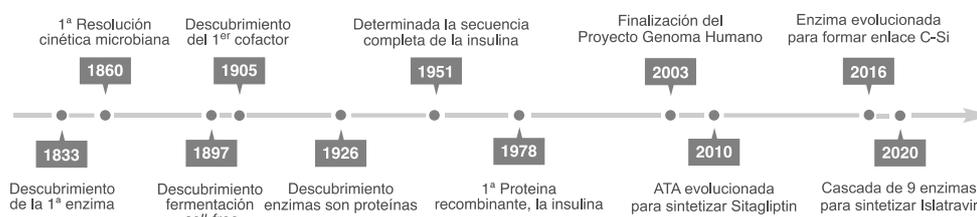


Figura 2. Cronología con algunos de los principales avances en la enzimología/biotecnología.

En 1860, Louis Pasteur⁸ realizó la resolución cinética del ácido tartárico a partir del racemato. Para esta primera resolución microbiana empleó *Penicillium glaucum*, un moho común. Pasteur observó que los microorganismos sólo podían metabolizar uno de los enantiómeros, el (+)-ácido tartárico, lo que resultaba en la degradación de ese ácido y la acumulación del enantiómero no metabolizado, el (-)-ácido tartárico, el cual quedó prácticamente intacto.

Hasta este momento de la historia, los microorganismos eran los únicos capaces de realizar procesos bioquímicos como las fermentaciones. Esto planteó la cuestión de si tales procesos eran manifestaciones de una fuerza vital especial que sólo existía con la materia viva (vitalismo).

En 1897, Eduard Buchner descubrió que los extractos de levadura (*cell-free*) obtenidos después de ser molidas sus células con arena, podían catalizar la conversión de azúcar en alcohol (fermentación alcohólica), generando etanol y CO₂.⁹ Esto llevó a la conclusión de que los procesos bioquímicos no dependen exclusivamente de células vivas, sino que pueden ser impulsados por sustancias, las enzimas, presentes en el interior de esas células. La concesión del Premio Nobel de Química en 1907 a Buchner, supuso el golpe final al vitalismo.

⁷ E. F. Armstrong, *Nature* **1933**, 131, 535–537.

⁸ J. Gal, *Chirality* **2008**, 20, 5–19.

⁹ a) R. Kohler, *J. Hist. Biol.* **1971**, 4, 35–61. b) Eduard Buchner – Facts. *NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach AB 2023*. <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1907/buchner/facts/>>

Introducción

No fue hasta 1926 que se pudo aislar alguna de estas enzimas. James B. Sumner consiguió aislar la primera enzima (ureasa) y confirmó que era una proteína. Sumner fue laureado con el Premio Nobel de Química en 1946 por ello.¹⁰

En 1951, Sanger determinó la estructura (primaria) de la insulina, revelando que, como se esperaba, se trataba de una secuencia definida de aminoácidos unidos por enlaces amida.^{11a,b} Por este trabajo recibió su primer Premio Nobel de Química en 1958.^{11c}

La primera proteína recombinante producida fue la insulina en 1978 y la producción comercial de insulina humana comenzó en 1982 comercializada por *Eli Lilly and Company*.¹² La insulina originalmente se fabricaba a partir de páncreas de animales (cerdos o vacas) y, si bien fue un proceso revolucionario para la época, esta insulina de origen animal, provocaba reacciones adversas en algunos pacientes.¹³ La insulina sintética llegó en la década de los años 70 junto a los descubrimientos en la tecnología del ADN recombinante, un proceso que acabaría eliminando la necesidad de la insulina de origen animal.

Todos estos avances tecnológicos, sumados a los que se fueron propiciando en las décadas posteriores, especialmente en la compresión y manipulación del material genético, ocasionaron una revolución en el campo de la enzimología y la biocatálisis (Premio Nobel de Química en 1980 a Paul Berg por sus estudios relacionados con los ácidos nucleicos, en particular del ADN recombinante).¹⁴ Por primera vez, se pudo identificar y clonar la secuencia de ADN de una enzima de interés, posibilitando su posterior sobreexpresión en *E. coli* (u otro organismo adecuado) y su obtención en cantidades suficientes para ser estudiada y utilizada en diversas aplicaciones.¹⁵

El siguiente gran avance se produjo en las décadas de los años 90 y 2000 de la mano de la evolución dirigida, que permitió la modificación de enzimas por mutagénesis.^{16a} El impacto de esta área de investigación se ejemplifica con el Premio Nobel de Química 2018,^{16b} otorgado a Frances Arnold "por la evolución dirigida de las enzimas." Esta última fase, a menudo conocida en la literatura como tercera 'ola',¹⁷ sentó una base sólida para la adopción

¹⁰ James B. Sumner – Facts. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach AB 2023.

<<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1946/sumner/facts/>>

¹¹ a) F. Sanger, H. Tuppy, *Biochem. J.* **1951**, *49*, 463–481. b) F. Sanger, H. Tuppy, *Biochem. J.* **1951**, *49*, 481–490.

c) *The Nobel Prize in Chemistry 1958*. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach AB 2023.

<<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1958/summary/>>

¹² I. S. Johnson, *Science* **1983**, *219*, 632–637.

¹³ I. B. Hirsch, R. Juneja, J. M. Beals, C. J. Antalis, E. E. Wright, Jr., *Endocr. Rev.* **2020**, *41*, 733–755.

¹⁴ *The Nobel Prize in Chemistry 1980*. NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach AB 2023.

<<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1980/summary/>>

¹⁵ J. Cossy, *Tetrahedron* **2022**, *123*, 132966.

¹⁶ a) M. T. Reetz, *Adv. Synth. Catal.* **2022**, *364*, 3326–3335. b) *The Nobel Prize in Chemistry 2018*.

NobelPrize.org. Nobel Prize Outreach AB 2023. <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/summary/>>

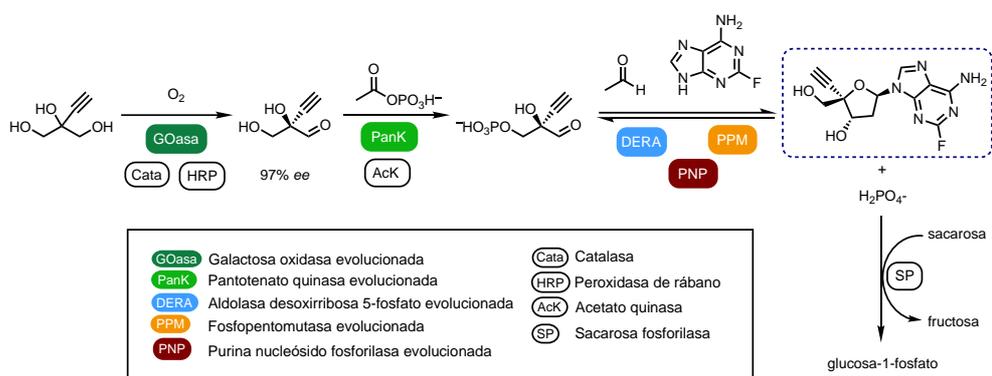
¹⁷ a) U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*,

185–194. b) U. Hanefeld, F. Hollmann, C. E. Paul, *Chem. Soc. Rev.* **2022**, *51*, 594–627.

generalizada de la biocatálisis por parte de la industria, y en particular del sector farmacéutico.

Son muchos los ejemplos que demuestran el enorme potencial de la ingeniería genética aplicada a la biocatálisis. Uno de ellos (Esquema 2) es la ruta diseñada, mediante una colaboración entre las empresas estadounidenses Codexis y Merck, para desarrollar Islatravir (un medicamento en investigación para el tratamiento de la infección por VIH).

En este trabajo se describe una cascada biocatalítica¹⁸ en la que están involucradas un total de nueve enzimas.¹⁹ Cinco de ellas, se diseñaron mediante evolución dirigida para que actuaran sobre sustratos que no eran naturales para sus versiones no evolucionadas, también conocidas como de tipo salvaje o naturales (en inglés se denominan *wild type* o WT). Estas enzimas evolucionadas trabajan en combinación con otras cuatro enzimas auxiliares (WT), que dirigen las reacciones en la dirección adecuada.



Esquema 2. Cascada biocatalítica para la síntesis de Islatravir, en la que participan 5 enzimas evolucionadas y 4 enzimas auxiliares en una única disolución acuosa.

Como punto final de esta sección, se comentarán algunas posibles tendencias en el futuro de la biocatálisis a corto-medio plazo, de una manera sucinta.

La accesibilidad de los biocatalizadores, tanto desde el punto de vista económico (precios cada vez más competitivos), como en relación con la variedad de enzimas que están disponibles comercialmente, ha provocado una tendencia creciente a adoptar la biocatálisis

¹⁸ El término de ‘cascada’ se expondrá más detenidamente en un apartado posterior de la introducción (Sección 0.4.).

¹⁹ M. A. Huffman, A. Fryszkowska, O. Alvizo, M. Borra-Garske, K. R. Campos, K. A. Canada, P. N. Devine, D. Duan, J. H. Forstater, S. T. Grosser, H. M. Halsey, G. J. Hughes, J. Jo, L. A. Joyce, J. N. Kolev, J. Liang, K. M. Maloney, B. F. Mann, N. M. Marshall, M. McLaughlin, J. C. Moore, G. S. Murphy, C. C. Nawrat, J. Nazor, S. Novick, N. R. Patel; A. Rodríguez-Granillo, S. A. Robaire, E. C. Sherer, M. D. Truppo, A. M. Whittaker, D. Verma, L. Xiao, Y. Xu, H. Yang, *Science* **2019**, *366*, 1255–1259.

Introducción

como estrategia para la síntesis sostenible de moléculas complejas, como por ejemplo los productos farmacéuticos.

La consolidación de esta corriente dependerá en gran medida de los nuevos avances que se adopten en la ingeniería de proteínas²⁰ y en el descubrimiento de nuevas actividades enzimáticas, o actividades no canónicas; siendo, como recogen algunos autores, el itinerario previsto para la cuarta ola de la biocatálisis.²¹

Los principales objetivos a desarrollar en esta nueva ola serán el descubrimiento de nuevas clases de enzimas,²² así como la identificación y el desarrollo de actividades no-naturales o promiscuas²³ (concepto que se desarrollará más adelante, ver Sección 0.3.) mediante ingeniería de proteínas o cribado de bibliotecas metagenómicas.

El desarrollo de estas enzimas emergentes expandirá aún más las posibilidades de la biocatálisis, abriendo nuevas vías de transformación que anteriormente estaban limitadas a otras aproximaciones químicas. Se podría decir que, si con la evolución dirigida se consiguió preparar *enzimas a la carta*, el futuro de la biocatálisis podrá disponer de enzimas con *reactividades a la carta*.

Algunos ejemplos actuales dentro de estas nuevas reactividades se muestran en el Esquema 3. En el primer ejemplo seleccionado, el trabajo realizado por Ward y colaboradores,²⁴ se aprovechó la afinidad conocida entre la biotina y la estreptavidina para diseñar metaloenzimas artificiales. Estas metaloenzimas mostraron la capacidad de catalizar la metátesis de olefinas dentro de un ambiente biológico (*in vivo*), siendo esta una reacción no presente de manera natural entre las enzimas.

La interacción biotina-estreptavidina (biot-SAV) es una de las uniones no covalentes más fuertes conocidas en la naturaleza. Además, esta tecnología se emplea ampliamente en el ámbito del análisis clínico en la preparación de biomarcadores.²⁵ En el estudio de Ward y su equipo, realizaron una *biotinilación* de un catalizador de Hoveyda-Grubbs de 2ª generación (biot-Ru) para formar un complejo de unión (biot-Ru-SAV) capaz de cataliza la

²⁰ a) D. C. Miller, S. V. Athavale, F. H. Arnold, *Nat. Synth.* **2022**, *1*, 18–23. b) E. Derat, S. C. L. Kamerlin, *J. Phys. Chem. B* **2022**, *126*, 2449–2451. c) H. Chen, L. Ma, H. Dai, Y. Fu, H. Wang, Y. Zhang, *J. Agric. Food Chem.* **2022**, *70*, 4522–4533.

²¹ U. T. Bornscheuer, *Phil. Trans. R. Soc. A* **2018**, *376*, 20170063.

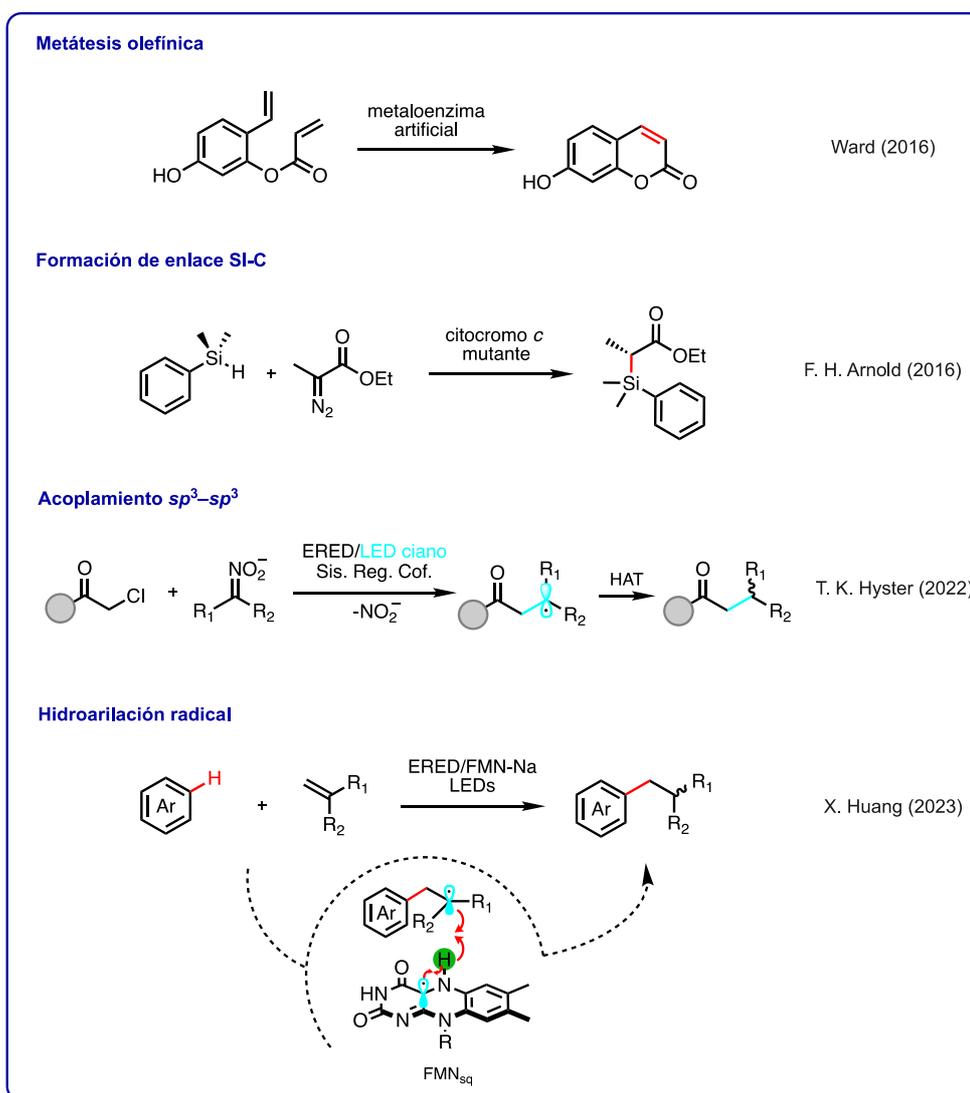
²² a) *Revisión*: J. R. Marshall, J. Mangas-Sánchez, N. J. Turner, *Tetrahedron* **2021**, *82*, 131926. b) [RedAm's] G. A. Aleku, S. P. France, H. Man, J. Mangas-Sánchez, S. L. Montgomery, M. Sharma, F. Leipold, S. Hussain, G. Grogan, N. J. Turner, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 961–969. c) [Degradación de plásticos] V. Tournier, S. Duquesne, F. Guillamot, H. Cramail, D. Taton, *Chem. Rev.* **2023**, *123*, 5612–5701. d) [Friedel-Crafts acilasa] V. Kumar, W. Bruce Turnbull, A. Kumar, *ACS Catal.* **2022**, *12*, 10742–10763. e) [EnelRED] T. W. Thorpe, J. R. Marshall, V. Harawa, R. E. Ruscoe, A. Cuetos, J. D. Finnigan, A. Angelastro, R. S. Heath, F. Parmeggiani, S. J. Charnock, R. M. Howard, R. Kumar, D. S. B. Daniels, G. Grogan, N. J. Turner, *Nature* **2022**, *604*, 86–91.

²³ S. C. Hammer, A. M. Knight, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2017**, *7*, 23–30.

²⁴ M. Jeschek, R. Reuter, T. Heinisch, C. Trindler, J. Klehr, S. Panke, T. R. Ward, *Nature* **2016**, *537*, 661–665.

²⁵ J. H. T. Luong, S. K. Vashist, *ACS Omega* **2020**, *5*, 10–18.

metátesis de cierre de anillo (RCM, del inglés *ring-closing metathesis*) *in vivo*, mediante el empleo de una cepa de *E. coli*. Cabe destacar que el cofactor libre, biot-Ru, es casi inactivo, lo que confiere a la *metatasa* artificial una actividad única de metátesis.



Esquema 3. Ejemplos seleccionados de enzimas diseñadas para catalizar diversas reacciones no naturales.

El grupo de Frances H. Arnold ha sido pionero en la mutación de citocromos P450 mediante evolución dirigida. Ejemplo de ello es el trabajo que presentaron en 2016 en el que

Introducción

lograron catalizar la formación de compuestos organosilícicos.²⁶ En él, detallan como un citocromo *c* de *Rhodothermus marinus* evolucionado logra producir moléculas de organosilicio enantioenriquecidas mediante la inserción de un carbeno en un enlace silicio-hidrógeno en condiciones fisiológicas.

Las enzimas dependientes de un cofactor como la flavina son interesantes debido a su considerable potencial catalítico. Se sabe que, bajo ciertas condiciones de exposición a la luz, las flavoproteínas pueden experimentar una reacción de fotoexcitación, lo que les confiere una nueva actividad inusual (promiscuidad).²⁷ A través de esta fotoexcitación, ya bien sea de los cofactores redox o de los complejos cofactor/sustrato en proteínas como las enereductasas (ERED's), se da acceso a nuevas vías sintéticas que actualmente no tienen comparación.

De este modo, el grupo de Hyster recientemente ha documentado el acoplamiento cruzado sp^3 - sp^3 entre haluros de alquilo y nitroalcanos catalizados por ERED's dependientes de flavina.²⁸

El paso clave de formación del enlace C-C se produce mediante la reacción entre un radical alquilo con un nitroalcano (en forma de nitronato generado *in situ*) para formar un anión de radical nitro que colapsa para formar nitrito y un radical alquilo (Esquema 3, acoplamiento sp^3 - sp^3). Por último, la ERED controla además con precisión la transferencia del átomo de hidrógeno (HAT, del inglés *hydrogen atom transfer*) a este radical alquilo permitiendo controlar la formación de los productos con un alto nivel de enantioselectividad.

También recientemente, Huang y colaboradores han desarrollado un procedimiento basado en la excitación de ERED's con luz para lograr, en este caso, una hidroarilación radical intermolecular de alquenos con arenos ricos en electrones, lo que permite la formación de enlaces sp^2 - sp^3 .²⁹ Después de la activación mediante luz, la ERED excitada (FMN_{ox}^{*}) inicia la oxidación del areno con la transferencia de un solo electrón, generando así el correspondiente catión radical en el areno y llevando la flavina a su forma radical FMN_{sq} (forma parcialmente reducida de la flavina, ver Esquema 3). Finalmente, el catión radical areno se une al alqueno para que, mediante un proceso HAT regulado por la enzima (el H proviene de la flavina), se obtengan los productos de acoplamiento.

²⁶ S. B. J. Kan, R. D. Lewis, K. Chen, F. H. Arnold, *Science* **2016**, *354*, 1048–1051.

²⁷ B. A. Sandoval, A. J. Meichan, T. K. Hyster *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 11313–11316.

²⁸ H. Fu, J. Cao, T. Qiao, Y. Qi, S. J. Charnock, S. Garfinkle, T. K. Hyster, *Nature* **2022**, *610*, 302–307.

²⁹ B. Zhao, J. Feng, L. Yu, Z. Xing, B. Chen, A. Liu, F. Liu, F. Shi, Y. Zhao, C. Tian, B. Wang, X. Huang, *Nat Catal.* **2023**, (doi.org/10.1038/s41929-023-01024-0).

0.2. Química sostenible, los Principios de la Química Verde.

El consumo de energía por parte del ser humano ha ido aumentando drásticamente a lo largo de su historia. Desde el mismo descubrimiento del fuego, pasando por la agricultura, la ganadería y la domesticación de animales, hasta llegar a la Revolución Industrial (siglo XVIII) en la que se generalizó masivamente el uso de los combustibles fósiles (carbón en primer lugar y posteriormente petróleo y gas natural) como fuente de energía.³⁰

Del mismo modo, a medida que se iban desarrollando las distintas industrias, como la química, las cantidades, cada vez más copiosas, de desechos que también se iban generando, comenzaron a gestar una serie de preocupaciones al respecto. Se iniciaron movimientos que señalaban la necesidad de implementar procesos alternativos, que fueran más eficientes en el uso de los recursos, produciendo menos desechos y, todo ello, realizándolo de una manera más segura para las personas y el medio ambiente.³¹

Fue en la década de los 90, cuando varias instituciones entre la que destaca la Agencia de Protección del Medioambiente de los Estados Unidos (EPA, del inglés *Environmental Protection Agency*) impulsaron una serie de normativas (y alicientes económicos), dirigidas al replanteamiento de muchos de los procesos químicos y los tipos de tecnologías presentes hasta ese momento; dando lugar al nacimiento del término «*Química Verde*».³²

El término fue ganando reconocimiento formal, sobre todo con la publicación de los *12 Principios de la Química Verde*, por los químicos Paul Anastas y John Warner en 1998 en su libro: 'Green Chemistry: Theory and Practice'.³³

Estos *doce principios* establecen las pautas a seguir para diseñar procesos y/o productos de una manera más sostenible, minimizando la producción o el uso de sustancias peligrosas, y promoviendo, en la medida de lo posible, la reducción de la contaminación asociada.

La biocatálisis cumple, en la mayoría de las situaciones, con los principios de la química verde. Las reacciones enzimáticas generalmente se realizan bajo condiciones suaves de reacción, siendo los medios predominantemente acuosos³⁴ (disoluciones tamponantes) y

³⁰ P. Intasian, K. Prakinee, A. Phintha, D. Trisrivirat, N. Weeranoppanant, T. Wongnate, P. Chaiyen, *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 10367–10451.

³¹ R. A. Sheldon, J. M. Woodley, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 801–838.

³² V. G. Zuin, I. Eilks, M. Elschami, K. Kümmerer, *Green Chem.* **2021**, *23*, 1594–1608.

³³ P. T. Anastas, J. Warner (1998). *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press. p.30. ISBN: 978-0198502340.

³⁴ Artículos seleccionados sobre el agua y otros solventes empleados en las biotransformaciones: a) M. M. C. H. van Schie, J.-D. Spöring, M. Bocola, P. Domínguez de María, D. Rother, *Green Chem.* **2021**, *23*, 3191–3206. b)

Introducción

en presencia de reactivos de baja toxicidad; minimizando de esta manera, potenciales accidentes, ya bien sean por vertidos, explosiones o incendios, por ejemplo. De esta manera estaría en consonancia con los principios (3), (4), (5), (6) y (12).

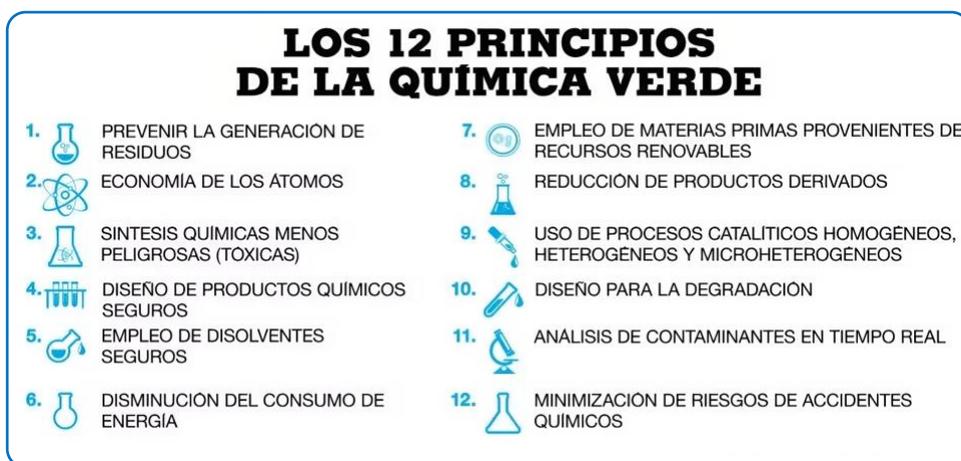


Figura 3. Lista representativa con los enunciados de los 12 Principios de la Química Verde.³⁵

Las enzimas proceden de recursos naturales, son biodegradables y no son tóxicas, lo que las convierte en una alternativa sostenible perfecta. De esa manera, estarían cubiertos los principios (7) y (9).

Gracias a la notable quimioselectividad de la que hacen gala estos biocatalizadores, los procesos de síntesis de moléculas complejas, sobre todo, se vuelven más eficientes. Se evitan pasos intermedios de protección/desprotección de grupos funcionales, así como el aislamiento y purificación de los productos intermedios, principios (1) y (10). Este enfoque minimiza la formación de subproductos indeseables, simplificando en gran medida el monitoreo y análisis de las etapas de reacción, principios (2), (8) y (11).

La biocatálisis, como hemos visto a lo largo de esta introducción, ha emergido como una poderosa herramienta de interés industrial y, además, respetuosa con el medio ambiente, alineándose de manera destacada con los 12 principios de la *química verde*.³⁶ No obstante,

D. Holtmann, F. Hollmann, *Mol. Catal.* **2022**, *517*, 112035. c) Y. Ni, D. Holtmann, F. Hollmann, *ChemCatChem.* **2014**, *6*, 930–943.

³⁵ a) *12 Principles of Green Chemistry.* *acs.org*. Fecha de consulta: 20/08/2023.

<<https://www.acs.org/greenchemistry/principles/12-principles-of-green-chemistry.html>> b) Fuente de la imagen: <<https://www.france24.com/es/20190625-medio-ambiente-quimica-verde-ciencia>> Fecha de consulta: 20/08/2023.

³⁶ A. R. Alcántara, P. Domínguez de María, J. A. Littlechild, M. Schürmann, R. A. Sheldon, R. Wohlgenuth, *ChemSusChem.* **2022**, *15*, e202102709.

como se ha señalado recientemente,³⁷ no siempre es así, ya que, el mero hecho de usar un biocatalizador en una reacción química, no garantiza que el proceso vaya a ser ecológico o que tenga una sostenibilidad garantizada.

Varios autores han propuesto una serie de parámetros para determinar el impacto medioambiental «real» de una transformación química.³⁸ De entre todos ellos, el factor E de Sheldon (kg de residuos/kg de producto) es sin duda el más popular.³⁹

Para un proceso dado, la reducción del impacto ambiental estaría fundamentado en tres puntos: concentración de sustrato, *reciclaje* del medio de reacción y gestión de residuos. Por una parte, si se incrementa la concentración de sustrato, al mejorarse significativamente la eficiencia, el impacto ambiental disminuye, ya que para una misma cantidad de residuos generados (y energía consumida), se genera más producto. Del mismo modo ocurriría si se reutiliza el medio en nuevos ciclos de reacción, ya que la producción de residuos a tratar por ciclo disminuiría.

En los últimos años, se han ido introduciendo otro tipo de avances tecnológicos para mejorar los sistemas biocatalíticos que, además de conseguir procesos más respetuosos con el medio ambiente, son de gran interés para la industria. Entre estas tecnologías, destacan la inmovilización enzimática⁴⁰ y la química de flujo.⁴¹

El uso de enzimas inmovilizadas, al estar soportadas en una matriz, facilita su separación del medio de reacción (recuperabilidad), y además permite su reutilización, lo que reduce la necesidad de producir grandes cantidades de biocatalizadores, ahorrando recursos y energía. Además, al reutilizar el catalizador, se minimizan los residuos asociados al mismo.

La estabilidad de las enzimas también mejora mediante la inmovilización, lo que permite que resista más ciclos de reacción. Esto posibilita también su uso en medios orgánicos o con mayor proporción de cosolvente orgánico, aumentar la solubilidad del sustrato, su carga y la eficiencia global del proceso.

Un paso lógico para mejorar la productividad de las reacciones consiste en integrar las biotransformaciones en sistemas de flujo. Con ello, se reduce la liberación de residuos al medio ambiente, ya que, una vez optimizado el proceso global, el único producto que saldría del reactor sería el deseado y con una elevada pureza.

³⁷ P. Domínguez de María, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2021**, *31*, 100514.

³⁸ a) R. A. Sheldon, *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2018**, *6*, 32–48. b) R. A. Sheldon, M. L. Bode, S. G. Akakios, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2022**, *33*, 100569. c) S. Kar, H. Sanderson, K. Roy, E. Benfenati, J. Leszczynski, *Chem. Rev.* **2022**, *122*, 3637–3710.

³⁹ R. A. Sheldon, *Green Chem.* **2023**, *25*, 1704–1728.

⁴⁰ J. M. Bolivar, J. M. Woodley, R. Fernández-Lafuente, *Chem. Soc. Rev.* **2022**, *51*, 6251–6290.

⁴¹ A. I. Benítez-Mateos, M. L. Contente, D. R. Padrosa, F. Paradisi, *React. Chem. Eng.* **2021**, *6*, 599–611.

Introducción

También, presenta ventajas a la hora de escalar el proceso, permitiendo una reducción en los costes de producción. Se facilita un control preciso de las condiciones de reacción y puede dar pie a procesos de automatización para el funcionamiento en continuo.

Concluyendo con este apartado, el desafío de las próximas décadas radica en seguir impulsando la transición hacia un modelo de trabajo más verde y sostenible. En este sentido, resultará fundamental encontrar un equilibrio entre el impacto ambiental y el desarrollo económico, garantizando un progreso sostenible y respetuoso con nuestro entorno.

0.3. Los biocatalizadores en síntesis orgánica, la clasificación enzimática.

En la actualidad, se han aislado y caracterizado miles de enzimas, la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB) ha reconocido más de 8000 enzimas.⁴² Es por ello que a lo largo de los años se ha planteado la necesidad de clasificarlas bajo un mismo criterio.

En las primeras fases de su estudio, las enzimas a veces se nombraban de manera un tanto arbitraria al no existir directrices para su denominación. En ocasiones, dos enzimas diferentes compartían el mismo nombre, mientras que en otros casos, una misma enzima tenía dos nombres diferentes. Para abordar estas ambigüedades, se estableció un acuerdo internacional para implementar un sistema de nomenclatura común para las enzimas.

De este modo, la Unión Internacional de Bioquímica (IUB, anterior a la actual IUBMB) creó una *Comisión de Enzimas* encargada de establecer una clasificación sistemática de las enzimas. La lista finalmente se publicó en 1961, en donde se reconocieron (inicialmente) seis clases de enzimas basada su clasificación en el tipo de reacción que pueden catalizar, como se muestra en la Tabla 1. No obstante, con los años esta lista se ha ido actualizando y en agosto de 2018, la IUBMB incorporó una nueva clase enzimática (EC 7).

Según este sistema, a cada enzima se le asigna un número EC de cuatro dígitos separados por puntos con la forma general (EC $x^1.x^2.x^3.x^4$), donde EC significa “Enzyme Commission” (Comisión de enzimas).⁴³ El primer dígito (x^1) indica a cuál de las 7 clases pertenece la enzima. Los dos números siguientes reflejan una nueva división en función la

⁴² *ExplorEnz-The Enzyme Database*. Base de datos pública de la IUBMB. Fecha de consulta: 22/08/2022. <<https://www.enzyme-database.org/stats.php>>

⁴³ *Bibliografía consultada*: a) K. Faber (2018). *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*, 7ª Ed. Springer. ISBN 978-3-319-61589-9. b) C. Hoh, M. V. Filho (2006). *Industrial Biotransformations*. (Editores: A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey). Wiley-VCH. Capítulo 2. pp. 37–62. ISBN: 9783527310012. c) H. Gröger, Y. Asano (2012). *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, 3ª Ed. (Editores: K. Drauz, H. Gröger, O. May). Wiley-VCH. Capítulo 1. pp. 1–42. ISBN: 9783527325474.

naturaleza del sustrato o del tipo de cofactor empleado. Por último, el cuarto dígito (x^d) es un número de serie para completar la identificación de la enzima.

Tabla 1. Clasificación enzimática en función del tipo de reacción catalizada.

Nº EC	Nombre de la clase	Tipo de reacción catalizada
1	Oxidorreductasas	Transferencia de electrones (iones hidruro o átomos de H). Reducción de C=O, C=C y C=N; oxidación de C-H, C=C, C-N y C-O.
2	Transferasas	Transferencia de grupos (amino, acilo, fosforilo, metilo, glucosilo, nitro, grupos que contienen azufre, etc...).
3	Hidrolasas	Hidrólisis de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilos, etc., así como las reacciones inversas para formar dichos grupos.
4	Liasas	Ruptura reversible no hidrolítica de enlaces C-C o C-heteroátomo, dejando dobles enlace, anillos o adición de grupos a dobles enlaces.
5	Isomerasas	Reacciones de isomerizaciones como racemizaciones, epimerizaciones y reacciones de reordenación.
6	Ligasas	Formación de enlaces C-C, C-N o C-O mediante reacciones de condensación de dos moléculas o dos partes de una molécula con hidrólisis de ATP o un cofactor similar.
7	Translocasas	Movimiento de iones o moléculas a través de las membranas, o su separación dentro de las mismas.

Por ejemplo, en la enzima EC 2.6.1.18, el primer número, 2, indica que esta enzima pertenece a la clase de las *transferasas*. El número 6 indica que actúa catalizando la transferencia de *grupos nitrogenados*. El 1 que es una enzima del tipo *transaminasas*. Y por último el número de serie ($x^d = 18$) es necesario para la clasificación completa de la enzima; en este caso en concreto haría referencia a ser una enzima del tipo *β -alanina-piruvato transaminasa*.

Es habitual mencionar el origen de la enzima, junto con la clase o subclase más propicia, a pesar de que no se incluye en la clasificación, en vez de utilizar el número EC asignado de la enzima. De este modo, la enzima del ejemplo anterior, se suele denominar más habitualmente como “transaminasa de *Chromobacterium violaceum*”⁴⁴ o de manera reducida Cv-ATA, en vez de la transferasa EC 2.6.1.18.

De igual manera, algunos nombres comerciales de preparados enzimáticos disponibles en el mercado, tampoco se corresponden con la nomenclatura enzimática, por ejemplo, "Novozyme 435™" es una lipasa inmovilizada disponible comercialmente

⁴⁴ M. S. Humble, K. E. Cassimjee, M. Håkansson, Y. R. Kimbung, B. Walse, V. Abedi, H.-J. Federsel, P. Berglund, D. T. Logan, *FEBS Journal* **2012**, 279, 779–792.

Introducción

producida por Novozymes.⁴⁵ Se trata de una lipasa de triacilglicerol (EC 3.1.1.3), también conocida como Lipasa B de *Candida antarctica*.

Una consecuencia de este tipo de clasificación es que un determinado número EC no designa una única proteína enzimática, sino un grupo de proteínas con las mismas propiedades catalíticas. Es decir, el mismo tipo de enzima pero de diferente especie, no recibe un número EC distinto.

También hay que tener en cuenta que la clasificación se hace en función de la capacidad que tiene las enzimas de catalizar su reacción principal correspondiente en su sustrato o sustratos naturales. Sin embargo, en los últimos años⁴⁶ se han identificado enzimas que van más allá de su función principal y muestran actividad en reacciones secundarias con sustratos diferentes o no-naturales. Este fenómeno se conoce como "promiscuidad catalítica" y es un área emergente con un gran potencial.⁴⁷

Tanto las enzimas naturales como las versiones mutantes por evolución dirigida que exhiben estas actividades promiscuas se pueden emplear para el desarrollo de nuevas funciones catalíticas. Sin embargo, es importante destacar que la nomenclatura que se sigue para estas enzimas aún se basa en su actividad principal conocida.

A lo largo de los próximos capítulos que conforman esta Tesis Doctoral se emplearán tres tipos de enzimas, de los grupos EC 1 y EC 2. Más concretamente, las transaminasas (en el primer capítulo), las alcohol deshidrogenasas (segundo y tercer capítulo) y, por último, las ene-reductasas (tercer capítulo).

A continuación, se hará una descripción más detallada de estos biocatalizadores, destacando sus características más importantes, mecanismos de acción y algún ejemplo de su aplicación en procesos a escala industrial.

⁴⁵ C. Ortiz, M. L. Ferreira, O. Barbosa, J. C. S. dos Santos, R. C. Rodrigues, Á. Berenguer-Murcia, L. E. Briand, R. Fernández-Lafuente, *Catal. Sci. Technol.* **2019**, *9*, 2380–2420.

⁴⁶ *Ejemplos de promiscuidad catalítica recientes*: a) A. Cuetos, M. García-Ramos, E. Fischereeder, A. Díaz-Rodríguez, G. Grogan, V. Gotor, W. Kroutil, I. Lavandera, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3144–3147. b) B. A. Sandoval, A. J. Meichan, T. K. Hyster, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 11313–11316. c) K. F. Biegasiewicz, S. J. Cooper, M. A. Emmanuel, D. C. Miller, T. K. Hyster, *Nature Chem* **2018**, *10*, 770–775. d) K. A. Biegasiewicz, S. J. Cooper, X. Gao, D. G. Oblinsky, J. H. Kim, S. E. Garfinkle, L. A. Joyce, B. A. Sandoval, G. D. Scholes, T. K. Hyster, *Science* **2019**, *364*, 1166–1169.

⁴⁷ *Revisiones consultadas*: a) M. López-Iglesias, V. Gotor-Fernández, *Chem. Rec.* **2015**, *15*, 743–759. b) R. D. Gupta, *Sustain. Chem. Process* **2016**, *4*, 2. c) R. B. Leveson-Gower, C. Mayer, G. Roelfes, *Nat. Rev. Chem.* **2019**, *3*, 687–705. d) A. Patti, C. Sanfilippo, *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2675.

0.3.1. Aminotransferasas/Transaminasas (ATA's)

La aminación reductiva es uno de los métodos más versátiles y utilizados en la preparación de aminas en sistemas químicos y/o biológicos.⁴⁸ Las aminas quirales se utilizan con frecuencia como componentes básicos (*building blocks*) de compuestos bioactivos y están presentes en aproximadamente entre el 40-45% de las pequeñas moléculas farmacéuticas.⁴⁹ Dentro de la industria farmacéutica o medicinal desempeña un papel indispensable. En cuanto a las aproximaciones enzimáticas, la producción de aminas quirales puede llevarse a cabo utilizando una variedad de enzimas diferentes,⁵⁰ no obstante, las transaminasas son actualmente el ejemplo más significativo.⁵¹

Las aminotransferasas o transaminasas (ATA's, EC 2.6.1.x), son enzimas dependientes del cofactor piridoxal-5'-fosfato (PLP, del inglés *pyridoxal 5'-phosphate*), las cuales median en la transferencia de un grupo amino desde un donador hasta un aceptor (un grupo cetona o aldehído) para la síntesis de aminas quirales, proporcionando una ruta más concisa para la aminación reductora en comparación con sus homólogos químicos.^{43a,52}

Mecanicamente, el proceso de biotransaminación consta de dos etapas clave.⁵³ En la primera mitad del ciclo (Esquema 4), en la dirección de la aminación, el complejo covalente enzima-PLP (E-PLP) transfiere el grupo amino del donador de amino (por ejemplo alanina) al PLP, generando una serie de reordenamientos intermedios que tras una etapa de hidrólisis, se formará la especie aminada del PLP, la piridoxamina 5'-fosfato (PMP, del inglés *pyridoxamine 5'-phosphate*), y una cetona como subproducto (siguiendo con el ejemplo, una molécula de ácido pirúvico).

La segunda mitad del ciclo implica la transferencia del grupo amino del PMP (unido a la enzima no covalentemente, E-PMP) al aceptor amino (*nuestra* molécula de estudio,

⁴⁸ a) R. P. Tripathi, S. S. Verma, J. Pandey, V. K. Tiwari, *Current Org. Chem.* **2008**, *12*, 1093–1115. b) O. I. Afanasyev, E. Kuchuk, D. L. Usanov, D. Chusov, *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 11857–11911.

⁴⁹ M. D. Patil, G. Grogan, A. Bommarius, H. Yun, *Catalysts* **2018**, *8*, 254.

⁵⁰ *Revisiones consultadas*: a) M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42–51. b) [Hidrolasas]: E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3998–4035. c) J. H. Schrittwieser, S. Velikogne, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1655–1685. d) [IRED's]: J. Mangas-Sánchez, S. P. France, S. L. Montgomery, G. A. Aleku, H. Man H., M. Sharma, J. I. Ramsden, G. Grogan, N. J. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2017**, *37*, 19–25. e) [AmDH's]: T. Knaus, W. Bohmer, F. G. Mutti, *Green Chem.* **2017**, *19*, 453–463. f) [Oxidoreductasas]: M. D. Patil, G. Grogan, A. Bommarius, H. Yun, *ACS Catal.* **2018**, *8*, 10985–11015. *Capítulo de libro*: g) F. G. Mutti, T. Knaus (2021). *Biocatalysis for Practitioners: Techniques, Reactions and Applications*. (Editores: G. de Gonzalo, I. Lavandera). Wiley-VCH. Capítulo 6. pp. 143–180. ISBN: 978-3-527-34683-7.

⁵¹ J. P. Adams, M. J. B. Brown, A. Díaz-Rodríguez, R. C. Lloyd, G. Roiban, *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361*, 2421–2432.

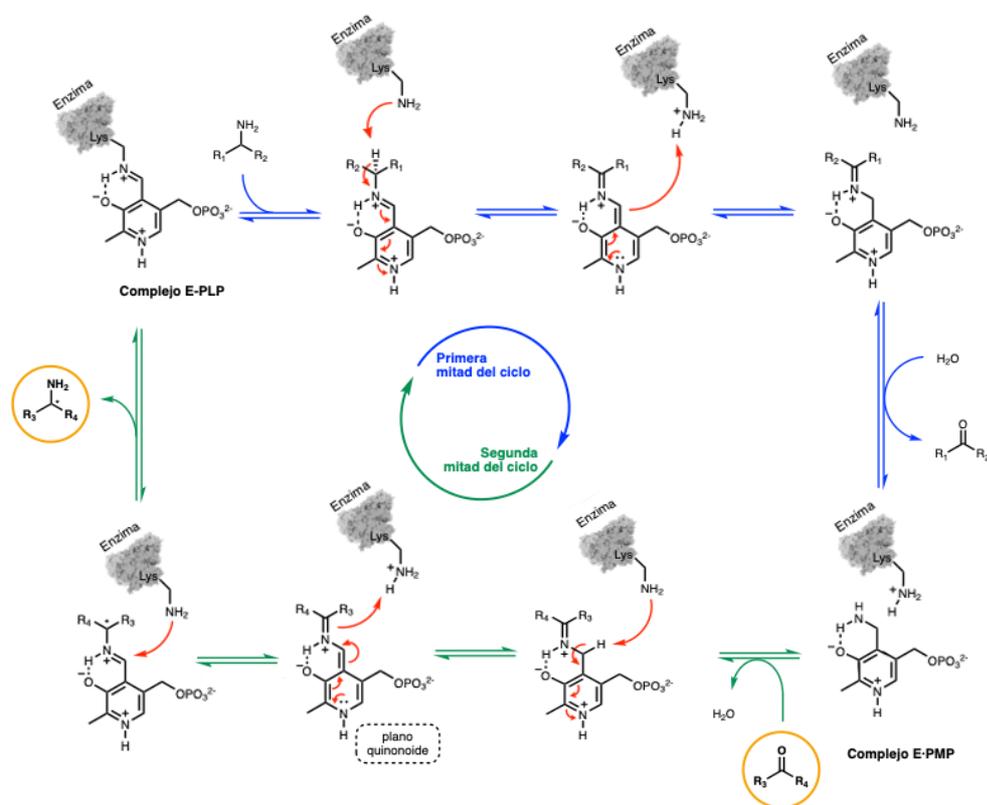
⁵² *Bibliografía consultada*: a) F. Guo, P. Berglund, *Green Chem.* **2017**, *19*, 333–360. b) Q. Meng, C. Ramírez-Palacios, H. J. Wijma, Dick B. Janssen, *Front. Catal.* **2022**, *2*, 1049179. c) M. Höhne, U. Bornscheuer (2012). *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, 3ª Ed. (Editores: K. Drauz, H. Gröger, O. May). Wiley-VCH. Capítulo 19. pp. 779–820. ISBN: 9783527325474.

⁵³ Mecanismo para una aspartato aminotransferasa de estructura conocida: J. F. Kirsch, G. Eichele, G. C. Ford, M. G. Vincent, J. N. Jansonius, H. Gehring, P. Christen, *J. Mol. Biol.* **1984**, *174*, 497–525.

Introducción

cetona o aldehído), produciendo el producto amino final, y regenerando el cofactor PLP para otro ciclo catalítico. El Esquema 4 muestra la naturaleza reversible de la biotransformación.^{52b,54}

El cambio de molécula proquiral a quiral (reconocimiento molecular) se produce sobre el intermedio plano “tipo imina” (plano quinonoide) generado entre el carbonilo del sustrato y el cofactor PMP, a través de la protonación estereoespecífica de este intermedio por un residuo de lisina (*Lys*) en el centro activo de la ATA. Se han identificado tanto en transaminasas *R*-selectivas como *S*-selectivas que, aunque los pliegues de las proteínas difieren, la estereocomplementariedad puede explicarse simplemente por la diferente posición del residuo catalítico clave (*Lys*), el cual se encuentra situado en la cara *Si* del PLP en las *S*-ATA's y en la cara *Re* en las *R*-ATA's.⁵⁵



Esquema 4. Propuesta mecanística de aminación de un compuesto carbonílico catalizada por ATA's. Las flechas azules indican la primera mitad del ciclo, las verdes la segunda. Todos los pasos de la reacción son reversibles.

⁵⁴ Artículos que han servido como base del Esquema 4: a) M. Fuchs, J. E. Farnberger, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 6965–6982. b) J. F. Rocha, A. F. Pina, S. F. Sousa, N. M. F. S. A. Cerqueira, *Catal. Sci. Technol.* **2019**, 9, 4864–4876.

⁵⁵ M. Hall, *RSC Chem. Biol.* **2021**, 2, 958–989.

Aunque en la naturaleza la preferencia por el enantiómero (*S*) parece ser la más común, investigadores como Bornscheuer y colaboradores⁵⁶ han identificado varias *R*-ATA's utilizando métodos de búsqueda computacional. También, Kroutil y colaboradores⁵⁷ han desarrollado síntesis estereoselectivas para aminas de configuración (*R*).

Termodinámicamente, las constantes de equilibrio de los procesos de transaminación empleando ATA's suelen ser cercanas a la unidad y la transferencia del grupo amino a una cetona está fuertemente desfavorecida.^{43a} Además, en algunas situaciones, ciertas ATA's pueden experimentar una inhibición debido a la acumulación de subproductos, lo que limita la eficacia global del proceso.

Con el transcurso de los años, se han ido desarrollando diferentes estrategias para tratar de minimizar estas dificultades, cuando se utilizan donadores de amino en exceso. A continuación, en el Esquema 5 se describen algunas de las estrategias desarrolladas con el propósito de eliminar los subproductos y conseguir desplazar el equilibrio hacia el producto deseado.

Las ATA's utilizan la D- o L-alanina como sustrato natural, dependiendo de si la enzima empleada es (*S*)- o (*R*)-selectiva.⁵⁸ Este proceso produce ácido pirúvico como subproducto en las reacciones de biotransaminación. La acumulación del ácido pirúvico conduce a una inhibición gradual de las transaminasas.⁵⁹ Por lo tanto, resulta esencial eliminar el ácido pirúvico del entorno utilizando diferentes métodos.

Dos de los métodos más comúnmente utilizados consisten en eliminarlo *in situ* reciclándolo nuevamente a alanina o mediante reducción hasta el lactato. En el primero de ellos, se requiere una alanina deshidrogenasa (AlaDH), mientras que en el segundo se emplea una lactato deshidrogenasa (LDH). Debido a que el NAD(P)H, un cofactor requerido, se consume en cantidades estequiométricas en ambos métodos, es necesario emplear un sistema para su correcto reciclaje. Más adelante en la Sección 0.3.2 se profundizará más en detalle sobre este tipo de sistemas de regeneración.

Uno de los métodos más ampliamente empleados, incluso a escala industrial, para desplazar el equilibrio es el uso de 2-propilamina (IPA). Se trata de un reactivo económico y aquiral, lo que implica que se puede utilizar tanto para (*S*)- o (*R*)-ATA's. Además, no requiere del empleo de sistemas de enzimas auxiliares y como único subproducto se forma acetona,

⁵⁶ M. Höhne, S. Schätzle, H. Jochens, K. Robins, U. T. Bornscheuer, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 807–813.

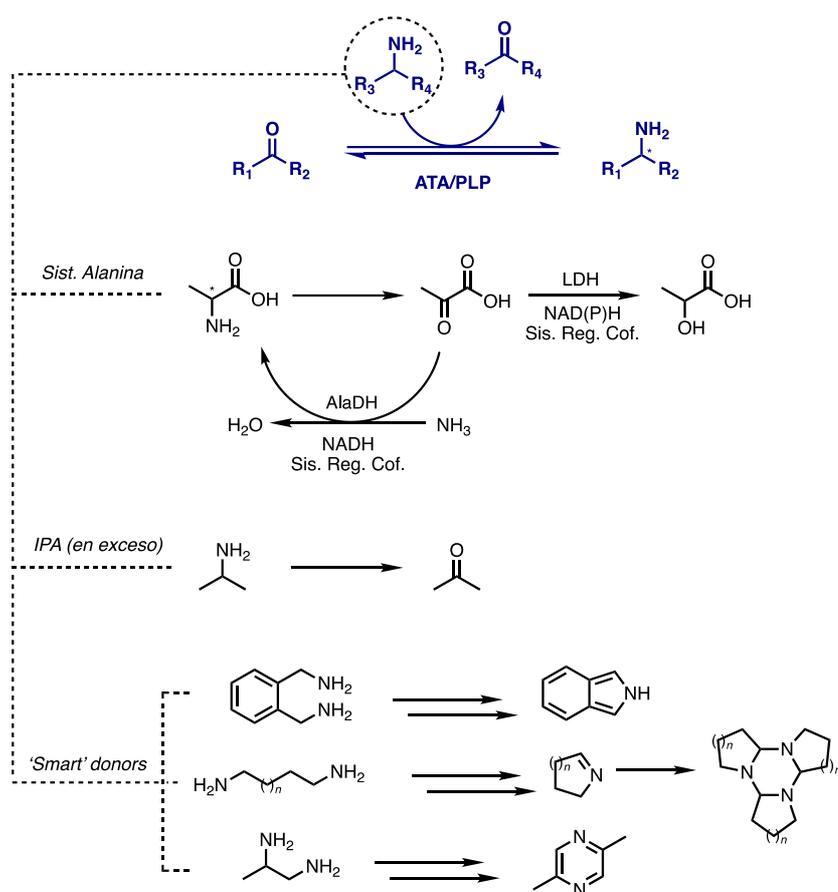
⁵⁷ F. G. Mutti, C. S. Fuchs, D. Pressnitz, J. H. Sattler, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 3227–3233.

⁵⁸ Para las (*S*)-ATA's se usa la L-Ala y para las (*R*)-ATA's, la D-Ala.

⁵⁹ a) J. S. Shin, B. G. Kim, *Biotechnol Bioeng.* **1999**, *65*, 206–211. b) P. Tufvesson, J. Lima-Ramos, J. S. Jensen, N. Al-Haque, W. Neto, J. M. Woodley, *Biotechnol Bioeng.* **2011**, *108*, 1479–1493. c) I. Sánchez-Moreno, I. Oroz-Guinea, L. Iturrate, E. García-Junceda (2012). *Comprehensive Chirality* (Editores: E. M. Carreira, H. Yamamoto). Elsevier Science. Capítulo 7. 20. pp. 430–453. ISBN: 978-0-08-095168.

Introducción

que puede ser eliminada fácilmente por destilación al ser volátil. Para desplazar el equilibrio, normalmente se utiliza en un gran exceso.



Esquema 5. Distintos sistemas de donador de amino empleados en las biotransformaciones con ATA's.

Una de las limitaciones que hay que tener en cuenta a la hora de aplicar este sistema es que una gran cantidad de ATA's de tipo salvaje (WT) no aceptan IPA como donador de amino.⁶⁰ No obstante, los avances en el campo de la evolución dirigida han resuelto este inconveniente y es una de las mutaciones que se suelen realizar para que sean capaces de aceptar esta amina, como se constató en la preparación a escala industrial del fármaco

⁶⁰ P. Kelefiotis-Stratidakis, T. Tyrikos-Ergas, I. V. Pavlidis, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 1634–1642.

Sitagliptina, para la diabetes tipo 2.⁶¹ Este procedimiento se describirá más en detalle al final de este apartado.

En la última década se ha visto aumentada la necesidad de tener un método rápido, práctico y barato de cribado masivo (de alto rendimiento) o HTS (del inglés *High-Throughput Screening*); ya bien sea para identificar nuevas enzimas o para evaluar grandes bibliotecas de enzimas.⁶²

Para tratar solucionar este ‘cuello de botella’ se han desarrollado unos sistemas ‘inteligentes’ o más conocidos como ‘*smart-donors*’ que son capaces de desplazar el equilibrio termodinámico de una manera eficaz (ciclación irreversible) empleando cantidades cuasi-estequiométricas.⁶³ Dentro de este tipo de donadores, las 1,2-diaminas (vecinales) suelen ser los compuestos más empleados, y entre ellas se encuentran por ejemplo la *o*-xilendiamina. También se ha extendido el uso de otro tipo de diaminas como la cadaverina (1,5-diamina) o la putrescina (1,4-diamina), entre otros varios.⁶⁴

Otra de las ventajas que tienen estos sistemas es que los subproductos generados (compuesto de polimerización generalmente), suelen ser compuestos coloreados o que forman precipitados insolubles en el medio. Esto permitiría hacer análisis de manera rápida como los ensayos HTS mencionados anteriormente, o incluso permitiría realizar un análisis visual de los resultados.⁶⁵

La naturaleza reversible de la biotransaminación mediada por ATA’s, abre un amplio abanico de posibilidades desde una perspectiva sintética. Estas enzimas son capaces de catalizar tanto la conversión de grupos carbonilo en las respectivas aminas (quirales), como la transformación de aminas (racémicas) en grupos cetona o aldehído correspondientes. Este último proceso es aplicable en conjunto con metodologías de resolución cinética clásica (KR) o dinámica (DKR, del inglés *dynamic kinetic resolution*), lo que amplía significativamente sus oportunidades sintéticas.⁶⁶

⁶¹ 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.

⁶² a) S. Mathew, G. Shin, M. Shon, H. Yun, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2013**, *18*, 1–7. b) A. Swoboda, L. J. Pfeifenberger, Z. Duhović, M. Bürgler, I. Oroz-Guinea, K. Bangert, F. Weißensteiner, L. Parigger, K. Ebner, A. Glieder, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e2023127.

⁶³ A. P. Green, N. J. Turner, E. O’Reilly, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1–5.

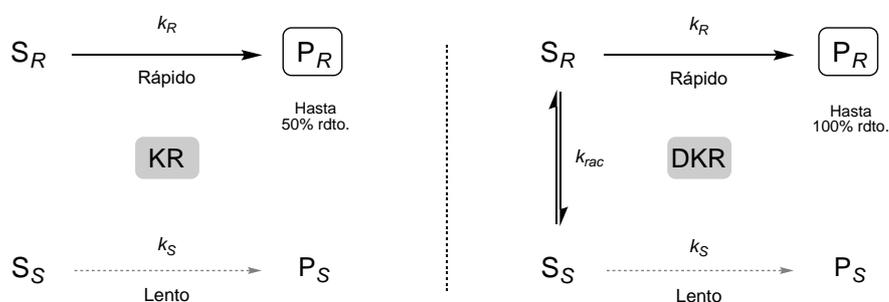
⁶⁴ S. E. Payer, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *17*, 2553–2559.

⁶⁵ a) A. Gomm, S. Grigoriou, C. Peel, J. Ryan, N. Mujtaba, T. Clarke, E. Kulcinskaja, E. O’Reilly, *Eur. J. Org. Chem.* **2018**, *38*, 5282–5284. b) J. T. Brown, R. M. Phelan, *Org. Process Res. Dev.* **2023**, *27*, 1293–1299.

⁶⁶ *Bibliografía seleccionada*: a) M.-J. Kim, J. Park, Y. K. Choi (2008). *Multi-Step Enzyme Catalysis: Biotransformations and Chemoenzymatic Synthesis*. (Editor: E. García-Junceda). Wiley-VCH. Capítulo 1. pp. 1–19. ISBN: 9783527319213. b) J. H. Lee, K. Han, M.-J. Kim, J. Park, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 999–1015. c) F. Ruggieri, L. M. van Langen, D. T. Logan, B. Walse, P. Berglund, *ChemCatChem* **2018**, *10*, 5012–5018. d) M. M. Musa, F. Hollmann, F. G. Mutti, *Catal. Sci. Technol.* **2019**, *9*, 5487–5503.

Introducción

En el caso de las metodologías KR, un enantiómero del racemato es eliminado por la transaminasa enantioespecíficamente dejando el otro sin reaccionar, permitiendo su extracción en forma enantiopura. En este caso, el rendimiento teórico es del 50%. En el caso de las DKR, esta restricción es abordada incorporando en el medio de reacción un agente (o el propio medio) que interconvierta (racemice) ambos enantiómeros entre sí, de esta manera la enzima potencialmente tiene disponible el 100% del enantiómero para el que es específica, permitiendo así alcanzar un rendimiento máximo del 100%.

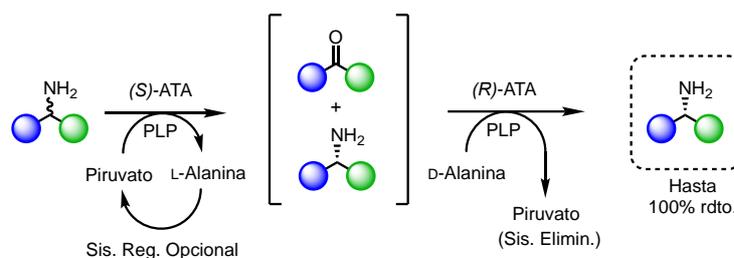


Esquema 6. Representación de los procesos de Resolución cinética (KR) izquierda vs Resolución cinética dinámica (DKR) derecha.

Para que una DKR sea eficaz, es necesario que se cumpla, por un lado, que la selectividad del proceso, así como la velocidad de racemización, sean elevadas. Por otro, en el caso de incorporar un catalizador para favorecer la racemización, este no debe reaccionar ni con el producto que se forma ni con la enzima en cuestión, además de ser compatibles en las condiciones de reacción ya que es un proceso simultáneo o en una sola etapa.

Otra forma de aumentar el rendimiento teórico de 50% en la situación de KR, consistiría en acoplar una segunda etapa con una ATA adicional, pero de selectividad opuesta (Esquema 7). Con ello, se realizaría un proceso de resolución completo, partiendo de una mezcla racémica de aminas.⁶⁷

⁶⁷ R. C. Simon, N. Richter, W. Kroutil (2014). *Cascade biocatalysis: integrating stereoselective and environmentally friendly reactions*. (Editores: S. Riva, W.-D. Fessner). Wiley-VCH. Capítulo 4. pp. 65–86. ISBN: 978-3-527-33522-0.



Esquema 7. Resolución secuencial de una amina racémica teórica por combinación de dos ATA's enantiocomplementarias.

En las dos últimas décadas se han llevado a cabo numerosas investigaciones utilizando ATA's, demostrando su utilidad como catalizadores incluso en la industria farmacéutica.⁶⁸ En consecuencia, el número de patentes concedidas que albergan varios de estos procedimientos también se ha visto aumentado.⁶⁹ En el Esquema 8 se muestran algunos de esos trabajos junto con sus características más destacables.

En primer lugar destaca el trabajo de Savile y colaboradores,⁶¹ con el fármaco antidiabético Sitagliptina (Januvia[®]) que se había mencionado anteriormente. Mediante una colaboración entre las empresas Codexis y Merck se realizó un proceso de evolución dirigida e ingeniería de proteínas guiada para obtener una enzima evolucionada (*ArRmut11*) a partir de la (*R*)-ATA-117 de la especie *Arthrobacter sp.* En este caso se llegaron a realizar 11 rondas de evolución con 27 mutaciones en total,⁷⁰ hasta llegar al catalizador que cumplía los objetivos del proceso requeridos.

En concreto, se consiguió aumentar la concentración de IPA que toleraba la enzima de partida, pasando de 0.5 a 1 M. El rango de temperatura eficiente también se aumentó hasta los 45 °C, no obstante, la principal mejora fue la tolerancia de una mayor concentración de cosolvente, DMSO, que pasó de un 5 a un 50% *v/v*. Todo ello, en conjunto, supuso un aumento significativo de la concentración de trabajo, pasando de 2 a 150 g·L⁻¹.

El siguiente ejemplo de transaminación a escala industrial corresponde al proceso quimioenzimático de un compuesto intermedio para la preparación de un inhibidor de la gamma secretasa.⁷¹ El paso enzimático, en el que se sintetiza un compuesto intermedio, desarrollado por investigadores de Pfizer, destaca principalmente por la escala de trabajo de

⁶⁸ 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. b) J. Ø. Madsen, J. M. Woodley, *ChemCatChem* **2023**, *15*, e202300560. c) S. Simić, E. Zukić, L. Schmermund, K. Faber, C. K. Winkler, W. Kroutil, *Chem. Rev.* **2022**, *122*, 1052–1126.

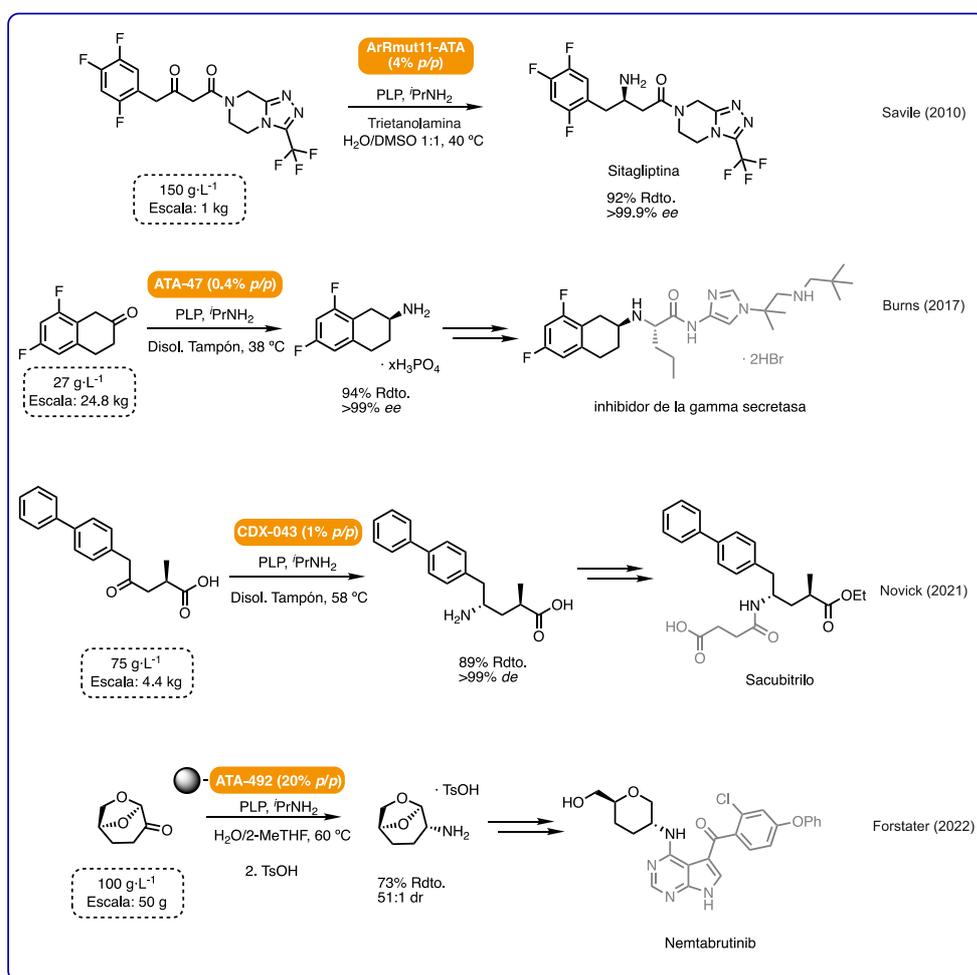
⁶⁹ a) P. Domínguez de Marfá, G. de Gonzalo, A. R. Alcántara, *Catalysts* **2019**, *9*, 802. b) D. L. Hughes, *Org. Process Res. Dev.* **2022**, *26*, 1878–1899.

⁷⁰ S. Mathew, H. Yun, *ACS Catal.* **2012**, *2*, 993–1001.

⁷¹ M. Burns, C. A. Martinez, B. Vanderplas, R. Wisdom, S. Yu, R. A. Singer, *Org. Process Res. Dev.* **2017**, *21*, 871–877.

Introducción

varios kilogramos (~25 kg) a la que se ha llevado a cabo, y por su eficiencia, ya que tan sólo con una carga de enzima del 0.4 % en peso se consiguen unos excelentes rendimientos y selectividad. La enzima utilizada es una transaminasa comercial, disponible a través de la compañía biotecnológica c-LEcta GmbH.



Esquema 8. Ejemplos seleccionados de procesos industriales utilizando ATA's.

Novartis, en colaboración con Codexis,⁷² desarrolló un proceso de transaminación para llevar a cabo la síntesis asimétrica de un aminoácido quiral intermedio para la fabricación de Sacubitrilo (Entresto[®]), un medicamento para tratar la insuficiencia cardíaca.

⁷² S. J. Novick, N. Dellas, R. Garcia, C. Ching, A. Bautista, D. Homan, O. Alvizo, D. Entwistle, F. Kleinbeck, T. Schlama, T. Ruch, *ACS Catal.* **2021**, *11*, 3762–3770.

Inicialmente, se partió de la ATA-217 (una variante de la *Vibrio fluvialis*-ATA) que mostraba una actividad mínima (<0.1%) y una diastereopreferencia opuesta a la deseada (0:100). Sin embargo, mediante 11 rondas de evolución enzimática (26 mutaciones), se logró identificar una enzima (CDX-043) con la selectividad deseada (>99.9:0.1) y un incremento en la actividad (Esquema 8).

Por último, la investigación más reciente, esta vez descrita por Merck,⁷³ desarrolla una reacción de transaminación enzimática del Cyrene™, un disolvente renovable y biodegradable hecho a partir de subproductos de la madera. La correspondiente amina es un intermedio clave en la formación de un inhibidor no covalente de la tirosina quinasa de Bruton (Nemtabrutinib).

La enzima empleada, disponible comercialmente a través de Codexis, se inmovilizó para poder operar en un medio acuoso saturado de disolvente orgánico (2-MeTHF) y a una temperatura elevada (60 °C). Se utilizó una alta carga de sustrato (100 g/L) en el proceso final, que se escaló hasta los 50 g. La amina correspondiente se obtuvo con un buen rendimiento y alta selectividad.

0.3.2. Alcohol deshidrogenasas/Cetoreductasas (ADH's/ KRED's)

Las reducciones y oxidaciones se encuentran entre las transformaciones más frecuentes de la síntesis orgánica. Entre ellas, la reducción asimétrica de carbonilos proquirales es una de las transformaciones químicas más importantes para la generación de centros estereogénicos.

Los alcoholes secundarios ópticamente activos representan una categoría de compuestos de gran relevancia, presentes en muchos productos farmacéuticos, compuestos biológicamente activos, o como productos intermedios dentro de una amplia panoplia de sectores. En particular, las transformaciones biocatalíticas representan una alternativa atractiva a los métodos no enzimáticos para la producción de alcoholes enriquecidos tanto a escala industria como en el mundo académico.

Las alcohol deshidrogenasas (ADH's, EC 1.1.1.x), también conocidas como cetoreductasas (KRED's), son oxidoreductasas que catalizan la reducción reversible de cetonas y aldehídos a sus correspondientes alcoholes.^{55,68c,74}

⁷³ C. K. Prier, K. C. Soto, J. H. Forstater, N. Kuhl, J. T. Kuethe, W. L. Cheung-Lee, M. J. Di Maso, C. M. Eberle, S. T. Grosser, H.-I. Ho, E. Hoyt, A. Maguire, K. M. Maloney, A. Makarewicz, J. P. McMullen, J. C. Moore, G. S. Murphy, K. Narsimhan, W. Pan, N. R. Rivera, A. Saha-Shah, D. A. Thaisrivongs, D. Verma, A. Wyatt, D. Zewge, *ACS Catal.* **2023**, *13*, 7707–7714.

⁷⁴ *Bibliografía consultada:* a) H. Gröger, W. Hummel, S. Borchert, M. Krauß (2012). *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, 3ª Ed. (Editores: K. Drauz, H. Gröger, O. May). Wiley-VCH. Capítulo 26. pp. 1035–1110.

Introducción

En este contexto, los cofactores empleados como fuente de hidruro son el dinucleótido de nicotinamida adenina [NAD(H)] o su derivado fosforilado, el dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato [NADP(H)] (Figura 4).

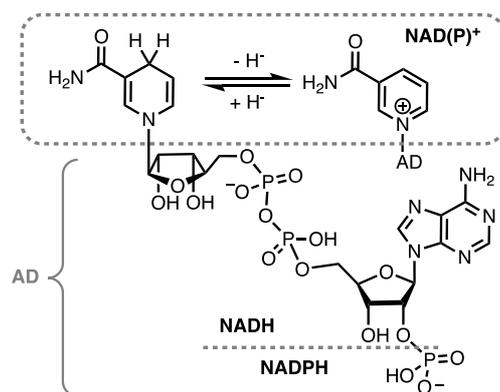


Figura 4. Estructuras de los cofactores nicotinámicos en su forma reducida NAD(P)H y oxidada NAD(P)⁺. AD: resto de adenina dinucleótido (P).⁷⁵

Estos cofactores en su contrapartida resultan ser demasiado costosos⁷⁶ (especialmente las especies reducidas) para poder ser utilizados en cantidades estequiométricas, además de los problemas asociados de inhibición enzimática que podrían derivarse en estos casos. Por este motivo, es casi obligatorio plantear un sistema de regeneración del cofactor *in situ*, para crear procesos enzimáticos eficientes y económicamente viables, especialmente cuando se trabaja a gran escala. En este punto cabe mencionar que en las transformaciones en las que se involucran células enteras, no se plantea esta dificultad por la capacidad que tienen estos sistemas *in vivo* de regenerarlos intrínsecamente (por ejemplo, añadiendo glucosa).⁷⁷

Los sistemas de regeneración más empleados, son el del *sustrato acoplado* y el de la *enzima acoplada*. Se han descrito varias metodologías alternativas⁷⁸ que involucran técnicas fotoquímicas, electroquímicas, métodos químicos (metales),⁷⁹ o combinación de varias disciplinas.⁸⁰ También se ha propuesto la síntesis de estructuras análogas que actúen como

ISBN: 9783527325474. b) M. Hall (2021). *Biocatalysis for Practitioners: Techniques, Reactions and Applications*. (Editores: G. de Gonzalo, I. Lavandera). Wiley-VCH. Capítulo 7. pp. 181–224. ISBN: 978-3-527-34683-7. c) A. S. de Miranda, C. D. F. Milagre, F. Hollmann, *Front. catal.* **2022**, *2*, 900554. d) C. D. F. Milagre, H. M. S. Milagre, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem* **2022**, *38*, 100694. e) M. M. Musa, *ChemistryOpen* **2022**, *11*, e202100251.

⁷⁵ A. S. De Miranda, C. Milagre, F. Hollmann, *Front. catal.* **2022**, *2*, 900554.

⁷⁶ Coste de los cofactores nicotinámicos en Merck (agosto 2023): Precio de NADP⁺ = 1050.00 €/g (Ref. N5755). Precio de NAD⁺ = 199.00 €/g (Ref. N3014).

⁷⁷ S. M. A. De Wildeman, T. Sonke, H. E. Schoemaker, O. May, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1260–1266.

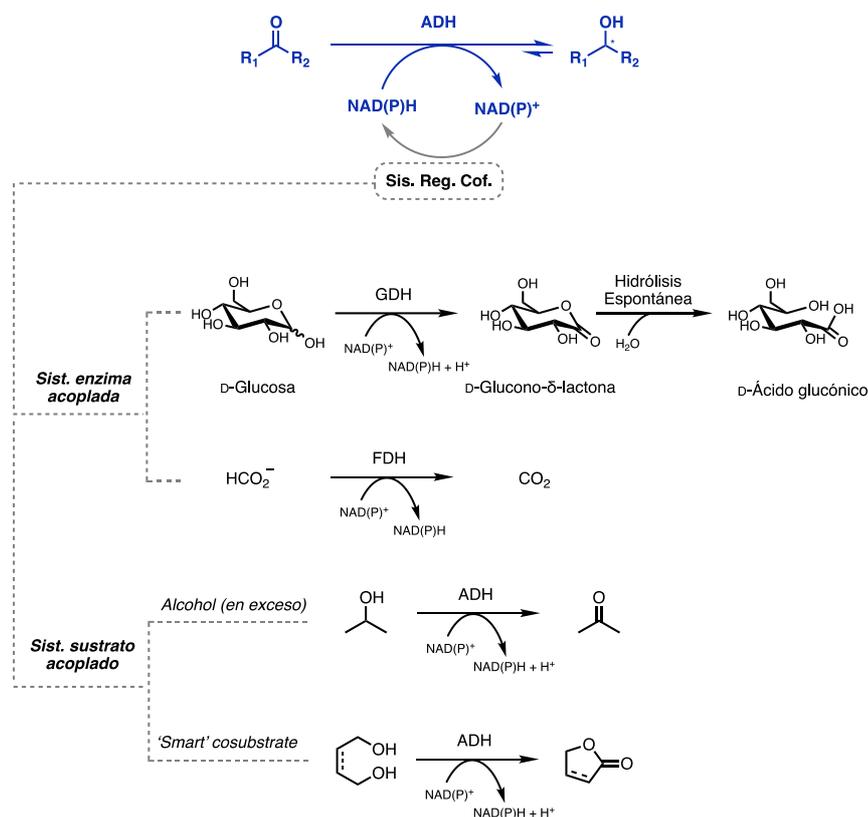
⁷⁸ *Revisiones consultadas*: a) C. Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor, *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 2525–2541. b) S. Mordhorst, J. N. Andexer, *Nat. Prod. Rep.* **2020**, *37*, 1316–1333. c) K. Bachosz, J. Zdzarta, M. Bilal, A. S. Meyer, T. Jesionowski, *Sci. Total Environ.* **2023**, *868*, 161630.

⁷⁹ Y. Maenaka, T. Suenobu, S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 367–374.

⁸⁰ W. Dong, J. Tang, L. Zhao, F. Chen, L. Deng, M. Xian, *Green Chem.* **2020**, *22*, 2279–2287.

miméticos de los cofactores.⁸¹ Sin embargo, los sistemas tradicionales presentados anteriormente, siguen siendo los más recurrentes.

Dentro de los métodos de la *enzima acoplada*, los sistemas más utilizados para la regeneración de la forma reducida de los cofactores nicotinamídicos son los basados en el uso de formiato deshidrogenasa (FDH, EC 1.17.1.x) y glucosa deshidrogenasa (GDH, EC 1.1.1.x), en presencia de los correspondientes sustratos formiato (amónico) y glucosa, respectivamente.⁸² Estos dos sistemas comparten la ventaja de ser reacciones prácticamente irreversibles y, además, emplean cosustratos económicos (Esquema 9).



Esquema 9. Sistemas de regeneración del cofactor más empleados con enzimas NAD(P)H-dependientes.

⁸¹ a) C. E. Paul, S. Gargiulo, D. J. Opperman, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, A. Taglieber, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 180–183. b) C. E. Paul, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 788–797. c) T. Knaus, C. E. Paul, C. W. Levy, S. de Vries, F. G. Mutti, F. Hollmann, N. S. Scrutton, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 1033–1039. d) J. Murray, D. R. W. Hodgson, A. C. O'Donoghue, *J. Org. Chem.* **2023**, *88*, 7619–7629.

⁸² E. E. Ferrandi, D. Monti, S. Riva (2014). *Cascade biocatalysis: integrating stereoselective and environmentally friendly reactions*. (Editores: S. Riva, W.-D. Fessner). Wiley-VCH. Capítulo 2. pp. 23–42. ISBN: 978-3-527-33522-0.

Introducción

Por todo ello, ambos sistemas serían adecuados para desplazar eficazmente el equilibrio de las reacciones catalizadas por las ADH's, hacia la formación de los productos deseados. Sin embargo, es importante considerar que en el sistema de glucosa/GDH, se produce un equivalente de ácido por cada ciclo de reciclaje, lo que puede provocar una disminución significativa del pH. Por esta razón, es esencial que la solución tenga una capacidad amortiguadora proporcional para contrarrestar este efecto.

Respecto a las metodologías del *sustrato acoplado*, una de las más simples, consiste en utilizar un alcohol a modo de cosustrato, usualmente 2-propanol o etanol, en un gran exceso para desplazar el equilibrio. Esta estrategia ofrece varias ventajas, en primer lugar, ambas transformaciones, tanto la principal como la auxiliar, estarían catalizadas por la misma enzima. Del mismo modo, el empleo de un alcohol fácilmente accesible y económico como único agregado para regenerar el cofactor, y que, además, produce subproductos fácilmente eliminables (por ejemplo, en el caso del 2-PrOH, el único subproducto sería acetona), simplifica el proceso y reduce los costes globales. Estas características lo convierten en una opción particularmente atractiva para aplicaciones industriales.

Sin embargo, es importante destacar que no todas las enzimas (sobre todo las WT) son capaces de aceptar estos alcoholes como sustrato, lo que impediría un correcto funcionamiento del sistema.

En la última década, se han venido desarrollando otro tipo de sustratos acoplados *inteligentes*, los denominados *smart cosubstrates*.⁸³ Estos son capaces de desplazar el equilibrio de una manera eficaz empleando incluso cantidades subestequiométricas de cosustrato. Los compuestos empleados en este tipo de sistemas generalmente son dioles (1,4-/1,5- o 1,6-), los cuales, en presencia de las ADH's se oxidarán a los correspondientes hidroxialdehídos que están en equilibrio con su forma ciclada (lactol o hemiacetal cíclico). Una vez que se consume de nuevo el cofactor en la reacción principal, este lactol se oxidará a la correspondiente lactona final, una especie muy estable que desplaza el equilibrio irreversiblemente. Por esta doble oxidación, con una cantidad subestequiométrica ~ 0.5 equiv. bastaría para llevar a cabo la totalidad de la transformación principal.

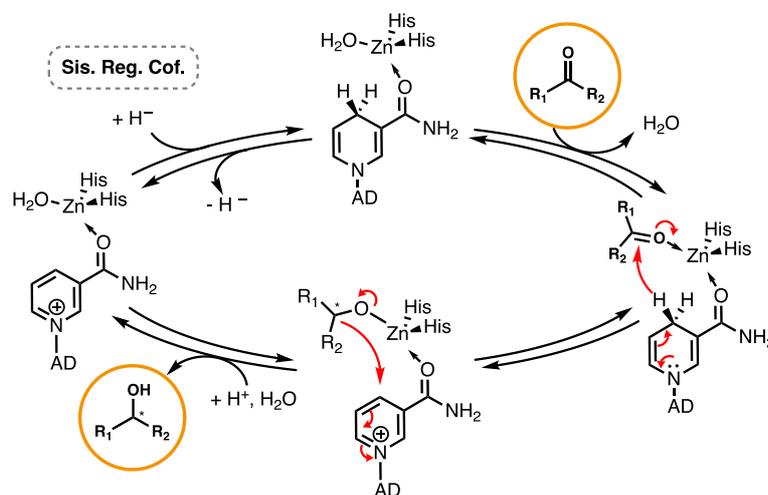
Las alcohol deshidrogenasas se dividen en tres categorías fundamentales según sus características estructurales y sus diferencias que radican en su centro catalítico. Según la longitud de la cadena de aminoácidos, tenemos ADH's de cadena larga, media y corta, siendo estas dos últimas las más empleadas en los procesos biocatalíticos.^{74b}

⁸³ a) S. Kara, D. Spickermann, J. H. Schrittwieser, C. Leggewie, W. J. H. van Berkel, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *Green Chem.* **2013**, *15*, 330–335. b) R. Zuhse, C. Leggewie, F. Hollmann, S. Kara, *Org. Process Res. Dev.* **2015**, *19*, 369–372. c) A. Bornadel, R. Hatti-Kaul, F. Hollmann, S. Kara, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 2442–2445. d) L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 1618–1624.

Las ADH's de cadena media (MDR, del inglés *medium-chain dehydrogenases/reductases*) generalmente son enzimas dependientes de zinc. Dicho átomo se encuentra fuertemente coordinado en su sitio activo y actúa como *ácido de Lewis* activando al sustrato para la oxidación/reducción según corresponda (Esquema 10).

Por otro lado, las ADH's de cadena corta (SDR, del inglés *short-chain dehydrogenases/reductases*), a diferencia de las anteriores, en general, son enzimas no dependientes de un metal (en su centro activo). Si bien es cierto, es frecuente el uso de iones Mg^{2+} para estabilizar la estructura cuaternaria de la proteína y brindarle así mayor estabilidad frente a altas temperaturas y solventes orgánicos.

El mecanismo de la acción catalítica en las SDR se basa en la activación del sustrato por un residuo de tirosina presente en el sitio activo. La tirosina debe estar en su forma aniónica para abstraer el protón del alcohol durante la oxidación del mismo, o en su forma protonada para ceder el protón ácido (*ácido de Brønsted*) al enlace O-H del alcohol que se forma en la reducción del carbonilo.



Esquema 10. Mecanismo catalítico simplificado para una ADH dependiente de zinc. AD: resto de adenosina dinucleótido (P). Fuente: Modificado de Hollmann *et al.*⁸⁴

Durante el proceso de transferencia del hidruro entre el cofactor y el sustrato,⁸⁵ este, puede tener lugar por la cara *Si* o por la cara *Re* (ver Figura 5). A la inversa, partiendo del alcohol, ocurriría la misma situación.

⁸⁴ F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, D. Holtmann, *Green Chem.* **2011**, *13*, 2285–2314.

⁸⁵ Existen 4 hidruros transferibles distintos en función de la cara (*Re/Si*) y del propio H (pro-*R*/pro-*S*): C. W. Bradshaw, H. Fu, G. J. Shen, C. H. Wong, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1526–1532.

Introducción

La mayoría de las ADH's siguen la regla de Prelog,⁸⁶ es decir, el hidruro es transferido por la cara *Re* de la cetona proquiral, produciendo los correspondientes (*S*)-alcoholes.⁸⁷ En base a esta regla, aquellas que generan alcoholes de configuración (*S*), son denominadas de tipo “*Prelog*”, y del mismo modo, las que catalizan la formación de alcoholes de configuración (*R*), se denominan “*anti-Prelog*”.

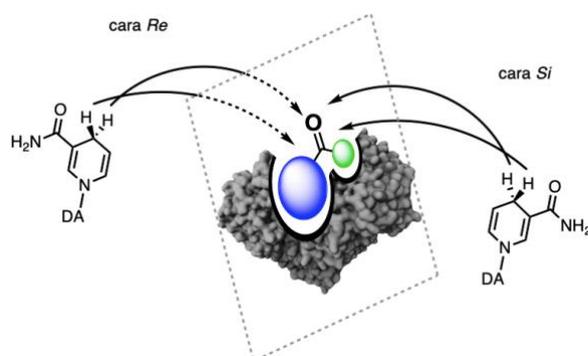


Figura 5. Transferencia estereoselectiva del hidruro del cofactor NAD(P)H al carbono carbonílico del sustrato. El sustituyente voluminoso (*bola azul*) tiene preferencia sobre el sustituyente pequeño (*bola verde*). AD: resto de adenina dinucleótido (P).

Las ADH's con estereopreferencia *anti-Prelog* son poco comunes y no satisfacen la alta demanda de producción de alcoholes ópticamente activos mediante la reducción asimétrica de cetonas proquirales. Por lo tanto, es crucial descubrir más ADH's con esta preferencia, ya sea en su forma natural (WT) o mediante modificaciones genéticas.^{74e}

Las ADH's de *Lactobacillus brevis*⁸⁸ y de *Lactobacillus kefir*⁸⁹ son dos ejemplos de ADH *anti-Prelog*.

Las reacciones de reducción asimétrica catalizadas por ADH's están ganando cada vez más importancia en la preparación de fármacos y compuestos bioactivos. Esta tendencia se debe en gran parte a la importancia *per se* de los alcoholes quirales (centros quirales sp^3 potencialmente derivables) y, sobre todo, a la alta enantioespecificidad mostrada por estas enzimas.⁹⁰

⁸⁶ V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **1964**, 9, 119–130.

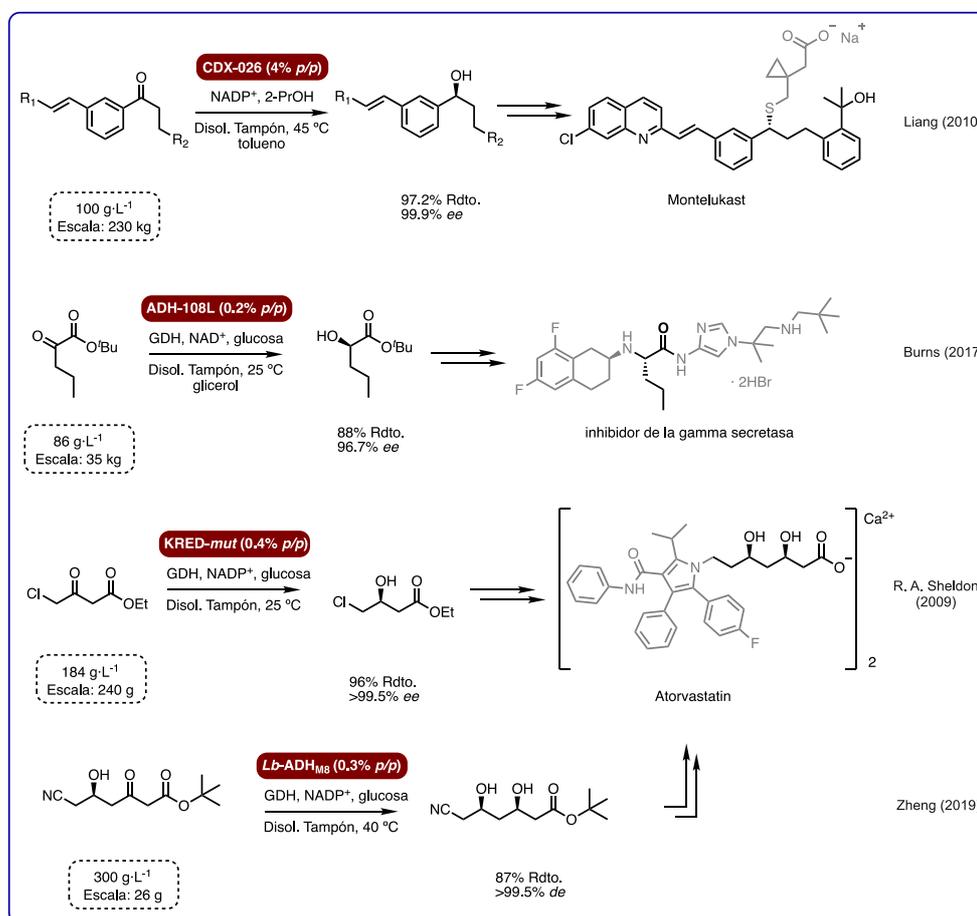
⁸⁷ En situaciones específicas, por cambio en la preferencia establecida por las *Reglas de Prioridad* de Cahn-Ingold-Prelog, las enzimas *Prelog* pueden generar los productos con configuración (*R*).

⁸⁸ N. H. Schlieben, K. Niefind, J. Müller, B. Riebel, W. Hummel, D. Schomburg, *Mol. Biol.* **2005**, 349, 801–813.

⁸⁹ C. W. Bradshaw, W. Hummel, C. H. Wong, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 1532–1536.

⁹⁰ F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, D. Holtmann, *Green Chem.* **2011**, 13, 2285–2313.

Además, se han convertido en una alternativa atractiva a los catalizadores químicos “tradicionales” siendo estos últimos sustituidos, en algunos casos, por los procesos enzimáticos correspondientes.⁹¹ Y es que, a parte de la notable selectividad que caracteriza a las ADH's (siendo en algunos casos prácticamente inimitable), también presentan ventajas en términos de coste económico y energético, contribuyendo a la mejora de la sostenibilidad y productividad de los procesos químicos.



Esquema 11. Ejemplos seleccionados de procesos industriales utilizando ADH's.

En el Esquema 11 se presenta una selección con algunos ejemplos destacados en la preparación de *principios activos farmacéuticos* (API's, del inglés *Active pharmaceutical ingredient*). En el primero de ellos, se muestra la bioreducción de un intermedio clave en la síntesis del fármaco Montelukast, conocido y comercializado bajo el nombre de *Singulair*[®],

⁹¹ Z. Li, H. Yang, J. Liu, Z. Huang, F. Chen, *Chem. Rec.* **2021**, *21*, 1611–1630.

Introducción

un medicamento utilizado para el tratamiento del asma crónico y de los síntomas de la alergia estacional.⁹²

En este caso, Codexis ha desarrollado un proceso quimioenzimático, empleando una ADH evolucionada, que ha sido capaz de sustituir al anterior protocolo (desarrollado por Merck) en el que se empleaba un organoborano, (-)-Ipc₂BCl, para introducir la quiralidad. El proceso enzimático final alcanzó una carga de trabajo de 100 g/L, presentando una tolerancia alta, tanto a la concentración del sustrato, como a los disolventes orgánicos necesarios (hasta 70 % entre tolueno y 2-PrOH) y a las temperaturas elevadas (45 °C). El proceso biocatalítico se ejecuta actualmente a una escala de >200 kg.

El siguiente ejemplo es de nuevo la síntesis desarrollada por Burns y colaboradores⁷¹ para la preparación de un inhibidor de la gamma secretasa, mencionada anteriormente (ver Esquema 8). En este paso de la síntesis, se accede a un hidroxiéster quiral intermedio empleando una ADH comercial (c-LEcta GmbH).

En este caso los investigadores de Pfizer evaluaron aplicar el sistema de reciclaje del cofactor usando 2-PrOH por su simplicidad y costo operativo; sin embargo, debido a la inestabilidad enzimática a altas concentraciones se descartó. El proceso destaca también por la baja carga de enzima empleada para generar el producto, siendo ésta del 0.2 % en peso (56 g).

En las últimas dos entradas del Esquema 11 se presentan dos de entre las diferentes estrategias biocatalíticas desarrolladas para la preparación de Atorvastatin (Lipitor®), un fármaco *blockbuster* utilizado para disminuir los niveles de colesterol y para prevenir enfermedades cardiovasculares.

En la primera de ellas, desarrollada por Codexis,⁹³ se aplicó una ADH de diseño (KRED-*mut*) para la reducción del 4-cloro-3-oxobutanoato de etilo de partida. Se obtuvo el correspondiente hidroxiéster ópticamente activo con un 96% de rendimiento y un exceso enantiomérico >99.5 %.

En la segunda, Zheng y colaboradores,⁹⁴ parten de un sustrato ópticamente activo de estructura similar. Mediante la reducción de la enzima se logra obtener el segundo centro estereogénico hidroxilado de forma asimétrica. La capacidad de transformación del proceso alcanza los 1.05 kg·L⁻¹ por día manteniendo una selectividad elevada (>99.5 % *de*).

⁹² 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.

⁹³ 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.

⁹⁴ X.-M. Gong, Z. Qin, F.-L. Li, B.-B. Zeng, G.-W. Zheng, J.-H. Xu, *ACS Catal.* **2019**, *9*, 147–153.

0.3.3. Alqueno reductasas/Ene-reductasas (ERED's)

La reducción asimétrica de los enlaces C=C es una reacción muy valiosa para generar quiralidad, ya que conduce a la creación de hasta dos centros estereogénicos. Por ello, se han desarrollado distintos tipos de catalizadores muy eficaces incluso a escala industrial.

La hidrogenación asimétrica basada en metales de transición ha logrado un grado alto de éxito y rendimiento, siendo destacados los avances en este campo de William S. Knowles y Ryōji Noyori; a los que se le otorgó el Premio Nobel de Química de 2001.⁹⁵ La organocatálisis, por otra parte, sin la necesidad de metales, emplea catalizadores de tipo ácido para llevar a cabo la hidrogenación. Sin embargo, debido a requerir generalmente cantidades equimolares de reductor, su economía atómica es limitada.⁹⁶ La naturaleza, por su parte, ofrece una alternativa atractiva, sostenible y rentable. Varios tipos de enzimas son activas en la reducción estereoselectiva de los dobles enlaces.

Las alqueno reductasas o ene-reductasas (ERED's) conforman un conjunto de múltiples familias de enzimas capaces de catalizar la reducción asimétrica de alquenos activados utilizando un cofactor reducido como fuente de hidruro.^{74b,97}

La familia más predominante de ERED's son las oxidorreductasas de la familia 'Old Yellow Enzymes' (OYE's, EC 1.6.99.1), las cuales son flavoproteínas dependientes de NAD(P)H.

El mecanismo de reducción catalizada por ERED's (OYE) de alquenos activados α,β -insaturados se ha estudiado con gran detalle.⁹⁸ En primer lugar se produce la reducción del mononucleótido de flavina (FMN) mediante la transferencia de hidruro desde una molécula de NAD(P)H. Esta coenzima, FMN, es en realidad un grupo prostético, es decir, un componente permanente (unión covalente)⁹⁹ que forma parte de la estructura de la (hetero)proteína en cuestión. A continuación, la flavina reducida (FMNH₂) transfiere estereoselectivamente un hidruro al C _{β} del compuesto α,β -insaturado activado (Esquema 12).

⁹⁵ Un 1/4 de premio otorgado respectivamente: *The Nobel Prize in Chemistry 2001. Nobel Prize Outreach AB 2023.* <<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2001/summary/>>

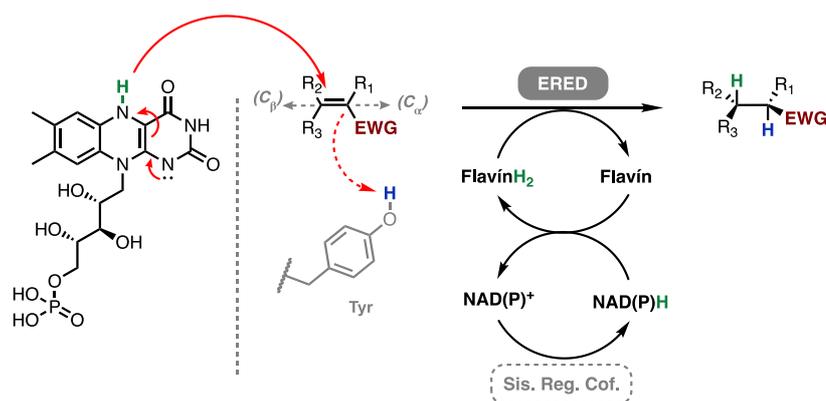
⁹⁶ A. M. F. Phillips, A. J. L. Pombeiro, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 2307–2340.

⁹⁷ *Revisiones consultadas:* a) C. K. Winklerb, G. Tasnádia, D. Clayb, M. Hallb, K. Faber, *J. Biotechnol.* **2012**, *162*, 381–389. b) C. K. Winkler, K. Fáber, M. Hall, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *43*, 97–105. c) H. S. Toogood, N. S. Scrutton, *ACS Catal.* **2018**, *8*, 3532–3549. d) T. K. Roy, R. Sreedharan, P. Ghosh, T. Gandhi, D. Maiti, *Chem. Eur. J.* **2022**, *28*, e202103949. *Capítulos de libro:* e) T. Knaus, H. S. Toogood, N. S. Scrutton (2016). *Green Biocatalysis*. (Editor: R. N. Patel). Wiley. Capítulo 18. pp. 473–488. ISBN: 978-1-118-82229-6. f) G. Brown, T. S. Moody, M. Smyth, S. J. C. Taylor (2017). *Biocatalysis: An Industrial Perspective*. (Editores: G. de Gonzalo, P. Domínguez de María). Royal Society of Chemistry. Capítulo 8. pp. 229–256. ISBN: 978-1-78262-619-0.

⁹⁸ R. M. Kohli, V. Massey, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32763–32770.

⁹⁹ D. L. Nelson, M. M. Cox (2014). *Lehninger: Principios de Bioquímica*, 6ª Ed. Omega (Barcelona). ISBN: 978-8428216036.

Introducción



Esquema 12. Bioreducción asimétrica de un alqueno activado usando una ene-reductasa. A la izqda. la forma reducida del cofactor flavín mononucleótido (FMN). [H^+]: protón de un residuo de tirosina o del disolvente.

Al mismo tiempo, se transfiere un protón al C_α desde el lado opuesto, normalmente procedente de un residuo de tirosina (Tyr) o, en última instancia, derivado del disolvente. Al producirse este por la cara opuesta, la adición múltiple al enlace $\text{C}=\text{C}$ se realiza de forma relativa *trans*-estereoespecífica. El producto reducido finalmente abandona el sitio activo, dejando el FMN nuevamente en su estado oxidado y listo para el siguiente ciclo catalítico. La tirosina eventualmente es protonada de nuevo por el disolvente.

Dado que el cofactor de flavina oxidado debe ser regenerado para continuar el ciclo catalítico, se requiere un sistema de reciclaje de NAD(P)H robusto, de igual manera que con las ADH's (ver Sección 0.3.2, Esquema 9). Las estrategias más empleadas incluyen el uso de glucosa/GDH siguiendo un enfoque de enzima acoplada, o el uso de 2-PrOH/ADH, basado en un sustrato acoplado. Además, también se ha estudiado el empleo de miméticos de los cofactores nicotinámicos (mNADH's), como se ha visto anteriormente.⁸¹

Tal como se ha mencionado, es necesario que el alqueno esté activado, por ello, se requiere un grupo aceptor de electrones (EWG, del inglés *Electron Withdrawing Group*) conjugado para la actividad. Su presencia reduce la densidad electrónica en el doble enlace $\text{C}=\text{C}$, lo que hace que sea más susceptible un ataque de hidruro. El grupo aceptor de electrones también es responsable de anclar el sustrato en el sitio activo de la enzima mediante enlaces de hidrógeno con otros aminoácidos de la cavidad (His o Asn). Los siguientes grupos funcionales pueden servir como *activadores*:

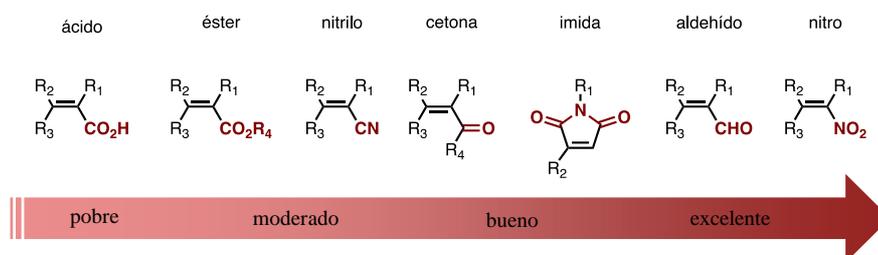


Figura 6. Listado resumen con los grupos electroattractores de los compuestos α,β -insaturados clasificados según la activación del doble enlace. Fuente: Adaptado de M. Hall.⁵⁵

Los alquenos poco activados, conocidos como sustratos límite, como por ejemplo los que incluyen un único grupo éster conjugado o un grupo carboxílico libre, exhiben una menor reactividad y su reducción es más compleja en comparación con aquellos que cuentan con un grupo electroattractor más efectivo.

Estas enzimas representan un recurso de gran interés para aplicaciones industriales debido a su alta regio-, estereo- y enantioselectividad, así como una alternativa real a los métodos no enzimáticos. Además, los métodos sintéticos de *trans*-hidrogenación asimétrica son poco comunes en general.¹⁰⁰

En el Esquema 13, se han seleccionado algunos de los procedimientos sintéticos presentes en la bibliografía empleando las ERED's como biocatalizadores. El primer ejemplo de biorreducción¹⁰¹ es una síntesis catalizada por una OYE3, realizada en escala de gramo, de un intermedio de Tesaglitazar, una API propuesta para el tratamiento de la diabetes tipo 2. Como material de partida se utiliza un aldehído α,β -insaturado con un grupo alcoxi (EtO-) geminal al aldehído.

El segundo ejemplo,¹⁰² lejos de ser un procedimiento industrial, ya que la escala de trabajo es del orden de los miligramos, es importante porque la estructura de tipo ácido 2-fenilpropiónico que se obtiene, está presente de forma recurrente en API's como el flurbiprofen o el ibuprofeno, entre otros.

En el último ejemplo, se muestra un enfoque biocatalítico para la preparación de ciclohexanonas 3-sustituidas quirales, estructuras comunes en numerosas API's o como *building block* en síntesis orgánica. En esta aproximación,¹⁰³ realizada por investigadores de

¹⁰⁰ a) S. Kraft, K. Ryan, R. B. Kargbo, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 11630–11641. b) A. Scholtissek, D. Tischler, A. H. Westphal, W. J. H. van Berkel, C. E. Paul, *Catalysts* **2017**, *7*, 130.

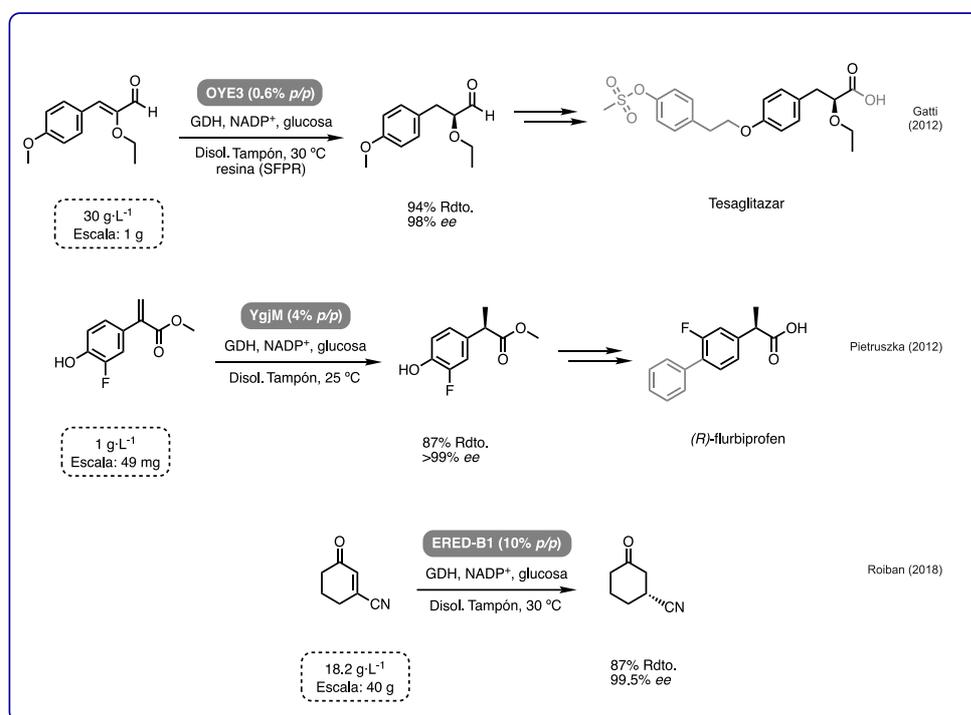
¹⁰¹ M. Bechtold, E. Brenna, C. Femmer, F. G. Gatti, S. Panke, F. Parmeggiani, A. Sacchetti, *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16*, 269–276.

¹⁰² J. Pietruszka, M. Schölzel, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 751–756.

¹⁰³ T. Hadi, A. Díaz-Rodríguez, D. Khan, J. P. Morrison, J. M. Kaplan, K.T. Gallagher, M. Schober, M. R. Webb, K. K. Brown, D. Fuerst, R. Snajdrova, G.-D. Roiban, *Org. Process Res. Dev.* **2018**, *22*, 871–879.

Introducción

GlaxoSmithKline, se emplean tanto enzimas comerciales como sobreexpresadas producidas internamente, planteándose distintas rutas para obtener los productos deseados. Las enzimas utilizadas abarcan ERED's, lipasas y nitrilasas. No obstante, las dos últimas enzimas mencionadas, a diferencia de las ERED's, sólo pueden alcanzar un rendimiento teórico del 50% (resolución del producto racémico inicial).



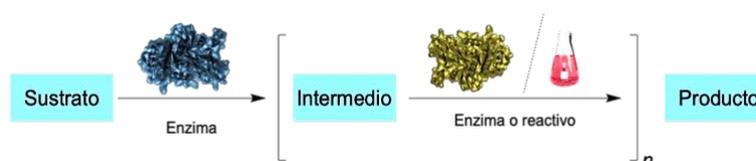
Esquema 13. Ejemplos seleccionados de procesos utilizando ERED's.

0.4. Procesos multicatalíticos. Tipos de cascada.

Como se ha discutido anteriormente, en la actualidad, los procesos químicos, especialmente en la industria, han de cumplir las expectativas que demanda tanto la sociedad como las regulaciones gubernamentales. Esto implica adoptar nuevas estrategias y prácticas más sostenibles y respetuosas con el medio ambiente, reduciendo la generación de residuos y, al mismo tiempo, aumentando la productividad en la medida de lo posible.

Un enfoque innovador que ha surgido para cumplir con estas demandas consiste en la combinación de catalizadores dentro de un único recipiente, es decir, promover la implementación de reacciones en cascada. En este marco, las enzimas son catalizadores ideales para estos procesos, ya que la mayoría de ellas comparten condiciones de reacción compatibles.

La definición más simple de cascada consiste en la combinación de al menos dos pasos químicos en un único recipiente de reacción sin aislar los intermedios.¹⁰⁴ En función de la naturaleza de los catalizadores se puede realizar una primera clasificación: cuando se usan dos o más enzimas (o con una como veremos más adelante), se denomina cascada *biocatalítica* o *multienzimática*. Si se combina una enzima con un catalizador metálico,¹⁰⁵ orgánico¹⁰⁶ o fotocatalizador,¹⁰⁷ se emplea el término de cascada *quimioenzimática*, *híbrida* o, de manera más general, procesos multicatalíticos.



Esquema 14. Ejemplo de un proceso en cascada utilizando catalizadores enzimáticos y/o reactivos químicos.

En contraposición, la química tradicional destaca por un planteamiento de síntesis en ‘múltiples etapas’ separadas, es decir, se inicia en un recipiente (matraz, reactor, etc.) en el que se introduce el primer catalizador, así como el resto de componentes y sustratos necesarios para llevar a cabo la primera reacción. Después, los productos se extraen del medio de reacción y se purifican (opcional en algunos casos) para que sirvan como sustrato para el segundo paso catalítico en un nuevo recipiente, y así hasta completar la ruta sintética.¹⁰⁸

Como se puede deducir a partir de esta manera de trabajar, la principal desventaja radica en la necesidad de un paso de extracción y purificación después de cada etapa, incrementándose en gran medida los residuos asociados, así como el consumo energético global o los recursos, como los múltiples disolventes empleados.

En comparación, una de las ventajas más destacables de las reacciones en cascada es que evitan los pasos de aislamiento de intermedios, lo cual no sólo supone un ahorro en tiempo, esfuerzo y dinero, sino que, además, en el caso de trabajar con intermedios inestables

¹⁰⁴ J. H. Schrittwieser, S. Velikogne, M. Hall, W. Kroutil, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 270–348.

¹⁰⁵ a) N. Ríos-Lombardía, J. García-Álvarez, J. González-Sabín, *Catalysts* **2018**, *8*, 75. b) C. Pérez-Ríquez, A. Rodríguez-Otero, J. M. Palomo, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 7114–7123.

¹⁰⁶ F. R. Bisogno, M. G. López-Vidal, G. de Gonzalo, *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359*, 2026–2049.

¹⁰⁷ a) W. Harrison, X. Huang, H. Zhao, *Acc. Chem. Res.* **2022**, *55*, 1087–1096. b) M. A. Emmanuel, S. G. Bender, C. Bilodeau, J. M. Carceller, J. S. DeHovitz, H. Fu, Y. Liu, B. T. Nicholls, Y. Ouyang, C. G. Page, T. Qiao, F. C. Raps, D. R. Sorigué, S.-Z. Sun, J. Turek-Herman, Y. Ye, A. Rivas-Souchet, J. Cao, T. K. Hyster, *Chem. Rev.* **2023**, *123*, 5459–5520. c) V. Alphand, W. J. H. Berkel, V. Jurkaš, S. Kara, R. Kourist, W. Kroutil, F. Mascia, M. M. Nowaczyk, C. E. Paul, S. Schmidt, J. Spasic, P. Tamagnini, C. K. Winkler, *ChemPhotoChem* **2023**, *7*, e20220032.

¹⁰⁸ E. Heuson, F. Dumeignilb, *Catal. Sci. Technol.* **2020**, *10*, 7082–7100.

Introducción

o de difícil purificación, estos se producen y se transforman directamente en el mismo medio de reacción.¹⁰⁹

Las reacciones en cascada se pueden clasificar de diversas maneras, en la literatura no existe un criterio único para designarlas y, en muchas ocasiones, se emplean distintos términos para describir el mismo proceso, lo que puede generar cierta confusión.¹¹⁰ Atendiendo a la función o al cometido específico para el que están diseñadas, se pueden destacar cuatro categorías clave de cascadas: *lineales*, *ortogonales*, *paralelas* y *cíclicas*.¹¹¹

Las cascadas *lineales* son las más comunes e importantes, implican reacciones consecutivas desde un único sustrato hasta el producto final, con uno o varios intermedios. A su vez, se pueden dividir en dos tipos de procesos, las cascadas concurrentes y las secuenciales:

- **Cascada concurrente:** En estos procesos, todos los reactivos deben agregarse al comienzo de la reacción en el mismo recipiente. Además, las condiciones de reacción se mantienen constantes durante el proceso.
- **Cascada secuencial:** En estos procesos, algunos reactivos se incorporan a la mezcla de reacción después de que una etapa haya concluido, es decir, en el mismo recipiente y una vez terminado un determinado paso catalítico, se agrega un nuevo catalizador necesario para que tenga lugar la siguiente etapa. En algunas ocasiones, también se suele ajustar las condiciones de reacción para adaptarlas al nuevo catalizador.

En los sistemas concurrentes, el hecho de que los catalizadores deban trabajar en las mismas condiciones iniciales puede suponer un desafío, y es que, se deben identificar unas condiciones, como los rangos de pH, la temperatura o los cosolventes empleados, compatibles entre sí.¹⁰⁹

También hay que tener en cuenta que se pueden dar situaciones en las que el mismo compuesto (o intermedio) es sustrato de varios de los catalizadores que participan en el proceso, lo cual supondría una pérdida en la (quimio)selectividad, generando subproductos no deseados en el proceso.

¹⁰⁹ N. Losada-García, Z. Cabrera, P. Urrutia, C. García-Sanz, A. Andreu, *Catalysts* **2020**, *10*, 1258.

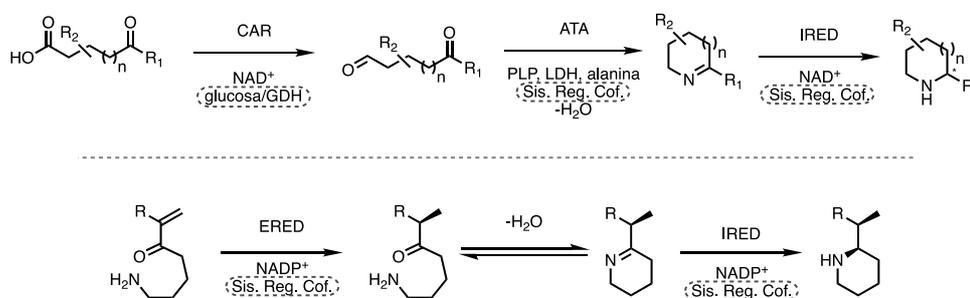
¹¹⁰ a) E. García-Junceda, I. Lavandera, D. Rotherc, *J. Mol. Catal., B Enzym.* **2015**, *114*, 1–6. b) F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, H. Gröger, R. Snajdrova, H. Iding, U. T. Bornscheuer, *Nat. Catal.* **2018**, *1*, 12–22.

¹¹¹ *Revisiones consultadas:* a) I. Oroz-Guinea, E. García-Junceda, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 236–249. b) R. C. Simon, N. Richter, E. Busto, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 129–143. c) C. An, K. M. Maloney, *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.* **2022**, *34*, 100591. d) A. I. Benítez-Mateos, D. R. Padrosa, F. Paradisi, *Nat. Chem.* **2022**, *14*, 489–499.

Por otro lado, realizar una cascada en modo secuencial permite la flexibilidad de emplear condiciones de reacción no compatibles y puede prevenir la pérdida de selectividad asociada a reactividades cruzadas de los catalizadores implicados como se ha comentado anteriormente.

Dos ejemplos recientes de este tipo de cascadas son, por un lado, la combinación de una reductasa de ácido carboxílico (CAR), una ATA y una imino reductasa (IRED) en un enfoque concurrente;¹¹² por otro está la combinación de una ERED y una IRED mediante una cascada secuencial.¹¹³ Ambos procesos han sido desarrollados por el grupo de investigación del profesor Nicholas J. Turner (Esquema 15).

En el primer ejemplo, publicado en 2016, se obtienen mediante cascada concurrente, piperidinas y pirrolidinas mono y disustituidas ópticamente activas. En el primer paso, la CAR transforma un cetoácido en el cetoaldehído análogo. A continuación, mediante una transaminación se llega a la formación de la imina tras un proceso de ciclación espontánea a partir del intermedio de aminocetona precursor. En el último paso, la IRED realiza la reducción asimétrica de la imina formada para obtener así los productos finales correspondientes.



Esquema 15. Esquema superior, cascada concurrente CAR/ATA/IRED. Esquema inferior, cascada secuencial ERED/IRED.

En el ejemplo de cascada secuencial, publicado en 2019, (parte inferior, Esquema 15), una ERED actúa sobre el enlace C=C de una serie de ω -aminoenonas reduciéndolas. En el medio de reacción, las ω -aminoenonas se encuentran en equilibrio con su forma de anillo cerrado. Por esta razón, si se incorporara la IRED desde el principio, se podría reducir esa imina, generando un producto que no es activo para la ERED y dando como resultado una mezcla de productos.

¹¹² S. P. France, S. Hussain, A. M. Hill, L. J. Hepworth, R. M. Howard, K. R. Mulholland, S. L. Flitsch, N. J. Turner, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 3753–3759.

¹¹³ T. W. Thorpe, S. P. France, S. Hussain, J. R. Marshall, W. Zawodny, J. Mangas-Sánchez, S. L. Montgomery, R. M. Howard, D. S. B. Daniels, R. Kumar, F. Parmeggiani, N. J. Turner, *J. Am. Chem. Soc.* **2019** *141*, 19208–19213.

Introducción

Por ello, una vez concluido el primer paso se añade la IRED al medio de reacción y comienza la reducción del enlace C=N de la imina. De esta manera, se obtiene una variedad de heterociclos de aminas sustituidos, enriquecidos diastereoisoméricamente.

Continuando con la clasificación, las cascadas *paralelas* y las *ortogonales*, son procesos que están íntimamente relacionados. En general suelen implicar pasos enzimáticos auxiliares, que complementan a la cascada principal, regenerando intermedios clave como los cofactores. Un ejemplo de cascada paralela es el mostrado en el Esquema 9 para el reciclaje del cofactor NAD(P)H en oxidorreductasas, utilizando el sistema auxiliar de glucosa/GDH.

En las cascadas *ortogonales*, el cosustrato conduce a un intermedio que, en vez de ser regenerado como en el caso anterior, se convierte en un coproducto (generalmente no deseado) que es eliminado, logrando así desplazar el equilibrio de la reacción principal. Un ejemplo de cascada ortogonal es el sistema acoplado por las enzimas ATA/LDH/GDH (ver Esquema 5).

Las cascadas *cíclicas*, por su parte, se limitan a aplicaciones especiales, generalmente se emplean en reacciones de desracemización,¹¹⁴ en las que uno de los productos generados a través de una cascada, se convierte de nuevo en uno de los materiales de partida tras varios ciclos de acción.^{110a}

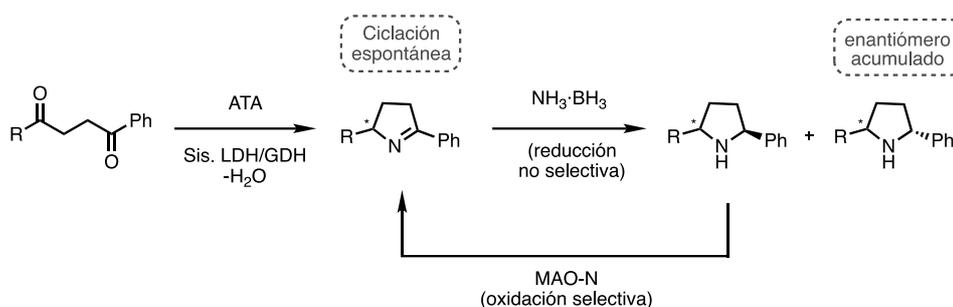
Un ejemplo común de cascada cíclica lo encontramos de nuevo en un trabajo de Turner y colaboradores.¹¹⁵ En dicha investigación accedieron a pirrolidinas 2,5-disustituidas ópticamente activas mediante un proceso en cascada (cíclica) regio- y estereoselectiva empleando un sistema de transaminasa/monoamino oxidasa (MAO-N)/NH₃·BH₃ (Esquema 16).

Una vez obtenida la imina por la acción de la ATA (tras un proceso espontáneo de ciclación), el sistema de desracemización MAO-N/NH₃·BH₃ combina una oxidación enantioselectiva (MAO-N) con una reducción no estereoselectiva (NH₃·BH₃) en el ciclo a ciclo se acumula el enantiómero no oxidado por la monoamino oxidasa.

Dado que el borano puede reducir a la dicetona inicial, la adición de todos los reactivos simultáneamente, cascada concurrente, en este caso no es posible.

¹¹⁴ a) C. C. Gruber, I. Lavandera, K. Faber, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 1789–1805. b) C. Aranda, G. Oksdath-Mansilla, F. R. Bisogno, G. de Gonzalo, *Adv. Synth. Catal.* **2020**, *362*, 1233–1257. c) M. Huang, T. Pan, X. Jiang, S. Luo, *J. Am. Chem. Soc.* **2023**, *145*, 10917–10929.

¹¹⁵ E. O'Reilly, C. Iglesias, D. Ghislieri, J. Hopwood, J. L. Galman, R. C. Lloyd, N. J. Turner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 2447–2450.



Esquema 16. Cascada ATA/MAO-N/NH₃·BH₃ regio- y estereoselectiva para acceder a pirrolidinas 2,5-disustituidas quirales.

Finalmente, existe un caso particular de cascadas, conocidas como *auto-cascadas*, donde sólo se requiere de un único catalizador. Algunos procesos de este tipo han aparecido ya en los ejemplos previos, (Esquemas **15** sup. y **16**, pasos con la ATA).

Una vez que ha tenido lugar la transformación enzimática, se desencadena una reacción espontánea ya bien sea de forma inter- o intramolecular, que evoluciona hacia el producto final.¹¹⁶ Las moléculas cíclicas en particular se pueden obtener a partir de cascadas activadas por una única enzima sin añadir reactivos o catalizadores adicionales. En este caso reciben el nombre de *cascada espontánea de cierre de anillo*, o, en inglés: *spontaneous ring-closure cascade*.¹⁰⁴

En los Capítulos 1 y 2 de esta Tesis Doctoral, veremos ejemplos específicos donde, este tipo de cascadas, han sido el paso clave en los procesos quimioenzimáticos que se han desarrollado.

0.5. Biocatálisis, entre la industrial y la academia.

La biocatálisis ha experimentado un marcado crecimiento durante la última década y se ha consolidado como un campo destacado dentro de la investigación y del desarrollo. Además, si tenemos en cuenta la tendencia que tienen los precios cada vez más competitivos y accesibles a la hora de adquirir enzimas, se puede afirmar que se ha producido una *democratización* (necesaria), que ha igualado las oportunidades de uso dentro la de comunidad científica.

Tanto en el ámbito académico como en el industrial, se han logrado avances que han impulsado este crecimiento.¹¹⁷ Si bien es cierto que ambas disciplinas comparten ciertas similitudes en sus objetivos y siguen una trayectoria paralela en muchos aspectos, es

¹¹⁶ A. Martín, I. Solanki, M. B. Haarr, E. O'Reilly, *Eur. J. Org. Chem.* **2023**, e202300858.

¹¹⁷ N. C. Goodwin, J. P. Morrison, D. E. Fuerst, T Hadi, *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 1363–1366.

Introducción

importante destacar que también existen diferencias notables que causan, que cada una a su manera, se enfoque en desarrollar la biocatálisis según sus intereses primarios.

Uno de los puntos en que difieren se encuentra en el nivel de desempeño exigido en los procesos industriales. Como ya se ha visto en secciones anteriores, para que la biocatálisis se pueda implementar de manera correcta en la industria, las *métricas* de los procesos deben cumplir ciertos criterios; por ejemplo, los productos químicos básicos requieren productividades entre 2.000-10.000 kg de producto por kilogramo de enzima, mientras que los productos farmacéuticos sólo requieren productividades de entre 50-100 kg de producto/kg de enzima.¹¹⁸

Los procesos que se desarrollan en un laboratorio académico, casi sin excepción, no alcanzan los valores objetivo necesarios que sí se le exigen a la industria y están lejos de realizar transformaciones a esas escalas de trabajo. Es evidente que, al menos en este aspecto, ambos mundos tienen diferentes prioridades.¹¹⁹ Mientras que en el entorno industrial se busca (y se debe buscar) que el proceso sea rentable, capaz de estandarizarse a gran escala y con una calidad adecuada; el entorno académico se centra (y se debe centrar) en generar conocimiento y comunicarlo a la comunidad científica, lo cual puede servir, directa o indirectamente, para optimizar los procesos de la industria.

Como es de esperar, las recompensas que se obtienen también son diferentes, la mayor visibilidad posible que los académicos pueden dar a su trabajo, es una publicación en una revista de alto impacto; mientras que en la industria el enfoque consiste en ser la pionera en llevar su producto al mercado, lo cual se traduce en un beneficio económico directo.

Otra diferencia notable se encuentra en las limitaciones adjuntas a cada investigación. La investigación básica requiere una búsqueda continua de financiación,¹²⁰ a menudo acompañada de compromisos docentes y burocráticos.¹²¹

Los laboratorios universitarios, o centros de investigación, tienen un marcado carácter formativo, muestra de ello es la amplia rotación de participantes, que van desde estudiantes noveles que están por primera vez en un laboratorio hasta *postdocs* ya ‘totalmente’ formados. A pesar de las ralentizaciones a corto plazo que esto puede causar, sin la formación se carecería de la base necesaria para el correcto desarrollo de las investigaciones.

Por otro lado, la industria generalmente no tiene problemas destacados en términos de formación o financiación, siendo en esta última en parte debido al régimen de patentes

¹¹⁸ Tufvesson, J. Lima-Ramos, M. Nordblad, J. M. Woodley, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 266–274.

¹¹⁹ S. Hanessian, *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 6–9.

¹²⁰ Inciso, es una afirmación general, la búsqueda de financiación entre distintos grupos puede ser muy dispar. En otros países, por ejemplo, es habitual que se financien con las patentes que el propio grupo genera.

¹²¹ J. C. Barrow, *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 687–689.

presente en este ámbito. Aunque la figura de la ‘propiedad intelectual’ es esencial en este ámbito, algunas partes de la comunidad la ven como un posible obstáculo para la innovación y el acceso al conocimiento.

Todas estas diferencias mencionadas a veces pueden complicar una posible colaboración entre ambos ámbitos. No obstante, en determinadas disciplinas, como las relacionadas con la farmacología o el desarrollo de medicamentos, (y cuando la legislación no es un impedimento), la colaboración entre academia e industria puede resultar productiva.¹¹⁹ Estas alianzas facilitan la transferencia de conocimiento y tecnología, acelerando la implementación de procesos biocatalíticos a escala industrial. La academia puede contribuir con catalizadores y conocimientos innovadores, mientras que la industria puede proporcionar recursos y financiación para apoyar investigaciones académicas orientadas hacia aplicaciones prácticas.

OBJETIVOS GENERALES

Objetivos generales

Como se ha puesto de manifiesto en la Introducción de esta Tesis Doctoral, la incorporación de biocatalizadores en la síntesis orgánica posibilita la preparación de compuestos orgánicos con una elevada selectividad y en condiciones suaves de reacción. De esta manera, la Biocatálisis se presenta como una seria alternativa a las estrategias químicas tradicionales, permitiendo en muchos casos desarrollar procesos de manera más sostenible, al lograr minimizar el uso de sustancias peligrosas, y fomentar, en la medida de lo posible, la reducción de la contaminación asociada.

Por ello, en esta Tesis Doctoral nos planteamos el empleo de diversas enzimas, incluyendo transaminasas, alcohol deshidrogenasas y ene-reductasas, con el fin de obtener productos de elevado valor añadido a través de métodos eficientes y selectivos. Así, esta Memoria se dividirá en tres Capítulos, en función de las estructuras objetivo a desarrollar.

El primer Capítulo, considerando las posibilidades sintéticas que tienen las transaminasas y la relevancia biológica asociada a los 1,4-diazoheterociclos, se centró en diseñar una metodología enzimática sencilla y general que permita la síntesis enantioselectiva de piperazinonas y 1,4-diazepanonas ópticamente activas.

En el segundo Capítulo, del mismo modo, se ha diseñado una estrategia quimioenzimática empleando, en este caso, alcohol deshidrogenasas para sintetizar un grupo de isobenzofuran-1(3*H*)-onas 3-sustituidas, de forma enantioselectiva.

Tanto en el primer como en el segundo Capítulo se ha desarrollado un tipo específico de proceso en cascada conocido como: *cascada espontánea de cierre de anillo* en el cual, los productos finales se forman mediante una ciclación espontánea que tiene lugar a continuación del paso biocatalítico, produciéndose, en el mismo recipiente de reacción, sin necesidad añadir reactivos o catalizadores adicionales ni de aislar los intermedios que se formen.

En la actualidad, se están estableciendo nuevas estrategias innovadoras en las que se promueve el uso de varias enzimas o catalizadores en el mismo medio de reacción conocidos, de manera general, como *procesos multicatalíticos*.

Por este motivo, en el tercer Capítulo se han desarrollado metodologías de trabajo que emplean un sistema bi-enzimático formado por una ene-reductasa y una alcohol deshidrogenasa, capaz de actuar en un único recipiente tanto de manera *concurrente* como *secuencial*. En este contexto, se ha investigado la preparación estereoselectiva de 3-hidroxipiperidinas con sustitución en la posición C5. Estas estructuras están presentes en numerosos compuestos con actividad biológica y, además, pueden desempeñar el papel de *bloques de construcción* en procesos de síntesis.

Todos los proyectos de investigación recogidos en esta Memoria, además de tener como denominador común el uso de biocatalizadores en las etapas clave de reacción, presentan una

Objetivos generales

serie de estrategias de trabajo que se han replicado en cada uno de ellos. De manera general han consistido en:

- Estudiar y optimizar los parámetros de reacción más importantes de las etapas enzimáticas para conseguir aumentar la eficiencia de dicho proceso.
- Preparar un panel heterogéneo de moléculas para el estudio, que incorpore modificaciones estructurales, considerando, en la medida de lo posible, incluir modificaciones que ofrezcan un mayor potencial para una funcionalización posterior.
- Evaluar la robustez de las mejores biotransformaciones encontradas en cada Capítulo, mediante el diseño y la realización de experimentos en una escala semipreparativa.

CAPÍTULO 1.

Síntesis de piperazinonas y 1,4-diazepanonas ópticamente puras empleando transaminasas.

ANTECEDENTES

1.1. Importancia de los 1,4-diazoheterociclos.

Los compuestos heterocíclicos nitrogenados, como por ejemplo las *piperazinas*, las *piperazinonas* o los *diazepanos*, desempeñan un papel muy importante en el descubrimiento de nuevos medicamentos. Al revisar los medicamentos aprobados por la FDA¹²² durante el año 2021, se observa que entre los fármacos de molécula pequeña (*small molecule*), un tercio de los aprobados para uso oncológico (9) contienen un anillo de piperazina. Además, según un análisis¹²³ realizado sobre los sistemas de anillos presentes en los medicamentos incluidos en el Libro Naranja de la FDA, el ciclo de piperazina es el cuarto más utilizado.

El anillo de piperazina contiene en su estructura dos átomos de nitrógeno, lo que le confiere unas propiedades fisicoquímicas relevantes en el ámbito de la química médica y del descubrimiento de fármacos basados en fragmentos, conocido como FBDD (del inglés, *Fragment Based Drug Desing*). alguna de estas cualidades son:

- Fácil derivatización de los átomos de nitrógeno con sustituyentes, una modificación que puede realizarse ortogonalmente y que puede configurarse para modular su basicidad.¹²⁴
- Rigidez estructural relativa que, junto con la facilidad de modificar las posiciones nitrogenadas citada anteriormente, resulta en una estrategia muy interesante para modular la biodisponibilidad y las propiedades ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción)¹²⁵ de los candidatos clínicos.
- La simetría lineal de los nitrógenos en la estructura, le convierte en una excelente opción como espaciador (*linker*) ya que permite unir o separar componentes de un sistema de manera controlada, como si de un puente se tratara.¹²⁶ Ello proporciona un grado de libertad mayor al desarrollar rutas sintéticas, especialmente en el FBDD.
- Los anillos de piperazinas son una base para añadir quiralidad y complejidad molecular, permitiendo mejorar así la afinidad de unión y especificidad por las

¹²² <https://www.fda.gov/drugs>

¹²³ R. D. Taylor, M. MacCoss, A. D. Lawson, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 5845–5859. Otros artículos que lo mencionan: a) E. Vitaku, D. T. Smith, J. T. Njardarson *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10257–10274. b) N. A. Meanwell, O. Loiseleur, *J. Agric. Food Chem.* **2022**, *70*, 10942–10971.

¹²⁴ Z. Y. Kristen, E. Gettys, M. Dai, *Beilstein J. Org. Chem.* **2016**, *12*, 702–715.

¹²⁵ R. H. Zhang, H. Y. Guo, H. Deng, J. Li, Z. S. Quanb, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2021**, *36*, 1165–1197.

¹²⁶ a) M. Yu, M. Lizarzaburu, H. Beckmann, R. Connors, K. Dai, K. Haller, C. Li, L. Liang, M. Lindstrom, J. Maa, A. Motani, M. Wanska, A. Zhang, L. Li, J. C. Medina, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1758–1762. b) S. Hu, Z. Wang, T. Hou, X. Maa, J. Li, T. Liu, X. Xie, Y. Hua, *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 1157–1168. c) J. H. Ryu, J. A. Lee, S. Kim, Y. A. Shin, J. Yang, H. Y. Han, H. J. Son, Y. H. Kim, J. H. Sa, J.-S. Kim, J. Lee, J. Lee, H.-G. Park, *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 10176–10189.

Capítulo 1.

dianas terapéuticas, sin alterar otras partes de la molécula, ya que, la unión receptor-ligando se define principalmente por interacciones tridimensionales.¹²⁷

Por todo ello, las piperazinas son ampliamente valoradas en química médica y han sido reconocidas como una *estructura privilegiada*, además de ser uno de los *N*-heterociclos más presentes en productos médicos.¹²⁸ En la Figura 7 se muestran algunos ejemplos significativos de fármacos actuales o en estudio que contienen anillos quirales de piperazina y de piperazina-2-ona.

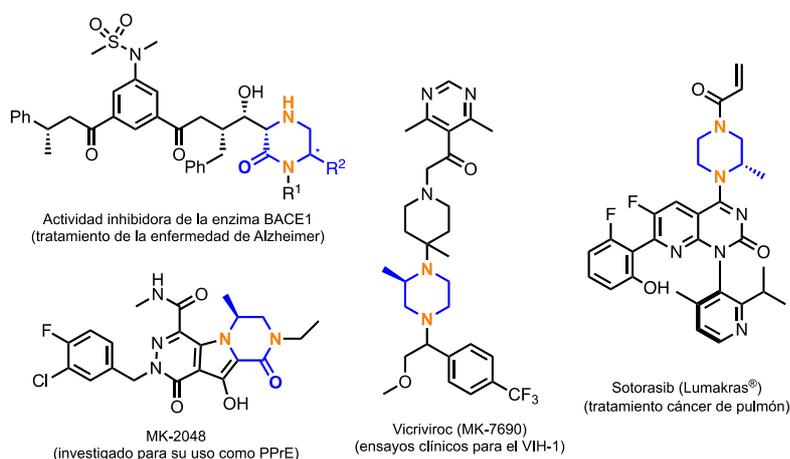


Figura 7. Ejemplos de moléculas con actividad biológica que contienen piperazinonas y piperazinas quirales en su estructura.

Las piperazina-2-onas (o simplemente piperazinonas), son precursores directos de los anillos de piperazina. Estas estructuras están presentes en numerosos compuestos naturales y pueden servir como intermedios sintéticos para la producción de diversas piperazinas,¹²⁹ ya que uno de los métodos más utilizados para sintetizar piperazinas es la reducción de las piperazinonas o las piperazinodionas correspondientes. Como se verá más adelante, estas estructuras se suelen preparar a partir de aminoácidos, es decir, a partir de compuestos que contengan una quiralidad intrínseca (estrategia de ‘chiral pool’).

Además, las piperazinonas son versátiles químicamente y pueden someterse a transformaciones posteriores originando estructuras más complejas.¹³⁰ También las

¹²⁷ a) A. W. Sun, S. N. Hess, B. M. Stoltz, *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 788–792. b) A. K. Rathi, R. Syed, H. S. Shin, R. V. Patel, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2016**, *26*, 777–797. c) A. W. Hung, A. Ramek, Y. Wang, T. Kaya, J. A. Wilson, P. A. Clemons, D. W. Young, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 6799–6804. d) R.-H. Zhang, H.-Y. Guo, H. D. Jinzi Li, Z.-S. Quan *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2021**, *36*, 1165–1197.

¹²⁸ a) M. Shaquizzaman, G. Verma, A. Marella, M. Akhtar, W. Akhtar, M. Faraz Khan, S. Tasneem, M. M. Alam, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *102*, 487–529. b) D. A. Horton, G. T. Bourne, M. L. Smythe, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 893–930.

¹²⁹ C. De Risi, M. Pelà, G. P. Pollini, C. Trapella, V. Zanirato, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 255–274.

¹³⁰ T. Maeba, K. Suzawa, M. Kotoku, R. Masuo, D. Motoda, N. Yamaoka, *US 2020/0017505 A1*, **2020**.

piperazinonas se han utilizado para introducir restricciones conformacionales en péptidos y han demostrado ser una valiosa herramienta en la búsqueda y desarrollo de nuevos peptidomiméticos.¹³¹

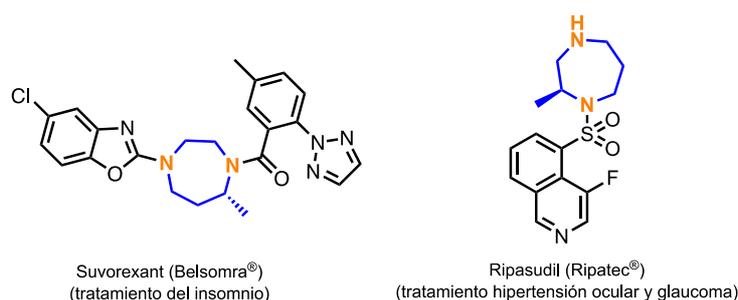


Figura 8. Ejemplos representativos de fármacos con 1,4 diazepanos quirales en su estructura.

Por otra parte, los *1,4-diazepanos*, también conocidos como *homopiperazinas*, aunque no están tan extendidos como los heterociclos mencionados anteriormente, también se pueden encontrar formando parte de los esqueletos de compuestos de interés médico. En la Figura 8 se muestran dos ejemplos de medicamentos comercializados: el **Suvorexant**,¹³² utilizado para tratar el insomnio, y el **Ripasudil**,¹³³ un inhibidor de la Rho-quinasa, indicado para tratar la hipertensión ocular y el glaucoma primario de ángulo abierto.

En conclusión, es de vital importancia buscar métodos eficientes para la síntesis de estos compuestos con diferentes sustituyentes en el anillo, debido a la relevancia que tienen en la química medicinal y el descubrimiento de fármacos. No es sorprendente, por ello, que existan una gran variedad de métodos sintéticos disponibles que permitan una construcción rápida y eficiente de estos heterociclos. Un gran número de estas estrategias están recopiladas en la revisión hecha por Dai y colaboradores¹³⁴ en el año 2017.

Los métodos biocatalíticos son especialmente atractivos debido a sus características inherentes como la suavidad de las condiciones de reacción en las que se realizan, la sostenibilidad o su alta selectividad.^{51,135} Sin embargo, el uso de estos métodos para la síntesis de 1,4-diazoheterociclos ha sido escasamente descrito.

¹³¹ C. Sandoval, N.-K. Lim, H. Zhang, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 1252–1255.

¹³² I. K. Mangion, B. D. Sherry, J. Yin, F. J. Fleitz, *Org. Lett.* **2012**, *14*, 3458–3461.

¹³³ S. Kusahara, M. Nakamura, *Clin. Ophthalmol.* **2020**, *14*, 1229–1236.

¹³⁴ K. E. Gettys, Z. Ye, M. Dai, *Synthesis* **2017**, *49*, 2589–2604.

¹³⁵ a) J. I. Ramsden, S. C. Cosgrove, N. J. Turner, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 11104–11112. b) S. Wu, R. Snajdrova, J. C. Moore, K. Baldenius, U. T. Bornscheuer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 88–119.

Capítulo 1.

1.2. Estrategias para la síntesis de anillos de piperazin-2-onas quirales.

Aunque la síntesis de derivados de piperazina se conoce desde hace casi un siglo,¹³⁶ la síntesis asimétrica de piperazinonas está menos estudiada y sigue siendo un reto para los químicos orgánicos.¹²⁸ En la bibliografía se han descrito diversos procesos para su obtención empleando metodologías convencionales que, como ya habíamos mencionado con anterioridad, generalmente implican el uso de aminoácidos (o derivados de ellos) u otros materiales como portadores de la quiralidad.

No obstante, estas metodologías presentan una limitación de base, ya que las opciones de sustitución en los átomos de carbono del anillo están condicionadas por los restos R^* de los aminoácidos o de los precursores quirales empleados. Por tanto, es importante desarrollar nuevos métodos de síntesis para introducir sustituyentes más variados.

El objetivo de este apartado es abordar las rutas estereoselectivas existentes para la preparación de piperazinonas quirales con sustitución en las distintas posiciones del anillo. Con el fin de organizar todas estas estrategias, se ha optado por clasificarlas en base al enlace carbononitrógeno que se forma en la reacción, una clasificación similar ya utilizada previamente por varios autores en la bibliografía.^{129,137} Se ha incluido un ejemplo representativo de cada una de estas posibilidades y, además, se han utilizado los colores rojo y azul, respectivamente, para mostrar el enlace $C-N$ formado y el átomo de nitrógeno participante en cada esquema.

Se ha incluido también una última sección donde se abordarán estrategias de síntesis asimétrica en las cuales, la quiralidad final, a diferencia de los casos anteriores, no depende exclusivamente de la configuración preexistente de los materiales de partida.

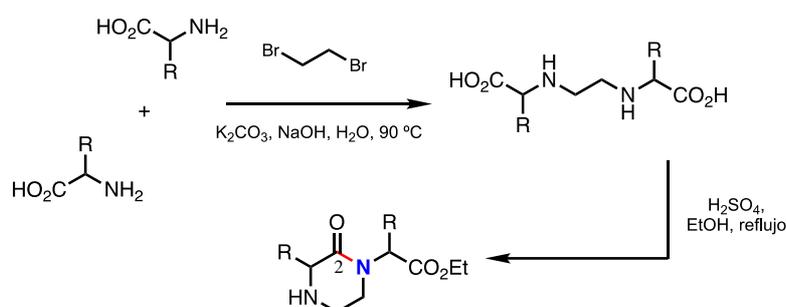
▪ Ciclación en N_1-C_2 .

La reacción intramolecular entre un grupo amino y un éster se ha utilizado ampliamente en la preparación no sólo de piperazinonas, si no de cualquier heterociclo del tipo lactámico. Yamashita y colaboradores¹³⁸ han desarrollado una forma sencilla de obtener piperazinonas 1,3-disustituidas mediante lactamización promovida por ácido. En primer lugar, se produce una reacción entre dos aminoácidos enantioméricamente puros y 1,2-dibromoetano (Esquema 17). Después, tras una doble esterificación de Fischer, se produce la ciclación intramolecular entre un grupo amino y otro de los ésteres carboxílicos formados.

¹³⁶ D. S. Pratt, C. O. Young, *J. Am. Chem. Soc.* **1918**, *40*, 1428-1431.

¹³⁷ a) C. J. Dinsmore, D. C. Beshore, *Org. Prepar. Proced. Int.* **2002**, *34*, 367-404. b) C. J. Dinsmore, D. C. Beshore, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 3297-3312.

¹³⁸ T. Yamashita, E. Tsuru, E. Banjyo, M. Doe, K. Shibata, M. Yasuda, M. Gemba, *M. Chem. Pharm. Bull.* **1997**, *45*, 1940-1944.

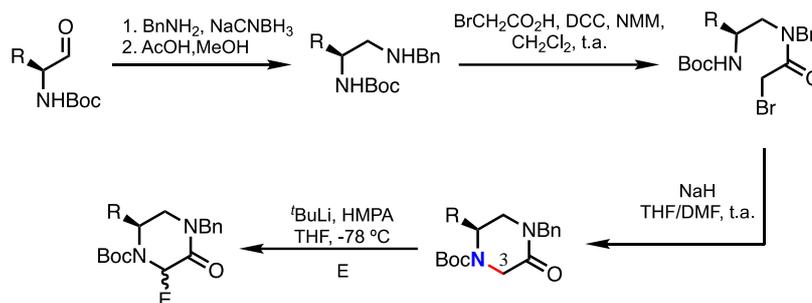


Esquema 17

El uso de dos aminoácidos diferentes proporciona una mezcla final de piperazinonas que pueden separarse por cromatografía. Sin embargo, el enfoque de Yamashita es particularmente adecuado para la preparación de derivados con dos aminoácidos idénticos, evitando así el paso de purificación.

- Ciclación en C_3-N_4 .

A través de la vía presentada por Reginato y colaboradores¹³⁹ en 2007, se logró sintetizar una serie de piperazinonas quirales mediante la ciclación por formación del enlace entre las posiciones C_3-N_4 .



Esquema 18

En este procedimiento se vuelven a utilizar como fuente de quiralidad los aminoácidos. Se inicia con la transformación de los aminoácidos en los correspondientes aminoaldehídos, mediante reducción con LiAlH_4 de las correspondientes amidas de Weinreb. A continuación, una aminación reductora con bencilamina, resulta en los intermedios de diamina protegidos ortogonalmente (Esquema 18). Las diaminas obtenidas se hicieron reaccionar con ácido

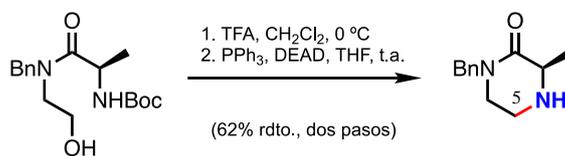
¹³⁹ G. Reginato, B. Di Credico, D. Andreotti, A. Mingardi, A. Paio, D. Donati, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2680–2688.

Capítulo 1.

bromoacético para dar las bromodiamidas intermedias, que a su vez generaron las piperazinonas quirales sustituidas en C5 mediante una ciclación asistida por base.

Por último, al tratar los enolatos de las correspondientes piperazinonas, en presencia de t BuLi /HMPA en THF a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, con varios electrófilos, se observó la formación, en la mayoría de los casos, de un único diastereoisómero con una disposición relativa *anti* de los sustituyentes.

- Ciclación en N_4 - C_5 .

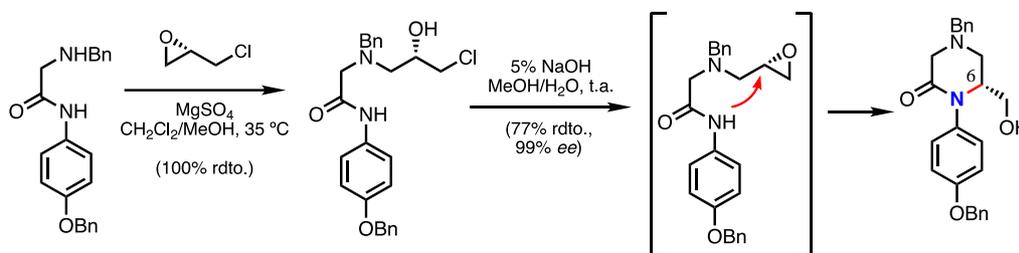


Esquema 19

En este ejemplo de formación del enlace N_4 - C_5 se utiliza como estrategia una reacción intramolecular de Mitsunobu, la cual fue utilizada por primera vez por Jacobsen y colaboradores,¹⁴⁰ en la que se consigue la preparación de la (3*R*)-1-bencil-3-metil-piperazin-2-ona. El material de partida se prepara mediante el acoplamiento de Boc-D-alanina y *N*-bencil-etanolamina utilizando 1,1-carbonildiimidazol (CDI) como activante. La posterior eliminación del grupo protector BOC mediante condiciones ácidas seguida de la ciclación mediante el protocolo de Mitsunobu (PPh_3 , DEAD) resultó en la piperazinona quiral final (Esquema 19).

Posteriormente, Schofield y colaboradores¹⁴¹ utilizaron el enfoque de Jacobsen como una ruta sencilla y flexible para la síntesis de *N*-bencilpiperazinonas con sustituyentes variables en C_3 a partir de α -aminoácidos o análogos con esa estructura como en su caso que usaron la (*S*)-ciclohexilalanina.

- Ciclación en C_6 - N_1 .



Esquema 20

¹⁴⁰ J. W. Mickelson, K. L. Belonga, E. J. Jacobsen, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 4177–4183.

¹⁴¹ J. Seibel, D. Brown, A. Amour, S. J. Macdonald, N. J. Oldham, C. Schofield, *J. Biorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 387–389.

Para la preparación del anillo implicando las posiciones C_6-N_1 se presenta en el Esquema **20** la aproximación de Powell y colaboradores¹⁴² en la que se consiguió obtener 1-aril-6-(hidroximetil)piperazinonas quirales con buenos rendimientos y con excelente pureza enantiomérica.

La amida inicial se obtuvo por reacción de la 4-benciloxianilina con cloruro de cloroacetilo seguida de una sustitución nucleófila con bencilamina a reflujo. Después, su reacción con (*S*)-epiclorohidrina en presencia de $MgSO_4$ produjo la clorohidrina intermedia. A continuación, se trató con una disolución acuosa de NaOH con la que se formó el epóxido, seguido de una lenta ciclación mediante la apertura 6-*exo* del epóxido, para dar la piperazinona final con un 77% de rendimiento tras los dos pasos.

▪ Misceláneo.

En esta última sección nos centraremos en destacar otro tipo de estrategias de síntesis de piperazinonas que han adquirido relevancia en los últimos años. En contraste con los enfoques anteriores, se ha producido una notable evolución en la introducción de quiralidad. Se ha observado una tendencia hacia el uso de la catálisis organometálica, utilizando metales con ligandos quirales, especialmente en hidrogenaciones asimétricas. Además, se ha destacado el empleo de la organocatálisis, utilizando moléculas orgánicas, como ureas o ácidos forfóricos, que poseen grupos donadores de puentes de hidrógeno capaces de proporcionar selectividad a las estructuras deseadas.

En las dos primeras entradas recogidas en el Esquema **21**, se emplea la catálisis organometálica para la preparación selectiva de los esqueletos de piperazinonas mediante una hidrogenación asimétrica catalizada por metales.

En el primero de ellos, Zhang y colaboradores¹⁴³ desarrollaron con éxito una hidrogenación asimétrica catalizada por iridio de piperazinonas insaturadas (iminas) sustituidas en la posición C_3 con distintos sustituyentes arilo, obteniendo piperazinonas con buenas enantioselectividades (hasta un 94% de *ee*).

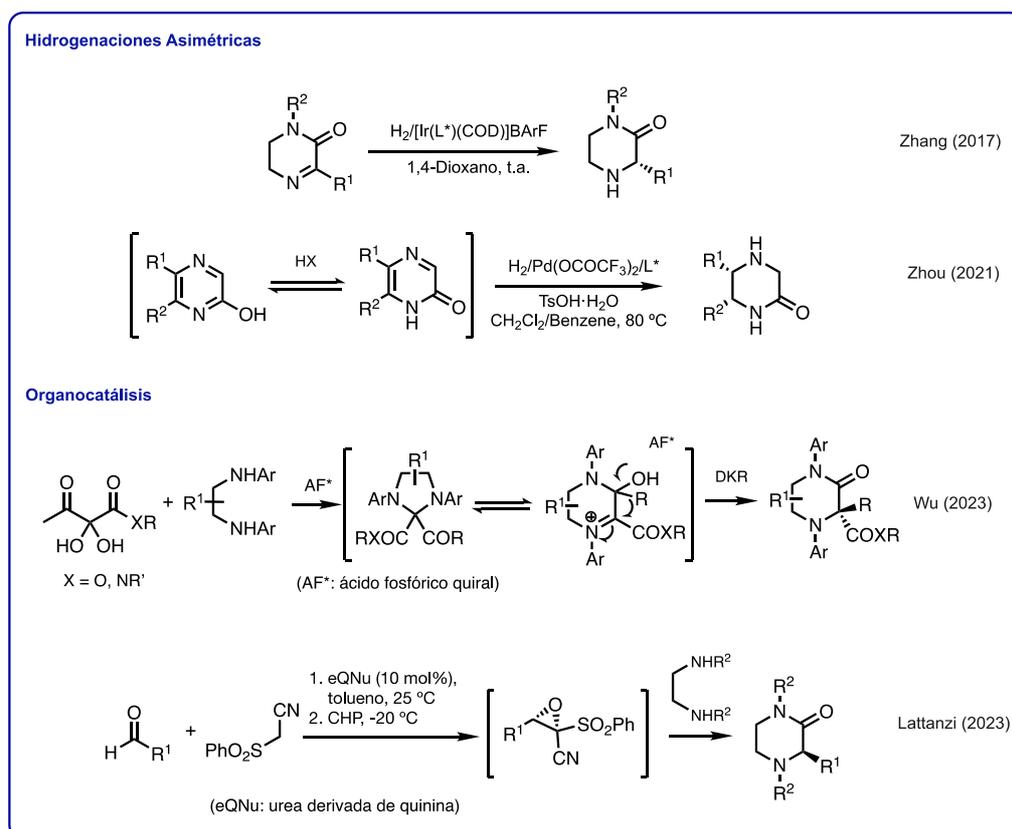
En el 2021, Zhou y colaboradores¹⁴⁴ llevaron a cabo una hidrogenación asimétrica catalizada por paladio de pirazin-2-oles, proporcionando un acceso fácil a 5,6-piperazin-2-onas disustituidas con altos rendimientos y estereoselectividades (hasta un 96% de *ee* y relaciones diastereoméricas >20:1).

¹⁴² N. A. Powell, F. L. Ciske, E. C. Clay, W. L. Cody, D. M. Downing, P. G. Blazecka, D. D. Holsworth, J. Edmunds, *J. Org. Lett.* **2004**, 6, 4069–4072.

¹⁴³ Y. Wang, Y. Liu, K. Li, G. Yang, W. *Adv. Synth. Catal.* **2017**, 359, 1933–1941.

¹⁴⁴ G.-S. Feng, Z.-B. Zhao, L. Shi, Y.-G. Zhou, *Org. Chem. Front.* **2021**, 8, 6273–6278.

Capítulo 1.



Esquema 21

Es importante destacar que en ambos métodos las hidrogenaciones se realizan a alta presión, oscilando entre los 50-80 bares. El enfoque de Zhou requiere además alta temperatura (80 °C). Y, en ambos procesos se emplean diclorometano o mezclas de diclorometano/benceno respectivamente como disolventes.

Entre los métodos basados en la organocatálisis, se han recogido en el esquema dos aportaciones recientes. En la primera de ellas, Wu y colaboradores¹⁴⁵ presentaron el primer proceso catalítico utilizando una reacción promovida por ácidos fosfóricos quirales (AF*) para la síntesis de piperazinonas C3-disustituidas, con enantioselectividades que pueden llegar hasta un 96% *ee*.

El proceso catalítico consiste en una secuencia dominó empezando con la formación del anillo imidazolidínico, [4+1], seguida de una migración 1,2-nitrogeno/arilo o alquilo, empleando

¹⁴⁵ Y.-P. He, R. Quan, X.-Z. Li, J. Zhu, H. Wu, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, 62, e202217954.

compuestos tricarbónicos vecinales y 1,2-diaminas, fácilmente disponibles como materiales de partida. La enantioselectividad estaría controlada por una resolución cinética dinámica (DKR) en el paso de migración 1,2 asistida por los AF*.

El segundo ejemplo, es el presentado por Lattanzi y colaboradores¹⁴⁶ para la preparación de piperazin-2-onas (y morfolin-2-onas) C3 sustituidas estereoselectivamente empleando una urea derivada de quinina (eQNu) como catalizador quiral. Los rendimientos oscilan entre 40-90% y la enantioselectividad llega a alcanzar el 99% *ee* en algunos casos.

En este caso el procedimiento planteado consiste también en un proceso dominó, que involucra una reacción de Knoevenagel, seguida de una epoxidación asimétrica y una ciclación final con apertura de anillo (DROC, del inglés *domino ring-opening cyclization*). Los dos primeros pasos son catalizados estereoselectivamente por la urea. Como materiales de partida se emplearon aldehídos comerciales, (fenilsulfonil)acetosnitrilos y 1,2-etilendiaminas (o 1,2-etanolaminas para las morfolin-2-onas). Para el proceso de la epoxidación, se utilizó hidroperóxido de cumilo (CHP) como agente oxidante.

El grupo de Lattanzi había descrito con anterioridad un procedimiento similar para la preparación de piperazinonas C3 sustituidas empleando una epoxidación asimétrica de alquilidene-malononitrilos como sustrato inicial.¹⁴⁷

1.3. Estrategias biocatalíticas para la síntesis de 1,4-diazo heterociclos.

En los últimos años, han surgido varios enfoques biocatalíticos hacia la preparación de este tipo de estructuras. El Esquema 22, resume los procedimientos descritos para la síntesis de piperazinas y 1,4 diazepanos sustituidos, mediante el uso de diferentes clases de enzimas.

En los dos primeros procesos se utilizan IRED's como catalizadores para la síntesis de piperazinas quirales¹⁴⁸ y 1,4-diazepanos.¹⁴⁹ Las IRED's son un tipo de enzima que han suscitado un gran interés en los últimos años.^{50d,150}

Son oxidorreductasas (EC 1) dependientes de NADPH que catalizan la reducción asimétrica de iminas a las correspondientes aminas quirales.

¹⁴⁶ S. Meninno, A. Lattanzi, *J. Org. Chem.* **2023**, *88*, 7888–7892.

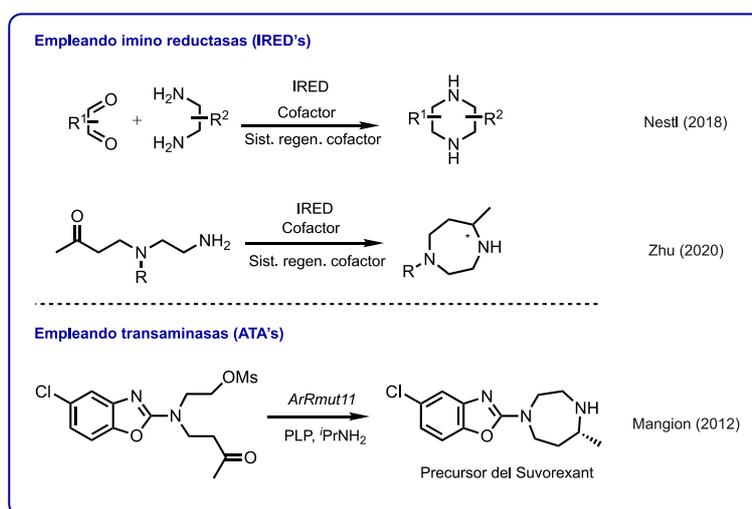
¹⁴⁷ S. Meninno, A. Vidal-Albalat, A. Lattanzi, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4348–4351.

¹⁴⁸ N. Borlinghaus, S. Gergel, B. M. Nestl, *ACS Catal.* **2018**, *8*, 3727–3732.

¹⁴⁹ Z. Xu, P. Yao, X. Sheng, J. Li, J. Li, S. Yu, J. Feng, Q. Wu, D. Zhu, *ACS Catal.* **2020**, *10*, 8780–8787.

¹⁵⁰ a) J. H. Schrittwieser, S. Velikogne, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357*, 1655–1685. b) A. K. Gilio, T. Thorpe, N. J. Turner, G. Grogan, *Chem. Sci.* **2022**, *13*, 4697–4713.

Capítulo 1.



Esquema 22

En el primero de ellos, Nestl y colaboradores en 2018 utilizaron por primera vez las IRED's en la síntesis directa de heterociclos de piperazina a partir de materiales de partida fácilmente disponibles como los 1,2-dicarbonilos y las 1,2-diaminas, con distintos tamaños y patrones de sustitución. Con esta metodología llegaron a obtener una gama variada de piperazinas *N*- y *C*-sustituidas con rendimientos entre altos y moderados y, en algunos casos, con alta enantio- y estereoselectividad.

La reacción global consiste en dos pasos de condensación y dos de reducción (aminación reductora doble). El mecanismo propuesto consta de un primer paso de condensación seguido de la reducción correspondiente por la IRED, formándose un intermedio del tipo *diiminoaldehído*. A continuación, se produciría el segundo paso de condensación, seguido finalmente de la reducción generándose el 1,4-diazoderivado deseado.

Sin embargo, esta metodología también presentó ciertas limitaciones. No se observó actividad cuando un sistema aromático estaba directamente unido al grupo amino. Tampoco se detectó formación de producto cuando se utilizaron diaminas funcionalizadas con grupos carboxilo o éster, lo que indica que estos grupos funcionales dificultan la actividad de las IRED's. En general, se observó que la sustitución de *C* en el sustrato de diamina provocaba una disminución en la actividad. Por otro lado, se observó que esta tendencia se invierte en casos con los sustratos dicarbónicos sustituidos.

Es importante comentar que cuando se combinan diaminas sustituidas con dicarbonilos sustituidos, pueden formarse dos posibles regioisómeros. En el caso de las diaminas *N*-sustituidas con dicarbonilos sustituidos, el proceso es regioselectivo ya que sólo se detecta un regioisómero (el que tiene más ventaja estérica). Sin embargo, en los casos de diaminas *C*-

sustituidas con dicarbonilos sustituidos, no se observó una regioselectividad estricta, y se detectaron ambos regioisómeros. También se observó la presencia de diastereómeros en proporciones variables al utilizar dicarbonilos disustituidos.

En resumen, este método permite la síntesis de piperazinas quirales que toleran sustratos con sustitución del tipo arilo y alquilo, lo que proporciona acceso a una variedad diversa de análogos de piperazina. Los avances mostrados en este trabajo, suponen una base para futuros trabajos tanto en la síntesis de piperazinas, como en el uso de las IRED's como catalizadores enzimáticos.

Un planteamiento similar fue desarrollado por Zun y colaboradores en 2020.¹⁴⁹ En esta investigación desarrollaron un proceso de aminación reductora asimétrica intramolecular de aminocetonas para la síntesis de 1,4-diazepanos quirales empleando IRED's.

A través del cribado de 48 IRED's disponibles en su grupo, se identificaron varias IRED's enantiocomplementarias que permitieron acceder a una gama de diferentes 1,4-diazepanos sustituidos, incluyendo un precursor del Suvorexant, con altos valores de conversión y enantioselectividad (81% rdt. aislado y >99% *ee* para el precursor en una escala preparativa). Este resultado se logró mediante una variante (Y194F/D232H) obtenida mediante mutagénesis, llegando a presentar una eficiencia catalítica 61 veces mayor que la enzima WT correspondiente.

Por último, aunque cronológicamente anterior a los ejemplos anteriores, Mangion y colaboradores¹³² en el año 2012 desarrollaron una síntesis enantioselectiva del Suvorexant utilizando una transaminasa de ingeniería,¹⁵¹ la *ArRmut11*, (la cual también está disponible en nuestro laboratorio y se emplea en la investigación de este Capítulo).

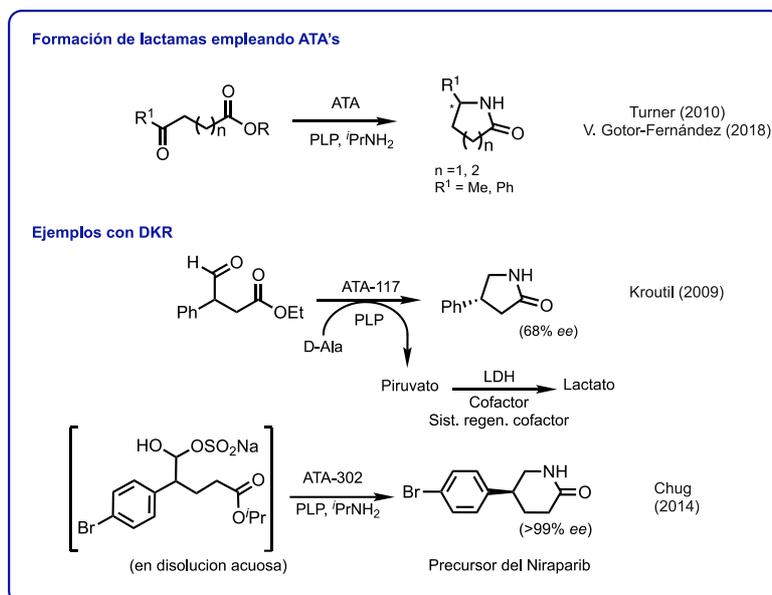
El enfoque utilizado en esta ocasión consistió en una transaminación enantioselectiva de una hidroxicetona mesilada. La posterior sustitución intramolecular del grupo mesilado por la amina formada produjo el correspondiente 1,4-diazepano precursor del Suvorexant con un exceso enantiomérico superior al 99%.

¹⁵¹ 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.

Capítulo 1.

1.4. Aplicación de transaminasas en la preparación de estructuras relacionadas.

En este apartado, se han seleccionado los ejemplos relevantes que se han descrito en la bibliografía y tienen similitudes con la investigación que se describe en este Capítulo, tanto respecto a la estructura de los productos obtenidos, como a la formación del heterociclo, que tiene lugar mediante una ciclación intramolecular, generándose un enlace de tipo amida. En todos estos casos, como catalizadores se emplearán transaminasas, al igual que en nuestra investigación. Los ejemplos están recogidos en el siguiente Esquema 23.



Esquema 23

En la primera estrategia,¹⁵² los grupos de Turner y Gotor-Fernández han planteado una biotransaminación catalizada por ATA's de compuestos de tipo cetoésteres con diferentes sustituyentes en la posición α a la cetona. El correspondiente aminoéster generado, experimenta una ciclación espontánea en el medio de reacción sin adición de reactivos externos, proceso que involucra 2 pasos de reacción en el mismo recipiente (*one-pot, two-steps*). Dependiendo de la selectividad de la transaminasa empleada, pueden obtenerse la (*R*) o (*S*)- correspondientes γ - o δ -lactamas.

¹⁵² a) M. D. Truppo, J. D. Rozzell, N. J. Turner, *Org. Process Res. Dev.* **2010**, *14*, 234–237; b) Á. Mourelle- Insua, L. A. Zampieri, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2018**, *360*, 686–695.

En el segundo ejemplo,¹⁵³ se lleva a cabo un proceso de DKR catalizado de nuevo por ATA's empleando un aldehído racémico, con un sustituyente fenilo en α . A través de una ciclación intramolecular, se obtiene una 4-fenilpirrolidin-2-ona enantioenriquecida (68% *ee*).

En el último ejemplo, se desarrolla una nueva ruta sintética para el medicamento *Niraparib* realizada por el equipo de Merck & Co.¹⁵⁴ En esta ruta, se ha incorporado un paso de biotransaminación eficiente y estereoselectivo (>99% *ee*) de un aldehído (se emplea un aducto de bisulfito para generar *in situ* el aldehído debido a la inestabilidad del mismo tanto en su purificación como en el mismo medio de reacción), mediante un proceso de DKR. La transformación tiene lugar a pH 10.5 en donde la racemización del aldehído de partida ocurre en el propio medio de reacción sin la necesidad de añadir más reactivos. De esta forma, la transaminasa (ATA-302) reacciona preferentemente con uno de los dos enantiómeros de la mezcla racémica, mientras que el otro se continúa racemizando.

En este proceso al igual que en los casos anteriores, se produce una ciclación espontánea en el medio de reacción, dando lugar a la formación de la δ -lactama deseada. Como consecuencia de esta nueva ruta, se logra incrementar el rendimiento global desde el 11% hasta el 40%, en la síntesis, a escala de kilogramo, del fármaco. Esto tiene un efecto positivo no sólo en el coste global del proceso, sino también en la reducción del impacto medioambiental que ello supone.

¹⁵³ D. Koszelewski, D. Clay, K. Faber, W. Kroutil, *J. Mol. Catal. B* **2009**, *60*, 191–194.

¹⁵⁴ C. K. Chung, P. G. Bulger, B. Kosjek, K. M. Belyk, N. Rivera, M. E. Scott, G. R. Humphrey, J. Limanto, D. C. Bachert, K. M. Emerson, *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18*, 215–227.

OBJETIVOS

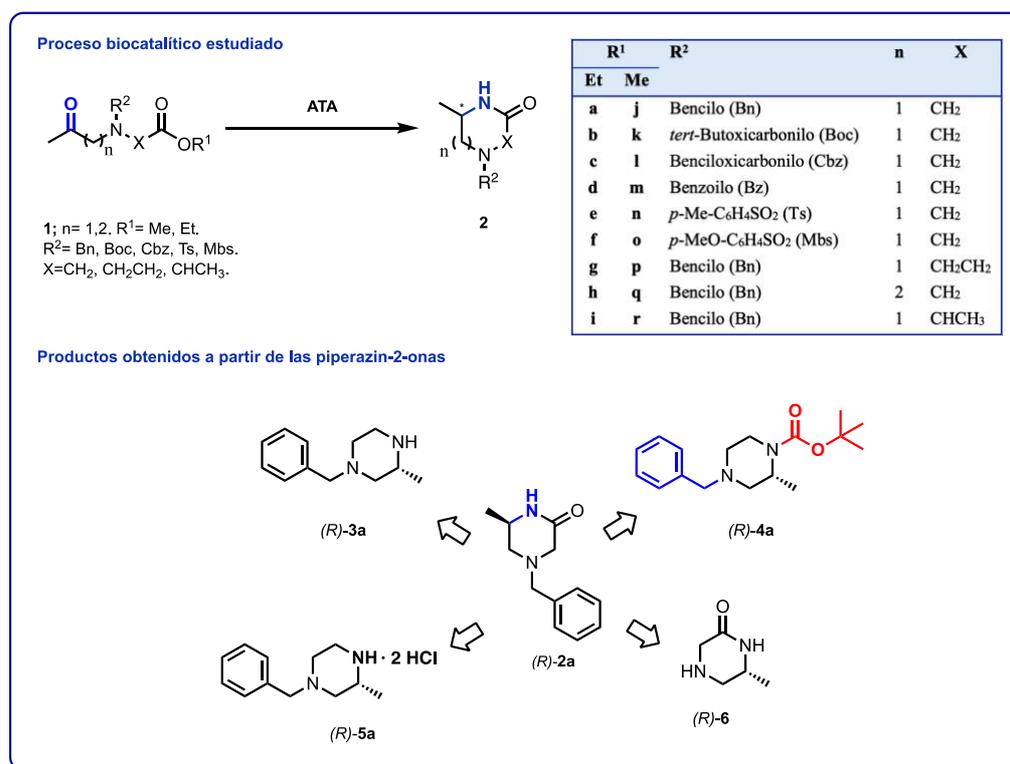
Objetivos

Considerando las posibilidades sintéticas que ofrecen las transaminasas, la relevancia biológica asociada a los 1,4-diazoheterociclos y la posibilidad de desarrollar un método biocatalítico en un único recipiente (mediante una *cascada espontánea de cierre de anillo*), nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

- Diseñar una metodología enzimática sencilla y general que permita la síntesis enantioselectiva de piperazinonas y 1,4-diazepanonas.
- Estudiar una estructura modelo, seleccionar los biocatalizadores más eficaces y optimizar los parámetros de reacción más importantes.
- Ampliar la gama de sustratos empleados para demostrar la aplicabilidad de la metodología de trabajo en moléculas con diferentes estructuras.
- Evaluar la robustez de estas biotransformaciones mediante el diseño y la realización de experimentos en una escala semipreparativa.
- Sintetizar una piperazina funcionalizada ortogonalmente con quiralidad definida, a través de un enfoque quimioenzimático, con el fin de explorar su versatilidad en aplicaciones potenciales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Esquema 24 que se presenta a continuación, se ofrece una visión general, a modo de guía-resumen, del proceso biocatalítico que se va a estudiar, junto con las estructuras de los diferentes sustratos y productos obtenidos.



Esquema 24

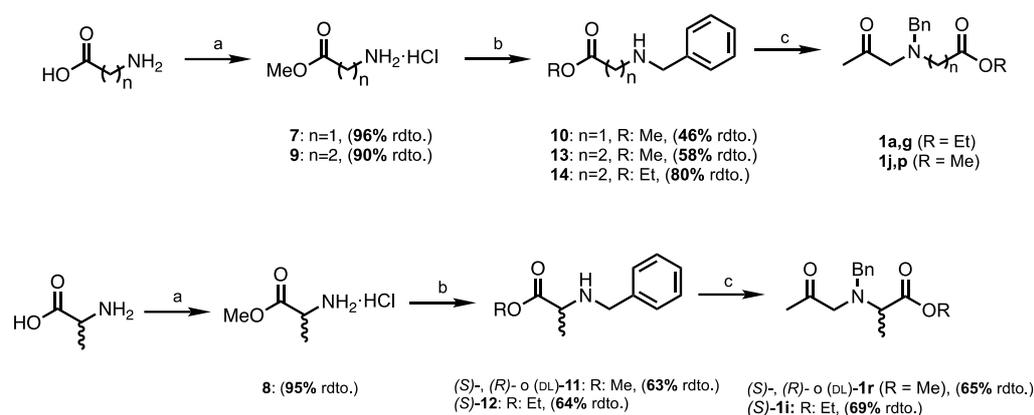
1.5. Preparación de los materiales de partida y los patrones de referencia.

En esta sección se llevará a cabo la preparación de la familia de sustratos **1a-r** que se emplearán para obtener los productos **2a-i**. En ellos se evaluarán distintos tipos de nitrógeno (amina, amida, carbamato o sulfonamida); así como modificaciones en la cadena (distancia) entre las posiciones de la cetona o el éster respecto a la posición del nitrógeno, las cuales permitirán obtener distintos patrones de diazepamonas, **2g** y **2h**.

En el Esquema 25 se resumen los pasos sintéticos necesarios para la síntesis de los sustratos con éster de etilo: **1a** y **1g**, y los sustratos con éster de metilo: **1j** y **1p**; todos ellos preparados a partir de α - o β -aminoácidos (glicina o β -alanina). Del mismo modo, en la parte

Capítulo 1.

inferior, se incluye la ruta (idéntica) para la preparación de los sustratos de los ésteres de la alanina (D-, L- o el racémico).



Esquema 25. Reactivos y condiciones: **a)** TMSCl, MeOH, t.a. **b)** 1. PhCHO, Et₃N, MgSO₄, CH₂Cl₂, 0 °C → t.a.; 2. NaBH₄, MeOH, 0 °C → t.a. **c)** Cloroacetona, NaHCO₃, NaI (cat.), acetona, 40 °C, (65-97 % rdto.).

En primer lugar, se realizó una esterificación empleando cloruro de trimetilsililo (TMSCl) en presencia de metanol formándose así los correspondientes clorhidratos (**7-9**). En el siguiente paso, y sin necesidad de purificación, se realizó una condensación con benzaldehído, seguida de la reducción de la imina resultante con borohidruro de sodio, obteniendo los compuestos **10, 13-14** con rendimientos entre moderados y buenos (46-80%).

En algunos casos se partió de los ésteres *N*-benzilados, los cuales estaban disponibles comercialmente, como el caso del precursor de **1a** (éster etílico).

En el caso del éster racémico de la alanina se procedió de igual manera partiendo desde el mismo aminoácido (racémico), pero en el caso de la preparación de los ésteres de la D- o la L-alanina, al igual que se ha reportado en la bibliografía¹⁵⁵ se observó que el sistema TMSCl/ROH, mostraba un alto grado de racemización (85:15 *er* para el caso de la D-alanina). Por esta razón, se decidió adquirir los ésteres ya preparados con excesos más elevados o en forma enantiopura, en lugar de sintetizarlos con esta metodología.

El siguiente paso sintético (paso c) consistió en la reacción del correspondiente *N*-benzil aminoéster **10-14** con cloroacetona utilizando NaI como catalizador y acetona como disolvente. Cabe mencionar que inicialmente se probaron otros métodos de síntesis presentes en la bibliografía¹⁵⁶ para este paso. Sin embargo, en nuestro caso los rendimientos obtenidos fueron

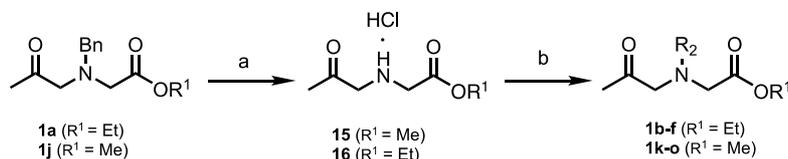
¹⁵⁵ a) J. Li, Y. Sha, *Molecules* **2008**, *13*, 1111–1119. b) B.-C. Chen, A. P. Skoumbourdis, P. Guo, M. S. Bednarz, O. R. Kocy, J. E. Sundeen, G. D. Vite, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9294–9296.

¹⁵⁶ a) T. H. V. Huynh, I. Shim, H. Bohr, B. Abrahamsen, B. Nielsen, A. A. Jensen, L. Bunch, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 5403–5412. b) A. Kanwar, B. J. Eduful, L. Barbeto, P. C. Bonomo, A. Lemus, B. A. Vesely, T. S. Mutka, A. Azhari,

significativamente más bajos que los reportados. Por ese motivo, se tomó la decisión de optimizar las condiciones de síntesis de forma propia para lograr una mejora en el rendimiento y la eficiencia en esta etapa.

La estrategia que planteamos para optimizar este paso sintético se basó en aprovechar la insolubilidad de algunas sales en disolventes orgánicos.¹⁵⁷ En nuestro caso, el yoduro de sodio es bastante más soluble en acetona (504 g/kg_{acetona}) que el cloruro de sodio (0.00042 g/kg_{acetona}), por lo que, al retirar el NaCl de la mezcla, se genera una fuerza motriz que impulsa la reacción a convertir más material de partida en producto, desplazándose así todos los equilibrios intermedios.¹⁵⁸

Los sustratos **1b-f** y **1k-o**, con un grupo protector diferente al bencilo, se han preparado a partir de **1a** y **1j** respectivamente, mediante una hidrogenación^{156a} en medio ácido catalizada por Pd-C, para formar así la amina desprotegida, en forma de clorhidrato (**15** o **16**, $\geq 98\%$ rdto.), seguida de la posterior introducción de un nuevo grupo protector (GP) sin necesidad de purificar la sal intermedia, utilizando el correspondiente anhídrido o cloruro de ácido necesario, obteniéndose unos rendimientos entre moderados y muy buenos (36-86%), Esquema **26**.



Esquema 26. Condiciones de síntesis de los compuestos **1b-f** y **1k-o**: **a**: H₂, Pd-C, ac. HCl, R¹OH, 25 °C, ($\geq 98\%$ rdto.); **b**: R²Cl or (R²)₂O, Et₃N, DMAP (cat.), CH₂Cl₂, t.a. (36-86% rdto.).

Se descartó la posibilidad de utilizar compuestos con una amina libre como sustratos de las reacciones enzimáticas. En su lugar, se optó por tenerlas protegidas con distintos GP¹⁵⁹ para garantizar la estabilidad durante las reacciones y facilitar también así el seguimiento de las mismas.

Por último, los sustratos **1h** y **1q** se han sintetizado con rendimientos altos (76-93%) mediante una adición de tipo Michael entre el éster de *N*-bencilglicinato y la butenona (MVK, del inglés *methyl vinyl ketone*), Esquema **27**.¹³²

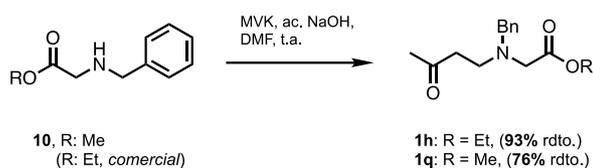
D. E. Kyle, J. W. Leahy, *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 797–801. c) J. W. Leahy, D. E. Kyle, B. A. Vesely, B. J. Eduful, A. Kanwar, L. C. Barbetto, PCT Int. Appl. WO2016191412A1, **2016**.

¹⁵⁷ J. Burgess (1978). *Metal Ions in Solution*. Ellis Horwood Series in Chemical Sciences. ISBN 9780470262931.

¹⁵⁸ J. Clayden, N. Greeves, S. Warren (2012). *Organic Chemistry*, 2^a Ed. Oxford University Press. ISBN 978-0-19-927029-3.

¹⁵⁹ T. W. Green, P. G. M. Wuts (2014). *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 5^a Ed. John Wiley & Sons. ISBN 978-1-118-05748-3.

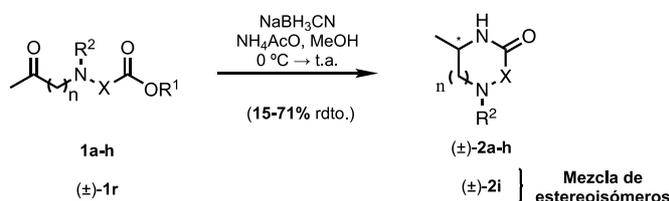
Capítulo 1.



Esquema 27

Con el fin de desarrollar un método analítico para el seguimiento de las biotransaminaciones, se sintetizaron los 1,4-diazoheterociclos racémicos correspondientes **2a-h** mediante un protocolo químico de aminación reductora estándar.^{152b} De esta manera, se transformaron los sustratos **1a-h** así como el \pm -**1i** proveniente de la alanina, (Esquema 28), utilizando acetato de amonio (NH_4AcO) como fuente de grupo amino y cianoborohidruro sódico (NaBH_3CN) como agente reductor, en metanol seco, obteniéndose los patrones con rendimientos moderados (15-71%).

En la Sección Experimental (1.15) se detallan las condiciones y tiempos de retención utilizados para optimizar el análisis mediante HPLC.



Esquema 28

1.6. Cribado enzimático inicial y optimización de las condiciones de reacción.

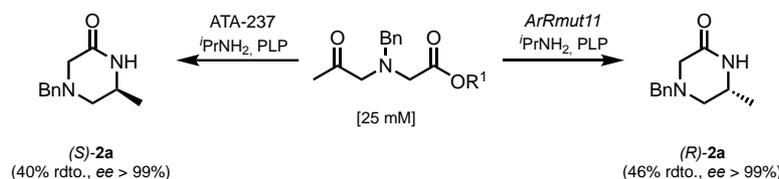
La metodología de trabajo consistió inicialmente en la realización de un cribado de los catalizadores, seguido de la optimización de los parámetros de reacción tomando un sustrato como modelo, el compuesto **1a**; debido a su fácil obtención en un solo paso de reacción. Posteriormente, los catalizadores más prometedores y las mejores condiciones de reacción encontradas se aplicarán al resto de estructuras de estudio. En esta primera serie de experimentos, se probaron 28 transaminasas comerciales junto con otras cuatro sobreexpresadas en *E. coli*: las ATA's con selectividad *Prelog* de *Chromobacterium violaceum* (CvTA) y *Arthrobacter citreus* (ArSTA), y las ATA's con selectividad anti-*Prelog* de *Arthrobacter sp.* (ArRTA) y su variante de ingeniería *ArRmut11*.

La concentración del sustrato **1a** fue de 25 mM y se utilizó para el cribado inicial: isopropilamina ($i\text{PrNH}_2$) como donador de amina en un gran exceso (1.0 M, 40 equiv.), una

Resultados y Discusión

concentración de 1.0 mM para el cofactor PLP y DMSO (2.5% v/v, 12.5 μ L) como cosolvente, en combinación con una disolución amortiguadora de fosfato de potasio (KPi) 100 mM, pH 7.5 en un volumen final de 500 μ L. Las reacciones se incubaron con agitación orbital (250 rpm) durante 24 h a 30 $^{\circ}$ C.

Los mejores resultados conseguidos bajo estas condiciones fueron proporcionados por la (*R*)-selectiva *ArRmut11* y la ATA-237 que condujo a la formación de (*S*)-**2a**; obteniendo unos valores de conversión moderados de 46 y 40% respectivamente (Esquema 29) con excelentes enantioselectividades en ambos casos (>99% *ee*).



Esquema 29. Condiciones de reacción: ATA: 10 mg para *E. coli ArRmut11* o 2.0 mg para ATA-237. Disol. tampón KPi (100 mM, pH 7.5), DMSO: 2.5% v/v. *i*PrNH₂: 1.0 M. PLP: 1.0 mM. Volumen final 500 μ L. 250 rpm, 30 $^{\circ}$ C, 24 h. Rendimiento analítico calculado mediante regresión lineal, los valores *ee* se determinaron mediante análisis HPLC.

Al analizar las reacciones al finalizar los experimentos, se observó que la concentración de sustrato **1a** remanente no concordaba con los valores lógicos esperados, sino que en todos los casos fue inferior al 5%. Este evento contrasta con el rendimiento analítico, moderado-bajo, medido por HPLC para el producto **2a**. Inicialmente atribuimos este hecho a un posible proceso de hidrólisis del grupo éster del sustrato, inducido por el medio de reacción. Al ir disminuyendo la cantidad de sustrato disponible para la enzima (sustrato con posibilidad de ciclarse después), se verían comprometidos los rendimientos debido a la competencia entre el proceso de degradación del sustrato y la biotransformación. Además, cualquier método de análisis basado en la medida del área del sustrato remanente, generaría valores de conversión artificialmente más altos que los reales.

Para validar la premisa anterior, se llevaron a cabo una serie de experimentos. En primer lugar se realizaron pruebas de extracción del medio de reacción, tanto para **1a** como para **2a**, con el fin de descartar problemas relacionados con la extracción del medio de reacción. Las pruebas se realizaron tras 10 minutos de incubación en el medio de reacción y en ausencia de enzima. En ambos casos no se observaron diferencia significativa entre las áreas medidas y las esperadas para **1a** o para **2a**.

A continuación, se llevaron a cabo unas pruebas de estabilidad para **1a**, se incubó en distintos medios de reacción, sin la presencia de la enzima. El tiempo para estos experimentos se fijó en 12 horas, la concentración de trabajo se mantuvo en 25 mM y se redujo la concentración

Capítulo 1.

de isopropilamina a 50 mM para evitar interferencias no deseadas en los resultados. Los resultados de estas pruebas se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2. Test de estabilidad del sustrato **1a**.



Entrada	pH	Cosolvente	Hidrolisis/% ^a
1	7.5	-	32 ± 2
2	7.5	DMSO	30 ± 2
3	7.5	MeCN	18 ± 2
4	7.5	MTBE	20 ± 2
5	8.5	-	53 ± 3
6	8.5	DMSO	49 ± 3
7	8.5	MeCN	37 ± 2
8	8.5	MTBE	35 ± 2

Condiciones de reacción: Cosolvente: 2.5% v/v (Entradas 1 y 5 sin cosolvente). Disol. tampón KPi (100 mM, pH 7.5 o 8.5). ^tPrNH₂: 50 mM. PLP: 1.0 mM. Volumen final 500 μL. ^a Valores analítico calculados con regresión lineal, mediante análisis HPLC.

Los resultados obtenidos tras las distintas incubaciones corroboran los resultados moderados-bajos de las biotransformaciones. Se observó que, en las mismas condiciones del cribado inicial (Esquema **29**), aproximadamente el 30% del sustrato se había ya hidrolizado, y, por lo tanto, ya no sería su ciclación espontánea para dar el compuesto **2a**. Al aumentar el pH se observa una clara tendencia a aumentar la hidrolisis, llegando a un valor cercano al 50% cuando se utilizó de nuevo DMSO como cosolvente y el pH se ajustó a 8.5 (entrada 6). No obstante, es importante tener en cuenta que algunas de las ATA's tienen un desempeño más alto precisamente a pH más básicos,¹⁶⁰ y además, el paso de ciclación posterior también se favorece en ese rango de basicidad.

En cuanto a los cosolventes ensayados, se seleccionaron disolventes orgánicos frecuentes en este tipo de reacciones¹⁶¹ y, más específicamente, con nuestras enzimas *E. coli*. Entre ellos,

¹⁶⁰ F. G. Mutti, C. S. Fuchs, D. Pressnitz, J. H. Sattler, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 3227–3233.

¹⁶¹ a) F. G. Mutti, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 3409–3413. b) S. E. Payer, J. H. Schrittwieser, B. Grischek, R. C. Simon, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 444–451. c) A. Fiorati, P. Berglund, M. S. Humble, D. Tessaro, *Adv. Synth. Catal.* **2020**, *362*, 1156–1166.

las diferencias encontradas son mínimas, a pH neutro el MeCN mejora ligeramente los resultados respecto al MTBE (entradas 3 y 4) mientras que, en condiciones de pH más elevado, es el sistema bifásico del MTBE es el que mostró mejores valores de estabilidad (entradas 7 y 8). También se llevaron a cabo pruebas sin la presencia de ningún cosolvente. Los resultados obtenidos (entradas 1 y 5) fueron los peores para este sustrato, junto con los obtenidos utilizando DMSO.

Teniendo en cuenta estos resultados, se procedió a examinar la influencia de alguna de esas condiciones de reacción como el pH, el cosolvente, así como otras como la temperatura, el grupo alquilo del éster (compuesto **1j**) y la concentración de isopropilamina; con el fin de minimizar los efectos de la hidrólisis y obtener biotransformaciones con rendimientos superiores. En la primera parte de la Tabla **3** se recoge los mejores resultados obtenidos. Cabe resaltar que, a pesar de realizar cambios en prácticamente todos los parámetros de estas reacciones enzimáticas, los excesos enantioméricos han permanecido en todo momento inalterables, dando como resultado la correspondiente (*S*)- o (*R*)- piperazinona **2a** en su forma ópticamente pura (*ee* >99).

El aumento del pH a 8.5 ha demostrado ser favorable en todos los ensayos mientras que, por el contrario, un aumento en la temperatura del proceso (se realizaron pruebas hasta los 45 °C), no tuvo un impacto significativo en los rendimientos.

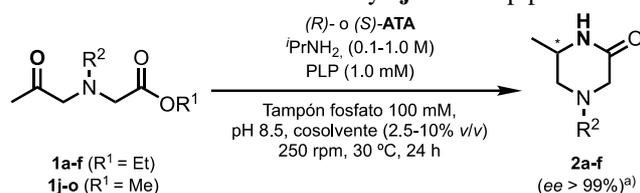
Se evaluaron una serie de cosolventes, incluyendo los ya probados durante las pruebas de estabilidad (MTBE y MeCN), así como otros comúnmente utilizados (etanol, *n*-heptano o DMF). Como se había teorizado, los mejores resultados se obtuvieron al emplear los cosolventes inmiscibles en agua (sistema bifásico). El rendimiento de (*R*)-**2a** aumentó hasta el 84% cuando se utilizó MTBE (2.5% *v/v*) para el proceso catalizado por *ArRmut11* a pH 8.5 y 30 °C (Tabla **3**, entrada 2). Por otro lado, el rendimiento de (*S*)-**2a** aumentó también hasta 84% al utilizar *n*-heptano (10% *v/v*) como cosolvente, con la ATA-237, en las mismas condiciones de reacción (Tabla **3**, entrada 8). El uso de MeCN, aunque no se trata de un sistema bifásico como los anteriores, también mejoró significativamente los resultados obtenidos en DMSO, alcanzándose rendimientos del 72-76% dependiendo del catalizador (entradas 4 y 7). La proporción de los cosolventes también fue objeto de estudio, para el *n*-heptano la concentración se fijó inicialmente en 10% *v/v* y para el resto se realizaron pruebas a una concentración superior al 2.5% *v/v* (5 y 10% *v/v*) pero todas ellas condujeron a peores resultados por lo que se fijó esta concentración para el resto de ensayos de la investigación.

La concentración de isopropilamina se fijó en 0.1 M prácticamente en todos los ensayos. Se realizaron algunas variaciones por debajo de esta concentración (50 mM, entrada 1) como en las pruebas de estabilidad, y por encima (200 mM, entrada 3), pero se obtuvieron resultados inferiores en ambos casos.

Capítulo 1.

En cuanto al grupo alquilo del éster, se probó el derivado **1j** con el éster metílico, con las condiciones óptimas. Con este éster, se alcanzaron valores de rendimiento inferiores (entradas 9 y 10) en comparación con el análogo **1a** con éster etílico (entradas 2 y 8).

Tabla 3. Biotransformaciones de los sustratos **1a-f** y **1j-o** en las piperazinonas **2a-f**.



Entrada	Sustrato			<i>i</i> PrNH ₂ /M	Cosol.	ATA	Producto ^{a)}		
	R ¹	R ²	[mM]					Rdto. /%	
1	1a	Et	Bn	25	0.05	MTBE	<i>ArRmut11</i>	(<i>R</i>)- 2a	60
2	1a	Et	Bn	25	0.1	MTBE	<i>ArRmut11</i>	(<i>R</i>)- 2a	84
3	1a	Et	Bn	25	0.2	MTBE	<i>ArRmut11</i>	(<i>R</i>)- 2a	68
4	1a	Et	Bn	25	0.1	MeCN	<i>ArRmut11</i>	(<i>R</i>)- 2a	78
5	1a	Et	Bn	25	0.1	<i>n</i> -Heptano	<i>ArRmut11</i>	(<i>R</i>)- 2a	79
6	1a	Et	Bn	25	0.1	MTBE	ATA-237	(<i>S</i>)- 2a	67
7	1a	Et	Bn	25	0.1	MeCN	ATA-237	(<i>S</i>)- 2a	72
8	1a	Et	Bn	25	0.1	<i>n</i> -Heptano	ATA-237	(<i>S</i>)- 2a	84
9	1j	Me	Bn	25	0.1	MTBE	<i>ArRmut11</i>	(<i>R</i>)- 2a	70
10	1j	Me	Bn	25	0.1	<i>n</i> -Heptano	ATA-237	(<i>S</i>)- 2a	76
11	1b	Et	Boc	25	1.0	MTBE	<i>ArRmut11</i>	(<i>R</i>)- 2b	83
12	1b	Et	Boc	25	1.0	MTBE	CvTA	(<i>S</i>)- 2b	54
13	1b	Et	Boc	25	1.0	<i>n</i> -Heptano	CvTA	(<i>S</i>)- 2b	89
14	1c	Et	Cbz	25	1.0	MTBE	<i>ArRmut11</i>	(<i>R</i>)- 2c	90
15	1c	Et	Cbz	25	1.0	MTBE	ATA-237	(<i>S</i>)- 2c	76
16	1d	Et	Bz	25	1.0	MTBE	ATA-412	(<i>R</i>)- 2d	32
17	1d	Et	Bz	25	1.0	MTBE	ATA-237	(<i>S</i>)- 2d	26
18	1e	Et	Ts	25	1.0	MeCN	<i>ArRmut11</i>	(<i>R</i>)- 2e	91
19	1e	Et	Ts	25	1.0	MeCN	ATA-237	(<i>S</i>)- 2e	73
20	1f	Et	Mbs	25	1.0	MeCN	<i>ArRmut11</i>	(<i>R</i>)- 2f	78
21	1f	Et	Mbs	25	1.0	MeCN	ATA-237	(<i>S</i>)- 2f	45
22	1b	Et	Boc	50	1.0	<i>n</i> -Heptano	CvTA	(<i>S</i>)- 2b	86
23	1c	Et	Cbz	50	1.0	MTBE	<i>ArRmut11</i>	(<i>R</i>)- 2c	82
24	1e	Et	Ts	50	1.0	MeCN	<i>ArRmut11</i>	(<i>R</i>)- 2e	87

Condiciones de reacción: ATA: 10 mg para *E. coli* CvTA o *ArRmut11* o 2.0 mg para las enzimas de Codexis. Cosolvente: 2.5% v/v (en el caso de *n*-heptano 10% v/v). Volumen final 500 μL. 250 rpm, 30 °C, 24 h. ^{a)} Rendimiento analítico calculado mediante regresión lineal, los valores *ee* se determinaron mediante análisis HPLC.

Después de completar el análisis de los resultados obtenidos para el sustrato modelo y, encontrar las condiciones óptimas de trabajo, a continuación nos centramos en explorar la

influencia de los diferentes grupos protectores escogidos, es decir, se evaluarán los compuestos **1b-f** (ésteres etílicos) y sus análogos metílicos **1k-o**.

En general, la presencia de grupos carbamilo (Cbz/Boc) o sulfonilo (Ts) aumentó la estabilidad de los sustratos en el medio de reacción. En todos los casos, la hidrólisis competitiva del éster se produjo en menor medida que para el sustrato **1a**. Para el caso del compuesto **1b** (sustrato con el grupo protector Boc y éster de etilo), se cuantificó la hidrólisis como en el sustrato modelo y los resultados fueron significativamente más bajos. Para las mismas condiciones mostradas en la Tabla 2, entrada 8, es decir, cosolvente MTBE y pH de 8.5, la hidrólisis encontrada para **1b** fue de 21 ± 4 %, casi un 15% menor que para el sustrato **1a**, con un grupo protector del tipo bencilo.

El pH se fijó, al igual que en el sustrato modelo, en 8.5 para el cribado general de las transaminasas y se seleccionó MTBE (2.5% v/v) o *n*-heptano (10% v/v) como cosolventes preferentes. En el caso de los derivados sulfonílicos **1e** y **1f**; y sus análogos con el grupo alquilo metílico **1n** y **1o** (estos últimos no mostrados en la Tabla 3), poco solubles en MTBE, se utilizó MeCN (2.5% v/v) como cosolvente. Una ventaja adicional que tienen estos disolventes en relación con el DMSO es su bajo punto de ebullición, algo muy conveniente en cuanto a la purificación, si se quiere realizar la transaminación en una escala mayor. Tras 24 h de incubación, varias transaminasas ensayadas proporcionaron buenas conversiones y enantioselectividades perfectas (>99% *ee*). El resto de condiciones, salvo la concentración de la isopropilamina que, para estos casos, se fijó en 1.0 M, son las mismas que se han empleado hasta ahora. En la Tabla 3, entradas 11-24, se muestra los mejores resultados obtenidos.

Si nos fijamos en los resultados de las ATA's (*R*)-selectivas, sin lugar a dudas la enzima *ArRmut11* se ha revelado como la mejor transaminasa para la síntesis de la mayoría de las (*R*)-piperazinonas. En la formación de (*R*)-**2b** se alcanzó un 83% de rendimiento (entrada 11), para (*R*)-**2c**, 90% de rdto. (entrada 14) y para (*R*)-**2e** y (*R*)-**2f**, rendimientos del 91 y 78% respectivamente (entradas 18 y 20).

Entre las transaminasas (*S*)-selectivas, se alcanzó una actividad moderada para CvTA en la formación del derivado de Boc (*S*)-**2b** (54% de rdto., entrada 12), mientras que la ATA-237 permitió la formación de (*S*)-**2c** con un 76% de rdto. (entrada 15) y de (*S*)-**2e** con un 73% de rdto. (entrada 19). El cambio de MTBE por *n*-heptano (10% v/v) como cosolvente tuvo un efecto muy positivo en la biotransaminación catalizada por CvTA del derivado de Boc **1b**. El rendimiento de la piperazinona (*S*)-**2b** aumentó del 54 al 89% (entrada 13).

En el caso de los compuestos con el grupo protector de tipo amida (**1d** y **1m**), los rendimientos para ambas configuraciones difieren de las demás estructuras de estudio. A pesar de utilizar las mismas condiciones optimizadas que en los otros casos, los rendimientos obtenidos nunca superaron el 50% y en el mejor de los casos se llegó a un 32% para (*R*)-**2d** (entrada 16).

Capítulo 1.

De forma similar al estudio realizado con el sustrato **1a**, también se examinó el efecto del grupo saliente de los ésteres, realizando los experimentos de biotransaminación sobre los ésteres metílicos **1k-o**. En general, estas reacciones condujeron a la piperazinona correspondiente con rendimientos similares o inferiores a los de sus análogos con ésteres etílicos, con algunas excepciones no significativas.

Antes de realizar estas biotransformaciones a escala semipreparativa, se estudiaron unas últimas modificaciones; se aumentó la concentración de sustrato hasta 50 mM para aquellos sustratos en los que se habían logrado los mayores rendimientos. Entre todas las reacciones estudiadas, las de los sustratos **1b**, **1c** y **1e** mostraron conversiones solo ligeramente inferiores a las obtenidas a 25 mM y manteniendo la estereoselectividad inalterada (>99% *ee*), (entradas 22, 23 y 24). Por lo tanto, posteriormente se utilizó una concentración de 50 mM de sustrato para llevar a cabo estas biotransformaciones en una mayor escala.

En vista de los buenos resultados obtenidos en general para las (*R*)-piperazinonas con la variante evolucionada *ArRmut11*, se decidió someterla a una semipurificación mediante una modificación del procedimiento previamente descrito por López-Iglesias y colaboradores.¹⁶² El procedimiento de purificación de la enzima, así como el de crecimiento desde una disolución stock en glicerol de la misma, se encuentra detallada en la Sección Experimental (1.12).

Después de realizar dicha purificación, el primer objetivo fue determinar qué cantidad, de esta nueva preparación, era necesaria para lograr una transformación equivalente a la obtenida con la preparación sin purificar. Para esta comparación, se utilizó el sustrato **1a** como referencia. Se observó que con 2 mg de la preparación sin células de *E. coli* (preparación *cell-free*) se logró la misma transformación que con los 10 mg de la preparación con células de *E. coli* (referida en la Tabla 4 como preparación ‘*cruda*’) bajo las mismas condiciones de agitación y tiempo de reacción (entradas 1 y 2). De esta manera se fijó esta cantidad de enzima para el resto de ensayos.

En el estudio comparativo realizado para el resto de sustratos, se observa una ligera mejora en los rendimientos de la biotransaminación al utilizar la versión *cell-free*. Con el compuesto **1b** se logró subir la concentración de trabajo de sustrato a 50 mM sin verse comprometido el rendimiento (84% rdt., entrada 5) en comparación con los ensayos a 25 mM.

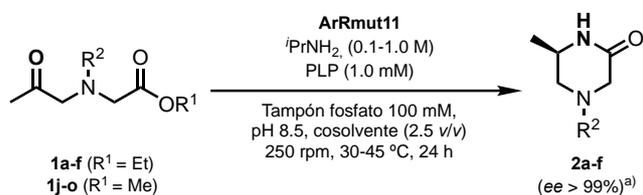
En el caso del compuesto con el grupo protector Cbz, **1c**, tanto la preparación de *E. coli* como la versión *cell-free* mostraron un alto desempeño a 50 mM de sustrato. Con los ensayos realizados a temperaturas superiores se observó que la preparación *cell-free* respondía mejor al aumento de la misma, lográndose un incremento del rendimiento analítico hasta el 92% (entrada 9) para 45 °C.

¹⁶² M. López-Iglesias, D. González-Martínez, V. Gotor, E. Busto, W. Kroutil, V. Gotor-Fernández, *ACS Catal.* **2016**, *6*, 4003–4009.

Resultados y Discusión

Para el compuesto con el grupo tosilo, **1e**, en general, con ambas preparaciones se tuvieron resultados similares y, las diferencias encontradas, a medida que se aumenta la temperatura de los ensayos disminuían. En la entrada 15 se recoge un rendimiento del 88% para la preparación *cell-free*, con una temperatura de 45 °C.

Tabla 4. Comparativa entre la preparación de *ArRmut11* liofilizada de *E. coli* (cruda) y la preparación liofilizada semipurificada (*cell-free*).



Entrada	Sustrato			$T^{\circ}\text{C}$	Preparación	Producto	Rdto./% ^{a)}	
	R^1	R^2	[mM]					
1	1a	Et	Bn	25	30	cruda	(<i>R</i>)- 2a	81
2	1a	Et	Bn	25	30	<i>cell-free</i>	(<i>R</i>)- 2a	81
3	1b	Et	Boc	25	30	cruda	(<i>R</i>)- 2b	83
4	1b	Et	Boc	25	30	<i>cell-free</i>	(<i>R</i>)- 2b	86
5	1b	Et	Boc	50	30	<i>cell-free</i>	(<i>R</i>)- 2b	84
6	1c	Et	Cbz	50	30	cruda	(<i>R</i>)- 2c	82
7	1c	Et	Cbz	50	30	<i>cell-free</i>	(<i>R</i>)- 2c	82
8	1c	Et	Cbz	50	40	<i>cell-free</i>	(<i>R</i>)- 2c	87
9	1c	Et	Cbz	50	45	<i>cell-free</i>	(<i>R</i>)- 2c	92
10	1e	Et	Ts	25	30	cruda	(<i>R</i>)- 2e	91
11	1e	Et	Ts	25	30	<i>cell-free</i>	(<i>R</i>)- 2e	83
12	1e	Et	Ts	50	30	cruda	(<i>R</i>)- 2e	87
13	1e	Et	Ts	50	30	<i>cell-free</i>	(<i>R</i>)- 2e	82
14	1e	Et	Ts	50	45	cruda	(<i>R</i>)- 2e	87
15	1e	Et	Ts	50	45	<i>cell-free</i>	(<i>R</i>)- 2e	88
16	1f	Et	Mbs	25	30	cruda	(<i>R</i>)- 2f	78
17	1f	Et	Mbs	25	30	<i>cell-free</i>	(<i>R</i>)- 2f	72

Condiciones: ATA, 10 mg para *E. coli ArRmut11* ('cruda') o 2.0 mg la preparación *cell-free ArRmut11*. ^{a)} Rendimiento analítico calculado mediante regresión lineal, los valores *ee* se determinaron mediante análisis HPLC.

También se evaluaron los sustratos con los ésteres metílicos (resultados no mostrados en la Tabla 4) frente a esta nueva versión de la *ArRmut11* resultando, como se había producido hasta

Capítulo 1.

el momento, en rendimientos similares o inferiores a los obtenidos al emplear la versión *cell-free* en los análogos con los ésteres etílicos.

- Preparación de las 1,4-diazepanonas **2h** y **2g**.

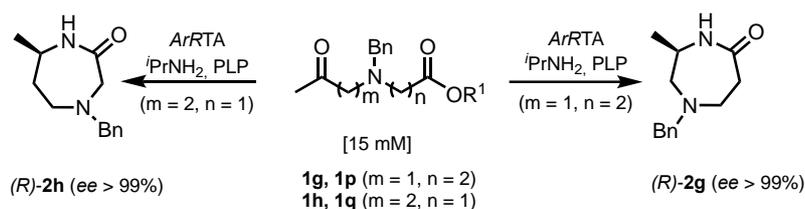
Para la preparación de compuestos heterocíclicos de mayor tamaño, se evaluaron como sustratos los ésteres etílicos **1g** y **1h**, así como los ésteres metílicos **1p** y **1q** mediante la acción de ATA's. Sin embargo, en el cribado inicial utilizando las condiciones de reacción optimizadas para el sustrato **1a**, se obtuvieron conversiones muy bajas (<10%) del heterociclo para todas las ATA's evaluadas. Además, con los derivados glicínicos **1h** y **1q**, al igual que con el análogo **1a**, se observó una gran competencia entre el proceso catalítico y la hidrólisis espontánea. Como cabía esperar, con los derivados que provienen de la β -alanina, **1g** y **1p**, al presentan un carbono adicional entre la posición de la amina bencilada y el grupo éster, se observó un menor grado de hidrólisis por su parte.

A pesar de los resultados desfavorables obtenidos en el cribado inicial, se llevó a cabo un estudio variando diversos parámetros de reacción con el objetivo de mejorar los resultados en la medida de lo posible, dada la relevancia propia de estos heterociclos. Las condiciones más favorables identificadas resultaron ser, entre otras, la reducción de la concentración de trabajo pasando de 25 a 15 mM.

Además, los ensayos realizados a pH 10 y tras fijar la concentración de $^i\text{PrNH}_2$ en 0.5 M, resultaron en la obtención del 1,4-diazepano (*R*)-**2h** de forma enantiopura con un rendimiento del **15** y **20%** para los sustratos **1h** y **1q** respectivamente, utilizando la enzima *ArRTA* (Tabla 5, entradas 1 y 2). Empleando la misma enzima, pero con los sustratos **1g** y **1p**, los cuales son menos propensos a la hidrólisis, se obtuvo el 1,4-diazepano (*R*)-**2g** enantiopuro con mejores resultados, en estos casos **45** y **63%** respectivamente (entradas 3 y 5). También modificaron otros parámetros como la temperatura (pruebas a 40 °C) y el cosolventes (MeCN) pero los resultados de estos ensayos no mejoraron o incluso empeoraron los resultados mostrados en la Tabla 5. Otras concentraciones de $^i\text{PrNH}_2$ fueron ensayadas, como se muestran en las entradas 4 y 6 pero los resultados fueron también inferiores.

Curiosamente, en estas reacciones los ésteres metílicos han demostrado ser mejores sustratos en comparación con los ésteres etílicos, en contraste con lo observado hasta ahora en la formación de las piperazinonas.

Esta discrepancia puede explicarse considerando que, en estos casos donde se están formando anillos de mayor tamaño, siete miembros, el paso de ciclación es más crítico, y en consecuencia, el empleo de un éster más reactivo, como el metílico, adquiere un papel diferenciador en este contexto, teniendo un impacto significativo en el proceso global.

Tabla 5. Biotransformaciones de los sustratos **1g**, **1p**, **1h**, y **1q** en las 1,4-diazepanonas **2g** y **2h**.

Entrada	Sustrato	R ¹	<i>i</i> PrNH ₂ /M	Producto ^{b)}	Rdto./% ^{a)}
1	1h	Et	0.5	<i>(R)</i> - 2h	15
2	1q	Me	0.5	<i>(R)</i> - 2h	20
3	1g	Et	0.5	<i>(R)</i> - 2g	45
4	1p	Me	0.25	<i>(R)</i> - 2g	50
5	1p	Me	0.5	<i>(R)</i> - 2g	63
6	1p	Me	1.0	<i>(R)</i> - 2g	37

Condiciones de reacción: Sustrato 15 mM. Transaminasa *ArRTA* (10 mg), MTBE (2.5% v/v), PLP (1.0 mM), tampón fosfato 100 mM, pH 10.0, volumen final 500 μ L. 250 rpm, 30 °C, 24 h. ^{a)} Rendimiento analítico calculado mediante regresión lineal. ^{b)} La configuración absoluta se asignó según la enantioselectividad de la ATA.

- Preparación de las piperazinonas derivadas de la D- o L-alanina.

El uso de α -aminoácidos ópticamente activos como precursores en la síntesis de los propios sustratos, como es el caso de la D- o L-alanina, conlleva un aumento en la complejidad estructural de las piperazinonas obtenidas mediante las reacciones biocatalíticas.

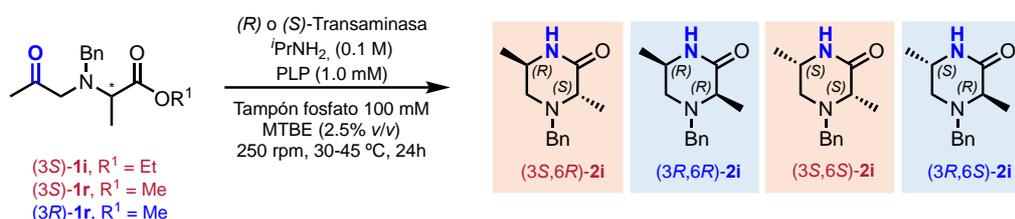
Teniendo esto en cuenta, si bien las biotransformaciones de los compuestos **1i** y **1r**, se llevaron a cabo utilizando las mismas condiciones de reacción optimizadas para el compuesto **1a**, se tomaron ciertas precauciones adicionales al extraer los productos del medio de reacción, para evitar la racemización en la posición α del carbonilo lactámico formado, en la que se encuentra el carbono asimétrico preexistente (C3).

Varias de las transaminasas ensayadas proporcionaron una buena conversión hacia la formación de la piperazinona **2i** correspondiente. El análisis por HPLC de la composición estereoisomérica de **2i** reveló una alta enantioselectividad, ya sea (*R*)- o (*S*)-, dependiendo de la transaminasa utilizada (Tabla 6). Por ejemplo, la transaminasa (*R*)-selectiva *ArRmut11* permitió la transformación de los sustratos (*S*)-**1i** y (*S*)-**1r** en (*3S,6R*)-**2i** (entradas 1 y 7), y el sustrato (*R*)-**1r** en (*3R,6R*)-**2i** (entrada 9) con rendimientos elevados (80-89%). También se ensayó la preparación *cell-free* de la transaminasa *ArRmut11*, pero la conversión en este caso fue menor que con la variante sin purificar (entrada 2). Además, también se lograron conversiones elevadas

Capítulo 1.

(85-88%) en la biotransaminación del sustrato (*R*)-**1r** utilizando las transaminasas (*R*)-selectivas ATA-412 y ATA-024 (entradas 11 y 12).

Tabla 6. Biotransformaciones de los sustratos **1i** y **1r** en las piperazinonas **2i**.



Entrada	Sustrato		ATA	Rdto. [% ^a]	Composición estereoisomérica de 2i ^b			
	(<i>ee</i> , %) ^a	R ¹ [mM]			(<i>S,S</i> , <i>R</i>)	(<i>R,R</i> , <i>R</i>)	(<i>S,S</i> , <i>S</i>)	(<i>R,R</i> , <i>S</i>)
1	(<i>S</i>)- 1i (99)	Et 25	<i>ArRmut11</i>	89	99	1	<1	<1
2	(<i>S</i>)- 1i (99)	Et 25	<i>ArRmut11</i> ^c	78	99	1	<1	<1
3	(<i>S</i>)- 1i (99)	Et 50	<i>ArRmut11</i>	65	98	1	1	<1
4	(<i>S</i>)- 1i (99)	Et 50	<i>ArRmut11</i>	74 ^d	98	1	<1	<1
5	(<i>S</i>)- 1i (99)	Et 25	ATA-237	92	<1	<1	>99	<1
6	(<i>S</i>)- 1i (99)	Et 50	ATA-237	83	<1	<1	>99	<1
7	(<i>S</i>)- 1r (97)	Me 25	<i>ArRmut11</i>	80	97	2	1	<1
8	(<i>S</i>)- 1r (97)	Me 25	ATA-237	82	<1	<1	98	2
9	(<i>R</i>)- 1r (96)	Me 25	<i>ArRmut11</i>	82	3	96	1	<1
10	(<i>R</i>)- 1r (96)	Me 25	ATA-237	82	<1	<1	3	97
11	(<i>R</i>)- 1r (96)	Me 25	ATA-412	88	3	96	1	<1
12	(<i>R</i>)- 1r (96)	Me 25	ATA-024	85	3	96	1	<1
13	(±)- 1r	Me 25	ATA-P2-A01	25	78	18	4	<1
14	(±)- 1r	Me 25	ATA-260	40	<1	<1	90	10

Condiciones de reacción: ATA: 10 mg para *E. coli ArRmut11* o 2.0 mg para las enzimas de Codexis o la preparación *cell-free*. MTBE (2.5% v/v), *i*PrNH₂ (0.1 M), PLP (1.0 mM), tampón fosfato (100 mM) pH 8.5, volumen final 500 μL. 250 rpm, 30 °C, 24 h. ^a Rendimiento analítico calculado mediante regresión lineal, los valores *ee* se determinaron mediante análisis HPLC. ^b La configuración absoluta se asignó según la enantioselectividad de la ATA. ^c Preparación *cell-free*. ^d El ensayo se llevó a cabo a 45 °C.

En cuanto a las transaminasas (*S*)-selectivas, con la ATA-237 se obtuvieron de nuevo los mejores resultados. La piperazinona (*S,S*)-**2i** se obtuvo a partir de los sustratos (*S*)-**1i** o (*S*)-**1r**, y el estereoisómero (*R,S*)-**2i** a partir del sustrato (*R*)-**1r** con rendimientos altos (entradas 5, 8 y 10, rendimientos 82-92%).

Se puede observar una correlación entre el exceso enantiomérico de los sustratos de partida y la proporción estereoisomérica de las piperazinonas que se obtienen. Por ejemplo (entrada 10), la presencia de un ~3% del resto de estereoisómeros distintos al mayoritario en los ensayos con el sustrato (*R*)-**1r**, es consecuencia únicamente de la pureza enantiomérica del sustrato de partida (*ee* 96%), lo cual pone de nuevo de manifiesto la alta enantioselectividad de los catalizadores usados.

Llegados a este punto y teniendo en cuenta algunas de las metodologías enzimáticas previamente establecidas, como la resolución cinética (KR) o resolución cinética dinámica (DKR)^{153-154,163} en las cuales las transaminasas han mostrado ser capaces de discriminar entre los enantiómeros de una mezcla racémica y transformarlos con alta estereoespecificidad, se consideró oportuno estudiar el compuesto racémico (\pm)-**1r** como sustrato.

Este sustrato se ensayó con el panel completo de transaminasas en las mismas condiciones de reacción que sus análogos ópticamente activos. Todas las ATA's ensayadas presentaron una alta enantioselectividad (esperada) pero no así una buena enantioespecificidad, lo que indica que la configuración del metilo preexistente en la estructura, no tiene efecto en su reconocimiento por parte de la enzima, en general.

En las entradas 13 y 14 de la Tabla 6 se muestran los resultados de las enzimas que sí mostraron una preferencia relativa, pero no exclusiva, hacia uno de los enantiómeros. Así, la ATA-260, (*S*)-selectiva, catalizó la transaminación del grupo carbonilo con una proporción diastereomérica (*dr*) de 9:1 hacia el (3*S*,6*S*)-**2i**, logrando una conversión del 40% (>99% *ee*). Por otro lado, la ATA-P2-A01, (*R*)-selectiva, obtuvo un *dr* de 8:2 para el (3*S*,6*R*)-**2i** con un *ee* >99%.

Una vez seleccionados los biocatalizadores que mostraron mejores resultados para los sustratos (*S*)-**1i** y (*R*)-**1r**, las ATA's *ArRmut11* y ATA-237, se aumentó la concentración del sustrato (*S*)-**1i** hasta 50 mM (entradas 3 y 6). Aunque se mantuvo una alta estereoespecificidad en estos procesos, la conversión disminuyó en estas condiciones. En el caso de la ATA-237, la conversión disminuyó en torno a 10%, pero, en el ensayo con la *ArRmut11*, se notó especialmente, ya que la disminución fue casi de un 25%. No obstante, se logró mejorar el rendimiento hasta el 74% (entrada 4) al aumentar la temperatura del proceso a 45 °C.

Cabe destacar que, en los procesos a concentración de 50 mM, la cantidad relativa de donador de amina (100 mM) es de tan solo de 2 equivalentes. Se realizaron pruebas a mayor concentración de ^tPrNH₂ (1.0 M) con el objetivo de optimizar los resultados, pero en todos los casos se obtuvieron resultados inferiores.

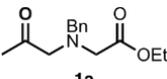
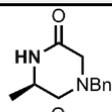
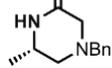
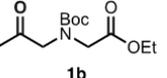
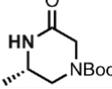
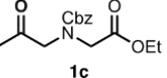
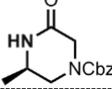
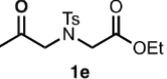
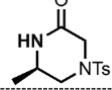
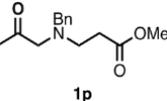
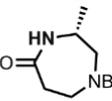
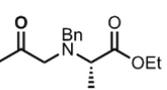
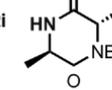
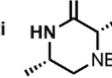
¹⁶³ a) Á. Mourelle-Insua, D. Méndez-Sánchez, J. L. Galman, I. Slabu, N. J. Turner, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Catal. Sci. Technol.* **2019**, *9*, 4083–4090. b) J. Limanto, E. R. Ashley, J. Yin, G. L. Beutner, B. T. Grau, A. M. Kassim, M. M. Kim, A. Klapars, Z. Liu, H. R. Strotman, M. D. Truppo, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 2716–2719. c) Z. Peng, J. W. Wong, E. C. Hansen, A. L. A. Puchlopek-Dermenci, H. J. Clarke, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 860–863.

Capítulo 1.

1.7. Experimentos en escala semipreparativa.

Con el propósito de ilustrar la utilidad de las biotransformaciones realizadas a escala analítica, se han llevado a cabo algunos procesos representativos a escala semipreparativa. Para ello, se seleccionaron las mejores condiciones de reacción encontradas para cada sustrato y se realizaron los escalados replicando las mismas condiciones. Por ejemplo, en el caso del compuesto (*R*)-**2c**, la escala de sustrato fue de 142 mg. Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla. En casi todos los casos, los productos se aislaron en forma enantiopura y su rendimiento aislado tras purificación fue acorde con los obtenidos analíticamente.

Tabla 7. Condiciones y resultados de las transformaciones estereoselectivas a escala semipreparativa.

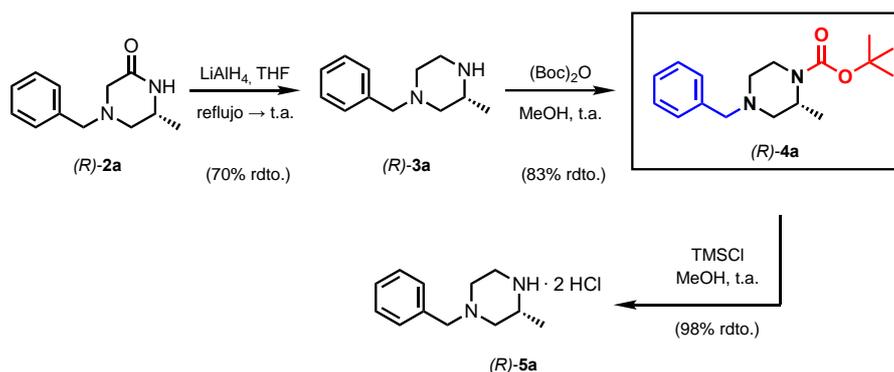
Entrada	Sustrato	<i>c</i> /[mM]	ATA	Producto	Rdto./% a)	ee/% ^{b)}
1	 1a	25	<i>ArRmut11</i>	(<i>R</i>)- 2a 	83	>99
2	1a	25	ATA-237	(<i>S</i>)- 2a 	81	>99
3	 1b	50	<i>CvTA</i>	(<i>S</i>)- 2b 	82	>99
4	 1c	50	<i>ArRmut11</i> ^{c)}	(<i>R</i>)- 2c 	90	>99
5	 1e	50	<i>ArRmut11</i> ^{c)}	(<i>R</i>)- 2e 	73	>99
6	 1p	15	<i>ArRTA</i>	(<i>R</i>)- 2g 	51	>99
7	 (S)-1i (ee 99%)	50	<i>ArRmut11</i>	(3 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)- 2i 	70	99
8	(S)-1i (ee 99%)	50	ATA-237	(3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)- 2i 	78	>99

^{a)} Rendimiento aislado. ^{b)} Determinado por HPLC en fase estacionaria quiral. ^{c)} Preparación *cell-free* liofilizada. La reacción se llevó a cabo a 45 °C.

1.8. Derivatizaciones, síntesis de la piperazina protegida ortogonalmente, (*R*)-**4a**.

Para demostrar la utilidad de las piperazinonas ópticamente puras obtenidas en los procesos biocatalíticos que se acaban de describir, se prepararon, a partir de las mismas, diversos productos derivados que también presentan gran interés sintético.

En primer lugar, se llevó a cabo la reducción de la piperazinona (*R*)-**2a** obtenida tras realizar el escalado con la enzima *ArRmut11*, obteniéndose así la piperazina (*R*)-**3a** derivada (Esquema 30). La reacción se realizó en THF a reflujo en condiciones anhidras y en presencia de hidruro de litio y aluminio.¹⁶⁴



Esquema 30. Transformaciones químicas realizadas a partir de piperazinonas enantiopuras.

La transformación proporciona una estructura de piperazina con una amina libre funcionalizable en la posición C4, mientras que la amina en la posición C1 se encuentra protegida con un grupo bencilo. A continuación, se trató a (*R*)-**3a** con pirocarbonato de di(*tert*-butilo) en metanol para obtener la piperazina (*R*)-**4a**, que presenta una protección ortogonal.

La última modificación realizada fue la transformación de la piperazina (*R*)-**4a** en el dihidrocloruro (*R*)-**5a**. Para ello se trató con cloruro de trimetilsililo en metanol.

Las ventajas de los clorhidratos son, por una parte, su mayor estabilidad, lo cual ayuda a prolongar su vida útil. Además, al ser generalmente sólidos cristalizables, facilita su manipulación, purificación y la caracterización.

¹⁶⁴ P. Maity, B. König, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1473-1476.

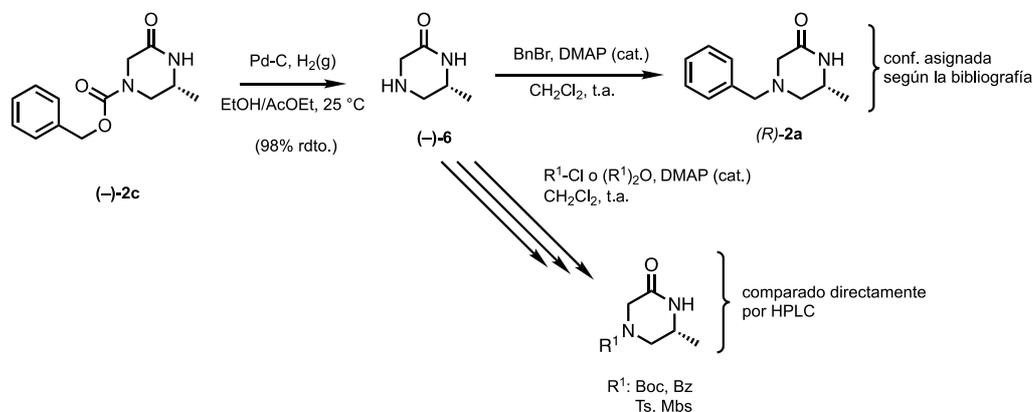
Capítulo 1.

1.9. Asignación de la configuración absoluta.

La determinación de la configuración absoluta de las piperazinonas obtenidas no se limitó únicamente a la asignación de acuerdo con enantioselectividad conocida de las transaminasas empleadas, sino que también se confirmó por correlación con compuestos derivados de las mismas, de configuración establecida en la bibliografía.

En primer lugar, se confirmó la configuración de la piperazinona **2a** mediante la comparación de la rotación óptica de (+)-**3a** (obtenida en el apartado 1.8.) con la descrita para la (*R*)-(+)-**3a**.¹⁶⁴

Teniendo ya determinada la configuración de la piperazinona **2a**, se procedió a desproteger la amina de la piperazinona (–)-**2c**, preparada usando la transaminasa *ArRmut11*, mediante hidrogenación catalítica en presencia de paladio sobre carbono. La reacción se llevó a cabo en etanol y acetato de etilo como disolventes, lo que resultó en la formación de la piperazinona (–)-**6**, con la amina libre (Esquema 31).



Esquema 31. Transformaciones químicas de la piperazinona (–)-**2c** ópticamente activa para la asignación de la configuración absoluta de las piperazinonas **2b-f**.

El siguiente paso fue transformar la piperazinona (–)-**6** en el **2a** mediante una sustitución nucleófila empleando bromuro de bencilo con DMAP como catalizador. De este modo se confirmó la configuración de (*R*)-(+)-**6** y la de su precursor, (*R*)-(+)-**2c**.

Repetiendo el mismo procedimiento, se prepararon las (*R*)-piperazinonas **2b** y **2d-f**, a partir del compuesto (*R*)-(+)-**6**. Mediante la comparación de los cromatogramas de estos compuestos por HPLC con los de los correspondientes productos obtenidos con las reacciones enzimáticas, se corroboró la configuración absoluta asignada inicialmente de acuerdo con la estereopreferencia de cada transaminasa.

Cabe destacar que la piperazina ortogonalmente protegida (*R*)-(-)-**4a** (Esquema **30**) también presentó una rotación óptica en concordancia con la del (*R*)-enantiómero, tal como se había descrito previamente.¹⁴⁰

La asignación de la configuración absoluta para los compuestos de tipo 1,4-diazepanona (**2g** y **2h**), se realizó teniendo en cuenta la selectividad esperada de la enzima *ArRTA*.

Por último, para los estereoisómeros derivados de la alanina, **2i**, se observó una concordancia total entre la selectividad esperada de las enzimas con los resultados que se obtuvieron de las biotransformaciones, así como la asignación de las configuraciones relativas *cis* y *trans* esperadas. No obstante, se realizó un estudio de caracterización adicional mediante experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) para confirmar estas predicciones.

En primer lugar, mediante los experimentos de RMN de ¹H, ¹³C y HSQC de los productos aislados (entradas 7 y 8 de la Tabla 7), se asignaron las señales obtenidas con cada átomo para los dos posible isómeros geométricos, *cis* o *trans*.

Una vez hecha esta asignación, se utilizó la técnica de resonancia NOESY (del inglés, *Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*) para obtener información sobre la disposición espacial entre los átomos de hidrógeno y determinar así la configuración relativa de las piperazinonas **2i**.

En el caso del isómero *cis*, no fue posible obtener información clara sobre la configuración relativa debido al solapamiento de las señales del protón en C6 con uno de los protones del metileno bencílico. Además, en este caso, los protones del metileno en la posición C5 del anillo de piperazinona aparecen como una única señal a 2.58 ppm en forma de doblete (³*J* = 5.9 Hz).

Afortunadamente, las correlaciones cruzadas nOe (del inglés, *nuclear Overhauser enhancement*) entre los protones para el isómero *trans*, sí permiten establecer la configuración absoluta relativa del centro estereogénico formado en la biotransformación. En este caso, los protones diastereotópicos en C5 aparecen con diferentes desplazamientos químicos en el espectro de ¹H-RMN (anisocronos). Uno de ellos aparece como un doblete a 2.01 ppm (³*J* = 9.2, |²*J*| = 11.8 Hz) y el otro, a un campo más bajo, también como un doblete a 2.85 ppm (³*J* = 3.8, |²*J*| = 11.8 Hz). Además, la confirmación de la configuración relativa, permitió establecer también la absoluta ya que, al provenir el centro estereogénico preexistente en el anillo del aminoácido L-alanina, la disposición del carbono C3 ya tenía una configuración conocida (*S*).

En la Figura 9 se muestran las correlaciones encontradas en el espectro del experimento de NOESY realizado para el isómero (3*S*, 6*R*)-**2i**. En él podemos observar que tanto el metilo-C6 como el protón-C3 presenta señal de cruce con uno de los protones (H^a) de la posición C5

Capítulo 1.

del anillo. Estos mismos grupos, no presentan señal de nOe con el otro protón-C5 (H^b) lo que concuerda con que, estos conjuntos de señales, se encuentran en distintos planos. También se observa señal de cruce entre H^b y C3-H al estar próximos y en el mismo plano (C3-H en disposición pseudoaxial y H^b en pseudoecuatorial).

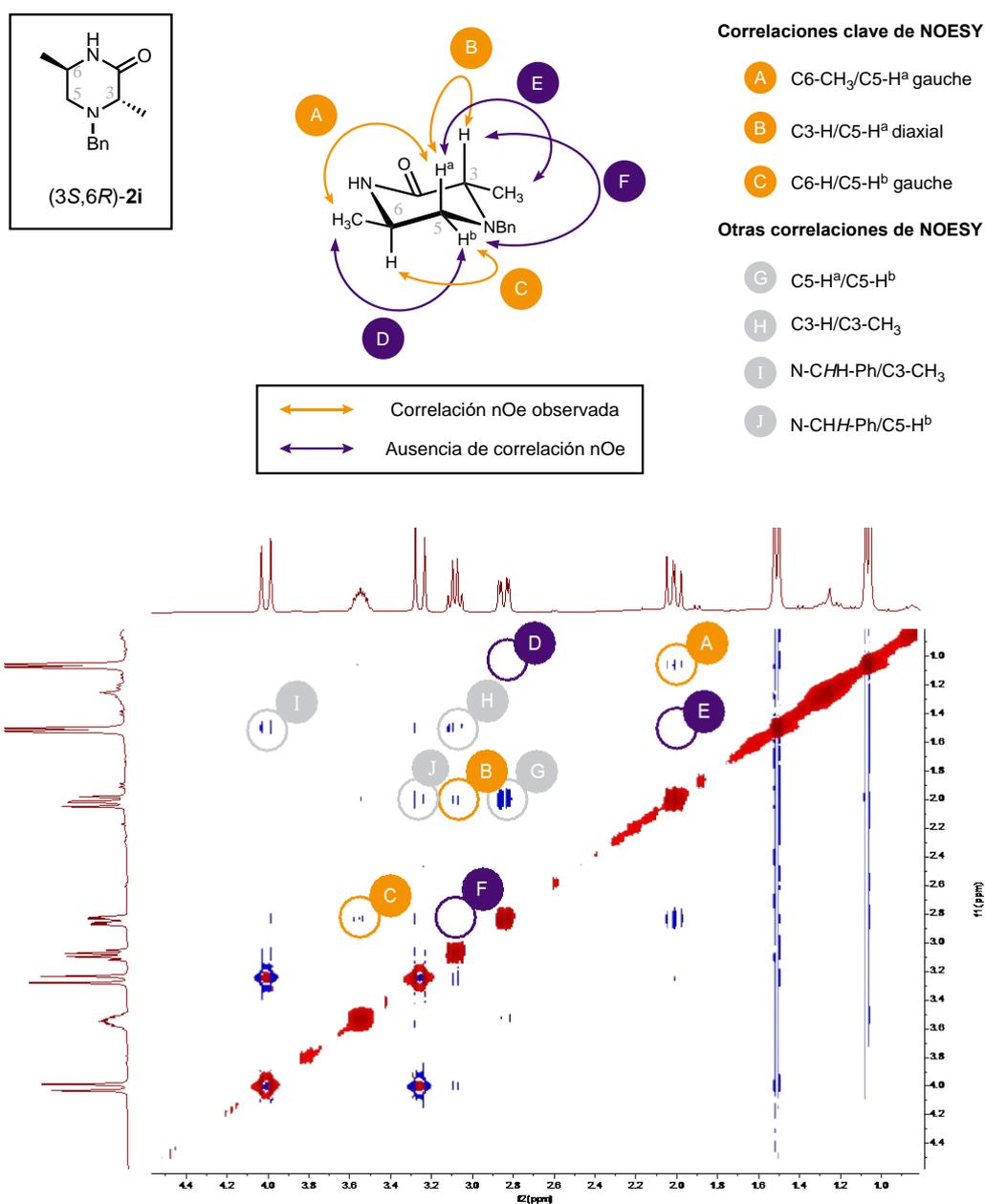


Figura 9. Configuración del isómero trans (3S, 6R)-2i revelada por el experimento de NOESY.

CONCLUSIONES

Conclusiones

En resumen, se ha desarrollado una metodología general, eficaz y altamente selectiva para la síntesis de piperazinonas y 1,4-diazepanonas ópticamente puras a partir de compuestos sencillos y económicos como materiales de partida y bajo condiciones de reacción suave.

La metodología ha consistido en la transaminación de una cetona catalizada por una transaminasa y en la ciclación espontánea de la amina formada (proceso *one-pot, two-steps*). Al poder disponer de transaminasas con opuesta estereopreferencia, han podido sintetizarse ambos enantiómeros en la mayoría de los productos.

Esta metodología se ha aplicado a diversos ésteres derivados de glicina y alanina, que han permitido acceder a productos heterocíclicos nitrogenados de una gran diversidad estructural.

Varios de los procesos enzimáticos optimizados para los derivados de glicina, se llevaron a cabo a escala preparativa (Tabla 7), lo que permitió comprobar la reproducibilidad de los resultados obtenidos a escala analítica. Así, por ejemplo, a partir del sustrato **1c**, se obtuvo la piperazinona (*R*)-**2c** con un rendimiento del 90% y un exceso enantiomérico >99% empleando como catalizador la preparación *cell-free* de la transaminasa *ArRmut11*.

En el caso de los derivados de alanina, al contar con un centro estereogénico prefijado en su estructura, se han podido obtener los cuatro posibles estereoisómeros, utilizando las correspondientes (*R*)- o (*S*)-ATA's, con rendimientos altos (74-92%) y de forma enantiopura (*ee* >99%). Se realizaron los correspondientes escalados y se obtuvieron las piperazinonas (3*S*,6*R*)-**2i** y (3*S*,6*S*)-**2i** con rendimientos de 70 y 78% respectivamente y *ee* ≥99%

El método también se ha aplicado a la preparación de dos 1,4-diazepanonas, **2h** y **2g**. Se realizó un proceso a escala semipreparativa que permitió aislar el compuesto (*R*)-**2g** con un rendimiento moderado (51%) y en forma enantiopura (*ee* >99%).

Las transformaciones realizadas para asignar la configuración absoluta a las piperazinonas ópticamente puras, así como la preparación de la piperazina ortogonalmente protegida, (*R*)-**4a**, han puesto de manifiesto la versatilidad de estas unidades estructurales clave para la síntesis de diversos compuestos bioactivos.

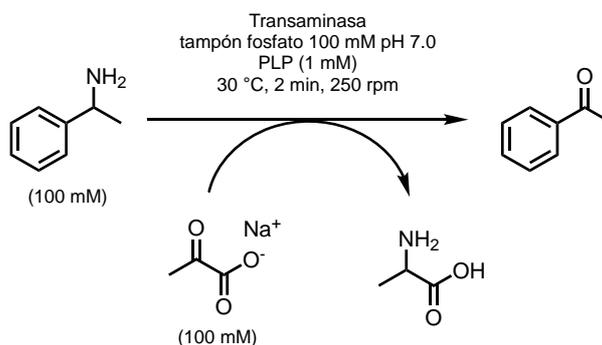
SECCIÓN EXPERIMENTAL

1.10. General.

Los reactivos químicos empleados fueron adquiridos de fuentes comerciales (Merck) y se utilizaron tal como se recibieron; a excepción de los disolventes, los cuales fueron destilados previamente en atmósfera de nitrógeno según procedimientos estándar para su secado.¹⁶⁵

Las transaminasas comerciales fueron adquiridas a la casa comercial Codexis® (*Codex*® *Amine Transaminase Screening Kit*) al igual que el cofactor piridoxal-5'-fosfato (PLP), mientras que las transaminasas de (*S*)-*Chromobacterium violaceum*¹⁶⁶ (CvTA, 1.6 U/mg), (*S*)-*Arthrobacter species*¹⁶⁷ (ArSTA, 0.8 U/mg), (*R*)-*Arthrobacter species*¹⁶⁸ (ArRTA, 1.8 U/mg) se sobreexpresaron en *E. coli* BL21 (DE3) y se utilizaron como células liofilizadas según los procedimientos descritos en la literatura, así como una variante evolucionada de *Arthrobacter sp.*¹⁵¹ (ArRMut11, 0.9 U/mg). Las cepas de las ATA's sobreexpresadas fueron proporcionadas por el Prof. Wolfgang Kroutil (Universidad de Graz).

La actividad de las ATA's sobreexpresadas se determinó mediante la reacción de desaminación de la 1-feniletilamina racémica con piruvato (Esquema 29). Las células liofilizadas de *E. coli* que contenían transaminasas sobreexpresadas (10 mg) se rehidrataron en 1.0 mL de un tampón fosfato 100 mM con pH 7.0 que contenía PLP (1.0 mM) y piruvato sódico (100 mM) a 30 °C durante 15 minutos. A continuación, se añadió la amina (100 mM) y la reacción se agitó durante 2 minutos a 30 °C y 250 rpm. La reacción se extrajo directamente con AcOEt (2 x 500 µL). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron con Na₂SO₄ y se analizaron por HPLC para obtener la conversión de la reacción. Tras 3 repeticiones, se determinó la actividad media según la siguiente fórmula: $U = \mu\text{mol} \cdot (\text{min} \cdot \text{mg catalizador})^{-1}$, donde µmol es la cantidad de acetofenona formada en esas condiciones.



Esquema 32. Reacción de desaminación para la determinación de la actividad de las transaminasas.

¹⁶⁵ W.L. F. Armarego, D. D. Perrin (1996). *Purification of Laboratory Chemicals*, 4th Ed. Oxford: Butterworth-Heinemann. ISBN 0-7506-3761-7.

¹⁶⁶ U. Kaulman, K. Smithies, M. E. B. Smith, H. C. Hailes, J. M. Ward, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *41*, 628–637.

¹⁶⁷ S. Pannuri, S. V. Kamat, A. R. M. Garcia, *PCT Int. Appl. WO 2006063336 A2*, **2006**.

¹⁶⁸ A. Iwasaki, Y. Yamada, N. Kizaki, Y. Ikenaka, J. Hasegawa, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *69*, 499-505.

Capítulo 1.

1.11. Técnicas de purificación y análisis.

La cromatografía en capa fina (TLC, del inglés *thin layer chromatography*) se realizó con placas recubiertas de gel de sílice 60 de Merck con un indicador fluorescente F₂₅₄ para su visualizado con luz UV. Como revelador se empleó una disolución acuosa con permanganato potásico o en algunos casos una disolución etanólica de ninhidrina, preparadas según procedimientos estándar conocidos.¹⁶⁹

La cromatografía en columna se realizó con gel de sílice 60 (230-400 *mesh*) o alúmina básica (70-230 *mesh*), ambas adquiridas a Merck.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H, ¹³C{¹H} y DEPT-135 así como los experimentos 2D de COSY, HSQC, HMBC, y NOESY han sido realizados con un espectrómetro Bruker AV300 (¹H, 300.13 MHz y ¹³C, 75.5 MHz). Los desplazamientos químicos (δ) se han expresado en ppm y se refieren a la señal residual del disolvente utilizada como patrón interno. Las constantes de acoplamiento (*J*) se expresan en Hz con una aproximación de 0.1 Hz.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés *high performance liquid chromatography*) se realizó en un cromatógrafo Hewlett Packard 1100 equipado con un desgasificador G1322A, una bomba binaria G1312A, un automuestreador de placa de pocillos G1313A, un compartimento de columna termostatzado G1316 y un detector de matriz de diodos G1315A. Las columnas analíticas utilizadas fueron Chiralpak® AD-H, Chiralpak® IB, Chiralpak® IC, Chiralcel® OD y Chiralcel® OJ-H. Todas ellas con una longitud de 250 mm, 4.6 mm de diámetro y 5 μ m de tamaño de partícula. Se utilizó un volumen de inyección de 5 μ L y los cromatogramas se monitorizaron a diferentes longitudes de onda (dependiendo del cromóforo presente en cada caso). Para la fase móvil se utilizaron mezclas de *n*-hexano/2-propanol (2-PrOH) o acetonitrilo (MeCN) en las proporciones adecuadas (ver sección 1.15 para más información).

En el análisis de las reacciones enzimáticas mediante HPLC, se empleó una regresión lineal basada en una recta de calibrado previamente establecida para cada muestra. Se determinaron los intervalos de confianza asociados a cada medición utilizando la prueba estadística *t* de Student con un nivel de significación de 0.05. En todos los casos, la incertidumbre de las medias obtenidas mostró un error porcentual $\leq 6\%$, por lo tanto, se consideró el valor medio de cada intervalo como el valor real de la medida analítica. Esta metodología permite una evaluación cuantitativa y confiable de los datos, asegurando una interpretación precisa de los resultados.

¹⁶⁹ J. J. Li, C. Limberakis, D. A. Pflum (2007). *Modern Organic Synthesis in the Laboratory*. Oxford University Press, Inc. ISBN 978-0-19-518798-4.

Las rotaciones específicas se midieron con un polarímetro Perkin-Elmer 343 utilizando la línea D de sodio a 20 °C. Las concentraciones (*c*) se han expresado en g/100 mL y las unidades de los valores de rotación óptica específica son $10^{-1} \cdot \text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$.

Los puntos de fusión (Pf) se midieron con un aparato de punto de fusión Gallenkamp en tubos capilares abiertos, por lo que sus valores no están corregidos.

Los espectros de masas de alta resolución (HRMS, del inglés *high-resolution mass spectrometry*) de los nuevos compuestos se obtuvieron en un espectrómetro Impact II™ de Bruker con un cuadrupolo y un tubo de tiempo de vuelo (TOF, del inglés *time-of-flight*) como analizadores. La ionización se realizó por electrospray (ESI, del inglés *electrospray ionization*) en modo positivo. Los valores se obtuvieron como unidades de masa atómica (uma).

1.12. Crecimiento y semipurificación de la enzima *ArRmut11*.

El crecimiento se inició cultivando las células en un medio LB (del inglés, *luria broth*) con ampicilina como antibiótico (10 mL, 100 mg/L), el cual se incubó a 37 °C y 120 rpm durante 12 h. A continuación, ese precultivo se añadió a un nuevo medio LB con ampicilina, (330 mL, 100 mg/L) y se incubó de nuevo a 37 °C y 120 rpm, hasta que el OD₆₀₀ (densidad óptica medida a 600 nm) alcanzó un valor de 0.5 (aprox. entre 2-3 horas). En ese momento, se dejó enfriar la mezcla hasta temperatura ambiente (20 °C), se le añadió una cantidad adicional de ampicilina (30 mg/L) y se indujo la producción de transaminasa añadiendo isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, 0.5 mM). La mezcla resultante se agitó durante aproximadamente 15 h a 20 °C y 120 rpm. Por último, las células se centrifugaron a 4900 rpm durante 20 min a 4 °C, se lavaron con una disolución tampón de fosfato (pH 7.0, 100 mM), se congelaron con nitrógeno líquido y se liofilizaron. Las células obtenidas se almacenaron a 4 °C.

Para la purificación se inició resuspendiendo las células de *E. coli* liofilizadas del paso anterior (~1.0 g) en un tampón fosfato 100 mM pH 7.0 (10 mL). La suspensión resultante se sonicó con el siguiente protocolo: 1 s de pulso; 4 s de pausa; 2.5 min; 40% de amplitud. La mezcla se centrifugó durante 20 min a 4900 rpm a 4 °C, y el sobrenadante se calentó a 50 °C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, la suspensión se centrifugó de nuevo durante 20 min a 4900 rpm y 4 °C, y el sobrenadante que resultó se congeló con nitrógeno líquido y se liofilizó. Finalmente, la preparación (*pellet*) obtenida del tipo *cell-free*, se almacenó a -18 °C.

Capítulo 1.

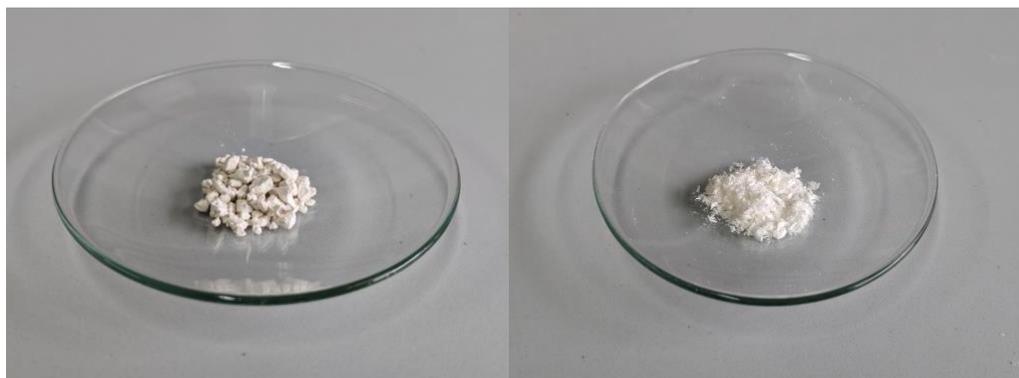


Figura 10. Imágenes comparativas entre las preparaciones de células liofilizadas de *E. coli* (izqda.) y de *cell-free* liofilizado (dcha.) para la enzima *ArRmut11*.

1.13. Procedimientos sintéticos.

Procedimiento para la síntesis de los sustratos **1a**, **1g**, **1j**, **1i**, **1p**, y **1r**.

A una suspensión en agitación que contenía el correspondiente éster etílico o metílico de la *N*-bencilglicina, *N*-bencil- β -alanina o (L-, D-, o DL -) *N*-bencilalanina (1.0 mmol), NaHCO₃ (2.0 equiv.) y NaI (0.05 equiv.) en acetona (2.5 mL) a 40 °C se añadió gota a gota una solución de cloroacetona (2.0 equiv.) en acetona (1.0 mL). Después de agitar toda la noche, se dejó que la mezcla de reacción alcanzara la temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se filtró y se concentró, después se extrajo con AcOEt/H₂O y las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se evaporó y el material crudo resultante se purificó mediante cromatografía en columna para obtener el producto correspondiente (65-97% de rendimiento).

Procedimiento para la síntesis de los sustratos **1b-f** desde **1a**, y de los sustratos **1k-o** desde **1j**.

Primer paso:^{156a} A una disolución de **1a** o **1j** (1.0 mmol) en EtOH absoluto o MeOH respectivamente (0.15 M) se añadió Pd-C (10% en peso) y una disolución acuosa concentrada de HCl (1.3 equiv.). La mezcla resultante se agitó bajo una atmósfera de H₂(g) durante 2 h a 25 °C. Transcurrido este tiempo, la mezcla se filtró a través de una capa de Celite® y el residuo negro se lavó varias veces con más disolvente. A continuación, el filtrado se concentró para proporcionar los productos **15** y **16** correspondientes, que se utilizaron en el paso siguiente sin purificación adicional (rdto. del 98-99%).

Segundo paso: A una solución de los clorhidratos **15** y **16** del paso anterior (1.0 equiv.), Et₃N (2.1 equiv.) y DMAP (cat.) en CH₂Cl₂ seco (0.15 M) a 0 °C, se añadió gota a gota 2.5 equiv.

del reactivo correspondiente: (Boc)₂O, CbzCl, BzCl, TsCl, o MbsCl. La mezcla de reacción se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añadió agua y se separaron las capas. La capa acuosa se extrajo varias veces con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron. El material resultante se purificó mediante cromatografía en columna para obtener el compuesto correspondiente (36-86% rdt.).

Procedimiento para la síntesis de los sustratos **1h** y **1q**.¹³²

A una disolución en agitación del correspondiente éster etílico o metílico de *N*-bencilglicina (1.0 mmol) y una disolución acuosa de NaOH 10 M (0.01 equiv.) en DMF (2.0 mL), se añadió gota a gota 3-buten-2-ona (1.3 equiv.). Después de agitar a temperatura ambiente toda la noche, la reacción se finalizó añadiendo 10 mL de agua y se extrajo con Et₂O (3 x 15 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para obtener el compuesto correspondiente, el cual se purificó por cromatografía en columna (76-93% rdt.).

Procedimiento general para la síntesis de las (±)-piperazinonas (**2a-f** y **2i**) y las (±)-1,4-diazepanonas (**2g-h**).^{152b}

A una disolución del cetoéster correspondiente **1a-h** o (±)-**1r** (1.5 mmol) en MeOH anhidro (5.0 mL), se añadió acetato amónico (10 equiv.) a 0 °C, y la mezcla resultante se dejó agitando a temperatura ambiente durante 2 h. Transcurrido este tiempo, se añadió cianoborohidruro de sodio (2.0 equiv.) a 0 °C y la mezcla resultante se agitó durante toda la noche. Después de ese tiempo, la reacción se terminó añadiendo una disolución acuosa de NaOH 10 M hasta llegar a un pH ~ 10 y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar el crudo de reacción que se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (mezclas AcOEt o AcOEt/MeOH como eluyente) dando las piperazinonas (21-71%) o las 1,4-diazepanonas (15-24%) correspondientes.

Síntesis de (*R*)-1-bencil-3-metilpiperazina, (*R*)-**3a**.¹⁶⁴

A una suspensión de LiAlH₄ (80 mg, 4.5 equiv.) en THF anhidro (4.0 mL) a reflujo vigoroso y bajo atmósfera de argón, se añadió gota a gota una disolución de la piperazinona (*R*)-**2a** (95 mg, 0.47 mmol) en THF anhidro (2.0 mL). La mezcla se mantuvo a reflujo durante 3 h y después toda la noche a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la mezcla se enfrió a 0 °C y se diluyó con Et₂O, después se añadió lentamente agua seguida de una solución acuosa de NaOH (15%). A continuación, se dejó que la mezcla resultante alcanzara la temperatura ambiente y se añadió MgSO₄. Después, la mezcla se filtró y las sales se lavaron con más Et₂O. Las fases orgánicas se combinaron y se concentraron para obtener el crudo de reacción como un aceite amarillo. El material resultante se purificó mediante cromatografía, en columna de

Capítulo 1.

alúmina básica (mezclas de hexano/AcOEt como eluyente), aislando la piperazina (*R*)-**3a** enantiopura como un aceite amarillo pálido (62 mg, 70% de rendimiento).

Síntesis de (*R*)-4-bencil-2-metilpiperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo, (*R*)-**4a**.

A una disolución de (*R*)-**3a** (60 mg, 0.32 mmol) en MeOH (2.0 mL) se añadió gota a gota una disolución de pirocarbonato de di(*tert*-butilo) (175 mg, 2.5 equiv.) en MeOH (1.0 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Transcurrido este tiempo, la mezcla resultante se concentró y el crudo se disolvió en acetato de etilo (3 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar un crudo, el cual se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (mezclas de hexano/Et₂O como eluyente), obteniéndose (*R*)-**4a** como un aceite amarillo (76 mg, 83% de rendimiento).

Síntesis de (*R*)-dihidrocloruro de 1-bencil-3-metilpiperazina, (*R*)-**5a**.

A una disolución con (*R*)-**4a** (50 mg, 0.17 mmol) en MeOH (2.0 mL) se añadió cloruro de trimetilsililo (437 μL, 20 equiv.). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche, tras lo cual, la mezcla se concentró y el sólido blanco que se forma se lavó varias veces con THF frío para dar el compuesto (*R*)-**5a** como un sólido blanco (44 mg, 98% de rendimiento).

Síntesis de (*R*)-6-metilpiperazin-2-ona, (*R*)-**6**.

A una solución con (*R*)-**2c** (100 mg, 0.4 mmol) en 1:1 EtOH/AcOEt (4 mL, 0.1 M) se añadió Pd-C (10 mg, 10% en peso). La mezcla resultante se agitó durante una noche bajo una atmósfera de H₂(g) a 25 °C. Transcurrido este tiempo, la mezcla se filtró a través de una capa de Celite® y el residuo negro se lavó varias veces con más disolvente. Se eliminó el disolvente y el crudo se lavó de nuevo varias veces con *n*-pentano frío para obtener el compuesto del título (*R*)-**6** como un sólido blanco (44 mg, 96% de rendimiento).

Procedimiento para la síntesis de los clorhidratos de éster metílico de glicina (7), alanina (8) y β-alanina (9).^{155a}

Se añadió gota a gota cloruro de trimetilsililo (2.5 equiv.) a la correspondiente disolución de glicina, LD-alanina o β-alanina (1 equiv.) en MeOH (0.2 M). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche. El disolvente se evaporó a presión reducida para obtener el correspondiente compuesto suficientemente puro para el siguiente paso.

Procedimiento para la síntesis de los *N*-bencil ésteres 10-14.

Primer paso: A una suspensión en agitación compuesta por el clorhidrato etílico o metílico correspondiente de la glicina, o alanina (β -, L-, D-, o DL-) (1.0 equiv.) y MgSO_4 (1.2 equiv.) en CH_2Cl_2 (0.2 M), se añadió de forma secuencial y gota a gota Et_3N (1.1 equiv.) y benzaldehído (1.2 equiv.) a 0 °C. La reacción se mantuvo a esa temperatura durante 30 minutos y después a temperatura ambiente durante toda la noche. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se filtró y se evaporó el disolvente.

Segundo paso: A continuación, el crudo de reacción resultante se disolvió en MeOH (0.35 M) y se añadió NaBH_4 (2.5 equiv.) en porciones a 0 °C. La reacción se monitorizó mediante TLC y una vez completada (aprox. 2-3 horas) se agregó una disolución saturada de NH_4Cl . La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y el disolvente se evaporó a presión reducida.

Los compuestos derivados de la β -alanina, el de la glicina, y el de la DL-alanina se purificaron mediante una extracción ácido-base, mientras que los compuestos derivados de la alanina (D-, o L-,) se purificaron utilizando una columna cromatográfica para evitar posibles racemizaciones.

1.14. Procedimientos enzimáticos.

Protocolo general para las transformaciones en escala analítica.

El sustrato correspondiente **1 a-r** (15, 25 o 50 mM) se disolvió en MTBE (12,5 μL), MeCN (12,5 μL) o *n*-heptano (50 μL) dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 mL. A continuación, se añadió el tampón fosfato (100 mM, pH 7.5, 8.5 o 10.0, volumen final 500 μL) el cual contenía el cofactor PLP (concentración final 1.0 mM) y la $^i\text{PrNH}_2$ (concentración final 0.05-1.0 M), seguido de la adición de la ATA correspondiente (2.0 mg para las enzimas de Codexis® o el *cell-free* de la ATA *ArRmut11*, y 10 mg para las células liofilizadas de *E. coli* que contienen las ATA's sobreexpresadas de: *Cv*, *ArS*, *ArR* y *ArRmut11*). La reacción se agitó a 250 rpm y 30 °C o 45 °C durante 24 h.

Transcurrido este tiempo, las reacciones se pararon añadiendo una disolución acuosa de NaOH (100 μL , 10 M) y se extrajeron con acetato de etilo ($2 \times 500 \mu\text{L}$), excepto en el caso de **1i** y **1r**, que se extrajeron directamente con acetato de etilo ($2 \times 500 \mu\text{L}$) sin la adición previa de la base (para evitar una posible racemización). En el caso de **1e**, **1f**, **1n** y **1o**, poco solubles en AcOEt, la extracción se realizó con diclorometano. Las capas orgánicas se separaron por centrifugación (90 s, 13000 rpm), se combinaron y se secaron sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó en un SpeedVac™, y el crudo de reacción resultante se analizó mediante HPLC para determinar el rendimiento analítico y los valores de exceso enantiomérico.

Capítulo 1.

Protocolo general para las transformaciones en escala semipreparativa de los sustratos **1a, b, c, e, p**, y (*S*)-**1i** en los 1,4-diazoheterociclos ópticamente activos.

El sustrato correspondiente (15, 25 o 50 mM) se disolvió en el cosolvente apropiado (2.5% o 10%) dentro de un tubo cónico Falcon de tamaño apropiado. A continuación, se añadió el tampón fosfato (100 mM, pH 8.5 o 10.0) con la ⁱPrNH₂ (concentración final 0.1, 0.5 o 1.0 M) y el PLP (concentración final 1.0 mM), seguido de la adición de la ATA correspondiente. La mezcla resultante se agitó a 30 o 45 °C y 250 rpm durante 24 h.

Transcurrido este tiempo, las reacciones se pararon añadiendo una disolución acuosa de NaOH (10 M) hasta pH ~10, se extrajeron con acetato de etilo o diclorometano (sustrato **1e**) y se centrifugaron (5 min, 4900 rpm). En los casos de los derivados de alanina (sustrato (*S*)-**1i**) se extrajeron directamente con AcOEt para evitar una posible racemización. Este protocolo de extracción y centrifugación se realizó tres veces y, finalmente, las capas orgánicas se combinaron y se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar el correspondiente crudo de reacción el cual se purificó mediante cromatografía en columna en los casos necesarios para finalmente obtener la piperazinona o 1,4-diazepanona enantiopura correspondiente.

A continuación, se presentan de forma resumida las cantidades y los resultados obtenidos en cada uno de los escalados realizados:

- **(*R*)-4-Bencil-6-metilpiperazin-2-ona, (*R*)-2a.** Sustrato: **1a** (125 mg, 0.50 mmol, concentración final: 25 mM). Cosolvente: MTBE (500 µL, 2.5% v/v). Disolución tampón (100 mM, pH 8.5, 19.5 mL). ⁱPrNH₂ (0.1 M). ATA: *ArRmut11* (403 mg). *T*: 30 °C.
Producto (*R*)-**2a**: sólido blanco (83.2 mg, 83% rdto., *ee* >99%).
- **(*S*)-4-Bencil-6-metilpiperazin-2-ona, (*S*)-2a.** Sustrato: **1a** (18.3 mg, 0.073 mmol, concentración final: 25 mM). Cosolvente: *n*-heptano (300 µL, 10% v/v). Disolución tampón (100 mM, pH 8.5, 2.7 mL). ⁱPrNH₂ (0.1 M). ATA: ATA-237 (12 mg). *T*: 30 °C.
Producto (*S*)-**2a**: sólido blanco (12.1 mg, 81% rdto., *ee* >99%).
- **(*S*)-4-*tert*-Butoxicarbonil-6-metilpiperazin-2-ona, (*S*)-2b.** Sustrato: **1b** (61.0 mg, 0.24 mmol, concentración final: 50 mM). Cosolvente: *n*-heptano (460 µL, 10% v/v). Disolución tampón (100 mM, pH 8.5, 4.2 mL). ⁱPrNH₂ (1.0 M). ATA: CvTA (95 mg). *T*: 30 °C.
Producto (*S*)-**2b**: sólido blanco (41.1 mg, 82% rdto., *ee* >99%).
- **(*R*)-4-Benciloxicarbonil-6-metilpiperazin-2-ona, (*R*)-2c.** Sustrato: **1c** (142 mg, 0.48 mmol, concentración final: 50 mM). Cosolvente: MTBE (240 µL, 10% v/v).

Sección Experimental

Disolución tampón (100 mM, pH 8.5, 9.4 mL). ⁱPrNH₂ (1.0 M). ATA: *cell-free ArRmut11* (40 mg). *T*: 45 °C.

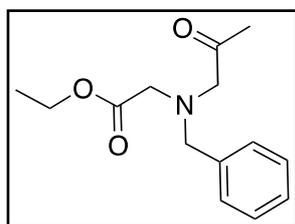
Producto (*R*)-**2c**: sólido blanco (108 mg, 90% rdto., *ee* >99%).

- (**R**)-**6-Metil-4-tosilpiperazin-2-ona**, (*R*)-**2e**. Sustrato: **1e** (70 mg, 0.22 mmol, concentración final: 50 mM). Cosolvente: MeCN (111 μL, 2.5% *v/v*). Disolución tampón (100 mM, pH 8.5, 4.4 mL). ⁱPrNH₂ (1.0 M). ATA: *cell-free ArRmut11* (18 mg). *T*: 45 °C. Producto (*R*)-**2e**: sólido blanco (43.5 mg, 90% rdto., *ee* >99%).
- (**R**)-**1-Bencil-3-metil-1,4-diazepan-5-ona**, (*R*)-**2g**. Sustrato: **1p** (57.0 mg, 0.23 mmol, concentración final: 15 mM). Cosolvente: MTBE (380 μL, 2.5% *v/v*). Disolución tampón (100 mM, pH 10.0, 14.9 mL). ⁱPrNH₂ (0.5 M). ATA: *ArRTA* (305 mg). *T*: 30 °C.
Producto (*R*)-**2g**: sólido blanco (25.6 mg, 51% rdto., *ee* >99%).
- (**3S,6R**)-**4-Bencil-3,6-dimetilpiperazin-2-ona**, (*3S,6R*)-**2i**. Sustrato: (*S*)-**1i** (56 mg, 0.21 mmol, concentración final: 50 mM). Cosolvente: MTBE (106 μL, 2.5% *v/v*). Disolución tampón (100 mM, pH 8.5, 4.1 mL). ⁱPrNH₂ (0.1 M). ATA: *ArRmut11* (85 mg). *T*: 30 °C. Producto (*3S,6R*)-**2i**: sólido blanco (32.4 mg, 70% rdto., *ee* 99%).
- (**3S,6S**)-**4-Bencil-3,6-dimetilpiperazin-2-ona**, (*3S,6S*)-**2i**. Sustrato (*S*)-**1i** (61 mg, 0.23 mmol, concentración final: 50 mM). Cosolvente: MTBE (115 μL, 2.5% *v/v*). Disolución tampón (100 mM, pH 8.5, 4.5 mL). ⁱPrNH₂ (0.1 M). ATA: *ATA-237* (19 mg). *T*: 30 °C.
Producto (*3S,6S*)-**2i**: sólido blanco (39.5 mg, 78% rdto., *ee* >99%).

Capítulo 1.

1.15. Datos experimentales de los compuestos sintetizados en este Capítulo.

N-Bencil-N(2-oxopropil)glicinato de etilo, (1a)



Fórmula empírica: C₁₄H₁₉NO₃
Masa molecular/g·mol⁻¹: 249.31
Aspecto físico: aceite amarillo
R_f: 0.65 (Hexano:AcOEt-6:4)
Rendimiento: 79%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.39 – 7.24 (m, 5H), 4.16 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.84 (s, 2H), 3.52 (s, 2H), 2.12 (s, 3H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 207.91 (CO), 171.10 (CO), 138.13 (C), 129.01 (2 CH), 128.44 (2 CH), 127.45 (CH), 63.16 (CH₂), 60.41 (CH₂), 58.47 (CH₂), 54.39 (CH₂), 27.54 (CH₃), 14.24 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₄H₂₀NO₃)⁺ (M+H)⁺ 250.1438; encontrada 250.1434.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OD

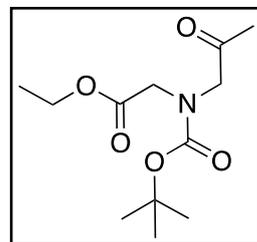
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20

Tiempo de retención: 6.3 min

Temperatura: 30 °C

Flujo: 0.8 mL·min⁻¹

N(tert-Butoxicarbonil)-N(2-oxopropil)glicinato de etilo, (1b)



Fórmula empírica: C₁₂H₂₁NO₅
Masa molecular/g·mol⁻¹: 259.30
Aspecto físico: aceite amarillento pálido
R_f: 0.45 (Hexano:AcOEt-6:4)
Rendimiento: 85%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*), mezcla de conformeros (54:46): δ 4.19 (q, *J* = 7.1 Hz, CH₂, conf. mayoritario), 4.19 (q, *J* = 7.1 Hz, CH₂, conf. minoritario), 4.15 (s, CH₂, mayor.), 4.06 (s, CH₂, minor.), 4.02 (s, CH₂, minor.), 3.95 (s, CH₂, mayor.), 2.150 (s, CH₃, mayor.), 2.147 (s, CH₃, minor.), 1.433 (s, ^tBu, mayor.), 1.427 (s, ^tBu, minor.), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, CH₃, mayor.), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, CH₃, minor.).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 204.5 (CO), 204.3 (CO), 170.0 (CO), 169.9 (CO), 155.3 (CO), 155.2 (CO), 81.23 (C), 81.16 (C), 61.3 (CH₂), 61.2 (CH₂), 58.0 (CH₂), 57.5 (CH₂), 49.9 (CH₂), 49.4 (CH₂), 28.2 (3 CH₃), 27.1 (CH₃), 26.9 (CH₃), 14.3 (CH₃), 14.2 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₂H₂₁NNaO₅)⁺ (M+Na)⁺ 282.1312; encontrada 282.1308.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: AD-H

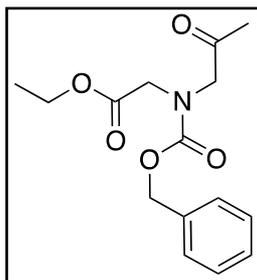
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 85/15

Tiempo de retención: 12.6 min

Temperatura: 30 °C

Flujo: 0.4 mL·min⁻¹

***N*'-((Benzoiloxi)carbonil)-*N*'-(2-oxopropil)glicinato de etilo, (1c)**



Fórmula empírica: C₁₅H₁₉NO₅

Masa molecular/g·mol⁻¹: 293.32

Aspecto físico: aceite amarillento pálido

R_f: 0.35 (Hexano/AcOEt 6:4)

Rendimiento: 72%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*), mezcla de confórmers (54:46): δ 7.43–7.24 (m, 5H, Ph, ambos confórmers), 5.12 (s, CH₂, mayor.), 5.10 (s, CH₂, minor.), 4.21 (s, CH₂, mayor.), 4.18 (q, *J* = 7.1 Hz, CH₂ minor.), 4.13 (s, CH₂, minor.), 4.10 (s, CH₂, minor.), 4.10 (q, *J* = 7.1 Hz, CH₂, mayor.), 4.03 (s, CH₂, mayor.), 2.13 (s, CH₃, mayor.), 2.05 (s, CH₃, minor.), 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, CH₃, minor.), 1.18 (t, *J* = 7.1 Hz, CH₃, mayor.).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 203.7 (CO), 203.5 (CO), 169.6 (CO), 169.5 (CO), 156.0 (CO), 136.1 (C), 136.0 (C), 128.5 (2 CH), 128.54 (CH), 128.48 (CH), 128.2 (CH), 128.1 (CH), 127.9 (2 CH), 127.8 (2 CH), 67.9 (CH₂), 67.8 (CH₂), 61.3 (CH₂), 57.6 (CH₂), 57.3 (CH₂), 49.6 (CH₂), 49.4 (CH₂), 27.1 (CH₃), 26.9 (CH₃), 14.2 (CH₃), 14.1 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₅H₂₀NO₅)⁺ (M+H)⁺ 294.1336; encontrada 294.1332.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: AD-H

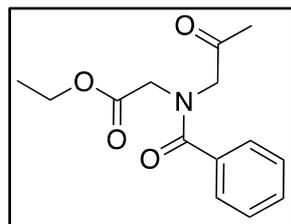
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20

Tiempo de retención: 20.1 min

Temperatura: 25 °C

Flujo: 0.5 mL·min⁻¹

N-Benzoil-N-(2-oxopropil)glicinato de etilo, (1d)



Fórmula empírica: C₁₄H₁₇NO₄

Masa molecular/g·mol⁻¹: 263.29

Aspecto físico: aceite ligeramente amarillento

R_f: 0.25 (Hexano/AcOEt 6:4)

Rendimiento: 71%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): mezcla de confórmers (58:42): δ 7.44–7.27 (m, 5H, Ph, ambos confórmers), 4.35 (s, CH₂, mayor.), 4.28–4.06 (m, incluyendo O-CH₂-CH₃ para ambos conf. y 2 s de 2 señales CH₂ para el conf. minor.), 4.01 (s, CH₂, mayor.) 2.19 (s, CH₃, mayor.), 1.96 (s, CH₃, minor.), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, CH₃, minor.), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, CH₃, mayor.).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 203.1 (CO), 202.9 (CO), 172.3 (CO), 172.2 (CO), 169.4 (CO), 169.3 (CO), 135.0 (C), 134.8 (C), 130.2 (2 CH), 128.6 (2 CH), 126.8 (CH), 126.6 (CH), 61.5 (CH₂), 61.3 (CH₂), 59.6 (CH₂), 55.7 (CH₂), 51.9 (CH₂), 47.6 (CH₂), 27.4 (CH₃), 27.0 (CH₃), 14.2 (CH₃), 14.1 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₄H₁₈NO₄)⁺ (M+H)⁺ 264.1230; encontrada 264.1227.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

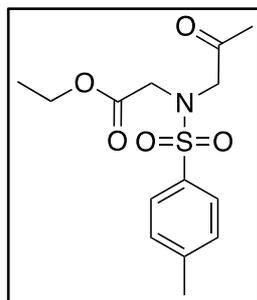
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 85/15

Tiempo de retención: 12.7 min

Temperatura: 40 °C

Flujo: 1.0 mL·min⁻¹

N-(2-Oxopropil)-N-tosilglicinato de etilo, (1e)



Fórmula empírica: C₁₄H₁₉NO₅S

Masa molecular/g·mol⁻¹: 313.10

Aspecto físico: aceite amarillento

R_f: 0.31 (Hexano/AcOEt 6:4)

Rendimiento: 36%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.75–7.65 (m, 2H), 7.35–7.25 (m, 2H), 4.17 (s, 2H), 4.09 (s, 2H), 4.09 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.42 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 1.20 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 203.5 (CO), 168.7 (CO), 143.9 (C), 136.2 (C), 129.7 (2 CH), 127.4 (2 CH), 61.5 (CH₂), 56.8 (CH₂), 48.8 (CH₂), 27.1 (CH₃), 21.6 (CH₃), 14.1 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₄H₂₀NO₅S)⁺ (M+H)⁺ 314.1057; encontrada 314.1054.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: IB

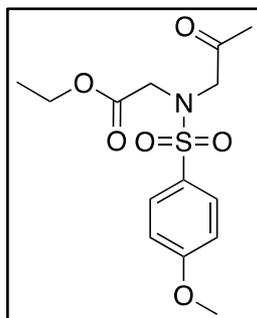
Eluyente: 100% MeCN

Tiempo de retención: 6.3 min

Temperatura: 25 °C

Flujo: 0.5 mL·min⁻¹

N-[(4-Metoxifenil)sulfonyl]-N-(2-oxopropil)glicinato de etilo, (1f)



Fórmula empírica: C₁₄H₁₉NO₆S

Masa molecular/g·mol⁻¹: 329.37

Aspecto físico: sólido amarillento pálido

Pf: 64-66 °C

R_f: 0.33 (Hexano/AcOEt 6:4)

Rendimiento: 58%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.75 – 7.64 (m, 2H), 6.97–6.86 (m, 2H), 4.10 (s, 2H), 4.02 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.02 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 1.14 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 203.7 (CO), 168.8 (CO), 163.2 (C), 130.6 (C), 129.6 (2 CH), 114.3 (2 CH), 61.5 (CH₂), 56.8 (CH₂), 55.7 (CH₃), 48.8 (CH₂), 27.1 (CH₃), 14.1 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₄H₂₀NO₆S)⁺ (M+H)⁺ 330.1006; encontrada 330.1001.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: IB

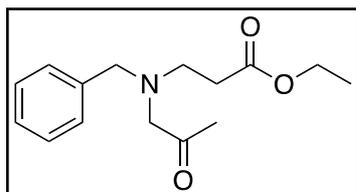
Eluyente: 100% MeCN

Tiempo de retención: 6.3 min

Temperatura: 25 °C

Flujo: 0.5 mL·min⁻¹

3-[Bencil(2-oxopropil)amino]propanoato de etilo, (1g)



Fórmula empírica: C₁₅H₂₁NO₃

Masa molecular/g·mol⁻¹: 263.34

Aspecto físico: aceite pardo naranja

R_f: 0.62 (Hexano:AcOEt-6:4)

Rendimiento: 97%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.35–7.18 (m, 5H), 4.12 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.67 (s, 2H), 3.22 (s, 2H), 2.91 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.49 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.06 (s, 3H), 1.24 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 208.9 (CO), 172.4 (CO), 138.5 (C), 129.0 (2 CH), 128.4 (2 CH), 127.4 (CH), 63.9 (CH₂), 60.5 (CH₂), 58.5 (CH₂), 50.5 (CH₂), 33.2 (CH₂), 27.5 (CH₃), 14.3 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₅H₂₂NO₃)⁺ (M+H)⁺ 264.1594; encontrada 264.1594.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

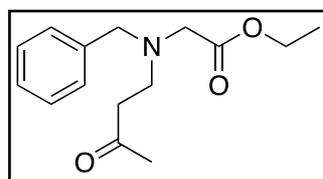
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH – 80/20

Tiempo de retención: 7.3 min

Temperatura: 40 °C

Flujo: 1.0 mL·min⁻¹

N-Bencil-N'(3-oxobutil)glicinato de etilo, (1h)



Fórmula empírica: C₁₅H₂₁NO₃

Masa molecular/g·mol⁻¹: 263.34

Aspecto físico: aceite amarillo

R_f: 0.49 (Hexano:AcOEt-6:4)

Rendimiento: 93%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.36–7.19 (m, 5H), 4.15 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.78 (s, 2H), 3.31 (s, 2H), 2.99 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.61 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.12 (s, 3H), 1.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 207.7 (CO), 171.0 (CO), 138.5 (C), 128.7 (2 CH), 128.1 (2 CH), 127.0 (CH), 60.0 (CH₂), 57.9 (CH₂), 54.0 (CH₂), 48.6 (CH₂), 42.1 (CH₂), 29.7 (CH₃), 14.1 (CH₃).

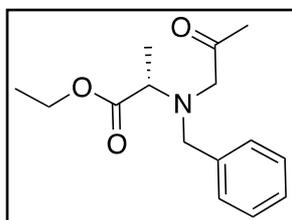
HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₅H₂₂NO₃)⁺ (M+H)⁺ 264.1594; encontrada 264.1594.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: IC
 Eluyente: *n*-Hexano:2-PrOH – 80:20
 Tiempo de retención: 7.9 min

Temperatura: 30 °C
 Flujo: 1.0 mL·min⁻¹

(S)-N-Bencil-N-(2-oxopropil)alaninato de etilo, [(S)-1i]



Fórmula empírica: C₁₅H₂₁NO₃

Masa molecular/g·mol⁻¹: 263.34

Aspecto físico: aceite amarillo pálido

R_f: 0.71 (Hexano:AcOEt-6:4)

Rendimiento: 69%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.42–7.20 (m, 5H), 4.18 (parte AB de un sistema ABX₃, 2H, ³J_{AX} = ³J_{BX} = 7.1 Hz, |²J_{AB}| = 10.9 Hz, O-CH₂-CH₃), 3.81 (d, |²J| = 13.8 Hz, 1H), 3.72 (d, |²J| = 13.8 Hz, 1H), 3.53 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.42 (s, 2H), 2.11 (s, 3H), 1.32 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.30 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 209.1 (CO), 173.4 (CO), 138.7 (C), 128.9 (2 CH), 128.4 (2CH), 127.4 (CH), 60.8 (CH₂), 60.5 (CH₂), 58.1 (CH), 56.4 (CH₂), 27.4 (CH₃), 15.3 (CH₃), 14.4 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₅H₂₂NO₃)⁺ (M+H)⁺ 264.1594; encontrada 264.1591.

Rotación Óptica Específica: [α]_D²⁰ = – 65.2 (*c* 0.9, CHCl₃) [para (S)-**1i** con 99% *ee*]

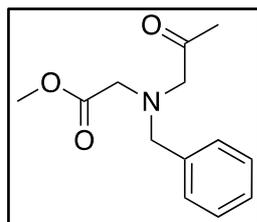
Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H
 Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80:20
 Tiempo de retención: 13.5 min

Temperatura: 30 °C
 Flujo: 0.5 mL·min⁻¹

Capítulo 1.

N-Bencil-N-(2-oxopropil)glicinato de metilo, (1j)



Fórmula empírica: C₁₃H₁₇NO₃
Masa molecular/g·mol⁻¹: 235.28
Aspecto físico: aceite amarillo
R_f: 0.58 (Hexano:AcOEt-6:4)
Rendimiento: 90%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.34 – 7.11 (m, 5H), 3.76 (s, 2H), 3.60 (s, 3H), 3.44 (s, 2H), 3.39 (s, 2H), 2.02 (s, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 207.5 (CO), 171.3 (CO), 134.0 (C), 128.8 (2CH), 128.3 (2CH), 127.3 (CH), 62.9 (CH₂), 58.3 (CH₂), 54.0 (CH₂), 51.2 (CH₃), 27.4 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₃H₁₈NO₃)⁺ (M+H)⁺ 236.1281; encontrada 236.1280.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OD

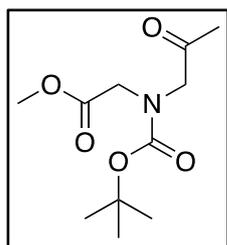
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20

Flujo: 0.8 mL·min⁻¹

Tiempo de retención: 7.0 min

N-(tert-Butoxicarbonil)-N-(2-oxopropil)glicinato de metilo, (1k)



Fórmula empírica: C₁₁H₁₉NO₅
Masa molecular/g·mol⁻¹: 245.28
Aspecto físico: aceite amarillento pálido
R_f: 0.41 (Hexano:AcOEt-6:4)
Rendimiento: 48%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*), mezcla de conformeros (53:47): δ 4.13 (s, CH₂, conf. mayor.), 4.05 (s, CH₂, conf. minor.), 4.01 (s, CH₂, minor.), 3.95 (s, CH₂, mayor.), 3.704 (s, CH₃, mayor.), 3.695 (s, CH₃, minor.), 2.121 (s, CH₃, mayor.), 2.119 (s, CH₃, minor.), 1.403 (s, ^tBu, mayor.), 1.400 (s, ^tBu, minor.).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 204.4 (CO), 204.2 (CO), 170.5 (CO), 170.4 (CO), 155.2 (CO), 155.2 (CO), 81.3 (C), 81.2 (C), 58.0 (CH₂), 57.4 (CH₂), 52.2 (CH₃), 52.1 (CH₃), 49.7 (CH₂), 49.2 (CH₂), 28.2 (3 CH₃), 27.1 (CH₃), 26.9 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₁H₁₉NNaO₅)⁺ (M+Na)⁺ 268.1155; encontrada 268.1149.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: AD-H

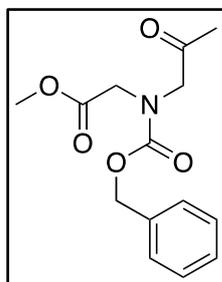
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 85/15

Tiempo de retención: 14.3 min

Temperatura: 30 °C

Flujo: 0.4 mL·min⁻¹

***N*[(Benzoiloxi)carbonil]-*N*(2-oxopropil)glicinato de metilo, (11)**



Fórmula empírica: C₁₄H₁₇NO₅

Masa molecular/g·mol⁻¹: 279.29

Aspecto físico: aceite pardo

R_f: 0.41 (Hexano/AcOEt 6:4)

Rendimiento: 86%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*), mezcla de conformeros (53:47): δ 7.43–7.24 (m, 5H, ambos conf.), 5.14 (s, CH₂, mayor.), 5.13 (s, CH₂, minor.), 4.24 (s, CH₂, mayor.), 4.15 (s, CH₂, minor.), 4.14 (s, CH₂, minor.), 4.08 (s, CH₂, mayor.), 3.74 (s, CH₃, minor.), 3.67 (s, CH₃, mayor.), 2.17 (s, CH₃, mayor.), 2.09 (s, CH₃, minor.).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 203.7 (CO), 203.5 (CO), 170.1 (CO), 170.0 (CO), 156.0 (CO), 136.1 (C), 136.0 (C), 128.6 (2 CH), 128.5 (2 CH), 128.2 (CH), 128.1 (CH), 127.9 (2 CH), 127.8 (2 CH), 68.0 (CH₂), 67.9 (CH₂), 57.5 (CH₂), 57.3 (CH₂), 52.2 (CH₃), 52.1 (CH₃), 49.4 (CH₂), 49.2 (CH₂), 27.0 (CH₃), 26.9 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₄H₁₈NO₅)⁺ (M+H)⁺ 280.1179; encontrada 280.1179.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: AD-H

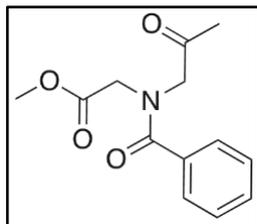
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20

Tiempo de retención: 21.8 min

Temperatura: 25 °C

Flujo: 0.5 mL·min⁻¹

N-Benzoil-N-(2-oxopropil)glicinato de metilo, (1m)



Fórmula empírica: C₁₃H₁₅NO₄

Masa molecular/g·mol⁻¹: 249.27

Aspecto físico: aceite amarillo

R_f: 0.21 (Hexano/AcOEt 6:4)

Rendimiento: 79%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): mezcla de confórmers (56:44): δ 7.76–7.13 (m, 5H, Ph, ambos conf.), 4.36 (s, CH₂, mayor.), 4.24 (s, CH₂, minor.), 4.21 (s, CH₂, minor.), 4.06 (s, CH₂, mayor.), 3.74 (s, CH₃, minor.), 3.70 (s, CH₃, mayor.), 2.21 (s, CH₃, mayor.), 1.98 (s, CH₃, minor.).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 203.0 (CO), 202.9 (CO), 172.4 (CO), 172.3 (CO), 169.9 (CO), 169.8 (CO), 134.9 (C), 134.8 (C), 130.3 (2 CH), 130.0 (2 CH), 128.7 (2 CH), 126.9 (CH), 126.7 (CH), 59.7 (CH₂), 55.6 (CH₂), 52.4 (CH₃), 52.3 (CH₃), 51.8 (CH₂), 47.5 (CH₂), 27.4 (CH₃), 27.0 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₃H₁₆NO₄)⁺ (M+H)⁺ 250.1074; encontrada 250.1074.

Columna: OJ-H

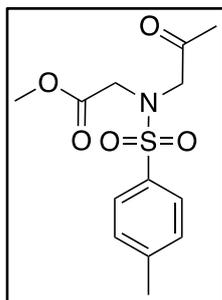
Temperatura: 40 °C

Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH – 85/15

Flujo: 1.0 mL·min⁻¹

Tiempos de retención: 12.5 min

N-(2-Oxopropil)-N-tosilglicinato de metilo, (1n)



Fórmula empírica: C₁₃H₁₇NO₅S

Masa molecular/g·mol⁻¹: 299.08

Aspecto físico: aceite ligeramente amarillento

R_f: 0.32 (Hexano/AcOEt 6:4)

Rendimiento: 66%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.71–7.61 (m, 2H), 7.37–7.22 (m, 2H), 4.16 (s, 2H), 4.08 (s, 2H), 3.60 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.15 (s, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 203.4 (CO), 169.2 (CO), 144.0 (C), 136.2 (C), 129.7 (2 CH), 127.4 (2 CH), 56.7 (CH₂), 52.2 (CH₃), 48.6 (CH₂), 27.0 (CH₃), 21.6 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₃H₁₈NO₅S)⁺ (M+H)⁺ 300.0900; encontrada 300.0896.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: IB

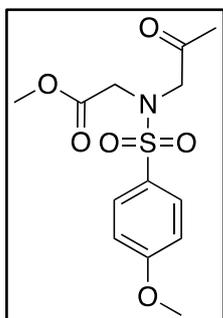
Eluyente: 100% MeCN

Tiempo de retención: 6.5 min

Temperatura: 25 °C

Flujo: 0.5 mL·min⁻¹

N[(4-Metoxifenil)sulfonil]-N-(2-oxopropil)glicinato de metilo, (1o)



Fórmula empírica: C₁₃H₁₇NO₆S

Masa molecular/g·mol⁻¹: 315.34

Aspecto físico: sólido amarillento pálido

Pf: 68-70 °C

R_f: 0.13 (Hexano/AcOEt 6:4)

Rendimiento: 36%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.78–7.67 (m, 2H), 7.00–6.89 (m, 2H), 4.15 (s, 2H), 4.07 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 2.16 (s, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 203.5 (CO), 169.3 (CO), 163.3 (C), 130.7 (C), 129.7 (2 CH), 114.3 (2 CH), 56.7 (CH₂), 55.7 (CH₃), 52.3 (CH₃), 48.7 (CH₂), 27.0 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₃H₁₈NO₆S)⁺ (M+H)⁺ 316.0849; encontrada 316.0846.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: IB

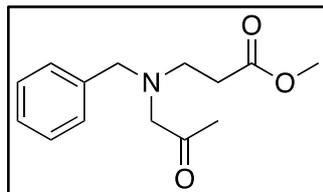
Eluyente: MeCN – 100%

Tiempo de retención: 6.6 min

Temperatura: 25 °C

Flujo: 0.5 mL·min⁻¹

3-[Bencil(2-oxopropil)amino]propanoato de metilo, (1p)



Fórmula empírica: C₁₄H₁₉NO₃
Masa molecular/g·mol⁻¹: 249.14
Aspecto físico: aceite amarillo
R_f: 0.57 (Hexano:AcOEt-6:4)
Rendimiento: 84%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.45–7.10 (m, 5H), 3.68 (s, 2H), 3.66 (s, 3H), 3.24 (s, 2H), 2.92 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.51 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.07 (s, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 208.1 (CO), 172.3 (CO), 138.2 (C), 128.6 (2 CH), 128.0 (2 CH), 126.9 (CH), 63.4 (CH₂), 58.1 (CH₂), 51.1 (CH₃), 49.9 (CH₂), 32.5 (CH₂), 27.0 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₄H₂₀NO₃)⁺ (M+H)⁺ 250.1438; encontrada 250.1439.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

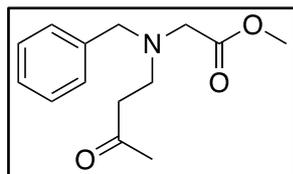
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH – 80/20

Tiempo de retención: 8.9 min

Temperatura: 40 °C

Flujo: 1.0 mL·min⁻¹

***N*-Bencil-*N*-(3-oxobutil)glicinato de metilo, (1q)**



Fórmula empírica: C₁₄H₁₉NO₃
Masa molecular/g·mol⁻¹: 249.31
Aspecto físico: aceite amarillo pálido
R_f: 0.50 (Hexano:AcOEt-6:4)
Rendimiento: 76%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.34–7.19 (m, 5H), 3.78 (s, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.32 (s, 2H), 2.99 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.60 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.11 (s, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 208.0 (CO), 171.7 (CO), 138.6 (C), 128.9 (2 CH), 128.3 (2 CH), 127.2 (CH), 58.1 (CH₂), 54.1 (CH₂), 51.3 (CH₃), 48.8 (CH₂), 42.4 (CH₂), 29.9 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₄H₂₀NO₃)⁺ (M+H)⁺ 250.1438; encontrada 250.1440.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: IC

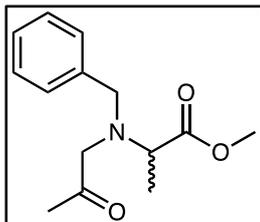
Eluyente: *n*-Hexano:2-PrOH – 80:20

Tiempo de retención: 8.6 min

Temperatura: 30 °C

Flujo: 1.0 mL·min⁻¹

N-Bencil-N'(2-oxopropil)alaninato de metilo, (1r)



Fórmula empírica: C₁₄H₁₉NO₃
Masa molecular/g·mol⁻¹: 249.14
Aspecto físico: aceite incoloro
R_f: 0.64 (Hexano:AcOEt-6:4)
Rendimiento: 65%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.46–7.16 (m, 5H), 3.81 (d, ²J = 13.8 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.71 (d, ²J = 13.8 Hz, 1H), 3.55 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 3.42 (s, 2H), 2.09 (s, 3H), 1.33 (d, J = 7.1 Hz, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 209.0 (CO), 174.0 (CO), 138.8 (C), 129.0 (2 CH), 128.6 (2 CH), 127.5 (CH), 60.8 (CH₂), 58.2 (CH), 56.4 (CH₂), 51.6 (CH₃), 27.5 (CH₃), 15.5 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₄H₂₀NO₃)⁺ (M+H)⁺ 250.1438; encontrada 250.1432.

Rotación Óptica Específica: [α]_D²⁰ = -75.0 (c 1.02, CHCl₃) [para (*S*)-**1r** con 97% *ee*]

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20

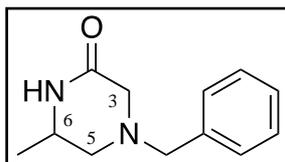
Tiempos de retención: *t_R* [(*S*)-**1r**] = 16.4 min, *t_R* [(*R*)-**1r**] = 23.7 min

Temperatura: 30 °C

Flujo: 0.5 mL·min⁻¹

Capítulo 1.

4-Bencil-6-metilpiperazin-2-ona, (2a)



Fórmula empírica: C₁₂H₁₆N₂O

Masa molecular/g·mol⁻¹: 204.27

Aspecto físico: sólido blanco

Pf: 165-167 °C (racémico), 94-95 °C [(*R*) o (*S*)-**2a**; >99% *ee*]

R_f: 0.60 (AcOEt:MeOH-8:1)

Rendimiento: 71%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.40–7.19 (m, 5H, Ph), 6.51 (s, 1H, NH), 3.70–3.49 (m, 1H, H-6), 3.58 (d, 1H, ²*J* = 13.1 Hz, *CHH*-Ph), 3.53 (d, 1H, ²*J* = 13.1 Hz, *CHH*-Ph), 3.28 (dd, 1H, ⁴*J* = 1.4, ²*J* = 16.5 Hz, *HH*-3), 2.95 (d, 1H, ²*J* = 16.5 Hz, *HH*-3), 2.81 (dd, 1H, ³*J* = 4.1, ²*J* = 11.6 Hz, *HH*-5), 2.12 (dd, 1H, ³*J* = 8.3, ²*J* = 11.6 Hz, *HH*-5) 1.15 (d, 3H, ³*J* = 6.4 Hz, CH₃).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 170.0 (CO), 137.1 (C), 129.1 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.6 (CH), 61.7 (CH₂), 56.6 (CH₂), 55.9 (CH₂), 47.6 (CH), 20.1 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₂H₁₇N₂O)⁺ (M+H)⁺ 205.1335; encontrada 205.1338.

Rotación Óptica Específica: [α]_D²⁰ = -4.4 (c 1.0, CHCl₃) [para (*R*)-**2a** con >99% *ee*]

[α]_D²⁰ = +4.6 (c 1.1, CHCl₃) [para (*S*)-**2a** con >99% *ee*]

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OD

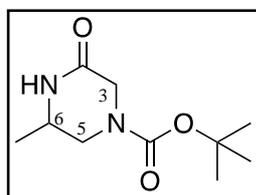
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20

Flujo: 0.8 mL·min⁻¹

Tiempos de retención: *t_R* [(*S*)-**2a**] = 8.6 min, *t_R* [(*R*)-**2a**] = 11.7 min

4-*tert*-Butoxicarbonil-6-metilpiperazin-2-ona, (2b)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₈N₂O₃

Masa molecular/g·mol⁻¹: 214.27

Aspecto físico: sólido blanco

Pf: 111-112 °C (racémico), 109-110 °C [(*R*) o (*S*)-**2b**; >99% *ee*]

R_f: 0.41 (AcOEt)

Rendimiento: 47%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 8.02 (s, 1H, NH), 4.04 (d, 1H, ²*J* = 18.4 Hz, *HH*-3), 3.88–3.75 (m, 2H, *HH*-5 y *HH*-3), 3.55–3.40 (m, 1H, H-6), 2.98–2.74 (m, 1H, *HH*-5), 1.33 (s, 9H, ^tBu), 1.08 (d, 3H, ³*J* = 6.5 Hz, CH₃).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 168.6 (CO), 153.8 (CO), 80.5 (C), 47.1 (CH), 46.2 (CH₂), 45.8 (CH₂), 28.2 (3 CH₃), 18.9 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₀H₁₈N₂NaO₃)⁺ (M+Na)⁺ 237.1210; encontrada 237.1213.

Rotación Óptica Específica: $[\alpha]_D^{20} = +20.7$ (*c* 0.5, CHCl₃) [para (S)-**2b** con >99% *ee*].

Separación Analítica (HPLC):

Columna: AD-H

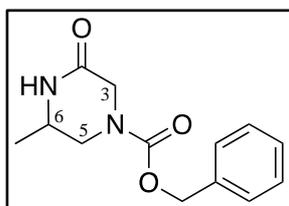
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 85/15

Tiempos de retención: *t_R* [(R)-**2b**] = 13.8 min, *t_R* [(S)-**2b**] = 15.4 min

Temperatura: 30 °C

Flujo: 0.4 mL·min⁻¹

4-Benciloxicarbonil-6-metilpiperazin-2-ona, (2c)



Fórmula empírica: C₁₃H₁₆N₂O₃

Masa molecular/g·mol⁻¹: 248.28

Aspecto físico: sólido blanco

Pf: 123-125 °C (racémico), 114-116 °C [(R) o (S)-**2c**; >99% *ee*]

R_f: 0.50 (AcOEt)

Rendimiento: 66%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.85–7.67 (s, 1H, NH), 7.39–7.22 (m, 5H, Ph), 5.14 (sistema AB, 2H, ²*J* = 12.5 Hz, CH₂-Ph), 4.26 (d, 1H, ²*J* = 18.4 Hz, HH-3), 4.04–3.97 (m, 2H, HH-3 y HH-5), 3.68–3.51 (m, 1H, H-6), 3.11–2.87 (m, 1H, HH-5), 1.18 (d, 3H, ³*J* = 6.4 Hz, CH₃).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 168.0 (CO), 154.7 (CO), 136.1 (C), 128.6 (2 CH), 128.3 (2 CH), 128.1 (CH), 67.7 (CH₂), 47.2 (CH), 46.8 (CH₂), 46.5 (CH₂), 19.1 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₃H₁₇N₂O₃)⁺ (M+H)⁺ 249.1234; encontrada 249.1234.

Rotación Óptica Específica: $[\alpha]_D^{20} = -17.8$ (*c* 1.0, CHCl₃) [para (R)-**2c** con >99% *ee*].

Separación Analítica (HPLC):

Columna: AD-H

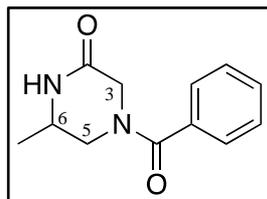
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH – 80/20

Tiempos de retención: *t_R* [(R)-**2c**] = 16.0 min, *t_R* [(S)-**2c**] = 17.8 min

Temperatura: 25 °C

Flujo: 0.5 mL·min⁻¹

4-Benzoil-6-metilpiperazin-2-ona, (2d)



Fórmula empírica: C₁₂H₁₄N₂O₂

Masa molecular/g·mol⁻¹: 218.26

Aspecto físico: sólido amarillento pálido

Pf: 140-142 °C (racémico)

R_f: 0.15 (AcOEt)

Rendimiento: 58%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): (Consiste en señales amplias debido a la presencia de una mezcla de confórmeros) δ 7.93 (s, 1H, NH), 7.43–7.28 (m, 5H, Ph), 4.70–4.00 (m, 2H, HH-3), 4.02–3.89 (m, 1H, HH-5), 3.70–3.48 (m, 1H, H-6), 3.06 (dd, *J* = 13.3, 8.4 Hz, 1H, HH-5), 1.23–1.00 (m, 3H, CH₃).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 170.2 (CO), 167.7 (CO), 134.6 (C), 130.2 (CH), 129.5 (CH), 128.6 (2 CH), 127.0 (2 CH), 126.2 (2 CH), 61.3 (CH₂), 61.1 (CH₂), 50.2 (CH₂), 47.1 (CH), 45.4 (CH₂), 19.1 (CH₃), 14.0 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₂H₁₅N₂O₂)⁺ (M+H)⁺ 219.1128; encontrada 219.1131.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

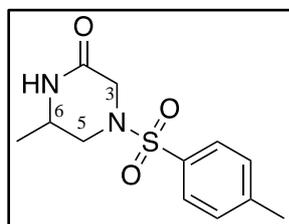
Temperatura: 40 °C

Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH – 85/15

Flujo: 1.0 mL·min⁻¹

Tiempos de retención: *t_R* [(*R*)-**2d**] = 15.0 min, *t_R* [(*S*)-**2d**] = 18.3 min

6-Metil-4-tosilpiperazin-2-ona, (2e)



Fórmula empírica: C₁₂H₁₆N₂O₃S

Masa molecular/g·mol⁻¹: 268.33

Aspecto físico: sólido blanco

Pf: 205-207 °C (descompone)[racémico], 190-194 °C [(*R*) o (*S*)-**2e**;

>99% *ee*]

R_f: 0.27 (AcOEt)

Rendimiento: 90%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.66 (d, 2H, ³*J* = 8.2 Hz, Ar), 7.36 (d, 2H, ³*J* = 8.2 Hz, Ar), 6.71 (s, 1H, NH), 3.88 (dd, 1H, ⁴*J* = 1.3, ²*J* = 16.7, HH-3), 3.76–3.65 (m, 1H, H-6), 3.58 (dd, 1H, ³*J* = 3.9, ²*J* = 12.0 Hz, HH-5), 3.39 (d, 1H, ²*J* = 16.7 Hz, HH-3), 2.55 (dd, 1H, ³*J* = 8.2, ²*J* = 12.0 Hz, HH-5), 2.44 (s, 3H, CH₃), 1.20 (d, ³*J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 166.4 (CO), 144.6 (C), 132.2 (C), 130.2 (2 CH), 127.9 (2 CH), 49.0 (CH₂), 48.2 (CH₂), 47.6 (CH), 21.7 (CH₃), 19.6 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₂H₁₇N₂O₃S)⁺ (M+H)⁺ 269.0954; encontrada 269.0953.

Rotación Óptica Específica: [α]_D²⁰ = -3.5 (*c* 0.8, MeCN) [para (*R*)-**2e** con >99% *ee*].

Separación Analítica (HPLC):

Columna: IB.

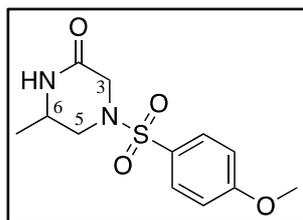
Eluyente: MeCN – 100%

Tiempos de retención: *t_R* [(*S*)-**2e**] = 8.5 min, *t_R* [(*R*)-**2e**] = 9.4 min

Temperatura: 25 °C

Flujo: 0.5 mL·min⁻¹

4-[(4-Metoxifenil)sulfonyl]-6-metilpiperazin-2-ona, (2f)



Fórmula empírica: C₁₂H₁₆N₂O₄S

Masa molecular/g·mol⁻¹: 284.33

Aspecto físico: sólido blanco

Pf: 212-214 °C (racémico)

R_f: 0.24 (AcOEt)

Rendimiento: 61%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.76–7.68 (m, 2H, Ar), 7.07–6.99 (m, 2H, Ar), 6.15 (s, 1H, NH), 3.95–3.85 (m, 1H, *HH*-3), 3.88 (s, 3H, O-CH₃), 3.79–3.66 (m, 1H, H-6), 3.59 (dd, |²*J*| = 12.0 Hz, ³*J* = 3.9, 1H, *HH*-5), 3.40 (d, |²*J*| = 16.6 Hz, 1H, *HH*-3), 2.57 (dd, |²*J*| = 12.0, ³*J* = 8.3 Hz, 1H, *HH*-5), 1.21 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 166.2 (CO), 163.7 (C), 130.1 (2 CH), 126.7 (C), 114.7 (2CH), 55.9 (CH₃), 49.0 (CH₂), 48.3 (CH₂), 47.7 (CH), 19.7 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₂H₁₇N₂O₄S)⁺ (M+H)⁺ 285.0904; encontrada 285.0902.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: IB

Eluyente: MeCN – 100%

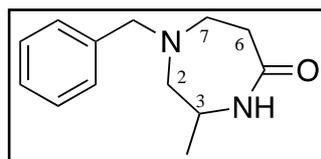
Tiempos de retención: *t_R* [(*S*)-**2f**] = 8.5 min, *t_R* [(*R*)-**2f**] = 9.4 min

Temperatura: 25 °C

Flujo: 0.5 mL·min⁻¹

Capítulo 1.

1-Bencil-3-metil-1,4-diazepan-5-ona, (2g)



Fórmula empírica: C₁₃H₁₈N₂O

Masa molecular/g·mol⁻¹: 218.30

Aspecto físico: sólido blanco

Pf: 90-92 °C (racémico) 104-106 °C [(*R*) o (*S*)-**2g**; >99% *ee*]

R_f: 0.33 (AcOEt)

Rendimiento: 15%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.48–7.05 (m, 5H, Ph), 5.88 (s, 1H, NH), 3.79–3.62 (m, 1H, H-3), 3.59 (sistema AB, 2H, ²*J* = 13.5 Hz, CH₂-Ph), 2.96–2.71 (m, 3H, HH-2, HH-6, HH-7), 2.53–2.30 (m, 2H, HH-6, HH-7), 2.19 (dd, 1H, ³*J* = 8.8, ²*J* = 12.6 Hz, HH-2), 1.15 (d, 3H, ³*J* = 6.9 Hz, CH₃).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 176.9 (CO), 138.2 (C), 130.0 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.4 (CH), 64.0 (CH₂), 63.2 (CH₂), 50.4 (CH₂), 48.8 (CH), 38.2 (CH₂), 20.1 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₃H₁₈N₂NaO)⁺ (M+Na)⁺ 241.1311; encontrada 241.1311.

Rotación Óptica Específica: [α]_D²⁰ = + 6.9 (*c* 0.8, CHCl₃) [para (*R*)-**2g** con >99% *ee*].

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

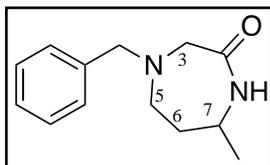
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH – 80/20

Tiempo de retención: *t_R* [(*S*)-**2g**] = 7.8 min, *t_R* [(*R*)-**2g**] = 9.3 min

Temperatura: 40 °C

Flujo: 1.0 mL·min⁻¹

4-Bencil-7-metil-1,4-diazepan-2-ona, (2h)



Fórmula empírica: C₁₃H₁₈N₂O

Masa molecular/g·mol⁻¹: 218.30

Aspecto físico: sólido amarillento pálido

Pf: 135-137 °C (racémico)

R_f: 0.33 (AcOEt)

Rendimiento: 24%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.61–7.08 (m, 5H), 6.19 (s, 1H, NH), 3.75 (sistema AB ²*J* = 13.4 Hz, 2H, CH₂-Ph), 3.73–3.60 (m, 1H, H-7), 3.56 (d, ²*J* = 15.0 Hz, 1H, HH-3), 3.41 (d, ²*J* = 15.0, 1H, HH-3), 3.02 (dt, ²*J* = 13.6, ³*J* = 3.8, 1H, HH-5), 2.78 (ddd, ²*J* = 13.6, ³*J* = 11.8, 3.5 Hz, 1H, HH-5), 1.92–1.72 (m, 1H, HH-6), 1.60–1.50 (m, HH-6), 1.24 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 175.0 (CO), 138.3 (C), 128.9 (2 CH), 128.4 (2 CH), 127.3 (CH), 60.1 (CH₂), 58.9 (CH₂), 54.8 (CH₂), 48.7 (CH), 35.1 (CH₂), 22.4 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₃H₁₈N₂NaO)⁺ (M+H)⁺ 241.1311; encontrada 241.1312.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: IC

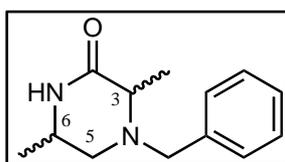
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH – 80/20

Flujo: 1.0 mL·min⁻¹

Tiempo de retención: *t_R* [(*S*)-**2h**] = 17.0 min, *t_R* [(*R*)-**2h**] = 20.4 min

4-Bencil-3,6-dimetilpiperazin-2-ona, (2i)



Fórmula empírica: C₁₃H₁₈N₂O

Masa molecular/g·mol⁻¹: 218.30

Aspecto físico: sólido blanco

Pf: 99-101 °C [(*cis*)-**2g**; >99% *ee*], 91-93 °C [(*trans*)-**2g**; 99% *ee*],

R_f: 0.44 (AcOEt)

Rendimiento: 71%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*):

- ***cis*-(2i) ¹H RMN:** δ 7.41–7.22 (m, 5H, Ph), 6.89 (s, 1H, NH), 3.80 (d, 1H, |²*J*| = 13.5 Hz, *CHH*-Ph), 3.67–3.55 (m, 1H, H-6), 3.55 (d, 1H, |²*J*| = 13.5 Hz, *CHH*-Ph), 3.31 (q, 1H, ³*J* = 7.0 Hz, H-3), 2.58 (d, 2H, ³*J* = 5.9 Hz, CH₂-5), 1.39 (d, 3H, ³*J* = 7.0 Hz, CH₃), 1.13 (d, 3H, ³*J* = 6.4 Hz, CH₃).
- ***trans*-(2i) ¹H RMN:** δ 7.42–7.24 (m, 5H, Ph); 5.96 (s, 1H, NH), 4.01 (d, 1H, |²*J*| = 13.6 Hz, *CHH*-Ph), 3.66–3.51 (m, 1H, H-6), 3.26 (d, 1H, |²*J*| = 13.6 Hz, *CHH*-Ph), 3.09 (q, 1H, ³*J* = 6.7 Hz, H-3), 2.85 (dd, 1H, ³*J* = 3.8, |²*J*| = 11.8 Hz, *HH*-5), 2.01 (dd, 1H, ³*J* = 9.2, |²*J*| = 11.8 Hz, *HH*-5), 1.51 (d, 3H, ³*J* = 6.7 Hz, CH₃), 1.07 (d, 3H, ³*J* = 6.4 Hz, CH₃).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*):

- ***cis*-(2i) ¹³C RMN:** δ 174.0 (CO), 138.4 (C), 128.7 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.3 (CH), 58.8 (CH), 57.9 (CH₂), 50.2 (CH₂), 46.6 (CH), 20.4 (CH₃), 14.3 (CH₃).
- ***trans*-(2i) ¹³C RMN:** δ 172.9 (CO), 138.1 (C), 129.0 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.4 (CH), 60.2 (CH), 58.4 (CH₂), 54.6 (CH₂), 47.3 (CH), 20.0 (CH₃), 16.1 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₃H₁₈N₂NaO)⁺ (M+H)⁺ 241.1311; encontrada 241.1311.

Rotación Óptica Específica: [α]_D²⁰ = + 10.4 (c 1.0, CHCl₃) [para (3*S*,6*S*)-**2i** con >99% *ee*]

[α]_D²⁰ = + 49.4 (c 1.0, CHCl₃) [para (3*S*,6*R*)-**2i** con 99% *ee*]

Capítulo 1.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

Temperatura: 30 °C

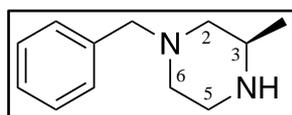
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80:20

Flujo: 0.5 mL·min⁻¹

Tiempo de retención: t_R [(3*S*,6*R*)-**2i**] = 10.0 min, t_R [(3*R*,6*S*)-**2i**] = 12.4 min

t_R [(3*R*,6*R*)-**2i**] = 11.0 min, t_R [(3*S*,6*S*)-**2i**] = 11.6 min

(*R*)-(+)-1-Bencil-3-metilpiperazina, [(*R*)-**3a**]



Fórmula empírica: C₁₂H₁₈N₂

Masa molecular/g·mol⁻¹: 190.29

Aspecto físico: aceite amarillo pálido

R_f: 0.57 (5% NH₄OH/MeOH)

Rendimiento: 70 %

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.35–7.19 (m, 5H), 3.49 (s, 2H), 3.05–2.82 (m, 3H), 2.82–2.70 (m, 2H), 2.42 (s, 1H), 2.14–1.99 (m, 1H), 1.73 (t, *J* = 10.5 Hz, 1H), 1.05 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H).

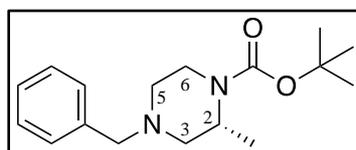
¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 138.1 (C), 129.3 (2 CH), 128.4 (2 CH), 127.2 (CH), 63.4 (CH₂), 61.0 (CH₂), 53.3 (CH₂), 50.8 (CH), 45.8 (CH₂), 19.8 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₂H₁₉N₂)⁺ (M+H)⁺ 191.1543; encontrada 191.1543.

Rotación Óptica Específica: [α]_D²⁰ = + 5.8 (*c* 1.31, CHCl₃) [para (*R*)-**3a** con >99% *ee*]

lit. [α]_D²⁰ = – 5.5 (*c* 0.51, CHCl₃) [para enantiómero-(*S*) con 98% *ee*]⁴⁴

(*R*)-(-)-4-Bencil-2-metilpiperazina-1-carboxilato de *tert*-butilo, [(*R*)-**4a**]



Fórmula empírica: C₁₇H₂₆N₂O₂

Masa molecular/g·mol⁻¹: 290.41

Aspecto físico: aceite amarillo

R_f: 0.31 (Hexano:Et₂O-9:1)

Rendimiento: 83%

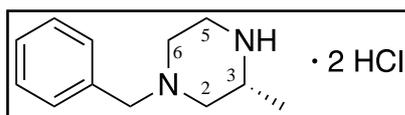
¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.40–7.20 (m, 5H), 4.30–4.09 (m, 1H, H-2), 3.80 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H, *HH*-6), 3.48 (sistema AB, 2H, |²*J*| = 13.3 Hz, *CH*₂-Ph), 3.13 (td, *J* = 12.7, 3.5 Hz, 1H, *HH*-6), 2.82–2.72 (m, 1H, *HH*-5), 2.61 (dt, *J* = 11.2, 1.9 Hz, 1H, *HH*-3), 2.14 (dd, *J* = 11.2, 3.9 Hz, 1H, *HH*-3), 2.02 (ddd, *J* = 12.2, 11.2, 3.5 Hz, 1H, *HH*-5), 1.48 (s, 9H), 1.26 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H).

^{13}C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 154.8 (CO), 138.4 (C), 128.7 (2 CH), 128.2 (2 CH), 127.0 (CH), 79.3 (C), 62.8 (CH₂), 57.4 (CH₂), 53.2 (CH₂), 47.1 (CH), 39.1 (CH₂), 28.5 (3 CH₃), 15.9 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₇H₂₇N₂O₂)⁺ (M+H)⁺ 291.2067; encontrada 291.2056.

Rotación Óptica Específica: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -59.3$ (*c* 1.11, CHCl₃) [para (*R*)-**4a** con >99% *ee*]
lit. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -62.0$ (*c* 0.84, EtOH) [para enantiómero-(*R*) con 98% *ee*]¹⁸

(*R*)-(+)-Dihidrocloruro de 1-bencil-3-metilpiperazina [(*R*)-5a]



Fórmula empírica: C₁₂H₂₀Cl₂N₂
Masa molecular/g·mol⁻¹: 262.10
Aspecto físico: sólido blanco
Pf: 218-220°C (descompone)
Rendimiento: 98%

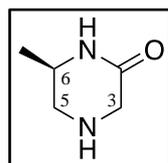
^1H RMN (300.13 MHz, Metanol-*d*₄): δ 9.26 – 9.01 (m, 5H), 6.04 (s, 2H, CH₂-Ph), 5.47 – 5.32 (m, 1H, H-3), 5.31 – 5.19 (m, 3H, HH-2, HH-5, HH-6), 5.11 (td, *J* = 13.7, 12.9, 2.6 Hz, 1H, HH-5), 4.97 (td, *J* = 12.9, 3.6 Hz, 1H, HH-6), 4.85 – 4.74 (m, 1H, HH-2), 2.98 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H).

^{13}C RMN (75.5 MHz, Metanol-*d*₄): δ 132.66 (2 CH), 131.57 (C), 130.51 (2 CH), 129.51 (CH), 61.81 (CH₂), 54.21 (CH₂), 50.53 (CH), 48.58 (CH₂), 41.88 (CH₂), 15.96 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₂H₁₉N₂)⁺ (M+H)⁺ 191.1543; encontrada 191.1549.

Rotación Óptica Específica: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +7.9$ (*c* 0.9, EtOH) [para (*R*)-**5a** con >99% *ee*].

(*R*)-(-)-6-Metilpiperazin-2-ona, (*R*)-6.



Fórmula empírica: C₁₂H₂₀Cl₂N₂
Masa molecular/g·mol⁻¹: 262.10
Aspecto físico: sólido blanco
Pf: 167-169 °C
Rendimiento: 96%

^1H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.32 (s, 1H, NH), 3.59–3.48 (m, 1H, H-6), 3.44 (sistema AB, 2H, $^2J = 17.3$ Hz, HH-3), 3.05 (dd, $^3J = 4.2$, $^2J = 13.0$, Hz, 1H, HH-5), 2.49 (dd, $^3J = 8.6$ Hz, $^2J = 13.0$, 1H, HH-5), 1.93 (s, 1H, NH), 1.11 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃).

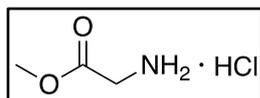
Capítulo 1.

^{13}C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 170.4 (CO), 49.6 (CH₂), 49.3 (CH₂), 49.3 (CH), 20.1 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₅H₁₀N₂NaO)⁺ (M+Na)⁺ 137.0685; encontrada 137.0685.

Rotación Óptica Específica: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -29.0$ (*c* 0.9, CHCl₃) [para (*R*)-**6** con >99% *ee*].

Clorhidrato de éster metílico de glicina, (7).



Fórmula empírica: C₃H₈ClNO₂

Masa molecular/g·mol⁻¹: 125.55

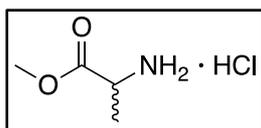
Aspecto físico: sólido blanco

Rendimiento: 96%

^1H RMN (300.13 MHz, Metanol-*d*₄) δ 3.88 (s, 2H), 3.84 (s, 3H).

^{13}C RMN (75.5 MHz, Metanol-*d*₄): δ 168.9 (CO), 53.5 (CH₃), 41.0 (CH₂).

Clorhidrato de éster metílico de DL-alanina, (8).



Fórmula empírica: C₄H₁₀ClNO₂

Masa molecular/g·mol⁻¹: 139.58

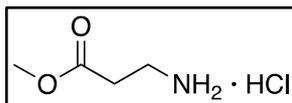
Aspecto físico: sólido blanco

Rendimiento: 95%

^1H RMN (300.13 MHz, Metanol-*d*₄) δ 4.13 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 1.55 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H).

^{13}C RMN (75.5 MHz, Metanol-*d*₄) δ 171.4 (CO), 53.7 (CH₃), 49.8 (CH), 16.2 (CH₃).

Clorhidrato de éster metílico de β-alanina, (9).



Fórmula empírica: C₄H₁₀ClNO₂

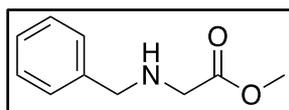
Masa molecular/g·mol⁻¹: 139.58

Aspecto físico: sólido blanco

Rendimiento: 90%

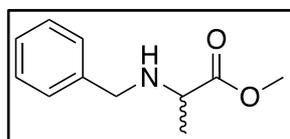
^1H RMN (300.13 MHz, Metanol-*d*₄) δ 3.74 (s, 3H), 3.24 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.82 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H).

^{13}C RMN (75.5 MHz, Metanol-*d*₄) δ 172.6 (CO), 52.7 (CH₃), 36.5 (CH₂), 32.1 (CH₂).

N-Bencilglicinato de metilo, (10).**Fórmula empírica:** C₁₀H₁₃NO₂**Masa molecular/g·mol⁻¹:** 179.22**Aspecto físico:** aceite incoloro**R_f:** 0.36 (Hexano:AcOEt-6:4)**Rendimiento:** 46%

¹H RMN (300 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.36 – 7.01 (m, 5H), 3.69 (s, 2H), 3.59 (s, 3H), 3.30 (s, 2H), 1.99 (s, 1H).

¹³C RMN (75 MHz, Cloroformo-*d*): δ 172.3 (CO), 139.2 (C), 127.9 (2 CH), 127.8 (2 CH), 126.6 (C), 52.7 (CH₂), 51.1 (CH₃), 49.3 (CH₂).

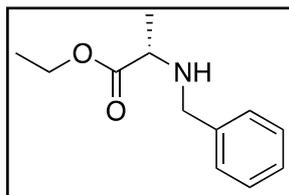
N-Bencilalaninato de metilo (11).**Fórmula empírica:** C₁₁H₁₅NO₂**Masa molecular/g·mol⁻¹:** 193.25**Aspecto físico:** aceite amarillo pálido**R_f:** 0.40 (Hexano:AcOEt-6:4)**Rendimiento:** 63%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.41 – 7.20 (m, 5H), 3.75 (sistema AB, 2H, |²J| = 12.9 Hz, CH₂-Ph), 3.74 (s, 3H), 3.42 (q, J = 7.0 Hz, 1H), 1.34 (d, J = 7.0 Hz, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 176.2 (CO), 139.7 (C), 128.5 (2 CH), 128.3 (2 CH), 127.1 (C), 55.9 (CH), 52.0 (CH₂), 51.8 (CH₃), 19.2 (CH₃).

Rotación Óptica Específica: [α]_D²⁰ = +18.3 (c 1.1, CHCl₃) [para (*R*)-**11** con 96% *ee*]

N-Bencil-L-alaninato de etilo (12).



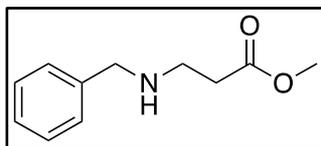
Fórmula empírica: C₁₂H₁₇NO₂
Masa molecular/g·mol⁻¹: 207.13
Aspecto físico: aceite amarillo
R_f: 0.48 (Hexano:AcOEt-6:4)
Rendimiento: 64%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.36 – 7.21 (m, 5H), 4.19 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.76 (sistema AB, 2H, |²*J*| = 12.8 Hz, CH₂-Ph), 3.37 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H), 1.92 (s, 1H), 1.32 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 175.8 (CO), 139.8 (C), 128.5 (2 CH), 128.3 (2 CH), 127.1 (C), 60.7 (CH₂), 56.1 (CH), 52.0 (CH₂), 19.2 (CH₃), 14.4 (CH₃).

Rotación Óptica Específica: [α]_D²⁰ = – 30.1 (*c* 1.3, CHCl₃) [para (*S*)-**12** con 99% *ee*]

3-(Bencilamino)propanoato de metilo, (13).

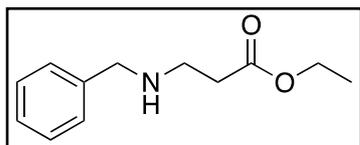


Fórmula empírica: C₁₁H₁₅NO₂
Masa molecular/g·mol⁻¹: 193.11
Aspecto físico: aceite incoloro
R_f: 0.33 (AcOEt)
Rendimiento: 58%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.35 – 7.17 (m, 5H), 3.79 (s, 2H), 3.66 (s, 3H), 2.89 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.53 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.71 (s, 1H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 173.15 (CO), 140.13 (C), 128.36 (2 CH), 128.03 (2 CH), 126.91 (C), 53.71 (CH₂), 51.52 (CH₃), 44.42 (CH₂), 34.53 (CH₂).

3-(Bencilamino)propanoato de etilo, (14).

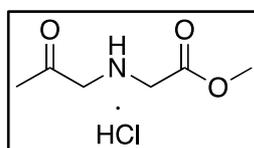


Fórmula empírica: C₁₂H₁₇NO₂
Masa molecular/g·mol⁻¹: 207.27
Aspecto físico: aceite incoloro
R_f: 0.23 (Hexano:AcOEt-6:4)
Rendimiento: 80%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.63 – 7.05 (m, 5H), 4.14 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.80 (s, 2H), 2.90 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.53 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 1.77 (s, 1H), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

^{13}C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 172.8 (CO), 140.2 (C), 128.4 (2 CH), 128.1 (2 CH), 127.0 (C), 60.4 (CH₂), 53.8 (CH₂), 44.5 (CH₂), 34.8 (CH₂), 14.3 (CH₃).

Clorhidrato de (2-oxopropil)glicinato de metilo, (15).



Fórmula empírica: C₆H₁₂ClNO₃

Masa molecular/g·mol⁻¹: 181.62

Aspecto físico: sólido verdoso

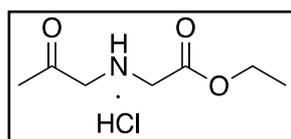
Pf: 97–100°C (descompone)

Rendimiento: 99%

^1H RMN (300.13 MHz, Metanol-*d*₄): δ 4.19 (s, 2H), 3.98 (s, 2H), 3.85 (s, 3H), 2.24 (s, 3H).

^{13}C RMN (75.5 MHz, Metanol-*d*₄): δ 200.7 (CO), 167.4 (CO), 55.9 (CH₂), 53.3 (CH₃), 47.8 (CH₂), 27.1 (CH₃).

Clorhidrato de (2-oxopropil)glicinato de etilo, (16).



Fórmula empírica: C₇H₁₄ClNO₃

Masa molecular/g·mol⁻¹: 195.64

Aspecto físico: sólido beige

Pf: 131-132 °C (descompone)

Rendimiento: 98%

^1H RMN (300.13 MHz, Metanol-*d*₄): δ 4.31 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.20 (s, 2H), 3.97 (s, 2H), 2.25 (s, 3H), 1.32 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

^{13}C RMN (75.5 MHz, Metanol-*d*₄): δ 201.3 (CO), 167.5 (CO), 63.6 (CH₂), 55.8 (CH₂), 47.9 (CH₂), 27.3 (CH₃), 14.3 (CH₃).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.^{156a}

CAPÍTULO 2.

Síntesis enantioselectiva de
ftalidas 3-sustituidas empleando
alcohol deshidrogenasas.

ANTECEDENTES

2.1. Importancia de las ftalidas.

Las ftalidas se encuentran con frecuencia en productos naturales y presentan un amplio espectro de actividades biológicas.¹⁷⁰ Desde la antigüedad, las plantas que contenían ftalidas, se han utilizado en todo el mundo como medicina tradicional, suplementos dietéticos o agentes aromatizantes de alimentos, entre otras actividades.¹⁷¹ Debido a este diverso perfil biológico, estas estructuras y sus derivados han generado un notable impacto en el desarrollo de nuevos fármacos recientemente.

El esqueleto básico de las ftalidas es la isobenzofuran-1(3*H*)-ona, que contiene un anillo de benceno (anillo A) fusionado con una γ -lactona (anillo B), Figura 11.

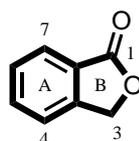


Figura 11. Estructura química de las ftalidas (isobenzofuran-1(3*H*)-ona).

En concreto, los derivados sustituidos en la posición C3 son el núcleo de muchas moléculas farmacológicamente relevantes.¹⁷² Algunos ejemplos representativos de productos de origen natural que poseen estos sistemas heterocíclicos se muestran en la Figura 12.

Cabe destacar de entre ellas, la 3-butilisobenzofuran-1(3*H*)-ona o NBP, la cual posee propiedades anti-hipertensivas¹⁷³ y efectos neuroprotectores.¹⁷⁴ Además, desde el 2002, el gobierno chino la aprobó como fármaco y se comercializa como antiagregante plaquetario contra el ictus isquémico.¹⁷⁵ También presenta actividad antibacteriana, antiviral y antihipertensiva. La

¹⁷⁰ a) R. Karmakar, P. Pahari, D. Mal, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 6213–6284. b) A. Awasthi, M. Singh, G. Rathee, R. Chandra, *RSC Adv.* **2020**, *10*, 12626–12652. c) A. León, M. Del-Ángel, J. L. Ávila, G. Delgado (2017). *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Vol. 104. (Editores: A. D. Kinghorn, H. Falk, S. Gibbons, J. Kobayashi). Springer. ISBN: 978-3-319-45616-4.

¹⁷¹ G. Lin, S. S.-K. Chan, H.-S. Chung, S.-L. Li (2005). *Studies in Natural Products Chemistry Vol. 32*. (Editor: Attar-Rahman). Elsevier: Amsterdam. ISBN-13: 978-0444521712.

¹⁷² a) J. Marco-Contelles, Y. Zhang, *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 12485–12510. b) K. Yoganathan, C. Rossant, S. Ng, Y. Huang, M. S. Butler, A. D. Buss, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1116–1117. c) C.-W. Chang, R.-J. Chein, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 4154–4157. d) E. L. Mullady, W. P. Millett, H.-D. Yoo, A. S. Weiskopf, J. Chen, D. DiTullio, V. Knight-Connoni, D. E. Hughes, W. E. Pierceall, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 2086–2089. e) A. Arnone, G. Assante, G. Nasini, O. Vajna de Pava, *Phytochemistry* **1990**, *29*, 613–616. f) R. Tomar, A. Sahni, I. Chandra, V. Tomar, R. Chandra, *Mini-Rev. Org. Chem.* **2018**, *15*, 345–363. g) J. A. Palermo, M. F. R. Brasco, C. Spagnuolo, A. M. Seldes, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4482–4486.

¹⁷³ D. Tsi, B. K. H. Tan, *Phytother. Res.* **1997**, *11*, 576–582.

¹⁷⁴ T. Zhang, W. Yan, Q. Li, J. Fu, K. Liu, W. Jia, X. Sun, X. Liu, *Neurol. Res.* **2011**, *33*, 396–404.

¹⁷⁵ R. Luo, R. Wangqin, L. Zhu, W. Bi, *Biomedical Reports* **2019**, *11*, 235–240.

Capítulo 2.

obtención de NBP a partir de fuentes naturales no es rentable. En consecuencia, su síntesis de laboratorio por medios químicos o bioquímicos ha sido un área activa.^{170a}

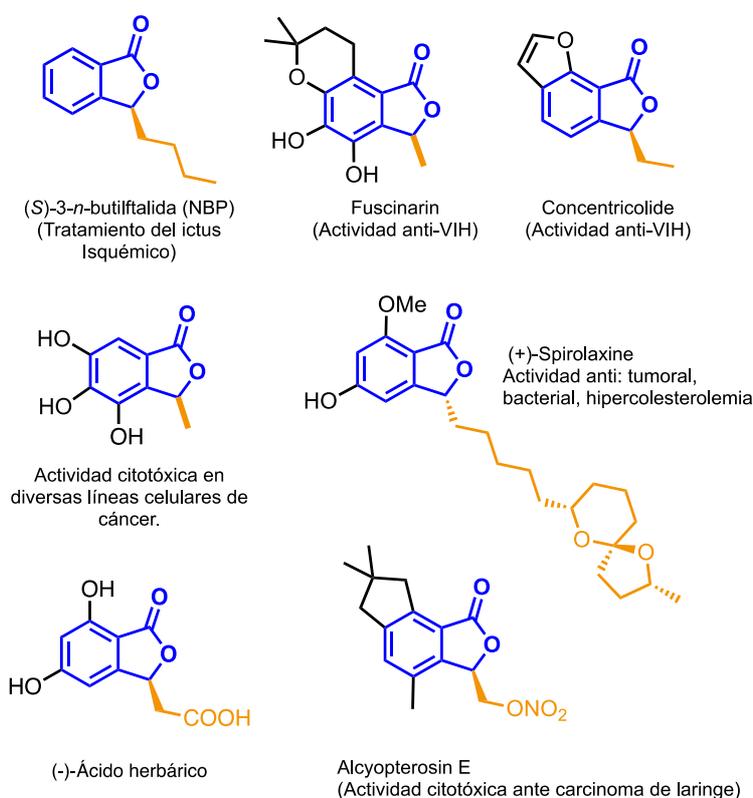


Figura 12. Ejemplos seleccionados de derivados naturales de ftalidas 3-sustituidas.

Teniendo en cuenta estos hechos, se puede afirmar que las ftalidas se han convertido en una valiosa estructura en los ámbitos de la síntesis orgánica y de la química médica. En consecuencia, se han desarrollado diversos procedimientos sintéticos para obtener estos compuestos en las últimas décadas.¹⁷⁶ En las siguientes secciones se detallan algunos de los métodos utilizados.

¹⁷⁶ C. Len, B. Renoux (2005). *Targets Heterocyclic Systems, Vol. 9.* (Editores: O. A. Atannasi, D. Spinelli). Società Chimica Italiana. ISBN 88 86208-31-6.

2.2. Estrategias no enzimáticas para la síntesis de ftalidas quirales.

En esta sección se dará una visión general de las estrategias utilizadas para obtener ftalidas quirales, desde una perspectiva no enzimática. Se han abordado numerosas aproximaciones entre las que destacan las reacciones catalizadas por metales de transición, aunque también se recogen ejemplos destacados empleando la organocatálisis o reducciones asimétricas clásicas. Todas ellas han demostrado su eficacia en la síntesis de estas valiosas estructuras con un alto control estereoquímico en la mayoría de los casos y una diversidad estructural en conjunto, elevada.

A continuación, en la Figura 13 se resumen las principales vías de obtención de ftalidas por estos métodos. Después, se destacarán sus características principales de manera sucinta.

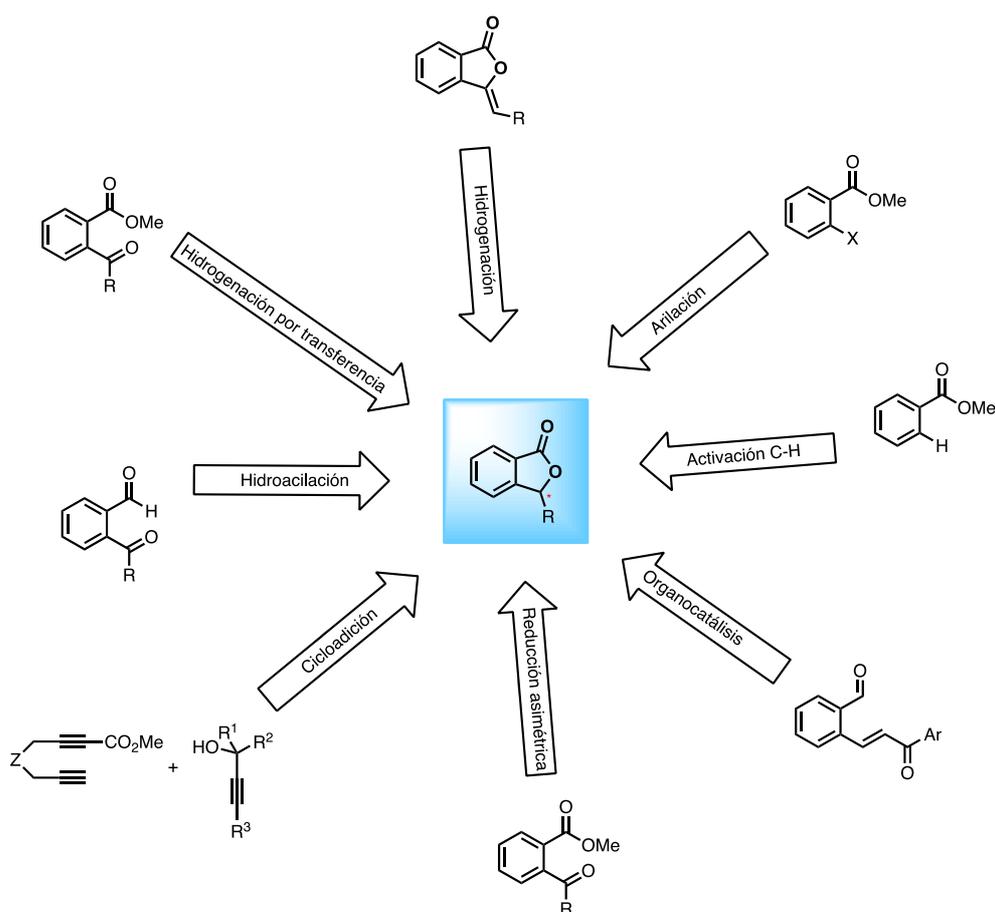


Figura 13. Aproximaciones no enzimáticas seleccionadas para la síntesis de ftalidas 3-sustituidas quirales.

Capítulo 2.

- Hidrogenación/hidrogenación por transferencia.

En los procesos de hidrogenación¹⁷⁷ o de hidrogenación por transferencia¹⁷⁸ (del inglés *transfer hydrogenation*), el rutenio y el iridio han sido los metales más frecuentes empleados. La hidrogenación por transferencia es una alternativa al proceso convencional de hidrogenación directa. En ese proceso no se requiere H₂ gas presurizado, ya que la fuente donante de hidrógeno es una molécula, que generalmente, está presente en el propio catalizador (ligando).¹⁷⁹ Estas moléculas suelen ser baratas y fáciles de manejar y los principales productos secundarios pueden reciclarse.

Dependiendo del sustrato, el proceso de hidrogenación puede ir seguido *in situ* de otro de lactonización para obtener la ftalida final.¹⁸⁰ En otros, como en el que se muestra en la Figura 13, la hidrogenación ocurre directamente sobre la olefina entre el carbono C3 y la cadena de la ftalida ya formada.¹⁸¹

- Hidroacilación.

En las reacciones de hidroacilación de cetonas para formar lactonas de cinco miembros, los metales que destacan son rodio¹⁸², cobalto¹⁸³ e iridio¹⁸⁴. En todas ellas el mecanismo de acción propuesto es semejante, una primera etapa en la que se produce la activación de un hidrógeno (generalmente de un grupo aldehído), seguido de un paso de inserción del enlace C=O de la cetona a través de un estado de transición intramolecular (Esquema 33).

¹⁷⁷ M. Kitamura, T. Ohkuma, S. Inoue, N. Sayo, H. Kumobayashi, S. Akutagawa, T. Ohta, H. Takaya, R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 629–631.

¹⁷⁸ a) K. Everaere, J.-L. Scheffler, A. Mortreux, J.-F. Carpentier, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 1899–1901. b) B. Zhang, M.-H. Xu, G.-Q. Lin, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4712–4715. c) T. Cheng, Q. Ye, Q. Zhao, G. Liu, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4972–4975.

¹⁷⁹ D. Wang, D. Astruc, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 6621–6686.

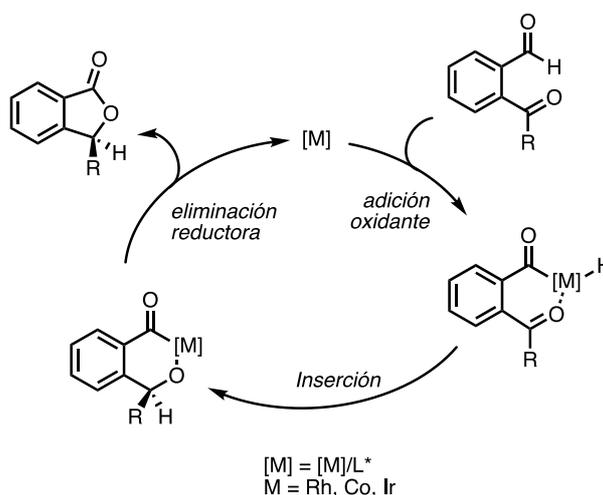
¹⁸⁰ a) J.-H. Xie, X.-Y. Liu, J.-B. Xie, L.-X. Wang, Q.-L. Zhou, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7329–7332. b) B. Lu, M.-M. Zhao, G.-N. Ding, X.-M. Xie, L.-L. Jiang, V. Ratovelomanana-Vidal, Z.-G. Zhang, *ChemCatChem* **2017**, *9*, 3989–3996. c) J. Song, C. Yin, Y. Zhang, Y. Shi, Y. Li, G.-Q. Chen, X. Zhang, *Chem. Commun.* **2022**, *58*, 8408–8411.

¹⁸¹ Y. Ge, Z. Han, Z. Wang, C.-G. Feng, Q. Zhao, G.-Q. Lin, K. Ding, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 13140–13144.

¹⁸² D. H. T. Phan, B. Kim, V. M. Dong, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15608–15609.

¹⁸³ J. Yang, N. Yoshikai, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 16748–16751.

¹⁸⁴ T. Shirai, T. Iwasaki, K. Kanemoto, Y. Yamamoto, *Chem. Asian J.* **2020**, *15*, 1858–1862.

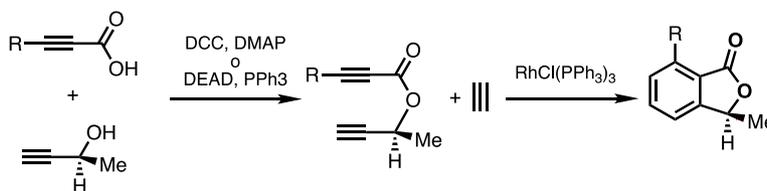


Esquema 33. Ciclo catalítico (propuesto) para la hidroacilación.

- Cicloadiciones.

En el caso de las cicloadiciones, la parte que se cicla se corresponde con el anillo aromático, por ello, la quiralidad ha de venir prefijada por alguno de los sintones (el alcohol propargílico quiral)¹⁸⁵ o bien mediante el empleo de un catalizador con ligandos quirales que participe en la desimetrización del alcohol racémico.¹⁸⁶

Witulski y Zimmermann¹⁸⁵ realizaron este proceso a partir de ácidos propiólicos (Esquema 34). En primer lugar, mediante una esterificación con DCC/DMAP (Steglich) o una reacción de Mitsunobu (con inversión de la configuración del alcohol) se logra la síntesis de los correspondientes ésteres dipropargílicos. Estos, mediante cicloadición [2+2+2] cruzada con acetileno formarán las ftalidas 3-sustituidas enantioméricas. El catalizador de Wilkinson ($\text{RhCl}(\text{PPh}_3)_3$) es uno de los empleados en este tipo de procesos.



Esquema 34. Ejemplo de cicloadición [2 + 2 + 2] catalizada por metales de transición de ésteres quirales.

¹⁸⁵ B. Witulski, A. Zimmermann, *Synlett* **2002**, 11, 1855–1859.

¹⁸⁶ K. Tanaka, T. Osaka, K. Noguchi, M. Hirano, *Org. Lett.* **2007**, 9, 1307–1310.

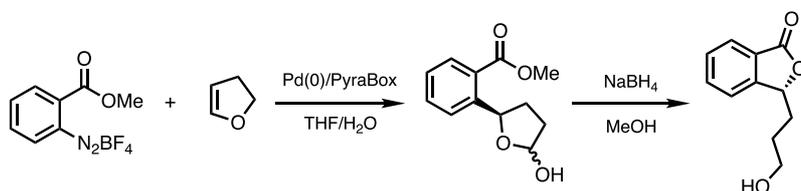
Capítulo 2.

En el caso de Hirano y colaboradores¹⁸⁶ partieron de ésteres dipropargílicos (Figura 13) y tras realizar la transesterificación con un alcohol propargílico racémico, se realizó la cicloadición [2+2+2] usando como catalizador un complejo de rodio (I) junto con un ligando quiral ((*R*)-Solphos).

▪ Arilación.

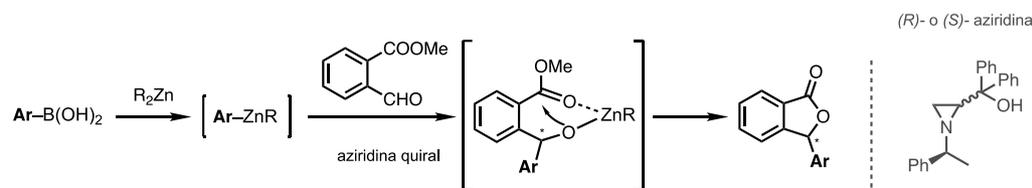
Dentro de los procesos de arilación, existen dos posibles escenarios, que el grupo arilo participante sea el anillo aromático de la ftalida (anillo A, Figura 11), o bien que el grupo arilo sea el sustituyente que se incorpora en la posición C3 de la ftalida final.

En el primero de estos casos tenemos el trabajo de Correia y colaboradores¹⁸⁷ en el que se realiza un primer paso de arilación (reacción de Heck-Matsuda) catalizada por paladio (Pd^0/L^*) empleando una sal de diazonio aromática ($\text{Ar-N}_2\text{BF}_4$) y como olefina, el 2,3-dihidrofurano. El hemiacetal resultante es reducido posteriormente con NaBH_4 seguido de la lactonización que proporciona las ftalidas correspondientes (Esquema 35).



Esquema 35. Preparación de ftalidas vía Heck-Matsuda.

En el segundo caso,¹⁸⁸ el agente arilante es una especie de diorganocinc (Ar-Zn-R), generada a partir de un ácido borónico (Ar-B(OH)_2) y un dialquilcinc por transmetalación. La arilación se produce sobre un aldehído aromático, en presencia de un ligando quiral, una aziridina diastereomérica catalítica. La transferencia del arilo concluye con un proceso de lactonización que proporciona las ftalidas correspondientes (Esquema 36).



Esquema 36. Preparación de 3-arylftalidas vía cascada asimétrica de arilación-lactonización.

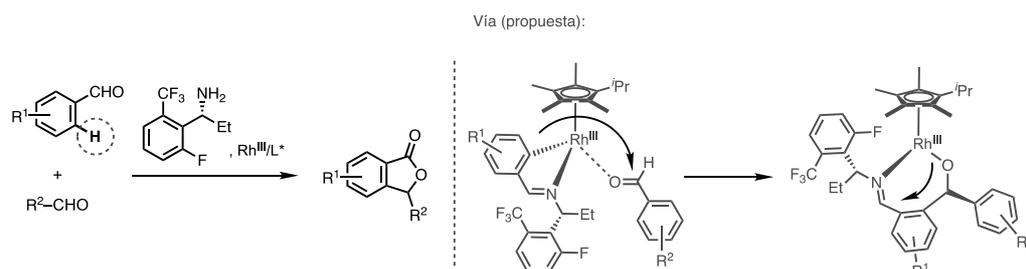
¹⁸⁷ S. Kattela, E. C. de Lucca, C. R. D. Correia, *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 17691–17696.

¹⁸⁸ X. Song, Y.-Z. Hua, J.-G. Shi, P.-P. Sun, M.-C. Wang, J. Chang, *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 6087–6093.

▪ Activación del enlace C-H.

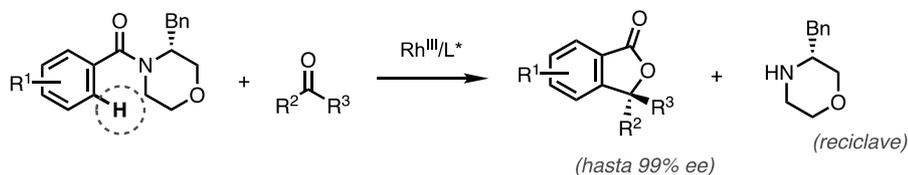
La activación de enlaces C-H catalizada por metales de transición ha sido una técnica ampliamente investigada y utilizada en la síntesis orgánica.¹⁸⁹ Con la utilización de metales como el rutenio¹⁹⁰ o el rodio, se pueden activar los enlaces C-H, transformando la unidad C-H inactiva, en una unidad C-M reactiva que se puede adicionar a aldehídos para obtener ftalidas.

En este caso, se pueden destacar dos trabajos, ambos de J. Wang y colaboradores.¹⁹¹ En el primero de ellos, el de 2019, la inducción quiral del proceso viene determinada por un ligando quiral, generado por una amina quiral y un aldehído aromático (el que formará el anillo de la ftalida). Este complejo (Rh^{III}/L*), realiza una adición de tipo Grignard a un segundo aldehído aromático (el que formará el sustituyente C3 de la ftalida) para producir las correspondientes ftalidas 3-aryl sustituidas (Esquema 37).



Esquema 37. Preparación de 3-arylftalidas vía activación enlace C-H.

En cambio, en el trabajo de 2020, en vez de partir de un aldehído, se parte de una amida aromática quiral (morfolina sustituida enantioenriquecida) que es ella misma la inductora de quiralidad en el carbono C3 (también del tipo arilo). La morfolina, una vez liberada la ftalida, se puede volver a reciclar para su uso.



Esquema 38. Preparación de ftalidas 3-sustituidas vía activación enlace C-H.

¹⁸⁹ Revisiones seleccionadas: a) R. H. Crabtree, *J. Organomet. Chem.* **2004**, 689, 4083–4091. b) T. W. Lyons, M. S. Sanford, *Chem. Rev.* **2010**, 110, 1147–1169.

¹⁹⁰ D. H. Dethle, N. C. Beeralingappa, S. A. Siddiqui, P. N. Chavan, *J. Org. Chem.* **2022**, 87, 4617–4630.

¹⁹¹ a) G. Li, J. Jiang, H. Xie, J. Wang, *Chem. Eur. J.* **2019**, 25, 4688–4694. b) W. Chen, J. Li, H. Xie, J. Wang, *Org. Lett.* **2020**, 22, 3586–3590.

Capítulo 2.

▪ Reducción asimétrica.

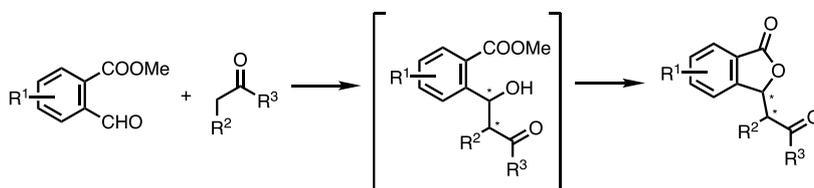
Dentro de los métodos entre los que se emplea una reducción asimétrica clásica, podemos destacar la reducción asimétrica de Corey-Bakshi-Shibata (CBS) empleada por Yang y colaboradores¹⁹² y la hidroborcación asimétrica empleada por el grupo de Herbert C. Brown.¹⁹³ En este último, el catalizador, (-)-Ipc₂BCl, se emplea como agente reductor estequiométrico.

El ciclo mecanístico de la reducción CBS se detalla en la Sección 2.7 en relación con la asignación de la configuración absoluta de las ftalidas preparadas en este Capítulo.

▪ Organocatálisis.

Para finalizar, encontramos varios ejemplos dentro del ámbito de la organocatálisis obteniendo, en la mayoría de los casos, excesos enantioméricos elevados.

En la primera de ellas, Wang y colaboradores,¹⁹⁴ desarrollan un proceso de aldol-lactonización asimétrica de 2-formilbenzoatos de metilo con cetonas/aldehídos en presencia de catalizadores basados en la L-prolina (Esquema 39).



Esquema 39. Preparación de ftalidas 3-sustituidas vía aldol-lactonización mediante derivados de la L-prolina.

En los otros dos procesos,¹⁹⁵ se produce una reacción dominada de oxidación/adición oxa-Michael asimétrica. El sustrato, como el que se muestra en la Figura 13, es oxidado en el caso de Park y colaboradores hasta el ácido.^{195a} Después, y en presencia de un alcaloide (la cinconina), se produce la adición oxa-Michael. En el caso de Ghorai y colaboradores^{195b} el aldehído de partida es oxidado con hidroperóxido terbutílico (tBuOOH o TBHP) hasta un peroxiacetal intermedio. Es por ello que, tras realizarse el paso de la adición oxa-Michael (en presencia de otra cinconina), es necesario un último paso para transformar el peroxiacetal en el éster lactámico de la ftalida correspondiente en presencia de FeCl₃·6H₂O catalítico (25 mol-%), siendo este último también relevante para obtener un exceso enantiomérico elevado.

¹⁹² G. Xu, Z. Z. Liu, J. H. Yang, S. Z. Chen, H. Y. Yang, *Chin. Chem. Lett.* **2007**, *18*, 653–655.

¹⁹³ P. V. Ramachandran, G.-M. Chen, H. C. Brown, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 2205–2208.

¹⁹⁴ H. Zhang, S. Zhang, L. Liu, G. Luo, W. Duan, W. Wang, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 368–374.

¹⁹⁵ a) S. W. Youn, H. S. Song, J. H. Park, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1028–1031. b) B. Parhi, S. Maity, P. Ghorai, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 5220–5223.

2.3. Estrategias enzimáticas para la síntesis de ftalidas quirales.

La abundancia y diversidad de métodos catalizados por metales contrasta con la escasez de enfoques biocatalíticos para la síntesis asimétrica de estas estructuras (Esquema 40).

Dentro de las estrategias asimétricas que utilizan enzimas como catalizadores, las resoluciones cinéticas (KR's) han sido uno de los procesos más ampliamente utilizado a lo largo de los años para la preparación de productos ópticamente activos a partir de sus mezclas racémicas.¹⁹⁶ La lipasa B de *Candida antarctica*, también conocida como CAL-B, es un biocatalizador muy eficiente para realizar este tipo de procesos, ya que, es capaz tanto de realizar procesos de hidrólisis en medios acuosos, como de esterificaciones en disolventes orgánicos.¹⁹⁷

Brimble y colaboradores¹⁹⁸ realizaron una resolución cinética asistida por microondas de un alcohol bencílico utilizando la enzima comercial Novozyme 435™ (CAL-B) como catalizador. Tras obtener el alcohol (*S*), se realizaron una serie de transformaciones químicas para obtener la (*S*)-3-vinilftalida con un exceso enantiomérico del 84%, la cual actúa como precursora del ácido herbárico (ver Figura 12).

Uno de los inconvenientes de las resoluciones cinéticas clásicas es que sólo se puede lograr un rendimiento teórico máximo del 50% en la resolución.

Por otro lado, el grupo de Pietruszka y colaboradores,¹⁹⁹ ha obtenido variantes de citocromo P₄₅₀-monooxigenasas BM-3 mediante evolución dirigida, que han demostrado un potencial prometedor como catalizadores en la hidroxilación bencílica estereoselectiva del 2-etilbenzoato de metilo, generando ambas formas enantioméricas de la 3-metilftalida. Sin embargo, es importante mencionar que, aunque es la primera vez que se aplican estas enzimas para la síntesis de ftalidas C3 sustituidas, la enantioselectividad mostrada es baja en comparación con otros métodos mencionados, ya que ambos enantiómeros presentan un exceso enantiomérico menor del 80%, y los rendimientos no superan el 30%.

En las siguientes investigaciones seleccionadas, los catalizadores empleados son microorganismos de diferentes cepas, siendo principalmente bacterias y hongos (Esquema 40).

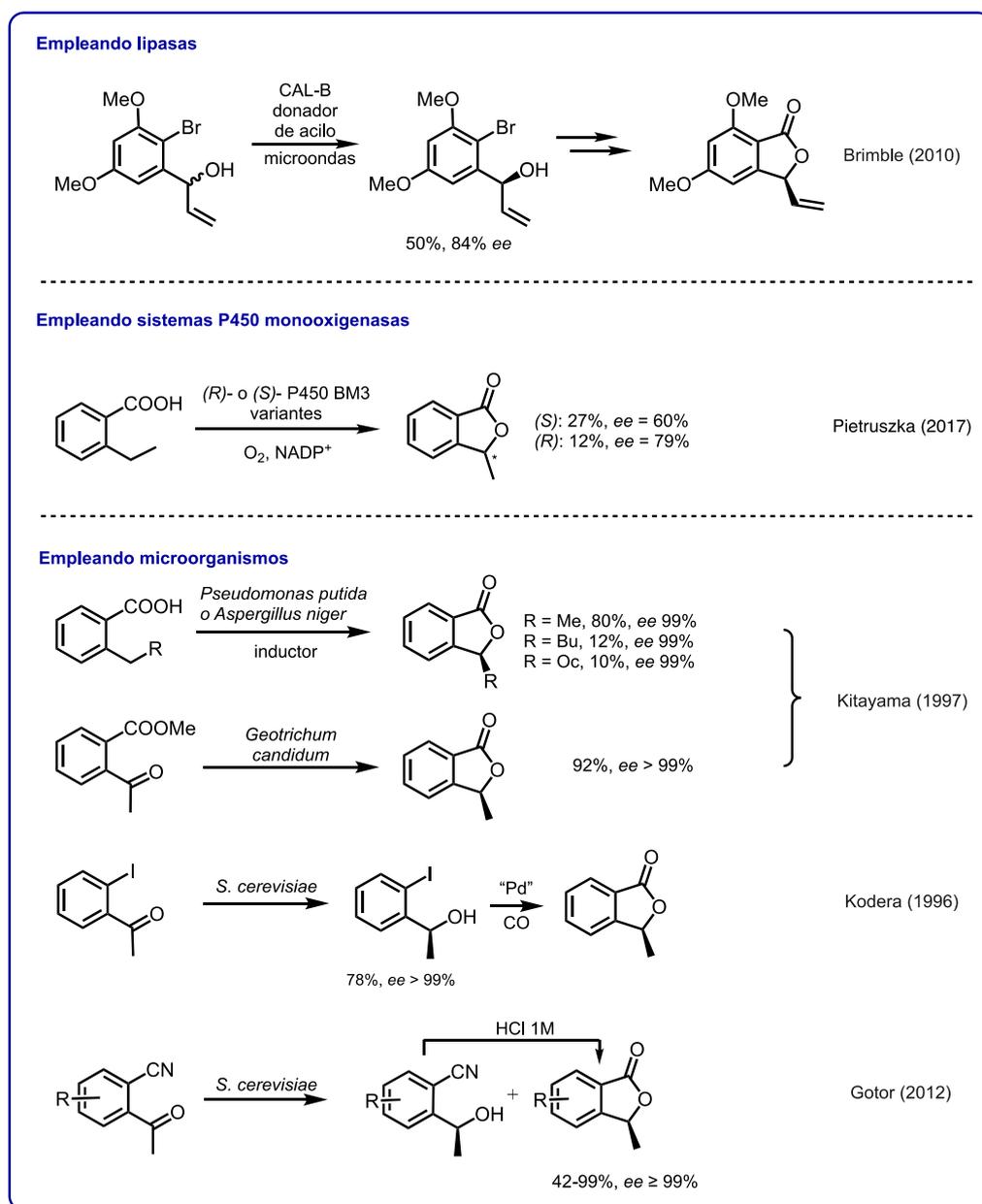
¹⁹⁶ V. Gotor-Fernández, V. Gotor (2016). *Green Biocatalysis*. (Editor: R. N. Patel). Wiley. Capítulo 9. pp. 231–266.

ISBN: 978-1-118-82229-6.

¹⁹⁷ a) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas (2005). *Hydrolases in Organic Synthesis*, 2ª Ed. Wiley-VCH. ISBN:9783527310296. b) V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *40*, 111–120.

¹⁹⁸ P. J. Choi, J. Sperry, M. A. Brimble, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 7388–7392.

¹⁹⁹ C. Holec, U. Hartrampf, K. Neufeld, J. Pietruszka, *ChemBioChem* **2017**, *18*, 676–684.



Esquema 40

Kitayama²⁰⁰ en 1997 presentó mediante dos aproximaciones distintas la síntesis de la (*S*)-3-metilftalida de manera ópticamente activa. El primer de los métodos consistió en una reducción microbiana asimétrica, para ello se sintetizó el 2-acetilbenzoato de metilo como sustrato, el cual

²⁰⁰ T. Kitayama, *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, 8, 3765–3774.

fue reducido asimétricamente por una cepa de *Geotrichum candidum* para obtener la correspondiente (*S*)-3-metilftalida en un rendimiento del 92% y con un exceso enantiomérico >99%.

Para el segundo método, una hidroxilación benzílica, empleó ácido 2-etilbenzoico como sustrato, el cual fue hidroxilado asimétricamente en la posición benzílica por una cepa de *Pseudomonas putida* o de *Aspergillus niger*, cuya fermentación fue inducida por ácido *o*-toluico, para obtener la (*S*)-3-metilftalida en un 80% de rendimiento (99% *ee*).

También sintetizó las correspondientes (*S*)-ftalidas con sustituyente C3 de butilo y de octilo. En estos casos los excesos enantioméricos siguieron siendo excelentes (99% *ee* en ambos casos) pero los rendimientos fueron considerablemente inferiores (12 y 10% respectivamente).

En los dos últimos ejemplos de esta sección, el catalizador empleado principalmente es la levadura de panadería o *Saccharomyces cerevisiae*. En el primer caso, Kodera y colaboradores²⁰¹ redujeron la 2-yodoacetofenona para producir el (*S*)-alcohol correspondiente, seguido de un paso de carbonilación catalizado por acetato de paladio (II) en atmósfera de monóxido de carbono para obtener la (*S*)-3-metilftalida final (59% rdt. tras los dos pasos y >99% *ee*). También se ensayaron las reducciones enzimáticas utilizando la 2-bromoacetofenona y la 2-yodovarelofenona como sustratos, pero no se obtuvieron resultados.

Por último, Gotor y colaboradores,²⁰² descubrieron que la levadura de panadería es un excelente biocatalizador para la biorreducción de 2-acetilbenzonitrilos con diferentes patrones de sustitución en el anillo aromático, mostrando una alta estereoselectividad. Tras finalizar las reacciones, los crudos de los alcoholes intermedios formados se trataron con un medio ácido (HCl 1M) durante 48 h a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se obtuvo acceso a las distintas (*S*)-3-metilftalidas enantiopuras con rendimientos entre moderados y excelentes (42-99% rdt., ≥99% *ee*).

Tras examinar los métodos biocatalíticos descritos, se observa un limitado alcance de estos procedimientos con respecto a la sustitución en C3 de los sustratos y una falta de biocatalizadores estereocomplementarios efectivos. Por tanto, es muy deseable desarrollar nuevos enfoques que permitan lograr la síntesis enantioselectiva complementaria de estos compuestos de manera más eficiente y versátil.

²⁰¹ T. Izumi, O. Itou, K. Kodera, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1996**, 67, 89–95.

²⁰² J. Mangas-Sánchez, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Org. Lett.* **2012**, 14, 1444–1447.

OBJETIVOS

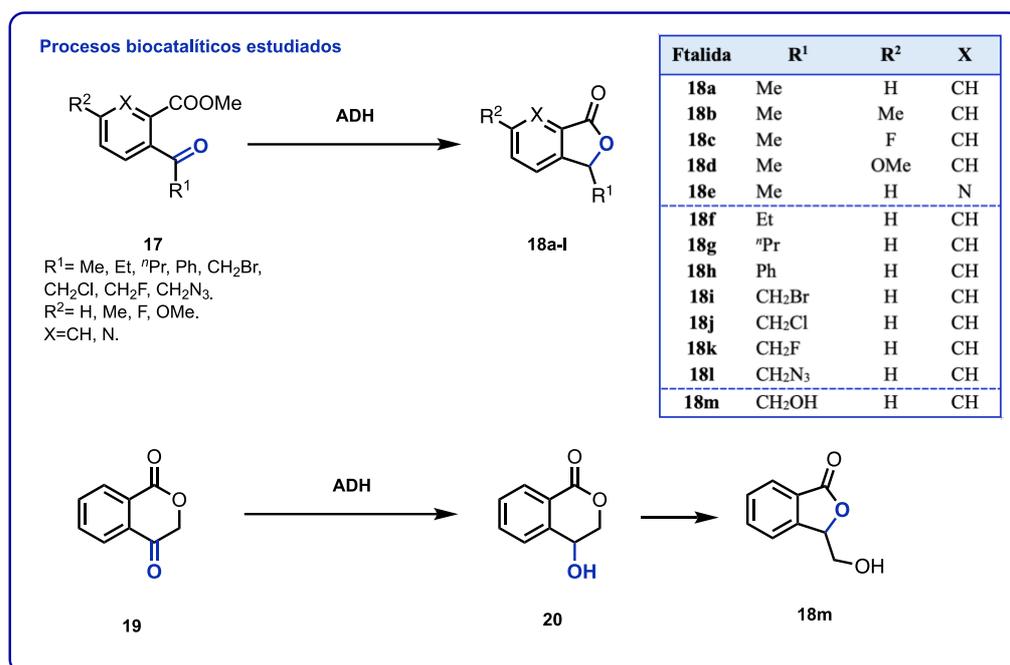
Objetivos

Dado el potencial sintético de las alcohol deshidrogenasas y la actividad biológica asociada de las estructuras isobenzofuran-1(3*H*)-onas 3-sustituidas, en este Capítulo nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

- Diseñar una estrategia enzimática que permita sintetizar ftalidas en un solo paso, de forma enantioselectiva y bajo condiciones suaves de reacción, utilizando como sustratos 2-acilbenzoatos de metilo.
- Preparar un panel heterogéneo de moléculas para el estudio, que incorpore modificaciones estructurales en el sustituyente voluminoso y en el menos impedido de la cetona, considerando aquellas estructuras que generen ftalidas con un mayor potencial para una funcionalización posterior.
- Establecer una estructura modelo y optimizar los parámetros de reacción más importantes, los cuales serán aplicados en el resto de moléculas que componen el estudio.
- En todos los sustratos se buscará encontrar ADH's enantiocomplementarias que permitan acceder a ambos enantiómeros de las ftalidas sintetizadas.
- Evaluar la robustez de estas biotransformaciones mediante el diseño y la realización de experimentos en una escala semipreparativa.
- Determinar la configuración absoluta de las ftalidas obtenidas y contrastarla con la enantioselectividad esperada de las ADH's.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Esquema 42 proporciona una visión general y resumida del proceso biocatalítico que será objeto de estudio. En esta representación, se incluyen las estructuras de los distintos sustratos y productos obtenidos.



Esquema 42

2.4. Preparación de los materiales de partida y los patrones de referencia.

En esta sección se describe la preparación del panel completo de los distintos 2-acilbenzoatos de metilo y análogos **17a-l** ('cetoésteres' de aquí en adelante), que conformarán el conjunto de sustratos objeto de estudio en este Capítulo. Las diferencias estructurales entre ellos se encontrarán en el patrón de sustitución en la posición C3 de la ftalida resultante, así como en el anillo aromático, con distintos sustituyentes en la posición 5.

También se ha incluido un ejemplo de anillo heterocíclico, derivado del ácido picolínico, (**17e**). El producto que se formaría (**18e**), no tendría estructura de isobenzofuranona o de ftalida estrictamente. No obstante, por simplicidad, en el resto del Capítulo nos referiremos a este compuesto como 'ftalida' de manera general, aunque lo conveniente sería referirse a él en términos de *7-azaftalida* o de *pseudoftalida*.

Del mismo modo se presentará el sustrato **19**, una isocrotonan-1,4-diona, que también formará parte de las estructuras estudiadas en este Capítulo. Este compuesto se observó como

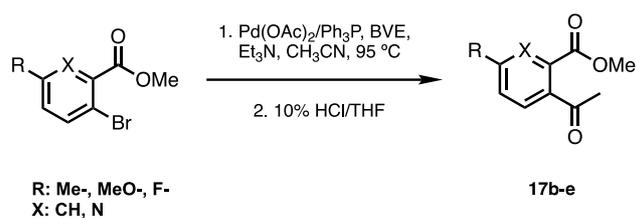
Capítulo 2.

subproducto en ciertas biotransformaciones, como veremos más adelante. La correspondiente 4-hidroxiisocroman-1-ona, **20**, obtenida por bioreducción es a su vez, un precursor directo de la ftalida funcionalizada, **18m**, un producto con un gran potencial sintético.

El 2-acetilbenzoato de metilo (**17a**) se seleccionó como sustrato modelo para el estudio de reducción enzimática. Para su preparación, se realizó, en primer lugar, una esterificación a partir del correspondiente ácido comercial, empleando yoduro de metilo en presencia de una base y DMF como disolvente logrando un rendimiento del 85% (Esquema 45). Una vez obtenido el sustrato, su ftalida (**18a**) racémica, que se utilizara como patrón de referencia para el análisis de los resultados mediante HPLC, se sintetizó mediante una reducción con borohidruro sódico (92% rdto.).

Este mismo protocolo se utilizó para la síntesis del sustrato **17h**, en este caso se partió del ácido comercial 2-benzoilbenzoico (91% rdto.).

La serie de compuestos con modificaciones en el anillo aromático se obtuvo mediante la metodología descrita en el Esquema 43. Se partió del 2-bromobenzoato de metilo (o 3-bromopicolinato en el caso del compuesto **17e**) apropiado, salvo en algunos casos en los que, al no disponer del correspondiente éster, se esterificó el ácido mediante una reacción de Fischer. A continuación, se llevó a cabo una arilación con *n*-butil vinil éter (BVE) catalizada por paladio en condiciones de acoplamiento de Heck.²⁰³ El compuesto arilado resultante se trató directamente con HCl al 10% acuoso en THF a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 h para producir los cetoésteres **17b-e** deseados (72-97% rdto.).

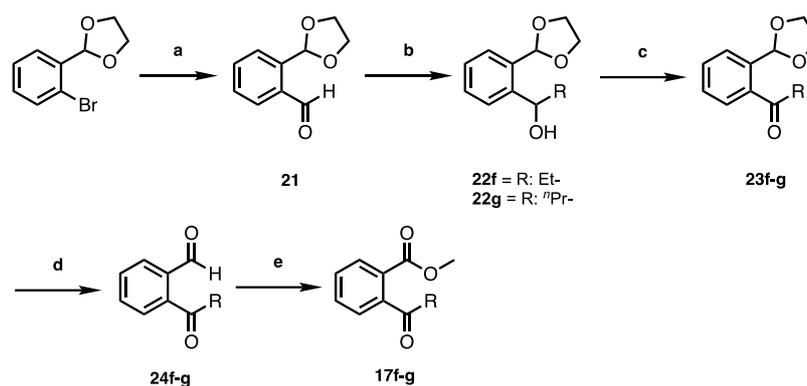


Esquema 43. Condiciones de síntesis de los compuestos **17b-e**.

Las reducciones con borohidruro de sodio de los cetoésteres **17b-e** condujeron a las correspondiente ftalidas racémicas con rendimientos cuantitativos en la mayoría de los casos. Como caso particular, en la reducción del sustrato **17c** se observó la presencia de un subproducto (~23% determinado por ¹H-RMN) de tipo diol. Este compuesto procede de la reducción simultánea de la cetona y del grupo éster.

²⁰³ J. C. Barcia, J. Cruces, J. C. Estévez, R. J. Estévez, L. Castedo, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 5141–5144.

Los sustratos con un sustituyente C3 de cadena alquílica más larga se prepararon a través de la siguiente ruta sintética:



Esquema 44. Condiciones de síntesis de los compuestos **17f-g**; **a**: *n*-BuLi, DMF, THF, -78 °C, 94% rdto.; **b**: RMgBr, THF, 0 °C → t.a., 83-86% rdto.; **c**: sistema TEMPO/NaOCl/NaBr, 91-99% rdto.; **d**: PTSA·H₂O, acetona/H₂O, t.a., 77-99% rdto.; **e**: 1. NaClO₂, H₂O₂, NaH₂PO₄, MeCN/H₂O, 0 °C; 2. MeI, K₂CO₃, DMF, 0 °C → t.a., 52-78% rdto.

Aunque como primera opción se plantearon otras rutas con un menor número de pasos como la utilizada por Zhang y colaboradores,^{180b} sin embargo, no fue posible replicar sus resultados. Por ello, se optó por rutas alternativas, que, aunque tuvieran un mayor número de pasos, llevaran a los cetoésteres con buenos rendimientos.

En nuestro planteamiento definitivo, se partió del 2-bromobenzaldehído protegido, el cual en presencia de una disolución de *n*-BuLi y DMF en THF anhidro y a -78 °C (reacción de Bouveault), condujo al correspondiente aldehído **21** con un 94% rendimiento y sin la necesidad de purificación adicional.

En el siguiente paso se realizó una reacción de Grignard con el reactivo correspondiente acorde a la cadena alquílica deseada, seguida de un *work up* suave, con una disolución acuosa de cloruro amónico saturada, para evitar la desprotección del aldehído. Como resultado se obtuvieron los alcoholes **22f** (83% rdto.) y **22g** (86% rdto.) al igual que en el paso anterior, sin necesidad de purificación adicional.

Se consideró también una ruta alternativa, en esta se partía del 2-bromobenzaldehído sin proteger. En primer lugar, se llevó a cabo la reacción de Grignard, seguida de un paso de oxidación del alcohol formado. Sin embargo, el rendimiento global de ambos pasos fue inferior al de la ruta que parte del aldehído protegido.

En el paso **c** del Esquema **44** se presenta la oxidación de los alcoholes **22f-g** utilizando unas condiciones estándar empleando el sistema TEMPO-NaOCl (oxidación de Anelli). También se probaron otros oxidantes para esta etapa, Dess-Martin y PCC, pero la oxidación

Capítulo 2.

utilizando TEMPO demostró ser significativamente la más rápida y limpia de todas las probadas. Además, se lograron rendimientos casi cuantitativos (91-99%).

En el siguiente paso se desprotegió el aldehído que había estado protegido desde el inicio bajo condiciones suaves de reacción, utilizando un medio acuoso ligeramente ácido empleando PTSA monohidrato.

El último paso, **e**, consta de dos etapas. En primer lugar, se oxidaron los aldehídos **24f-g** hasta los ácidos carboxílicos correspondientes utilizando el sistema clorito sódico-peróxido de hidrógeno (reacción de tipo Pinnick). La siguiente etapa consistió en tratar los crudos de reacción aislados anteriores con el mismo protocolo que el descrito para el sustrato modelo **17a** para su esterificación. Tras realizar una purificación en columna de gel de sílice, se obtuvieron los cetoésteres **17f** y **17g** con unos rendimientos de 78 y 52% respectivamente.

Otras aproximaciones fueron exploradas,²⁰⁴ algunas en un solo paso de reacción a partir de los acetales **23f-g**,²⁰⁵ para sintetizar los cetoésteres **17f-g**. Sin embargo, los crudos obtenidos resultaron ser complejos o con rendimientos muy bajos.

Por último, las ftalidas racémicas correspondientes, **18f** y **18g**, se prepararon utilizando unas condiciones estándar de reducción con NaBH₄ en metanol (91 y 95% rdt. respect.).

Continuando con los sustratos que conforman las α -halocetonas, así como la α -azidocetona, en el Esquema **45** se muestra las relaciones químicas presentes entre estas estructuras. En primer lugar, se comenzó replicando el mismo procedimiento descrito por Booker y colaboradores²⁰⁶ para el sustrato **17i**.

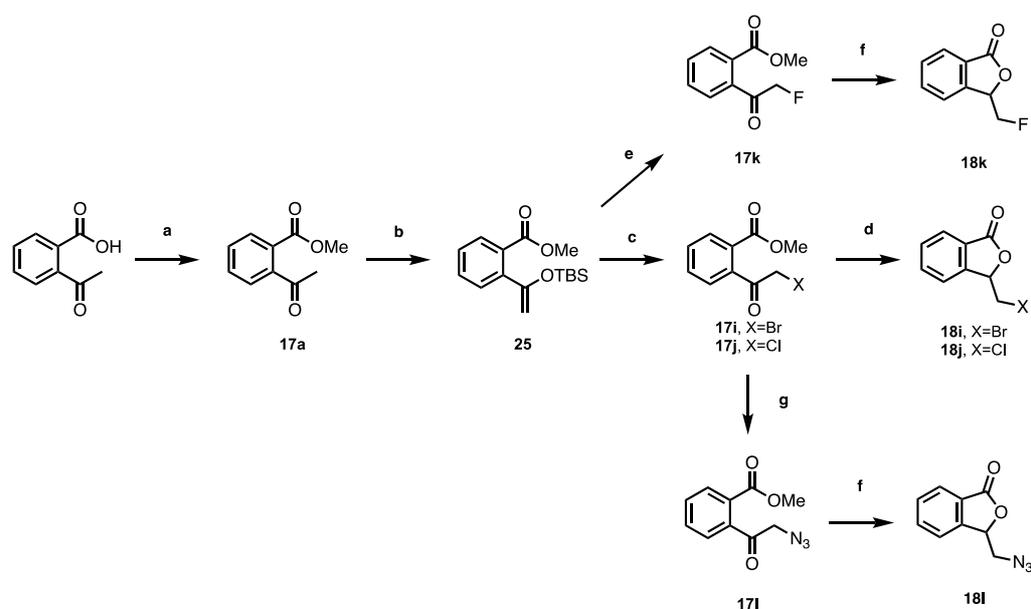
En él, partiendo del compuesto **17a** se llega a un silil enol éter intermedio, **25**, el cual es precursor de todos los demás compuestos. El compuesto **17i** se sintetiza mediante la adición de *N*-bromosuccinimida (NBS) al alqueno **25** en una disolución de THF/H₂O a 0 °C. En nuestro caso se obtuvo con un rendimiento del 85% después de purificarlo por cromatografía en columna. Para el sustrato **17j**, se utilizó *N*-clorosuccinimida (NCS) en vez de la NBS, y manteniendo el resto de condiciones se logró un rendimiento del 91%.

En el caso del sustrato **17i**, se intentó acceder a su correspondiente ftalida mediante una reducción con borohidruro sódico, sin embargo, no se consiguió. En su lugar se obtuvo la ftalida **18a** así como una mezcla de subproductos secundarios.

²⁰⁴ a) R. Gopinath, B. K. Patel, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 577–579. b) D. Talukdar, K. Sharma, S. K. Bharadwaj, A. J. Thakur, *Synlett* **2013**, *24*, 963–966. c) P.-F. Dai, J.-P. Qu, Y.-B. Kang, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 1393–1396.

²⁰⁵ R. Gopinath, A. R. Paital, B. K. Patel, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 5123–5126.

²⁰⁶ B. Wang, J. W. LaMattina, S. L. Marshall, S. J. Booker, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 5788–5797.



Esquema 45. Condiciones de síntesis de los sustratos **17i-l**; **a**: MeI, K_2CO_3 , DMF, $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$, 85% rdto.; **b**: TBSOTf, Et_3N , CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C}$, >99% rdto.; **c**: NBS o NCS, THF/ H_2O , $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$, (Br: 85% rdto., Cl: 91% rdto.); **d**: $Al(O^iPr)_3$, 2-PrOH, tolueno, reflujo, (Br: 96% rdto., Cl: 76% rdto.); **e**: Selectfluor[®], $NaHCO_3$, MeCN/ H_2O , $-10\text{ }^\circ\text{C}$, 93 % rdto.; **f**: $NaBH_4$, MeOH, $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$, (F: 97% rdto., N_3 : 95% rdto.); **g**: NaN_3 , MeCN, t.a., 99% rdto.

La explicación de esta transformación puede atribuirse a que, en ese medio de reacción, el alcohol resultante de la reducción genera un epóxido eliminando el bromo situado en la posición alfa. Este epóxido, al reaccionar nuevamente con un hidruro, se abriría y el alcohol formado, esta vez, se ciclaría con el éster, generando así la ftalida **18a** mayoritariamente.

Tanto para el sustrato **17i** como para el **17j** los mejores resultados se obtuvieron mediante la reducción de Meerwein-Ponndorf-Verley con la que se lograron obtener las correspondientes ftalida **18i** y **18j** con rendimientos de 96 y 76% respectivamente.

La α -fluorocetona **17k** se preparó partiendo del compuesto sililado **25** y utilizando Selectfluor[®] como agente fluorante.²⁰⁷ En este proceso, se obtuvo como subproducto el sustrato modelo **17a**. Se observó que la temperatura jugaba un papel importante en la proporción de estos compuestos, siendo una relación de 3:2 (**17k/17a**) la obtenida cuando la reacción se realiza a temperatura ambiente, mientras que, al llevar a cabo el proceso a $-10\text{ }^\circ\text{C}$ y usando acetonitrilo como disolvente en presencia de bicarbonato de sodio y agua, se logra que la relación de **17k/17a** sea de 24:1, obteniéndose un rendimiento aislado del 93%.

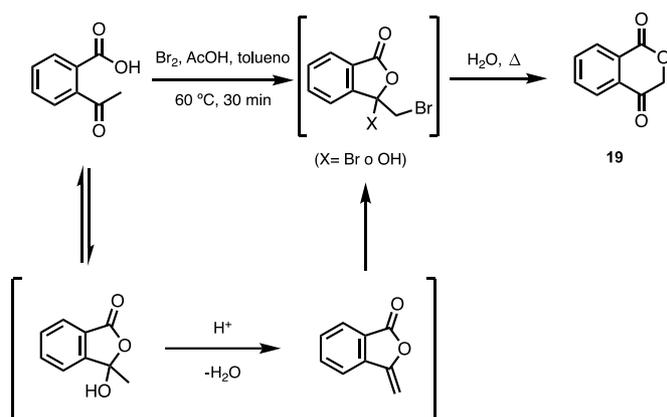
²⁰⁷ P. A. Champagne, J. Desroches, J.-D. Hamel, M. Vandamme, J.-F. Paquin, Chem. Rev. **2015**, *115*, 9073–9174.

Capítulo 2.

Las ftalida racémica **18k** correspondiente se preparó utilizando borohidruro sódico en metanol con un rendimiento del 97% y sin la aparición de productos secundarios.

La α -azidocetona se obtuvo a partir del sustrato bromado **17i** utilizando azida de sodio en acetonitrilo a temperatura ambiente durante una noche, logrando una conversión cuantitativa, al igual que su reducción con NaBH_4 para la síntesis de la ftalida racémica **18l**.

Existen varias rutas descritas en la bibliografía^{203,208} para la preparación de la isocroman-1,4-diona, **19**. Todas ellas presentan puntos en común, pero con ligeras diferencias entre ellas. Nosotros también realizamos alguna adaptación al respecto como se expone en la Sección 2.9.



Esquema 46. Condiciones de síntesis del sustrato **19**.

El primer paso se inicia con la bromación en medio ácido del ácido 2-acetilbenzoico. El medio ácido se requiere para desplazar el equilibrio tautomérico entre la forma abierta (ácido 2-acetilbenzoico) y la cíclica (3-hidroxi-3-metilisobenzofuran-1(3H)-ona). A este proceso le sigue una deshidratación hacia la olefina terminal que se broma para dar un compuesto intermedio, mono- o dibromado (Esquema 46).

Una vez completada la bromación, se añadió agua y la mezcla bifásica resultante se calentó a reflujo, durante la noche. El producto, **19**, se aisló con un rendimiento del 77% y una pureza adecuada para continuar sin necesidad de una mayor purificación para los siguientes pasos.

²⁰⁸ a) H. Britton, D. Catterick, A. N. Dwyer, A. H. Gordon, S. G. Leach, C. McCormick, C. E. Mountain, A. Simpson, D. R. Stevens, M. W. J. Urquhart, C. E. Wade, J. Warren, N. F. Wooster, A. Zilliox, *Org. Process Res. Dev.* **2012**, *16*, 1607–1617. b) M. O. Duffey, D. England, S. Freeze, Z. Hu, S. P. Langston, C. McIntyre, H. Mizutani, K. Ono, H. Xu, *PCT Int. Appl. WO 2016004136 A1*, **2015**.

La reducción de **19** con NaBH₄ conduce a la 4-hidroxiisocroman-1-ona **20** con un rendimiento del 83%.

2.5. Cribado enzimático inicial y optimización de las condiciones de reacción.

La metodología de trabajo en esta sección fue similar a la utilizada durante el Capítulo anterior. Inicialmente se realizó un cribado de los catalizadores utilizando como sustrato el compuesto **17a**, elegido como modelo. Tras seleccionar los catalizadores más prometedores se procedió a la optimización de los parámetros de reacción, así como la aplicación de las condiciones encontradas al resto de compuestos que forman este estudio.

Dentro de esta sección, se han dividido en dos grandes bloques los sustratos de estudio. El primero abarcará las moléculas con modificaciones en el anillo aromático, tanto con sustituyentes que presenten diferentes efectos electrónicos, así como un ejemplo de naturaleza heterocíclica (**17e**).

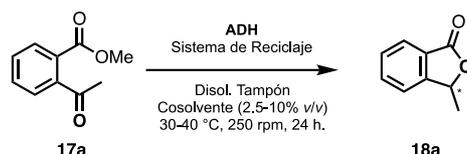
El segundo bloque se centrará en el estudio de los sustratos en los que se ha sustituido el metilo de la cetona por un sustituyente fenilo o cadenas de alquilo más voluminosas; así como metilos sustituidos con grupos que permitan posteriores transformaciones en la molécula, como los halógenos o el grupo azida. También en este bloque se ha considerado el análisis del sustrato isocroman-1,4-diona **19**.

En el *screening* inicial para sustrato modelo **17a** se probaron 24 alcohol deshidrogenasas comerciales de la casa Codexis® junto con otras cinco sobreexpresadas en *E. coli*: las ADH's con selectividad *Prelog* de *Ralstonia sp.* (*Ras*-ADH), *Rhodococcus ruber* (ADH-A), *Thermoanaerobacter sp.* (ADH-T) y *Thermoanaerobacter ethanolicus* (*TeS*-ADH); y la ADH con selectividad anti-*Prelog* de *Lactobacillus brevis* (*Lb*-ADH).

La concentración del sustrato **17a** se fijó inicialmente en 25 mM y, en aquellas enzimas que toleran alcohol isopropílico como sustrato, se usó un 10% en volumen de 2-PrOH (50 µL) para el reciclaje del cofactor. Para las enzimas que toleran mal el 2-PrOH, se utilizó glucosa y glucosa deshidrogenasa (GDH) como sistema para regenerar el cofactor. En todas ellas se utilizó una disolución amortiguadora de fosfato de potasio (KPi) 100 mM (300 mM para los ensayos con sistema de glucosa/GDH) con pH 7.0 que contenía un 1.0 mM de MgCl₂·6 H₂O y el cofactor correspondiente (1.0 mM concentración final), en un volumen final de 500 µL. Para los ensayos con el sistema de glucosa/GDH, al no usar 2-PrOH, se usó un 2.5% de DMSO (12.5 µL) como cosolvente para ayudar a disolver el compuesto en la fase acuosa.

Capítulo 2.

Tabla 8. Biotransformaciones seleccionadas para el sustrato **17a** en la ftalida **18a**^{a)}.



Entrada	ADH	c /mM	Disol. Tampón	Sistema de Reciclaje	Producto-18a ^{b)}	
					Rdto./%	ee/%
1	P1-B10	25	KPi pH 7.0	NADP ⁺ /2-PrOH	90	>99 (S)
2	P1-H08	25	KPi pH 7.0	NADP ⁺ /2-PrOH	96	99 (S)
3	P2-D03	25	KPi pH 7.0	NADP ⁺ /2-PrOH	>99	98 (S)
4	P2-D11	25	KPi pH 7.0	NADP ⁺ /2-PrOH	97	>99 (S)
5	P2-D12	25	KPi pH 7.0	NADP ⁺ /2-PrOH	91	>99 (S)
6	P3-G09	25	KPi pH 7.0	NADP ⁺ /2-PrOH	70	>99 (R)
7	Ras-ADH	25	KPi pH 7.0	NADP ⁺ /2-PrOH	26	>99 (S)
8	ADH-A	25	KPi pH 7.0	NAD ⁺ /2-PrOH	54	>99 (S)
9	P2-D11	100	KPi pH 7.0	NADP ⁺ /2-PrOH	89	>99 (S)
10	P2-D11	200	KPi pH 7.0	NADP ⁺ /2-PrOH	82	>99 (S)
11	P2-D11	300	KPi pH 7.0	NADP ⁺ /2-PrOH	79	>99 (S)
12	P2-D12	100	KPi pH 7.0	NADP ⁺ /2-PrOH	88	>99 (S)
13	P2-D12	200	KPi pH 7.0	NADP ⁺ /2-PrOH	81	>99 (S)
14	P2-D12	300	KPi pH 7.0	NADP ⁺ /2-PrOH	80	>99 (S)
15	P2-D12	300	Tris-HCl pH 7.0	NADP ⁺ /2-PrOH	86	>99 (S)
16	P2-D12	300	Tricina pH 7.5	NADP ⁺ /2-PrOH	77	>99 (S)
17	P2-D12	300	MES pH 7.5	NADP ⁺ /2-PrOH	82	>99 (S)
18	P2-D12	500	Tris-HCl pH 7.0	NADP ⁺ /2-PrOH	57	>99 (S)
19 ^{c)}	P2-D12	500	Tris-HCl pH 7.0	NADP ⁺ /2-PrOH	58	>99 (S)
20 ^{c)}	P2-D12^{d)}	300	Tris-HCl pH 7.0	NADP⁺/2-PrOH	97	>99 (S)
21	P3-G09	25	Tris-HCl pH 7.0	NADP⁺/2-PrOH	80	>99 (R)

^{a)} Condiciones de reacción: **17a** (25-500 mM), ADH: 2.0 mg para las enzimas de Codexis o 10 mg para *E. coli*. *Sist. Reci. 2-PrOH*: Disol. tampón 100 mM con 1.0 mM de MgCl₂·6 H₂O (400 μL), 2-PrOH (50 μL, 10% v/v), cofactor (50 μL, 1.0 mM). *Sist. Reci. glucosa/GDH*: Disol. tampón 100 mM con 1.0 mM de MgCl₂·6 H₂O (418 μL), DMSO (12.5 μL, 2.5% v/v), cofactor (50 μL, 1.0 mM), D-Glucosa (7.2 mg, 80 mM), GDH-105 (20 μL, 6U). Volumen final 500 μL. 30 °C, 24 h y 250 rpm. ^{b)} Rendimiento analítico calculado mediante regresión lineal, los valores *ee* se determinaron mediante análisis HPLC. ^{c)} El ensayo se llevó a cabo a 40 °C. ^{d)} 4 mg de enzima.

Después de ser incubadas durante 24 h a 30 °C y con agitación orbital (250 rpm) se analizaron los resultados por HPLC y se seleccionaron los mejores bajo estas condiciones. Para la (*S*)-ftalida **18a** se identificaron varias ADH's prometedoras (entradas 1-5 de la Tabla 8) que mostraron una alta conversión (>90% rdto.) y una excelente enantioselectividad en todos los casos (≥98% *ee*). En cuanto a las ADH's sobreexpresadas en *E. coli*, en general, se obtuvo un bajo o nulo desempeño siendo la ADH-A la más destacada con un rendimiento del 54% y un exceso enantiomérico >99% para la (*S*)-**18a** (entrada 8). Para el (*R*)-enantiómero, al disponer de un menor número de enzimas *anti-Prelog*, los mejores resultados en comparación fueron más limitados. La enzima P3-G09 mostró el mejor rendimiento logrando un 70% y un exceso enantiomérico >99% (entrada 6).

Resultados y Discusión

Después de analizar los datos obtenidos en el cribado inicial, el siguiente paso en el proceso de optimización fue aumentar la cantidad de sustrato. Se seleccionaron los catalizadores más prometedores para la obtención de la (*S*)-ftalida y se fue aumentando gradualmente la cantidad de sustrato hasta alcanzar los 300 mM. En este punto, con la enzima P2-D12 se logró un rendimiento del 80% y manteniéndose el exceso enantiomérico perfecto (>99%, entrada 14). Se realizaron pruebas a concentraciones aún mayores, sin embargo, se observó una notable disminución en el rendimiento, alcanzándose tan sólo un 62% de transformación utilizando la misma enzima a una concentración de sustrato de 400 mM.

A continuación, se emplearon distintos tipos de disoluciones amortiguadoras para determinar su influencia en las transformaciones. Entre todas las opciones, seleccionamos algunos de los más utilizados, como son el Tris·HCl, MES, o la disolución amortiguadora de Tricina.

Las comparativas entre ellos se realizaron con una concentración de sustrato de 300 mM y empleando la enzima P2-D12. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla 8, entradas 15-17. Se observó que empleando una disolución amortiguadora de Tris·HCl, el rendimiento mejoró un 6% en comparación con el resultado conseguido con el tampón fosfato.

Adicionalmente, se llevaron a cabo pruebas modificando el pH inicial de los ensayos, así como variando la proporción de 2-PrOH empleada. Sin embargo, todas estas modificaciones condujeron a resultados inferiores en comparación con los obtenidos anteriormente. Por lo tanto, se decidió dejar fijado el pH en un valor de 7.0 y mantener la proporción de 2-PrOH en un 10% en volumen.

El último de los parámetros analizados fue el de la temperatura. Para poder apreciar mejor la repercusión de la temperatura se aumentó la concentración de trabajo hasta los 500 mM. Al aumentarla hasta 40 °C, se vio una ligera mejora en el resultado respecto al ensayo a 30 °C (entradas 18 y 19).

En las dos últimas entradas de la Tabla 8, se aplicaron los parámetros previamente optimizados y se obtuvieron los mejores resultados para el sustrato **18a**. Para la (*S*)-ftalida se alcanzó una conversión casi completa utilizando la enzima P2-D12 (4 mg) y una concentración de sustrato de 300 mM (97% rdt., >99% *ee*, entrada 20).

En el caso de la (*R*)-ftalida, se consiguió mejorar el resultado inicial obtenido con la enzima P3-G09 al sustituir el tampón fosfato por la disolución amortiguadora de Tris·HCl, alcanzando un rendimiento del 80% y una completa enantioselectividad (*ee* >99%, entrada 21).

Capítulo 2.

En el siguiente gráfico se muestra un resumen del proceso de optimización del sustrato **17a** con la enzima P2-D12.

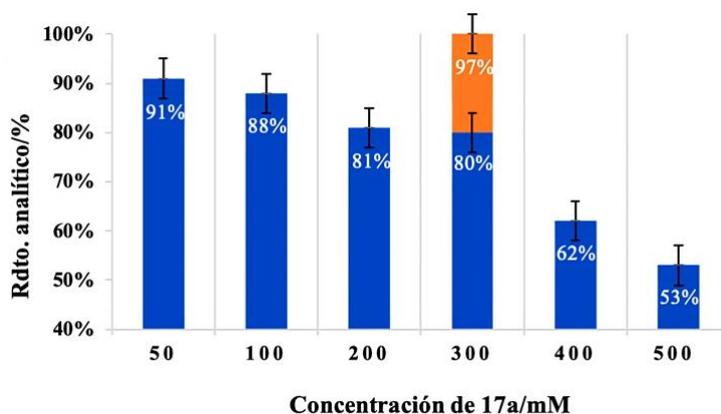


Figura 14. Efecto de la concentración de sustrato en la biotransformación de **17a** con la enzima P2-D12. Las condiciones óptimas de biotransformación se muestran en la barra naranja (entrada 20, Tabla 8).

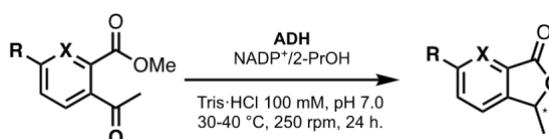
Las condiciones óptimas de trabajo establecidas para el sustrato modelo **17a**, se aplicaron al resto de los sustratos sintetizados. En primer lugar, se exponen los resultados obtenidos para los sustratos con sustitución en el anillo.

El estudio se continuó con el sustrato **17b**, que presenta un sustituyente metilo en la posición 5 del anillo. Para este sustrato se encontró una pareja de enzimas enantiocomplementarias que permiten acceder a ambas configuraciones de la ftalida **18b**. Así, con la enzima P1-A12 se obtiene el enantiómero de configuración *R* con un rendimiento analítico de 58% y un exceso enantiomérico de 93% (entrada 1, Tabla 9). Por otro lado, para el enantiómero *S*, destacan los resultados obtenidos con la enzima P1-H08, la concentración de sustrato se incrementó hasta 150 mM manteniendo tanto un rendimiento como un exceso enantiomérico elevados (98% rdto., 99% *ee*, entrada 4). La enzima P2-D11 proporcionó también un buen resultado con una concentración de sustrato de 25 mM, obteniéndose un único enantiómero (>99% *ee*, entrada 5) con elevado rendimiento, sin embargo, al aumentar la concentración de sustrato, se observó un descenso tanto del exceso enantiomérico como del rendimiento global (86% rdto., 98% *ee*, entrada 6).

Los resultados obtenidos con el sustrato **17c**, que presenta un sustituyente fluorado en la posición 5 del anillo fueron semejantes a los obtenidos con el sustrato anterior. La enzima con selectividad *Prelog* P2-D12 permitió acceder a la (*S*)-ftalida **18c** con un rendimiento del 94% y un exceso enantiomérico >99%, (entrada 10) para una concentración de trabajo de 100 mM. Por otro lado, con la enzima P2-G03 se obtuvo la correspondiente (*R*)-ftalida con unos rendimientos moderados (entradas 11-13). No obstante, es importante mencionar que con dicha enzima se

realizaron pruebas a distintas temperaturas, observándose que el exceso enantiomérico aumentaba con la temperatura, llegando a ser >99% a 40 °C (entrada 13).

Tabla 9. Biotransformaciones seleccionadas para los sustratos **17b-e** en la ftalidas **18b-e**^{a)}.



Entrada	Sustrato			ADH	T/°C	Producto		
	R	[mM]				Rdto./% ^{b)}	ee/% ^{b)}	
1	17b	Me	25	P1-A12	30	18b	58	93 (R)
2	17b	Me	25	P1-H08	30	18b	>99	99 (S)
3	17b	Me	100	P1-H08	30	18b	>99	99 (S)
4	17b	Me	150	P1-H08	30	18b	98	99 (S)
5	17b	Me	25	P2-D11	30	18b	93	>99 (S)
6	17b	Me	100	P2-D11	30	18b	86	98 (S)
7	17c	F	25	P1-A12	30	18c	43	94 (R)
8	17c	F	25	P2-D12	30	18c	>99	>99 (S)
9	17c	F	50	P2-D12	30	18c	>99	>99 (S)
10	17c	F	100	P2-D12	30	18c	94	>99 (S)
11	17c	F	25	P2-G03	30	18c	37	97 (R)
12	17c	F	25	P2-G03	37	18c	38	98 (R)
13	17c	F	25	P2-G03	40	18c	31	>99 (R)
14	17d	MeO	25	P2-D12	37	18d	85	96 (S)
15	17d	MeO	25	P2-G03	30	18d	20	99 (R)
16	17e	-	25	P1-B02	30	18e	99	99 (S)
17	17e	-	50	P1-B02	30	18e	94	99 (S)
18	17e	-	25	P2-D12	37	18e	>99	98 (S)
19	17e	-	50	P2-D12	37	18e	98	98 (S)
20	17e	-	100	P2-D12	37	18e	96	98 (S)
21	17e	-	25	P2-G03	30	18e	54	98 (R)
22	17e	-	25	P3-G09	30	18e	75	97 (R)

^{a)} Condiciones de reacción: sustrato (25-150 mM), ADH: 2.0 mg. *Sist. Recic. 2-PrOH*: Disol. tampón (Tris-HCl 100 mM) con 1.0 mM de MgCl₂·6 H₂O (400 μL), 2-PrOH (50 μL, 10% v/v), NADP⁺ (50 μL, 1.0 mM). Volumen final 500 μL. 30-40 °C, 24 h y 250 rpm. ^{b)} Rendimiento analítico calculado mediante regresión lineal, los valores *ee* se determinaron mediante análisis HPLC.

Para el sustrato **17d**, a diferencia de los sustratos anteriores, los resultados mostrados en el **Tabla 9** son los únicos que cumplían la condición de enantioselectividad elevada para para ambas configuraciones de la ftalida **18d** (entradas 14 y 15). Con el resto de enzimas seleccionadas para este sustrato (no incluidas en la tabla), se observaron en su mayoría relaciones enantioméricas cercanas a 80:20, así como cantidades significativas de sustrato sin reaccionar, incluso a una concentración de 25 mM.

Para concluir esta serie de sustratos con variaciones en el anillo, se abordó el sustrato con un anillo de piridina, derivado del ácido picolínico, **17e**. En esta ocasión se llevó a cabo un

Capítulo 2.

cribado de enzimas más amplio que con el resto de sustratos en esta categoría debido a que, considerando su naturaleza heterocíclica, suponíamos que el comportamiento de los biocatalizadores podría diferir en mayor medida respecto al sustrato modelo que con el resto de los sustratos estudiados. No obstante, al analizar los resultados obtenidos, encontramos una gran similitud en cuanto a los catalizadores más eficientes para esta transformación, y aquellos que lo eran con el sustrato modelo **17a**.

Los resultados más significativos se detallan en las entradas 16-22 de la Tabla **9**, donde destacan de nuevo con unas conversiones notables las enzimas *Prelog*. En las entradas 21 y 22 se destacan los resultados para las anti-*Prelog* siendo estos en general moderados. En general, los excesos enantioméricos obtenidos fueron altos. Cabe destacar la actividad de la enzima P2-D12, la cual permitió aumentar la concentración del sustrato hasta 100 mM sin comprometer el rendimiento y la enantioselectividad, alcanzando un 96% de rendimiento y un 98% de exceso enantiomérico (entrada 20).

A continuación, se describen los resultados obtenidos con los sustratos que presentan modificaciones en el sustituyente menos voluminoso de la cetona. En este bloque encontraremos grupos estéricamente algo más exigentes como un grupo fenilo (**17h**), etilo (**17f**), propilo (**17g**), azidometilo (**17l**), o halometilo (**17i-k**). En la Tabla **10** se muestran algunas de las pruebas realizadas para los sustratos **17f-h**.

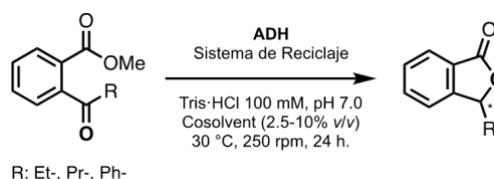
En términos generales, se ha logrado identificar una pareja complementaria de enzimas en todos los casos. No obstante, se observaron excesos enantioméricos y rendimientos inferiores a los obtenidos previamente. Es por ello, que en algunos casos, se optó por reducir la concentración de trabajo por debajo de 25 mM, como suele ser habitual.

Para el sustrato **17f**, el mejor resultado para la (*S*)-ftalida se obtuvo utilizando la enzima P2-D11, la cual consiguió obtener la ftalida (*S*)-**18f** con un rendimiento del 80% y un exceso enantiomérico del 94% para una concentración de 25 mM (entrada 1). Se llevaron a cabo pruebas, incrementando la concentración de sustrato, sin embargo, los rendimientos disminuían abruptamente, llegando a descender a un nivel cercano al 50% de conversión para una concentración de 100 mM, observándose también un descenso del exceso enantiomérico (93% de *ee*, entrada 3). En cuanto a la ftalida complementaria, el mejor resultado se logró con la enzima P3-G09, aunque el rendimiento no fue satisfactorio, llegando sólo a un 28% de conversión y un exceso enantiomérico del 90% (entrada 4).

El sustrato **17g**, con el sustituyente propilo, presentó nuevos desafíos, dada su mayor demanda estérica. Se obtuvieron resultados desfavorables en general (entradas 5-10). Se optó por reducir la concentración a 10 mM para mejorar los rendimientos de aquellas enzimas que mostraron una actividad mayor, pero tan solo con la enzima P2-D11 se llegó a un 56% de rendimiento, con un exceso enantiomérico del 88% (entrada 8). En el resto de casos, los

rendimientos, independientemente de la concentración de trabajo, oscilaban entre un 15 y un 40% y los excesos enantioméricos se situaron alrededor del 90%.

Tabla 10. Biotransformaciones seleccionadas para los sustratos **17f-h** en la ftalidas **18f-h** ^{a)}.



Entrada	Sustrato			ADH	Sistema de Reciclaje	Producto ^{b)}		
	R	[mM]				Rdto./%	ee/%	
1	17f	Et	25	P2-D11	NADP ⁺ /2-PrOH	18f	80	94 (S)
2	17f	Et	50	P2-D11	NADP ⁺ /2-PrOH	18f	76	94 (S)
3	17f	Et	100	P2-D11	NADP ⁺ /2-PrOH	18f	54	93 (S)
4	17f	Et	25	P3-G09	NADP ⁺ /2-PrOH	18f	28	90 (R)
5	17g	Pr	25	P1-H08	NADP ⁺ /2-PrOH	18g	31	91 (S)
6	17g	Pr	10	P1-H08	NADP ⁺ /2-PrOH	18g	38	91 (S)
7	17g	Pr	25	P2-D11	NADP ⁺ /2-PrOH	18g	33	88 (S)
8	17g	Pr	10	P2-D11	NADP ⁺ /2-PrOH	18g	56	88 (S)
9	17g	Pr	25	P3-G09	NADP ⁺ /2-PrOH	18g	11	90 (R)
10	17g	Pr	10	P3-G09	NADP ⁺ /2-PrOH	18g	18	90 (R)
11	17h	Ph	25	P2-D11	NADP ⁺ /2-PrOH	18h	63	>99 (S)
12	17h	Ph	15	101	NADP ⁺ /glu/GDH	18h	24	>99 (R)

^{a)} Condiciones de reacción: sustrato (10-100 mM), ADH: 2.0 mg. *Sist. Reci. 2-PrOH*: Disol. tampón (Tris-HCl 100 mM) con 1.0 mM de MgCl₂·6 H₂O (400 μL), 2-PrOH (50 μL, 10% v/v), NADP⁺ (50 μL, 1.0 mM). *Sist. Reci. glucosa/GDH*: Disol. tampón (Tris-HCl 100 mM) con 1.0 mM de MgCl₂·6 H₂O, pH 7.0 (418 μL), DMSO (12.5 μL, 2.5% v/v), NADP⁺ (50 μL, 1.0 mM), D-Glucosa (7.2 mg, 80 mM), GDH-105 (20 μL, 6U). Volumen final 500 μL. 30 °C, 24 h y 250 rpm. ^{b)} Rendimiento analítico calculado mediante regresión lineal, los valores ee se determinaron mediante análisis HPLC.

En el último sustrato de esta serie, **17h**, con un sustituyente fenilo, se observó una baja o nula actividad entre la mayoría de enzimas evaluadas. Sólo dos resultados destacables se presentan en la Tabla **10** anterior (entradas 11 y 12). Es importante destacar que de todas las enzimas evaluadas (*screening* completo) sólo 7 mostraron actividad, el porcentaje de producto formado en el resto de las biotransformaciones fue ≤3%. Aunque las mejores conversiones observadas fueron tan solo moderadas, la enantioselectividad fue muy elevada en todos los casos, consiguiéndose excesos enantioméricos superiores al 99%. En el caso de la enzima P2-D11, mejor ensayo obtenido, se alcanzó una transformación del 63% y un exceso enantiomérico >99% para la (*S*)-**18h** (entrada 11).

Dada la baja solubilidad del sustrato en el medio de reacción se estudió la influencia de otros parámetros como la temperatura (ensayos a 40 °C), o el uso de otros cosolventes (DMSO o MTBE) pero los resultados de estos ensayos no mejoraron o fueron incluso inferiores a los obtenidos en las condiciones iniciales, a pesar de conseguir una mayor solubilidad del sustrato. En aquellas pruebas en las que se empleó una concentración más alta de cosolvente (10-15% v/v), se observó, además, un descenso en el exceso enantiomérico considerable.

Capítulo 2.

A continuación, se describen los procesos biocatalíticos con las α -haloacetonas **17i** (Br), **17j** (Cl) y **17k** (F).

El primer sustrato estudiado en este grupo fue el **17i**, con el que se llevó a cabo un cribado inicial con un grupo seleccionado de enzimas. Al analizar los crudos obtenidos de estas reducciones enzimáticas, se observaron picos adicionales en los cromatogramas de HPLC que no correspondían a las señales esperadas de la ftalida **18i** o del sustrato **17i**. Además, en alguno de los cromatogramas se podía constatar que no se trataba de meras impurezas sino que incluso eran el producto mayoritario de la reacción.

El análisis de RMN de estos productos, permitió identificarlos como la 4-hidroxiisocroman-1-ona, **20**. La explicación de la formación de estos productos es sencilla: el sustrato (**17i**) experimenta un proceso espontáneo de hidrólisis en el medio de reacción, sustituyéndose el halógeno por un grupo hidroxilo, que evoluciona hasta la isocroman-1,4-diona **19**, mediante un proceso de lactonización intramolecular. En algunos casos, este nuevo compuesto es un sustrato reconocido por la ADH correspondiente, lo que da lugar al correspondiente producto de reducción, **20**.

Considerando que la competencia de la reacción de hidrólisis en el medio de reacción sería difícil de evitar con el derivado bromado, se decidió utilizar el derivado clorado **17j** como sustrato modelo para este grupo de sustratos halogenados, basándonos en que, lógicamente, con un peor grupo saliente, esta reacción secundaria debería de ser significativamente inferior. Después de establecer el método de análisis que permite identificar todos los posibles productos de la reacción, se procedió a realizar un cribado completo con todas las enzimas disponibles.

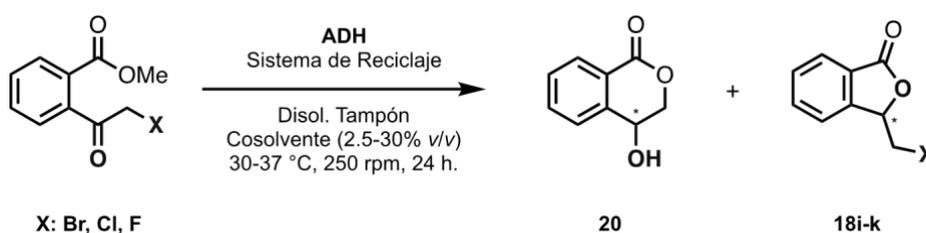
Del cribado enzimático se obtuvieron varios ensayos con resultados muy prometedores que respaldaron nuestra premisa inicial sobre la menor competencia de la hidrólisis para este sustrato. Respecto a las enzimas con selectividad *Prelog*,²⁰⁹ los mejores resultados se muestran en la Tabla **11** (entradas 1-3). En ellas podemos ver que, aunque el subproducto **20** se sigue formando, lo hace en un porcentaje inferior al 15% en todos los casos. Los rendimientos analíticos obtenidos son altos ($\geq 80\%$) al igual que los excesos enantioméricos ($\geq 97\%$ de *ee*). Con la KRED-101 se obtienen los mejores resultados para la (*S*)-ftalida **18j** con un rendimiento del 81% y de forma totalmente enantioselectiva ($>99\%$ de *ee*, entrada 4).

En algunos ensayos, al analizar los resultados se han encontrado situaciones en las que el producto principal de la reacción se ha obtenido con un rendimiento bajo, pero el rendimiento del compuesto **20** es, teniendo en cuenta que su presencia depende de la velocidad de hidrólisis/ciclación espontánea para ser transformado por la ADH, relativamente alto. Ejemplo de ello es el ensayo de la enzima sobreexpresada *Ras*-ADH; en él se obtiene (*R*)-**18j** sólo con un

²⁰⁹ Según las *Reglas de Prioridad* de Cahn-Ingold-Prelog para este tipo de sustratos, hay un cambio de la prioridad relativa de los sustituyentes debido a la presencia del heteroátomo, por lo que con las enzimas *Prelog* se obtienen los enantiómeros *R* y con las anti-*Prelog*, los *S*.

25% rendimiento, pero, a su vez, el compuesto **20** se forma con un 57% y con un 91% de exceso enantiomérico (entrada 5).

Tabla 11. Biotransformaciones seleccionadas para los sustratos **17i-k** en la ftalidas **18i-k**^{a)}.



Entrada	Sustrato		ADH	Disol. Tampón	Sistema de Reciclaje	20 ^{b)}		Producto ^{a),b)}		
	[mM]					Rdto. /%	ee/%	Rdto. /%	ee/%	
1	17j	25	P1-B10	Tris-HCl	NADP ⁺ /2-PrOH	14	35 (R)	18j	80	>99 (R)
2	17j	25	P1-B12	Tris-HCl	NADP ⁺ /2-PrOH	9	23 (R)	18j	90	98 (R)
3	17j	25	P2-B02	Tris-HCl	NADP ⁺ /2-PrOH	6	97 (S)	18j	93	97 (S)
4	17j	25	101	Tris-HCl	NADP ⁺ /glu/GDH	3	n.d.	18j	81	>99 (S)
5	17j	25	Ras-ADH	Tris-HCl	NADP ⁺ /2-PrOH	57	91 (R)	18j	25	96 (R)
6	17j	50	P1-B10	Tris-HCl	NADP ⁺ /2-PrOH	13	35 (R)	18j	80	>99 (R)
7	17j	50	P1-B10^{d)}	Tris-HCl	NADP⁺/2-PrOH	6	33 (R)	18j	91	>99 (R)
8	17j	100	P1-B10 ^{c),d)}	Tris-HCl	NADP ⁺ /2-PrOH	5	n.d.	18j	79	>99 (R)
9	17j	50	P1-B10 ^{d)}	Tricina	NADP ⁺ /2-PrOH	19	30 (R)	18j	73	>99 (R)
10	17j	25	101	Tricina	NADP ⁺ /glu/GDH	<1	n.d.	18j	82	>99 (S)
11	17j	50	101	Tricina	NADP⁺/glu/GDH	2	n.d.	18j	80	>99 (S)
12	17i	25	P1-C01	Tris-HCl	NADP ⁺ /2-PrOH	11	94 (S)	18i	25	84 (R)
13	17i	25	P2-B02	Tris-HCl	NADP ⁺ /2-PrOH	7	95 (S)	18i	45	90 (S)
14	17i	25	P2-H07	Tris-HCl	NADP ⁺ /2-PrOH	5	n.d.	18i	15	>99 (S)
15	17i	25	P1-B10	Tris-HCl	NADP ⁺ /2-PrOH	12	24 (R)	18i	35	>99 (R)
16	17i	25	P1-B12	Tris-HCl	NADP ⁺ /2-PrOH	12	14 (R)	18i	26	99 (R)
17	17i	25	101	Tricina	NADP ⁺ /glu/GDH	<1	n.d.	18i	15	>99 (S)
18	17k	25	P1-B10	Tris-HCl	NADP ⁺ /2-PrOH	9	30 (R)	18k	48	99 (R)
19	17k	25	P2-D12	Tris-HCl	NADP⁺/2-PrOH	9	86 (S)	18k	91	98 (R)
20	17k	50	P2-D12	Tris-HCl	NADP ⁺ /2-PrOH	6	82 (S)	18k	83	98 (R)
21	17k	25	101	Tricina	NADP⁺/glu/GDH	2	n.d.	18k	81	>99 (S)

^{a)} Condiciones de reacción: sustrato (25-100 mM), ADH: 2.0 mg para las enzimas de Codexis o 10 mg para *E. coli*. Disol. tampón: Tris-HCl 100 mM pH 7.0 o Tricina (100 mM) pH 7.5 (ambas con 1.0 mM de MgCl₂·6 H₂O). *Sist. Recic. 2-PrOH*: Disol. tampón (400 μL), 2-PrOH (50 μL, 10% v/v), NADP⁺ (50 μL, 1.0 mM). *Sist. Recic. glucosa/GDH*: Disol. tampón (418 μL), DMSO (12.5 μL, 2.5% v/v), NADP⁺ (50 μL, 1.0 mM), D-Glucosa (7.2 mg, 80 mM), GDH-105 (20 μL, 6U). Volumen final 500 μL. 30 °C, 24 h y 250 rpm. ^{b)} Rendimiento analítico calculado mediante regresión lineal, los valores ee se determinaron mediante análisis HPLC. ^{c)} 5 mg de enzima. ^{d)} El ensayo se llevó a cabo a 37 °C n.d.: no determinado.

Teniendo en cuenta este resultado, nos planteamos la posibilidad de incorporar la isocroman-1,4-diona **19** a nuestro panel de sustratos, para el estudio de su bioreducción hasta el compuesto **20**. Además, como se ha comentado antes de manera sucinta, el producto de

Capítulo 2.

reducción **20** podría ser fácilmente transformado en la hidroximetilftalida **18m** mediante una reducción de anillo.²¹⁰ Este estudio y la derivatización correspondiente se describen más adelante tras finalizar la exposición de los resultados con los sustratos halogenados.

Continuando con los ensayos realizados para el compuesto **17j**, se procedió a la optimización de los procesos en los que se obtuvieron mejores resultados, siendo las enzimas enantiocomplementarias P1-B10 y 101 las seleccionadas. En el caso de la P1-B10, se aumentó la concentración de sustrato (50-100 mM) y se hicieron pruebas a diferentes temperaturas. También se estudió el efecto de la adición de un cosolvente (DMSO, 10 % v/v) con el fin de incrementar la solubilidad del sustrato, así como el uso de diferentes disoluciones tampón, pero estas últimas variaciones no mejoraron el rendimiento. Las mejores condiciones para obtener la ftalida (*R*)-**18j** se muestran en la entrada 7, donde la enzima P1-B10 logró un rendimiento del 91% con un exceso enantiomérico >99% cuando el proceso se lleva a cabo con una concentración de 50 mM. En estas condiciones, la formación del subproducto **20** se redujo a un 6%.

Las condiciones óptimas para la enzima 101 se muestran en la entrada 11, donde, con una concentración de 50 mM de sustrato, se obtiene la ftalida (*S*)-**18j** con un 80% rendimiento y un exceso enantiomérico >99%. Para esta enzima se observó que al emplear una disolución tampón de tricina se moderaba la formación del subproducto **20** llegando a ensayos en los que su presencia era inferior al 1% (entrada 10).

Tras finalizar los ensayos con el sustrato **17j**, se seleccionaron las mejores enzimas y se probaron nuevamente con el sustrato **17i**. Los resultados obtenidos se encuentran en las entradas 12-17 de la tabla anterior. En general, se pueden apreciar rendimientos inferiores, en comparación con los obtenidos con el sustrato clorado, y una mayor formación de **20**, como cabía esperar.

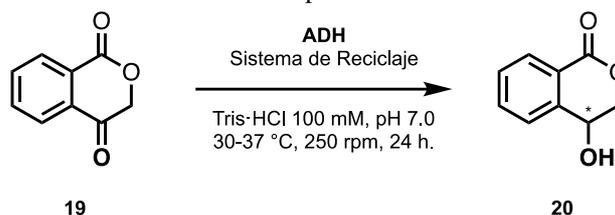
Para finalizar con la serie de α -halocetonas estudiadas, continuaremos con los resultados obtenidos para la ftalida fluorada **18k**. En este caso se probaron sólo una selección de enzimas, con las cuales se obtuvieron resultados muy similares a su homólogo clorado. Los mejores resultados se encontraron con la enzima P2-D12 para la ftalida (*R*)-**18k**, la cual se obtuvo con un rendimiento del 91% y un exceso enantiomérico de 98% (entrada 19). Y, entre las enzimas *anti-Prelog*, de nuevo con la 101 se obtuvieron los mejores resultados para (*S*)-**18k** (81% rdo., >99% *ee*, entrada 21).

A continuación, y como se había comentado, se expondrán los resultados obtenidos en las bio reducciones de la isocroman-1,4-diona (**19**), sustrato precursor de la correspondiente 4-

²¹⁰ Y.-C. Liu, C. Merten, J. Deska, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 12151–12156.

hidroxiisocroman-1-ona (**20**), hasta ahora tratado como subproducto en los ensayos realizados con las α -halocetonas.. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 12. Biotransformaciones seleccionadas para el sustrato **19**^{a)}.



Entrada	ADH	Sistema de Reciclaje	T/°C	20 ^{a)}	
				Rdto./% ^{b)}	ee/% ^{b)}
1	Ras-ADH	NADP⁺/glucosa/GDH	30	88	94 (R)
2	P1-A12	NADP ⁺ /2-PrOH	30	65	97 (S)
3	P2-B02	NADP ⁺ /2-PrOH	30	40	97 (S)
4	P1-C01	NADP ⁺ /2-PrOH	30	40	97 (S)
5	P2-C02	NADP⁺/2-PrOH	30	96	98 (S)
6	P2-C02	NADP ⁺ /2-PrOH	37	92	98 (S)
7	P2-G03	NADP ⁺ /2-PrOH	30	44	96 (S)
8	P2-H07	NADP ⁺ /2-PrOH	30	30	66 (S)
9	130	NADP ⁺ /glucosa/GDH	30	36	92 (R)

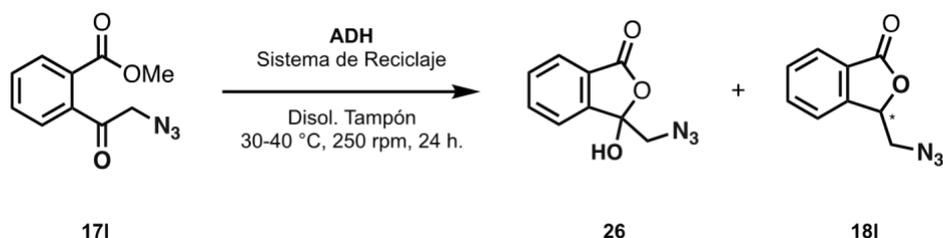
^{a)} Condiciones de reacción: sustrato **19** (25 mM), ADH: 2.0 mg para las enzimas de Codexis o 10 mg para *E. coli*. Disol. tampón: Tris-HCl 100 mM pH 7.0 (con 1.0 mM de MgCl₂·6 H₂O). *Sist. Recic. 2-PrOH*: Disol. tampón (400 μ L), 2-PrOH (50 μ L, 10% v/v), NADP⁺ (50 μ L, 1.0 mM). *Sist. Recic. Glucosa/GDH*: Disol. tampón (418 μ L), DMSO (12.5 μ L, 2.5% v/v), NADP⁺ (50 μ L, 1.0 mM), D-Glucosa (7.2 mg, 80 mM), GDH-105 (20 μ L, 6U). Volumen final 500 μ L. 30 °C, 24 h y 250 rpm. ^{b)} Rendimiento analítico calculado mediante regresión lineal, los valores *ee* se determinaron mediante análisis HPLC.

Nuevamente encontramos varias enzimas enantiocomplementarias que nos permitieron acceder de manera selectiva a ambas configuraciones del alcohol **20**.

Todos los ensayos se realizaron a una concentración de 25 mM. En el caso de la enzima sobreexpresada *Ras*-ADH, se obtuvo un rendimiento del 88%, con un exceso final del 94% (entrada 1, Tabla 12) utilizando como sistema de regeneración del cofactor el sistema de glucosa/GDH (también se usó el sistema de 2-PrOH pero con este, si bien se obtuvo un rendimiento idéntico, el exceso enantiomérico resultante fue peor (91%).

Para obtener el enantiómero opuesto, el mejor resultado fue el obtenido utilizando la enzima P2-C02, con la cual se logró un rendimiento del 96% y un exceso enantiomérico superior, llegando hasta un 98% para (*S*)-**20** (entrada 5, Tabla 12).

Tabla 13. Biotransformaciones seleccionadas para el sustrato **171**.^{a)}



Entrada	ADH	c/mM	T/°C	Sistema de Reciclaje	26		181 ^{a)}	
					Rdto./% ^{b)}	Rdto./% ^{b)}	ee/% ^{b)}	
1	P1-B10	25	30	NADP ⁺ /2-PrOH	5	89	>99	(R)
2	P1-B12	25	30	NADP ⁺ /2-PrOH	2	99	>99	(R)
3	P1-H08	25	30	NADP ⁺ /2-PrOH	9	83	>99	(R)
4	P2-D12	25	30	NADP ⁺ /2-PrOH	7	75	>99	(R)
5	101	25	30	NADP ⁺ /glu/GDH	3	33	>99	(S)
6	130	25	30	NADP ⁺ /glu/GDH	70	16	>99	(R)
7	NADH-101	25	30	NAD⁺/glu/GDH	97	<1	n.d.	
8	<i>Ras</i> -ADH	25	30	NADP ⁺ /2-PrOH	62	20	96	(R)
9	101^{c)}	25	30	NADP⁺/glu/GDH	7	67	>99	(S)
10	P1-B12	50	30	NADP ⁺ /2-PrOH	4	83	>99	(R)
11	P1-B12	50	37	NADP ⁺ /2-PrOH	4	85	>99	(R)
12	P1-B12	50	40	NADP ⁺ /2-PrOH	9	56	>99	(R)
13	P1-B12 ^{d)}	50	37	NADP ⁺ /2-PrOH	3	93	>99	(R)
14^{e)}	P1-B12 ^{d)}	50	37	NADP ⁺ /2-PrOH	4	86	>99	(R)
15	P1-B12^{d)}	40	37	NADP⁺/2-PrOH	2	97	>99	(R)

^{a)} Condiciones de reacción: sustrato **171** (25-50 mM), ADH: 2.0 mg para las enzimas de Codexis o 10 mg para *E. coli*. Disol. tampón: Tris·HCl 100 mM pH 7.0 o Tricina (100 mM) pH 7.5 (ambas con 1.0 mM de MgCl₂·6 H₂O). *Sist. Reci. 2-PrOH*: Disol. tampón (400 μL), 2-PrOH (50 μL, 10% v/v), NADP⁺ (50 μL, 1.0 mM). *Sist. Reci. Glucosa/GDH*: Disol. tampón (418 μL), DMSO (12.5 μL, 2.5% v/v), NADP⁺ (50 μL, 1.0 mM), D-Glucosa (7.2 mg, 80 mM), GDH-105 (20 μL, 6U). Volumen final 500 μL. 30 °C, 24 h y 250 rpm. ^{b)} Rendimiento analítico calculado mediante regresión lineal, los valores *ee* se determinaron mediante análisis HPLC. ^{c)} Disol. Tampón Tricina. ^{d)} 4 mg de enzima. ^{e)} DMSO (25 μL, 5% v/v).

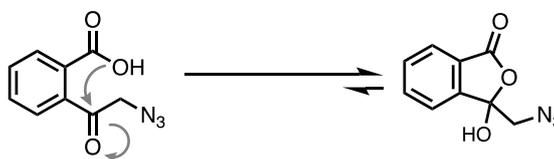
n.d.: no determinado.

Para concluir esta sección, se exponen los resultados obtenidos para la α-azidocetona **171**. Como en los casos anteriores, el estudio se inició con un cribado (casi) completo de las ADH's para tener una visión global previa al proceso de optimización. Al analizar los crudos obtenidos después de las reacciones enzimáticas, se sacaron varias conclusiones. En primer lugar, tan sólo 5 de las 25 ADH's ensayadas consiguieron un rendimiento analítico superior al 55%. No obstante, todas ellas presentaron un exceso enantiomérico elevado (≥97%).

Por otra parte, todos los ensayos presentaron en mayor o menor medida una señal que no se correspondía con las esperadas de la ftalida formada **181** o del sustrato **171**. Este mismo producto se obtuvo también en un ensayo (blanco de reacción) realizado en ausencia de enzima, obteniéndose un valor aprox. 11-13%. Además, en alguno de los ensayos (entrada 7 de la Tabla **13**) este era el único producto formado. Un análisis mediante RMN del producto confirmó que

el compuesto **171** de partida había experimentado un proceso de hidrólisis dando lugar al subproducto **26**, en su forma cíclica más estable.

En la forma abierta de la molécula **26** (Esquema **47**, fig. izda.), el hidrógeno ácido migra del grupo carboxílico al acetilo, formándose un enlace para completar un anillo heterocíclico de cinco miembros (Esquema **47**, fig. dcha.).



Esquema **47**. Tautómeros de *cadena-anillo* del compuesto **26**.

Se ha demostrado que este tautomerismo²¹¹ se produce en una serie de ácidos oxocarboxílicos análogos dando lugar a dicho equilibrio entre la forma cíclica y la abierta como ya habíamos visto previamente con el ácido 2-acetilbenzoico (Esquema **46**).

Como se ha comentado anteriormente, en el caso la enzima NADH-101 (entrada 7) y de otros catalizadores probados, se observó que no sólo se cataliza la formación del compuesto **21**, sino que además se favorece su formación. En la prueba control sin enzima (blanco) se corroboró que existe una cierta hidrólisis inducida por el medio, pero los valores de hidrólisis para estos ensayos enzimáticos son mucho más altos que los valores de la prueba en blanco. Esta diferencia podría deberse a la presencia de alguna proteína endógena del tipo hidrolasa (EC 3) del propio microorganismo huésped, que puede promover la producción de **26** mediante su acción.

La estructura del compuesto **26** se confirmó tras su aislamiento al realizar el escalado del proceso catalizado por la enzima NADH-101 (ver Esquema **48** y/o Sección 2.6), así como, mediante una hidrólisis química convencional utilizando un medio básico para catalizar la hidrólisis del éster (Sección 2.9).

Continuando con los resultados obtenidos del cribado de **171**, las mejores enzimas fueron la P1-B12 para la ftalida (*R*)-**181** (99% rdto., >99% *ee*, entrada 2) y la 101 para la ftalida (*S*)-**181**, con la que se obtuvo un 67% de rendimiento y un exceso enantiomérico >99%, utilizándose en este caso una disolución amortiguadora de tricina (entrada 9).

²¹¹ a) J. Finkelstein, T. Williams, V. Toome, S. Traiman, *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 3229–3230. b) A. J. Dobson, R. E. Gerkin, *Acta Cryst.* **1996**, *52*, 3078–3081. c) L. Santos, A. Vargas, M. Moreno, B. R. Manzano, J. M. Lluch, A. Douhal, *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108*, 9331–9341. d) W. H. Miles, D. G. Duca, B. R. Selfridge, C. A. Palha De Sousa, K. B. Hamman, E. O. Goodzeit, J. T. Freedman, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7809–7812.

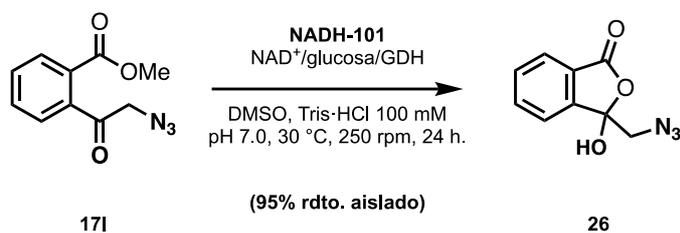
Capítulo 2.

Tras realizar las pruebas de optimización habituales para la enzima P1-B12 (análisis del efecto de la temperatura, concentración de sustrato, carga del catalizador o empleo de cosolventes), el mejor resultado obtenido fue el que se muestra en la entrada 15 (97% rdto. >99% *ee*, 40 mM de **171**).

2.6. Experimentos en escala semipreparativa.

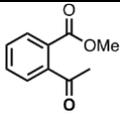
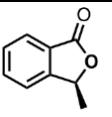
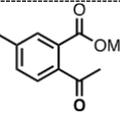
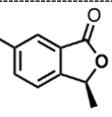
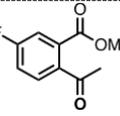
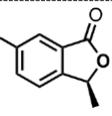
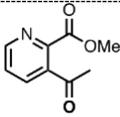
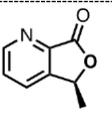
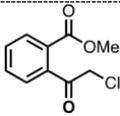
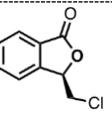
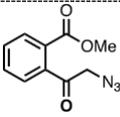
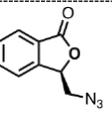
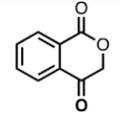
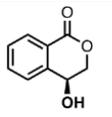
Después de concluir los ensayos en escala analítica, se seleccionaron las mejores biotransformaciones representativas y se llevaron a cabo los procesos a escala semipreparativa. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla **14**.

También se realizó el siguiente escalado, para la síntesis del compuesto **26**.



Esquema 48

Tabla 14. Condiciones y resultados de las transformaciones estereoselectivas a escala semipreparativa.

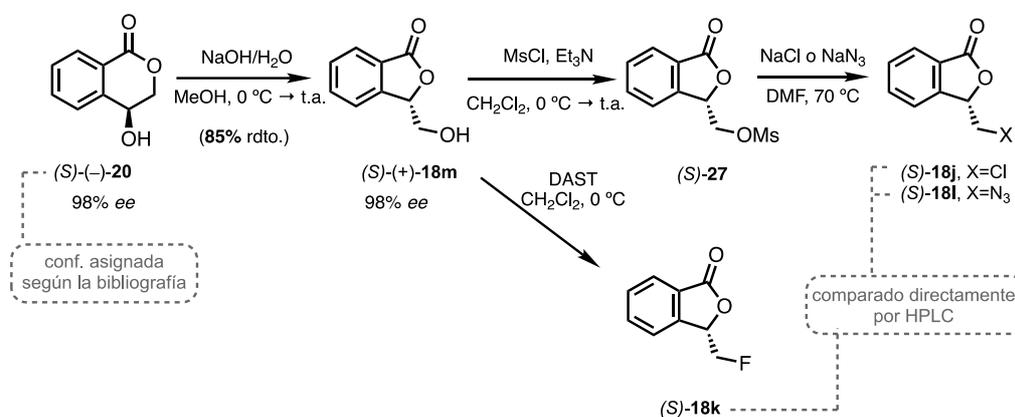
Entrada	Sustrato	<i>c</i> / [mM]	ADH ^{a)}	<i>T</i> /°C	Producto	Rdto./% ^{b)}	<i>ee</i> /% ^{c)}
1	 17a	300	P2-D12	40	 (S)-18a	93	>99
2	 17b	150	P1-H08	30	 (S)-18b	87	99
3	 17c	50	P2-D12	37	 (S)-18c	95	>99
4	 17e	100	P2-D12	37	 (S)-18e	75	98
5	 17j	50	P1-B10	37	 (R)-18j	91	>99
6	 17l	40	P1-B12	37	 (R)-18l	74	>99
7	 19	25	P2-C02	30	 (S)-20	93	98

^{a)} Sistema de reciclaje del cofactor empleado: 2-PrOH. ^{b)} Rendimiento aislado. ^{c)} Determinado por HPLC en fase estacionaria quiral.

Capítulo 2.

2.7. Síntesis de la ftalida (*S*)-**18m** y asignación de la configuración absoluta de los productos.

La primera reacción de derivatización que se planteó fue la síntesis de la ftalida (*S*)-**18m** mediante un reordenamiento en medio básico.²¹⁰ El proceso implica la contracción del anillo de la 4-hidroxiisocroman-1-ona (*S*)-**20**, obtenida enzimáticamente tras un escalado con la enzima P2-C02. El reordenamiento no afecta a la configuración del carbono asimétrico, que transcurre conservando por completo la actividad óptica del compuesto de partida (Esquema 49).



Esquema 49. Transformaciones químicas de la 4-hidroxiisocroman-1-ona (*S*)-**20** ópticamente activa para la asignación de la configuración absoluta de las ftalidas **18j-l**.

Respecto a la determinación de la configuración absoluta, para la mayoría de los casos consistió en la comparación directa de los datos físicos (rotación específica) o espectrales (cromatogramas) ya disponibles en la literatura. Además, la enantioselectividad determinada concuerda con la esperada según las preferencias de las ADH's empleadas.

En cambio, para los compuestos cuya configuración absoluta era desconocida, se llevaron a cabo diversas transformaciones químicas para su determinación, además de basarnos en la enantioselectividad propia de cada enzima.

Así tras obtener la ftalida (*S*)-**18m**, se preparó el mesilato (*S*)-**27** correspondiente por tratamiento con cloruro de mesilo, en presencia de una base (Et₃N). A continuación, mediante reacciones de sustitución nucleófila se sintetizaron las correspondientes (*S*)-ftalidas de los compuestos **18j** y **18l**. Para ello se utilizaron las sales adecuadas en DMF. La síntesis del compuesto (*S*)-**18k** se realizó directamente a partir de la ftalida (*S*)-**18m** mediante tratamiento con DAST como agente fluorante.

Una vez preparadas las ftalidas enantioenriquecidas mediante transformaciones químicas, se compararon sus cromatogramas de HPLC con los correspondientes a los ensayos enzimáticos, para asignar la configuración de los productos.

En el caso de la ftalida **18e** no se encontró ningún dato disponible en la literatura para realizar una comparación, ni tampoco de alguno de los posibles derivados de la molécula. Por ello, en este caso decidimos realizar una reducción asimétrica de Corey-Bakshi-Shibata (también conocida como reducción de Corey-Itsuno).

La reducción CBS ha demostrado ser un método eficaz para reducir una amplia gama de diferentes tipos de cetonas proquirales.²¹² Los mejores resultados se han mostrado cuando los dos sustituyentes de la cetona están bien diferenciados estéricamente, como es en el caso de la cetona **17e**, que tiene un sustituyente metilo (lado menos voluminoso) y un anillo de piridina (lado con más impedimento).

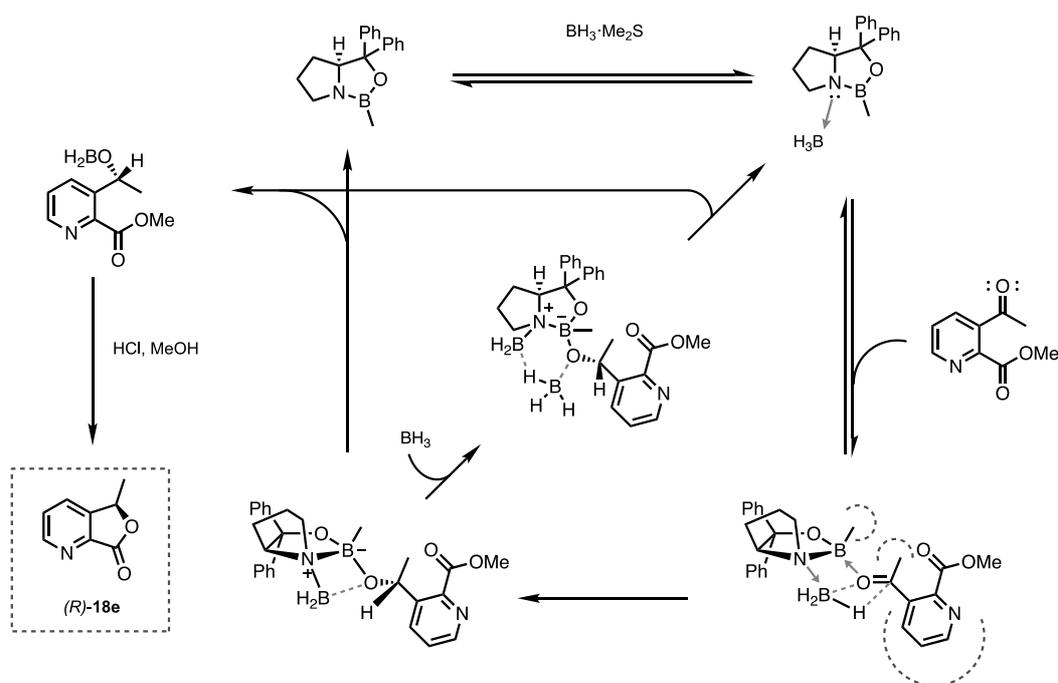
El mecanismo propuesto por E. J. Corey y colaboradores²¹³ en 1998 describe la razón de ser de la enantioselectividad del proceso mediante el uso de oxazaborolidinas quirales. El primer paso del mecanismo de reducción se inicia con una coordinación de una molécula de BH₃ con el átomo de nitrógeno del catalizador de oxazaborolidina (Esquema **50**). Esta coordinación sirve para activar el BH₃ como donador de hidruros (agente reductor activo) y para aumentar la acidez de Lewis del boro endocíclico del catalizador. Posteriormente, dicho boro endocíclico se coordinará con la cetona, en una unión preferente en la que se minimicen las interacciones estéricas entre la cetona y el grupo metilo del catalizador (el sustituyente grande queda dirigido hacia fuera). El hidruro se transfiere de forma selectiva a través de un estado de transición cíclico de seis miembros.

Finalmente, tras un tratamiento ácido se genera el alcohol quiral, el cual espontáneamente produce la ftalida **18e** en el medio de reacción, mediante una lactonización intramolecular. La relación enantiomérica obtenida se analizó por HPLC, encontrándose que los resultados del proceso químico y los esperados según la enantioselectividad descrita para la enzima, coinciden en la asignación de la configuración absoluta para **18e**. Para más información sobre el protocolo o el resultado, consultar la Sección 2.9.

²¹² B. T. Cho, *Tetrahedron* **2006**, 62, 7621–7643.

²¹³ E. J. Corey, C. J. Helal, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1986–2012.

Capítulo 2.



Esquema 50. Ciclo mecanístico para la reducción CBS de la cetona **17e**.

CONCLUSIONES

Conclusiones

En resumen, se ha diseñado un método biocatalítico selectivo para la síntesis de estructuras de tipo ftalida 3-sustituidas en una sola etapa (*one-pot, two-steps*) bajo condiciones suaves de reacción. Se utilizaron alcohol deshidrogenasas (ADH's) como biocatalizadores obteniéndose los productos enantioméricamente enriquecidos. En todos los casos, se pudieron preparar ambos enantiómeros de las ftalidas mediante la catálisis con ADH's complementarias.

La metodología se ha aplicado a un variado grupo de *cetoésteres* metílicos **17a-l**, abarcando una amplia diversidad estructural tanto en el tipo de sustituyente en la posición C3, como en el anillo aromático.

Del mismo modo, se aplicó el método para preparar la 4-hidroxiisocroman-1-ona (*S*)-**20**, la cual se transformó mediante un proceso de derivatización en la ftalida (*S*)-**18m** manteniendo el exceso enantiomérico de la isocromanona de partida (*ee* 98%).

Se optimizaron las condiciones de reacción y algunos de estos compuestos, los más representativos, se obtuvieron a escala semipreparativa. De este modo, se sintetizaron seis ftalidas ópticamente activas con rendimientos aislados entre 74-95% y con excesos enantioméricos $\geq 98\%$ en todos los casos.

Las transformaciones realizadas empleando la ftalida (*S*)-**18m** para la determinación de la configuración absoluta de las ftalidas enatiopuras cuya configuración no había sido descrita previamente, pone de manifiesto la versatilidad de estas unidades estructurales.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

2.8. General.

Los reactivos químicos empleados fueron adquiridos de fuentes comerciales (Merck, BLDpharm o TCI) y se utilizaron tal como se recibieron; a excepción de los disolventes, los cuales fueron destilados previamente en atmósfera de nitrógeno según los procedimientos estándar para su secado como en el Capítulo anterior.

Las alcohol deshidrogenasas (ADH's) comerciales fueron adquiridas a la casa comercial Codexis® (*Codex® Ketoreductase Screening Kit*) al igual que los cofactores de nicotinamida (NADH y NADPH) y la glucosa deshidrogenasa (GDH-105, 48 U·mg⁻¹).

Las ADH's procedentes de *Ralstonia sp. (Ras-ADH)*²¹⁴, *Lactobacillus brevis (Lb-ADH)*²¹⁵, *Rhodococcus ruber (ADH-A)*²¹⁶, *Thermoanaerobacter sp. (ADH-T)*²¹⁷ y *Thermoanaerobacter ethanolicus (TeS-ADH)*²¹⁸ se sobreexpresaron en *E. coli* BL21 (DE3) y se utilizaron como células liofilizadas según los procedimientos descritos en la literatura. Las cepas de las ADH's sobreexpresadas fueron proporcionadas por el Prof. Wolfgang Kroutil (Universidad de Graz).

Las técnicas de purificación y análisis empleadas en este Capítulo como la cromatografía en gel de sílice, en capa fina o la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), así como los espectros de resonancia magnética nuclear, las rotaciones específicas, los puntos de fusión o los espectros de masas de alta resolución; se han empleado los mismos instrumentos de medida y según se han descrito en el Capítulo anterior.

2.9. Procedimientos sintéticos.

Procedimiento para la síntesis de los sustratos 17a y 17h.

A una suspensión de ácido 2-acetilbenzoico (500 mg, 3.05 mmol, 1.0 equiv.) en DMF (10 mL, 0.3 M), se añadió K₂CO₃ (1.2 g, 9.2 mmol, 3.0 equiv.) a 0 °C y se agitó durante 30 minutos. Trascurrido ese tiempo, se añadió gota a gota yoduro de metilo (380 µl, 6.1 mmol, 2.0 equiv.). Después de agitar a temperatura ambiente toda la noche, se añadiendo 15 mL de agua y se extrajo con Et₂O (3 x 15 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se evaporó a presión reducida para proporcionar 2-

²¹⁴ I. Lavandera, A. Kern, B. Ferreira-Silva, A. Glieder, S. de Wildeman, W. Kroutil, *J. Org. Chem.* **2008**, *15*, 6003–6005.

²¹⁵ M. Wolberg, W. Hummel, C. Wandrey, M. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4306–4308.

²¹⁶ K. Edegger, C. C. Gruber, T. M. Poessl, S. R. Wallner, I. Lavandera, K. Faber, F. Niehaus, J. Eck, R. Oehrlein, A. Hafner, W. Kroutil, *Chem. Commun.* **2006**, 2402–2404.

²¹⁷ Z. Findrik, D. Vasić-Rački, S. Lütz, T. Dausmann, C. Wandrey, *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27*, 1087–1095.

²¹⁸ C. Heiss, M. Laivenieks, J. G. Zeikus, R. S. Phillips, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *7*, 1659–1666.

Capítulo 2.

acetilbenzoato de metilo (**17a**) como un aceite amarillo (461 mg, 85% rdt.). No fue necesaria purificación adicional.

En el caso de **17h**, sólido blanco (485 mg, 91% rdt.), se empleó una suspensión de ácido 2-benzoilbenzoico siguiendo el mismo protocolo anterior.

Procedimiento para la síntesis de los sustratos 17b-e.

Se prepararon mediante una variante de un procedimiento de acoplamiento de Heck,²⁰³ como se indica a continuación.

A una suspensión del apropiado 2-bromobenzoato de metilo (1 equiv.), Pd(OAc)₂ (5 mol-%) y PPh₃ (2 equiv. respecto al Pd) en CH₃CN anhidro y desoxigenado (0.35 M), se añadieron sucesivamente Et₃N (1.4 equiv.) y *n*-butil vinil éter (5 equiv.). La mezcla de reacción se calentó a 95 °C durante 16 h en un tubo sellado. Tras enfriarse a temperatura ambiente, la mezcla se diluyó con CH₂Cl₂ y se filtró sobre Celite®. El filtrado se lavó con agua, la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó a presión reducida.

Los crudos resultantes se disolvieron en THF (0.4 M) y se añadió gota a gota una solución acuosa de HCl (10% v/v, 3 equiv.) a temperatura ambiente. La reacción se monitorizó mediante TLC y una vez completada se agregó una disolución saturada de NaHCO₃ y se extrajeron con acetato de etilo. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y el disolvente se evaporó a presión reducida. Los crudos se purificaron mediante cromatografía en columna para obtener el producto deseado (72-97% rdt.).

Ruta sintética para la síntesis de los sustratos 17f-g, así como de los correspondientes intermedios.

Primer paso: A una disolución de acetal etilénico de 2-bromobenzaldehído (1000 mg, 4.37 mmol, 1 equiv.) en THF anhidro (11 mL, 0.4 M) a -78 °C se añadió *n*-BuLi (2.5 M en hexanos, 2.1 mL, 5.2 mmol, 1.2 equiv.). Después de 20 min, se añadió DMF (677 µl, 8.7 mmol, 2 equiv.) y la mezcla de reacción se agitó durante 30 min más a la misma temperatura. Transcurrido ese tiempo, se dejó que recuperara la temperatura ambiental lentamente y continuó agitándose durante 5 horas. Después se añadió una disolución acuosa de cloruro amónico saturada y se extrajo con acetato de etilo (3 x 15 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para obtener el correspondiente aldehído **21** como un aceite amarillo (731 mg, 94% rdt.). No fue necesaria purificación adicional para el siguiente paso.

Segundo paso: A una solución del compuesto **21** (1 equiv.) en THF (0.35 M) a 0 °C se añadió gota a gota el reactivo de Grignard apropiado (1.5 equiv.). La mezcla de reacción se dejó alcanzar la temperatura ambiente y se agitó hasta la desaparición del material de partida

comprobando mediante TLC (entre 2-3 horas). A continuación, se añadió una disolución acuosa de cloruro amónico saturada y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para obtener los alcoholes **22f** y **22g** correspondientes (83-86% rdto. respect.) como aceites amarillos. No fue necesaria purificación adicional para el siguiente paso.

Tercer paso:²¹⁹ A una mezcla de los alcoholes correspondientes sintetizados en el paso anterior (1 equiv.), TEMPO (3 mol-%), NaBr (0.5 equiv.) y NaHCO₃ (1.5 equiv.) en CH₂Cl₂ (0.3 M) y agua (1.0 M) se añadió gota a gota una solución de NaOCl (10% *p/v* en agua; 1.4 equiv.) a 0 °C. La mezcla de reacción se agitó enérgicamente durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se separaron las capas y la fase acuosa se extrajo con más CH₂Cl₂. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para producir las cetonas **23f** y **23g** correspondientes (91% rdto.) como aceites. No fue necesaria purificación adicional para el siguiente paso.

Cuarto paso: A una disolución de las correspondientes cetonas sintetizadas en el paso anterior (1 equiv.) en acetona/agua (0.2 M, 3:1) se añadió PTSA monohidrato (25 mol-%) y se agitó a temperatura ambiente hasta la desaparición del producto de partida comprobada por TLC. Pasado este tiempo, se añadió una disolución saturada de NaHCO₃ y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para producir los aldehídos **24f** y **24g** correspondientes (99-85% rdto. respect.) como aceites marrones. No fue necesaria purificación adicional para el siguiente paso.

Quinto paso:²²⁰ A una solución de los aldehídos sintetizados en el paso anterior (1 equiv.) en MeCN (0.1 M) y agua (1.2 M) a 0 °C, se añadieron sucesivamente NaH₂PO₄ (0.34 equiv.), H₂O₂ (30% *p/p* en agua, 2.5 equiv.) y NaClO₂ (4 equiv.). Se agitó vigorosamente la mezcla a la misma temperatura durante 1 h y después se diluyó en acetato de etilo y agua. La fase orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo con más EtOAc (3 veces). La capa orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó a presión reducida. Los ácidos resultantes son lo suficientemente puros como para utilizarlos sin más purificación.

A continuación, se esterificaron siguiendo el mismo procedimiento que para el sustrato modelo **17a**. La purificación mediante cromatografía en columna produjo los cetoésteres **17f** y **17g** correspondientes (78-52% rdto. respect.) como aceites amarillos.

²¹⁹ X. liang, B.O. Petersen, J. Ø. Duus, M. Bols, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 2764–2773.

²²⁰ Y.-F. Liu, G.-M. Cao, L. Chen, K. Li, X.-L. Lin, X.-X. Xu, Z.-G. Le, G.-P. Yang. *Adv. Synth. Catal.* **2022**, *364*, 1460–1464.

Capítulo 2.

Procedimiento para la síntesis de los sustratos **17i-j**, así como del intermedio **25**.

A una disolución enfriada con un baño de hielo y sal (de 0 a -5 °C) de **17a** (670 mg, 3.76 mmol) y trietilamina (2.0 mL, 15.0 mmol, 4.0 equiv.) en CH₂Cl₂ anhidro (15 mL, 0.25 M) se añadió TBSOTf (1.3 mL, 5.6 mmol, 1.5 equiv.) gota a gota. Después de la adición, la mezcla de reacción se agitó a esa misma temperatura durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se añadió metanol (~2 mL) y la mezcla resultante se lavó sucesivamente con una disolución de HCl (0.5 M), una disolución saturada de NaHCO₃ y salmuera. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó a presión reducida para producir el silil enol éter **25** (1.05 g, >99% rdto.) que se utilizó en el paso siguiente sin purificación adicional.

A continuación, a una disolución enfriada con un baño de hielo y sal de **25** (220 mg, 0.75 mmol) en THF (4 mL) y agua (0.6 mL) se añadió NBS (o NCS para el caso del **17j**) (160 mg, 0.9 mmol, 1.2 equiv). La mezcla de reacción se dejó que alcanzara la temperatura ambiente y se agitó durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se añadió EtOAc para diluir la mezcla y se lavó con disolución acuosa saturada de NaHCO₃, una disolución acuosa saturada de Na₂S₂O₃ y salmuera. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron. El material resultante se purificó mediante cromatografía en columna para producir las cetonas **17i** y **17j** correspondientes (85-91% de rdto. respect.).

Síntesis del sustrato **17k**.

A una disolución del silil enol éter **25** anterior (200 mg, 0.68 mmol) en MeCN (6.8 mL, 0.1 M) y agua (200 µL) se añadió NaHCO₃ (114 mg, 1.36 mmol, 2 equiv.). La mezcla se agitó a -10 °C y después se añadió Selectfluor[®] (363 mg, 1.5 mmol, 1.5 equiv.) en porciones. La mezcla resultante se agitó a esta temperatura durante 3 h, después, se añadió agua y acetato de etilo a la mezcla. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentraron a presión reducida. La purificación mediante cromatografía en columna produjo la fluoro-cetona **17k** (124 mg, 93% de rdto.) como un sólido blanco.

Síntesis del sustrato **17l**.

A una disolución de **17i** (523 mg, 2.03 mmol, 1 equiv.) en MeCN (5 mL, 0.4 M) se añadió NaN₃ (198 mg, 2.03 mmol, 1.5 equiv.) y la mezcla se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante una noche. La suspensión se diluyó con EtOAc y se filtró. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. Tras la purificación mediante cromatografía en columna se obtuvo la cetoazida **17l** (441 mg, 99% rdto.) como un sólido blanco.

Síntesis del sustrato 19.

El procedimiento utilizado se basa en una modificación de algunos métodos ya presentes en la bibliografía.^{203,208}

A una mezcla agitada de ácido 2-acetilbenzoico (700 mg, 4.26 mmol) en tolueno (8 mL, 0.53 M) se añadió ácido acético (4 mL, 0.35 M concentración final). A continuación, se añadió bromo (252 μ L, 4.9 mmol, 1.15 equiv.) gota a gota y la solución se calentó a 60 °C. Después de 30 minutos, se añadió agua (4 mL) y la reacción se calentó a reflujo durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, la reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se separaron las fases. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío. El sólido amarillo pálido era lo suficientemente puro como para utilizarlo sin más purificación (530 mg, 77% rdto.).

Síntesis de las ftalidas racémicas 18a-h, 18k-l y de la 4-hidroxiisocroman-1-ona 20.

La correspondiente cetona **17a-h, 17k-l o 19** (1.0 equiv.) se disolvió en metanol (0.35 M) a 0 °C y se añadió NaBH₄ (1.5 equiv.). La reacción se dejó agitando durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y agua. La capa acuosa se separó y se lavó con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron. La purificación mediante cromatografía en columna produjo las correspondientes ftalidas **18a-h, 18k-l** y la 4-hidroxiisocroman-1-ona **20** (61-99% rdto.).

Síntesis de las ftalidas racémicas 18i y 18j.

El procedimiento se llevó a cabo utilizando un protocolo estándar de reducción Meerwein-Ponndorf-Verley. Para el compuesto derivado del cloro, **18j**, el procedimiento es análogo al que se describe a continuación.

A una disolución de la cetona **17i** (20 mg, 0.08 mmol) en tolueno anhidro (1.0 mL, 0.08 M) y 2-PrOH (240 μ L, 3.12 mmol, 40 equiv.) se añadió isopropóxido de aluminio (17 mg, 0.09 mmol, 1.1 equiv.). La suspensión se calentó a reflujo durante 5 h, después se enfrió y se diluyó con H₂O y EtOAc. La fase orgánica se lavó con solución saturada de NaHCO₃ y salmuera. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron. El material resultante, **18i**, es lo suficientemente puro como para utilizarlo sin purificación adicional.

Capítulo 2.

Síntesis química del subproducto 26.

A una disolución de la cetona **171** (30 mg, 0.14 mmol) en MeOH y H₂O (3.0 mL, 2:1 v/v) a 0 °C se añadió NaOH (6 mg, 0.15 mmol, 1.1 equiv.). La mezcla de reacción se dejó alcanzar la temperatura ambiente y se agitó durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, la reacción se concentró y se extrajo con EtOAc y agua. Las fases orgánicas se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron. El material resultante es suficientemente puro en este punto (17mg, 61% rdto.).

Síntesis química de la ftalida (*S*)-**18m**.

Se preparó mediante el procedimiento reportado previamente por Deska y colaboradores.²¹⁰

A una disolución de (*S*)-**20** (55 mg, 0.34 mmol, 1.0 equiv., 98% *ee*) en metanol (3.4 mL, 0.1 M) se añadió a 0 °C una disolución acuosa de NaOH (1.7 mL, 1 M, 5 equiv.). La mezcla de reacción se dejó alcanzar la temperatura ambiente y se agitó durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, la solución se acidificó añadiendo HCl acuoso (1.8 mL, 1 M) y se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ y el disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo obtenido se purificó mediante cromatografía en columna para obtener (*S*)-**18m** como sólido blanco (47 mg, 85% rdto., 98% *ee*).

Procedimientos de derivatización para la preparación de (*S*)-**18j-1** a partir de (*S*)-**20**.

(*S*)-**20** se transformó en (*S*)-**18k** utilizando DAST (3 equiv.) en CH₂Cl₂ anhidro a 0 °C durante 1 hora (>99% rdto.). Para los compuestos (*S*)-**18j** y (*S*)-**18l**, en primer lugar, se sintetizó el mesilato (*S*)-**27** usando MsCl (1.2 equiv.), Et₃N (1.5 equiv.) en CH₂Cl₂ anhidro a 0 °C durante 16 horas. A continuación, y sin ningún paso de purificación, el crudo de (*S*)-**27** se transformó en las ftalidas correspondientes (61 y 97% rdto. respect.) utilizando NaCl (5 equiv.) o NaN₃ (3 equiv.) en DMF anhidra a 70 °C durante 16 horas.

Síntesis química de la ftalida **18e** enantioenriquecida.

El procedimiento llevado a cabo²²¹ fue un protocolo de reducción estándar de Corey-Bakshi-Shibata.

A una disolución agitada de (*S*)-2-metil-CBS-oxazaborolidina (3 mg, 0.1 equiv.) en THF (0.5 mL) a temperatura ambiente bajo nitrógeno se añadió gota a gota una disolución de BH₃·Me₂S (13 µL, 1.2 equiv.) en THF (0.5 mL). La mezcla de reacción se dejó agitar a temperatura ambiente durante 10 min, tras lo cual se enfrió a -15 °C. A esta solución enfriada se

²²¹ D. W. Smith, B. Muñoz, K. Srinivasan, C. P. Bergstrom, P. V. Chaturvedula, M. S. Deshpande, D. J. Keavy, M. F. Parker, O. B. Wallace, H. H. Wang, PCT Int. Appl. *WO 0050391*, **2000**.

añadió una solución de la cetona **17e** (20 mg, 1.0 equiv.) en THF (0.5 mL) gota a gota durante 10 min. La mezcla de reacción se dejó agitar otras 2 h a -15 °C. Después, se añadió MeOH para parar la reacción. El disolvente se eliminó a presión reducida para producir la correspondiente ftalida **18e** suficientemente pura (9 mg, 54% rdo., relación 21.6:78.4 de enantiómeros *S*:*R*) por HPLC).

2.10. Procedimientos enzimáticos.

Protocolo general para las transformaciones en escala analítica.

- Si se utiliza 2-PrOH como sistema de reciclaje del cofactor:

El sustrato correspondiente **17a-1** o **19** (25-500 mM) se disolvió en 2-PrOH (50 µL, 10% *v/v*), dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 mL. A continuación, se añadió el tampón correspondiente (450 µL, volumen final 500 µL) el cual contenía MgCl₂·6 H₂O (concentración final 1.0 mM), y el cofactor (50 µL de NADP⁺ o NAD⁺ con una concentración final 1.0 mM); seguido de la adición de la ADH correspondiente, compatible con este sistema (2.0 mg para las enzimas de Codexis® y 10 mg para las células liofilizadas de *E. coli*: *Ras*-ADH, *Lb*-ADH, ADH-A, ADH-T). La reacción se agitó a 250 rpm y 30-40 °C durante 24 h.

- Si se utiliza glucosa/GDH como sistema de reciclaje del cofactor:

El sustrato correspondiente **17a-1** o **19** (25-50 mM) se disolvió en DMSO (12.5 µL, 2.5% *v/v*), dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 mL. A continuación, se añadió una disolución tampón K-fosfato (418 µL, 300 mM, pH 7.0, volumen final 500 µL) el cual contenía MgCl₂·6 H₂O (concentración final 1.0 mM), el cofactor (50 µL de NADP⁺ o NAD⁺ con una concentración final 1.0 mM), D-glucosa (7.2 mg, 80 mM), GDH-105 (20 µL, 6U); seguido de la adición de la ADH correspondiente (2.0 mg para las enzimas de Codexis® y 10 mg para las células liofilizadas de *E. coli* que contienen las ADH's sobreexpresadas de: *Ras*-ADH, *Lb*-ADH, ADH-A, ADH-T, *TeS*-ADH). La reacción se agitó a 250 rpm y 30 °C durante 24 h.

Transcurrido este tiempo, las reacciones se extrajeron directamente con acetato de etilo (2 × 500 µL). Las fases orgánicas se separaron por centrifugación (90 s, 13000 rpm), se combinaron y se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó en un SpeedVac™, y el crudo de reacción resultante se analizó mediante HPLC para determinar el rendimiento analítico y los valores de exceso enantiomérico.

Capítulo 2.

Protocolo general para las transformaciones en escala semipreparativa de los sustratos **17a**, **17b**, **17c**, **17e**, **17j**, **17l** y **19**.

En un tubo cónico Falcon de tamaño apropiado, se rehidrató la enzima correspondiente en una disolución tampón Tris·HCl (100 mM, pH 7.0) con MgCl₂·6 H₂O (1.0 mM de concentración final) y NADP⁺ (1.0 mM de concentración final) durante 10 min a 37 °C y 250 rpm en un agitador orbital. A continuación, se añadió la cetona correspondiente y el propan-2-ol (10% v/v) (o una solución de ambos en los casos que era posible). Se cerró el vial y se incubó a la temperatura y agitación anteriores durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo, la mezcla se extrajo con acetato de etilo (tres veces), las capas orgánicas se separaron por centrifugación (3 min, 4900 rpm), se combinaron y finalmente se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar el correspondiente crudo de reacción, el cual se purificó mediante cromatografía en columna en los casos necesarios para finalmente obtener la ftalida, o la (*S*)-4-hidroxiisocroman-1-ona, enantioenriquecida deseada.

A continuación, se presentarán de forma resumida las cantidades y los resultados obtenidos en cada uno de los escalados realizados:

- (*S*)-**3-Metilisobenzofuran-1(3H)-ona**, (*S*)-**18a**. Sustrato: **17a** (26.7 mg, 0.15 mmol, concentración final: 300 mM). 2-PrOH: (50 µL, 10% v/v). Disolución tampón: Tris·HCl 100 mM, pH 7.0, 19.5 mL. ADH: P2-D12 (4.0 mg). *T*: 40 °C. Producto (*S*)-**18a**: aceite incoloro (20.6 mg, 93% rdtó., *ee* >99%).
- (*S*)-**3,6-Dimetilisobenzofuran-1(3H)-ona**, (*S*)-**18b**. Sustrato: **17b** (45 mg, 0.23 mmol, concentración final: 150 mM). 2-PrOH: (156 µL, 10% v/v). Disolución tampón: Tris·HCl 100 mM, pH 7.0, 1.4 mL. ADH: P1-H08 (6.5 mg). *T*: 30 °C. Producto (*S*)-**18b**: sólido amarillo pálido (33 mg, 87% rdtó., *ee* 99%).
- (*S*)-**6-Fluoro-3-metilisobenzofuran-1(3H)-ona**, (*S*)-**18c**. Sustrato: **17c** (55 mg, 0.28 mmol, concentración final: 50 mM). 2-PrOH: (560 µL, 10% v/v). Disolución tampón: Tris·HCl 100 mM, pH 7.0, 5.1 mL. ADH: P2-D12 (22 mg). *T*: 37 °C. Producto (*S*)-**18c**: sólido blanco (44.1 mg, 95% rdtó., *ee* >99%).
- (*S*)-**5-Metilfuro[3,4-b]piridin-7(5H)-ona**, (*S*)-**18e**. Sustrato: **17e** (33 mg, 0.18 mmol, concentración final: 100 mM). 2-PrOH: (180 µL, 10% v/v). Disolución tampón: Tris·HCl 100 mM, pH 7.0, 1.62 mL. ADH: P2-D12 (8.0 mg). *T*: 37 °C. Producto (*S*)-**18e**: sólido blanco (20.5 mg, 75% rdtó., *ee* 98%).

- **(R)-3-(Cloroacetil)isobenzofuran-1(3H)-ona, (R)-18j.** Sustrato: **17j** (103 mg, 0.48 mmol, concentración final: 50 mM). 2-PrOH: (970 μ L, 10% v/v). Disolución tampón: Tris-HCl 100 mM, pH 7.0, 8.6 mL. ADH: P1-B10 (38 mg). T: 37 °C. Producto **(R)-18j**: sólido blanco (80.4 mg, 91% rdto., ee >99%).
- **(R)-3-(Azidoacetil)isobenzofuran-1(3H)-ona, (R)-18l.** Sustrato: **17l** (60 mg, 0.27 mmol, concentración final: 40 mM). 2-PrOH: (675 μ L, 10% v/v). Disolución tampón: Tris-HCl 100 mM, pH 7.0, 6.1 mL. ADH: P1-B12 (38 mg). T: 37 °C. Producto **(R)-18l**: aceite marrón pálido (38.2 mg, 74% rdto., ee >99%).
- **(S)-4-Hidroxiisocroman-1-ona, (S)-20.** Sustrato: **19** (55 mg, 0.34 mmol, concentración final: 25 mM). 2-PrOH: (1.36 mL, 10% v/v). Disolución tampón: Tris-HCl 100 mM, pH 7.0, 12.2 mL. ADH: P2-C02 (55 mg). T: 30 °C. Producto **(S)-20**: aceite incoloro (52 mg, 93% rdto., ee 98%).

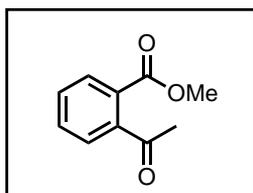
Protocolo para la transformación en escala semipreparativa de **17l** en el compuesto **26**.

En un tubo cónico Falcon de 10 mL, se rehidrató la enzima KRED-NADH-101 (22 mg) en una disolución tampón Tris-HCl (100 mM, pH 7.0, 5.4 mL) que contenía MgCl₂·6 H₂O (1.0 mM de concentración final), NAD⁺ (4.0 mg, 1.0 mM), D-glucosa (80 mg, 80 mM) y GDH-105 (2.0 mg, 96 U); durante 10 min a 30 °C y 250 rpm en un agitador orbital. A continuación, se añadió la cetona **17l** (30 mg, concentración final 25 mM) disuelta en DMSO (138 μ L, 2.5% v/v). Se cerró el vial y se incubó a la temperatura y agitación anteriores durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo, la mezcla se extrajo con acetato de etilo (4 x 5 mL), las capas orgánicas se separaron por centrifugación (3 min, 4900 rpm), se combinaron y se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para producir el compuesto **26** como un aceite marrón gomoso (26.6 mg, 95% rdto.). No fue necesaria ninguna purificación adicional.

2.11. Datos experimentales de los compuestos sintetizados en este Capítulo.

2-Acetilbenzoato de metilo, (17a)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₀O₃
Masa molecular/g·mol⁻¹: 178.19
Aspecto físico: aceite amarillo
R_f: 0.49 (Hexano:AcOEt-7:3)
Rendimiento: 85%

Capítulo 2.

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.70 (dd, *J* = 7.4, 1.7 Hz, 1H), 7.49 – 7.23 (m, 3H), 3.75 (s, 3H), 2.40 (s, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 202.4 (CO), 167.2 (CO), 142.3 (C), 131.8 (CH), 129.9 (CH), 129.3 (CH), 128.7 (C), 126.3 (CH), 52.2 (CH₃), 29.6 (CH₃).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²⁰²

Separación Analítica (HPLC):

Columna: ID

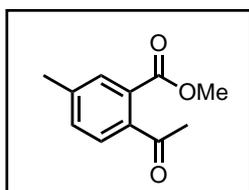
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 90/10

Tiempo de retención: 13.6 min

Temperatura: 30 °C

Flujo: 0.9 mL·min⁻¹

2-Acetil-5-metilbenzoato de metilo, (17b)



Fórmula empírica: C₁₁H₁₂O₃

Masa molecular/g·mol⁻¹: 192.21

Aspecto físico: aceite amarillo

R_f: 0.62 (Hexano:AcOEt-6:4)

Rendimiento: 95%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.56–7.44 (m, 1H), 7.3–7.22 (m, 2H), 3.82 (s, 3H), 2.45 (s, 3H), 2.33 (s, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 201.7 (CO), 168.1 (CO), 141.0 (C), 138.7 (C), 132.0 (CH), 129.8 (CH), 129.7 (C), 127.1 (CH), 52.4 (CH₃), 29.3 (CH₃), 21.1 (CH₃).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.^{180b}

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

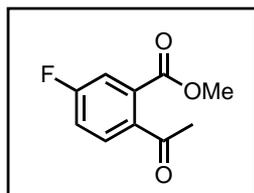
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 85/15

Tiempo de retención: 13.1 min

Temperatura: 35 °C

Flujo: 0.6 mL·min⁻¹

2-Acetil-5-fluorobenzoato de metilo, (17c)



Fórmula empírica: C₁₀H₉FO₃

Masa molecular/g·mol⁻¹: 196.18

Aspecto físico: aceite amarillo

R_f: 0.32 (Hexano:AcOEt-7:3)

Rendimiento: 97%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.50 – 7.36 (m, 2H), 7.24 – 7.14 (m, 1H), 3.85 (s, 3H), 2.47 (s, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 201.8 (CO), 164.9 (CO), 148.9 (C), 148.2 8 (C), 129.6 (C), 127.5 (CH), 127.3 (CH), 125.3 (CH), 53.3 (CH₃), 30.4 (CH₃).

¹⁹F {¹H} RMN (282 MHz, Cloroformo-*d*): δ -108.3.

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₀H₉FNao₃)⁺ (M+Na)⁺ 219.0428; encontrada 219.0434.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

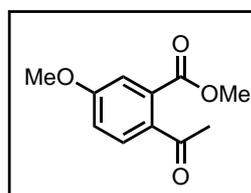
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20

Tiempo de retención: 12.6 min

Temperatura: 35 °C

Flujo: 0.6 mL·min⁻¹

2-Acetil-5-metoxibenzoato de metilo, (17d)



Fórmula empírica: C₁₁H₁₂O₄

Masa molecular/g·mol⁻¹: 208.21

Aspecto físico: sólido marrón

Pf: 52-53 °C

R_f: 0.62 (Hexano:AcOEt-6:4)

Rendimiento: 85%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.51 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.0.5 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 6.92 (dd, *J* = 8.6, 2.6 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 2.43 (s, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 199.1 (CO), 168.7 (CO), 161.6 (C-OCH₃), 133.5 (C), 131.7 (C), 130.1 (CH), 115.8 (CH), 114.2 (CH), 55.6 (CH₃), 52.6 (CH₃), 28.2 (CH₃).

Capítulo 2.

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²²²

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

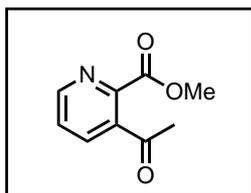
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20

Tiempo de retención: 17.4 min

Temperatura: 35 °C

Flujo: 0.7 mL·min⁻¹

3-Acetilpiridina-2-carboxilato de metilo, (17e)



Fórmula empírica: C₉H₉NO₃

Masa molecular/g·mol⁻¹: 179.18

Aspecto físico: sólido amarillo

Pf: 55-56 °C

R_f: 0.57 (AcOEt)

Rendimiento: 72%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 8.70 (dd, *J* = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 7.80 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 7.48 (dd, *J* = 7.9, 4.8 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 2.52 (s, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 200.3 (CO), 166.1 (CO), 150.7 (CH), 146.5 (C), 137.5 (C), 135.2 (CH), 125.9 (CH), 53.2 (CH₃), 29.6 (CH₃).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²²³

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

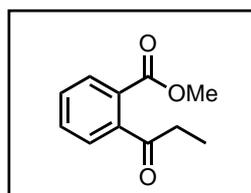
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20

Tiempo de retención: 23.9 min

Temperatura: 35 °C

Flujo: 0.6 mL·min⁻¹

2-Propionilbenzoato de metilo, (17f)



Fórmula empírica: C₁₁H₁₂O₃

Masa molecular/g·mol⁻¹: 192.21

Aspecto físico: aceite amarillo

R_f: 0.71 (Hexano:AcOEt-6:4)

Rendimiento: 78%

²²² M. Mercola, M. I. Dawson, J. Cashman, *WO2010033643A2*, 2010.

²²³ C. Subramanyam, S. Chattarjee, J. P. Mallamo, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 459-462.

Sección Experimental

^1H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.84 (dd, $J = 7.5, 1.4$ Hz, 1H), 7.50 (td, $J = 7.5, 1.4$ Hz, 1H), 7.42 (td, $J = 7.5, 1.4$ Hz, 1H), 7.28 (dd, $J = 7.5, 1.4$ Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 2.76 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 1.17 (t, $J = 7.2$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 206.4 (CO), 167.0 (CO), 143.3 (C), 132.2 (CH), 129.8 (CH), 128.2 (C), 126.1 (CH), 52.4 (CH₃), 36.1 (CH₂), 8.1 (CH₃).

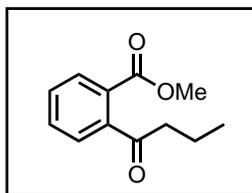
Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.^{180b}

Separación Analítica (HPLC):

Columna: ID
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 95/05
Tiempo de retención: 14.9 min

Temperatura: 30 °C
Flujo: 1.0 mL·min⁻¹

2-Butirilbenzoato de metilo, (17g)



Fórmula empírica: C₁₂H₁₄O₃
Masa molecular/g·mol⁻¹: 206.24
Aspecto físico: aceite amarillo
R_f: 0.62 (Hexano:AcOEt-7:3)
Rendimiento: 52%

^1H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.87 (dd, $J = 7.5, 1.4$ Hz, 1H), 7.55 (td, $J = 7.5, 1.4$ Hz, 1H), 7.47 (td, $J = 7.5, 1.4$ Hz, 1H), 7.34 (dd, $J = 7.5, 1.4$ Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 2.77 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.75 (h, $J = 7.4$ Hz, 2H), 0.99 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 205.6 (CO), 167.2 (CO), 143.3 (C), 132.1 (CH), 129.7 (CH), 128.6 (C), 126.3 (CH), 52.5 (CH₃), 44.6 (CH₂), 17.5 (CH₂), 13.7 (CH₃).

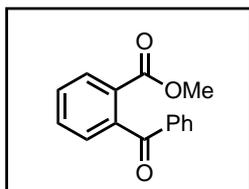
Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.^{180b}

Separación Analítica (HPLC):

Columna: ID
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 95/05
Tiempo de retención: 12.6 min

Temperatura: 30 °C
Flujo: 1.0 mL·min⁻¹

2-Benzoilbenzoato de metilo, (17h)



Fórmula empírica: C₁₅H₁₂O₃

Masa molecular/g·mol⁻¹: 240.26

Aspecto físico: sólido blanco

Pf: 48–49 °C

R_f: 0.64 (Hexano:AcOEt-6:4)

Rendimiento: 91%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 8.03 (d, *J* = 7.7, 1H), 7.78–7.70 (m, 2H), 7.70–7.47 (m, 3H), 7.47–7.35 (m, 3H), 3.59 (s, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 197.1, 166.4, 141.7, 137.2, 133.1, 132.5, 130.1, 129.7, 129.3, 128.6, 127.8, 52.2 (CH₃).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.^{180b}

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OD-H

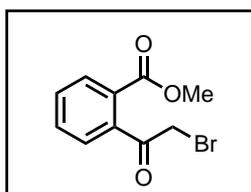
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 85/15

Tiempo de retención: 7.3 min

Temperatura: 35 °C

Flujo: 0.8 mL·min⁻¹

2-(Bromoacetil)benzoato de metilo, (17i)



Fórmula empírica: C₁₀H₉BrO₃

Masa molecular/g·mol⁻¹: 257.08

Aspecto físico: sólido blanco

Pf: 89–90 °C

R_f: 0.78 (Hexano:AcOEt-6:4)

Rendimiento: 85%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.93 (d, *J* = 7.5, 1H), 7.63 – 7.43 (m, 2H), 7.34 (d, *J* = 7.5, 1H), 4.29 (s, 2H), 3.85 (s, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 197.3 (CO), 166.4 (CO), 140.5 (C), 132.8 (CH), 130.3 (CH), 130.0 (CH), 127.7 (C), 127.6 (CH), 52.8 (CH₃), 35.0 (CH₂).

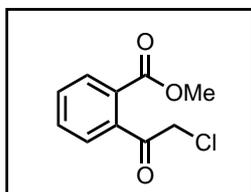
Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²⁰⁶

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20
Tiempo de retención: 21.0 min

Temperatura: 30 °C
Flujo: 0.6 mL·min⁻¹

2-(Cloroacetyl)benzoato de metilo, (17j)



Fórmula empírica: C₁₀H₉ClO₃
Masa molecular/g·mol⁻¹: 212.63
Aspecto físico: sólido blanco
Pf: 103–105 °C
R_f: 0.37 (Hexano:AcOEt-8:2)
Rendimiento: 91%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.99 (d, *J* = 7.6, 1H), 7.67 – 7.45 (m, 2H), 7.33 (d, *J* = 7.6, 1H), 4.47 (s, 2H), 3.90 (s, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 198.1 (CO), 166.5 (CO), 140.7 (C), 132.9 (CH), 130.4 (CH), 130.2 (CH), 128.1 (C), 127.1 (CH), 52.9 (CH₃), 48.6 (CH₂).

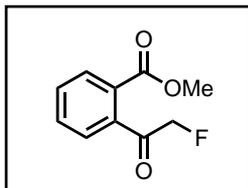
HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₀H₉ClNaO₃)⁺ (M+Na)⁺ 235.0132; encontrada 235.0135.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20
Tiempo de retención: 21.6 min

Temperatura: 30 °C
Flujo: 0.6 mL·min⁻¹

2-(Fluoroacetil)benzoato de metilo, (17k)



Fórmula empírica: C₁₀H₉FO₃
Masa molecular/g·mol⁻¹: 196.18
Aspecto físico: sólido blanco
Pf: 63–64 °C
R_f: 0.56 (Hexano:AcOEt-7:3)
Rendimiento: 93%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.97 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.67 – 7.48 (m, 2H), 7.34 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 5.14 (d, *J* = 47.2 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 202.1 (d, *J* = 22.4 Hz) (CO), 166.5 (CO), 139.4 (C), 132.9 (CH), 130.7 (CH), 129.8 (CH), 129.1 (C), 127.2 (CH), 84.8 (d, *J* = 185.8 Hz) (CH₂), 52.8 (CH₃).

¹⁹F {¹H} RMN (282.4 MHz, Cloroformo-*d*): δ -224.3.

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₀H₉FNaO₃)⁺ (M+Na)⁺ 219.0428; encontrada 219.0435.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

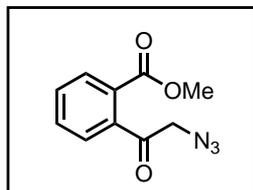
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20

Tiempo de retención: 21.8 min

Temperatura: 30 °C

Flujo: 0.6 mL·min⁻¹

2-(Azidoacetil)benzoato de metilo, (17l)



Fórmula empírica: C₁₀H₉N₃O₃
Masa molecular/g·mol⁻¹: 219.20
Aspecto físico: sólido blanco
Pf: 59–60 °C
R_f: 0.5 (Hexano:AcOEt-7:3)
Rendimiento: 99%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 8.02 (dd, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H), 7.64 (td, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 7.56 (td, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 7.32 (dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 4.27 (s, 2H), 3.93 (s, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 200.2 (CO), 166.4 (CO), 140.8 (C), 133.0 (CH), 130.4 (CH), 130.2 (CH), 128.0 (C), 126.3 (CH), 57.8 (CH₂), 52.8 (CH₃).

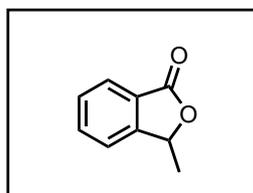
Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²²⁴

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20
Tiempo de retención: 28.2 min

Temperatura: 30 °C
Flujo: 0.6 mL·min⁻¹

3-Metilisobenzofuran-1(3*H*)-ona, (18a)



Fórmula empírica: C₉H₈O₂

Masa molecular/g·mol⁻¹: 148.16

Aspecto físico: aceite incoloro

R_f: 0.2 (Hexano:AcOEt-7:3)

Rendimiento: 92%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.84 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.70 – 7.60 (m, 1H), 7.54 – 7.38 (m, 2H), 5.54 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H), 1.60 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 170.5 (CO), 151.2 (C), 134.1 (CH), 129.1 (CH), 125.7 (C), 125.6 (CH), 121.6 (CH), 77.8 (CH), 20.4 (CH₃).

Rotación Óptica Específica: [α]_D²⁰ = **-38.4** (*c* 0.5, CHCl₃) [para (*S*)-**18a** con >99% *ee*]

lit.²⁰² [α]_D²⁰ = -39.5 (*c* 1.0, CHCl₃) [para enantiómero-(*S*) con >99% *ee*]

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²⁰²

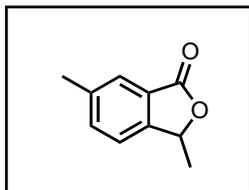
Separación Analítica (HPLC):

Columna: ID
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 90/10
Tiempo de retención: *t*_R [(*R*)-**18a**] = 14.9 min, *t*_R [(*S*)-**18a**] = 16.1 min

Temperatura: 30 °C
Flujo: 0.9 mL·min⁻¹

²²⁴ A. Di Mola, C. Tedesco, A. Massa, *Molecules* **2019**, *24*, 2177.

3,6-Dimetilisobenzofuran-1(3*H*)-ona, (18b)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₀O₂

Masa molecular/g·mol⁻¹: 162.19

Aspecto físico: sólido amarillo

Pf: 34–35 °C (racémico), 29–30 °C [(*R*) o (*S*)-**18b**; 99% *ee*]

R_f: 0.68 (Hexano:AcOEt-6:4)

Rendimiento: >99%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.62 (s, 1H), 7.45 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.48 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H), 2.41 (s, 3H), 1.57 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 170.6 (CO), 148.7 (C), 139.3 (C), 135.2 (CH), 125.9 (C), 125.5 (CH), 121.3 (CH), 77.7 (CH), 21.2 (CH₃), 20.5 (CH₃).

Rotación Óptica Específica: [α]_D²⁰ = -30.8 (*c* 0.77, CHCl₃) [para (*S*)-**18b** con 99% *ee*]
lit.²⁰² [α]_D²⁰ = -36.0 (*c* 1, CHCl₃) [para enantiómero-(*S*) con >99% *ee*]

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²⁰²

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

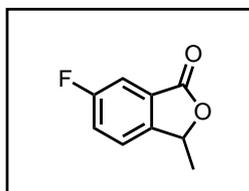
Temperatura: 35 °C

Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 85/15

Flujo: 0.6 mL·min⁻¹

Tiempo de retención: *t*_R [(*S*)-**18b**] = 11.5 min, *t*_R [(*R*)-**18b**] = 12.4 min

6-Fluoro-3-metilisobenzofuran-1(3*H*)-ona, (18c)



Fórmula empírica: C₉H₇FO₂

Masa molecular/g·mol⁻¹: 166.15

Aspecto físico: sólido blanco

Pf: 29–30 °C (racémico), 79–80 °C [(*R*) o (*S*)-**18c**; >99% *ee*]

R_f: 0.6 (Hexano:AcOEt-6:4)

Rendimiento: 61%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.50 (dd, *J* = 7.2, 2.1 Hz, 1H), 7.46 – 7.31 (m, 2H), 5.54 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 1.61 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 169.3 (d, *J* = 4.1 Hz) (CO), 163.2 (d, *J* = 249.2 Hz) (C-F), 146.8 (d, *J* = 2.4 Hz) (C), 127.9 (d, *J* = 9.0 Hz) (C), 123.4 (d, *J* = 8.5 Hz) (CH), 122.1 (d, *J* = 23.9 Hz) (CH), 112.0 (d, *J* = 23.7 Hz) (CH), 77.8 (CH), 20.5 (CH₃).

^{19}F $\{^1\text{H}\}$ RMN (282 MHz, Cloroformo-*d*): δ -111.7.

Rotación Óptica Específica: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -37.0$ (*c* 1.69, CHCl_3) [para (*S*)-**18c** con >99% *ee*]
lit.²⁰² $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -19.6$ (*c* 1, CHCl_3) [para enantiómero-(*S*) con >99% *ee*]

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²⁰²

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

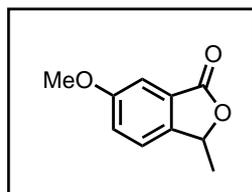
Temperatura: 35 °C

Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20

Flujo: 0.6 mL·min⁻¹

Tiempo de retención: t_R [(*S*)-**18c**] = 12.0 min, t_R [(*R*)-**18c**] = 13.2 min

3-Metil-6-metoxiisobenzofuran-1(3*H*)-ona, (18d)



Fórmula empírica: $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3$

Masa molecular/g·mol⁻¹: 178.19

Aspecto físico: sólido negro

Pf: 54–55 °C

R_f : 0.57 (Hexano:AcOEt-6:4)

Rendimiento: 96%

^1H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.32 – 7.24 (m, 2H), 7.19 (dd, *J* = 8.3, 2.4 Hz, 1H), 5.47 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 1.56 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H).

^{13}C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 170.6 (CO), 160.7 (C-OCH₃), 143.8 (C), 127.2 (C), 123.0 (CH), 122.5 (CH), 107.5 (CH), 77.7 (CH₃), 55.8 (CH), 20.6 (CH₃).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²⁰²

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

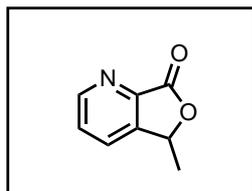
Temperatura: 35 °C

Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20

Flujo: 0.7 mL·min⁻¹

Tiempo de retención: t_R [(*S*)-**18d**] = 12.7 min, t_R [(*R*)-**18d**] = 14.5 min

5-Metilfuro[3,4-*b*]piridin-7(5*H*)-ona, (18e)



Fórmula empírica: C₈H₇NO₂

Masa molecular/g·mol⁻¹: 149.15

Aspecto físico: sólido blanco

Pf: 116–117 °C (racémico), 99–100 °C [(*R*) o (*S*)-**18e**; 98% *ee*]

R_f: 0.65 (Hexano:AcOEt-6:4)

Rendimiento: 64%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 8.86 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 7.88 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.57 (dd, *J* = 7.8, 4.6 Hz, 1H), 5.62 (q, *J* = 6.7 Hz, 1H), 1.67 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 168.1 (CO), 152.6 (CH), 145.0 (C), 144.5 (C), 130.6 (CH), 127.4 (CH), 76.0 (CH), 20.3 (CH₃).

Rotación Óptica Específica: [α]_D²⁰ = –50.5 (*c* 0.71, CHCl₃) [para (*S*)-**18e** con 98% *ee*]

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.^{178a}

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

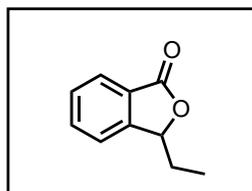
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20

Tiempo de retención: *t_R* [(*S*)-**18e**] = 30.0 min, *t_R* [(*R*)-**18e**] = 36.4 min

Temperatura: 35 °C

Flujo: 0.6 mL·min⁻¹

3-Etilisobenzofuran-1(3*H*)-ona, (18f)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₀O₂

Masa molecular/g·mol⁻¹: 162.19

Aspecto físico: aceite amarillo pálido

R_f: 0.67 (Hexano:AcOEt-6:4)

Rendimiento: 91%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.60 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.45 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.33–7.22 (m, 2H), 5.24 (dd, *J* = 7.2, 4.3 Hz, 1H), 1.99–1.79 (m, 1H), 1.66–1.45 (m, 1H), 0.72 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 170.1 (CO), 149.3 (C), 133.6 (CH), 128.5 (CH), 125.6 (C), 124.8 (CH), 121.5 (CH), 81.8 (CH), 27.0 (CH₂), 8.2 (CH₃).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.^{180b}

Separación Analítica (HPLC):

Columna: ID

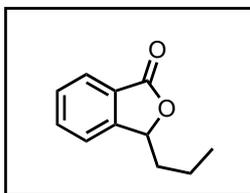
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 95/05

Flujo: 1.0 mL·min⁻¹

Tiempo de retención: t_R [(*R*)-**18f**] = 16.7 min, t_R [(*S*)-**18f**] = 19.5 min

3-Propilisobenzofuran-1(3*H*)-ona, (18g)



Fórmula empírica: C₁₁H₁₂O₂

Masa molecular/g·mol⁻¹: 176.22

Aspecto físico: aceite amarillo pálido

***R*_f:** 0.58 (Hexano:AcOEt-7:3)

Rendimiento: 95%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.85 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.65 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.49 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.42 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.45 (dd, *J* = 8.0, 4.0 Hz, 1H), 2.08–1.90 (m, 1H), 1.86–1.63 (m, 1H), 1.63–1.36 (m, 2H), 0.95 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 170.7 (CO), 150.2 (C), 134.0 (CH), 129.1 (CH), 126.2 (C), 125.7 (CH), 121.8 (CH), 81.3 (CH), 36.9 (CH₂), 18.3 (CH₂), 13.8 (CH₃).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.^{180b}

Separación Analítica (HPLC):

Columna: ID

Temperatura: 30 °C

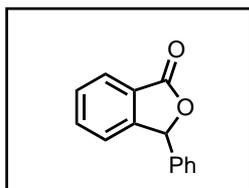
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 95/05

Flujo: 1.0 mL·min⁻¹

Tiempo de retención: t_R [(*R*)-**18g**] = 15.2 min, t_R [(*S*)-**18g**] = 17.5 min

Capítulo 2.

3-Fenilisobenzofuran-1(3*H*)-ona, (18h)



Fórmula empírica: C₁₄H₁₀O₂
Masa molecular/g·mol⁻¹: 210.23
Aspecto físico: sólido blanco
Pf: 113–114 °C
R_f: 0.65 (Hexano:AcOEt-6:4)
Rendimiento: 75%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.97 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.65 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.56 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.44–7.23 (m, 6H), 6.41 (s, 1H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 170.6, 149.8, 136.5, 134.4, 129.5, 129.4, 129.1, 127.1, 125.7, 122.6, 82.8.

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.^{180b}

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OD-H

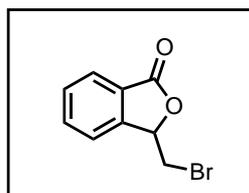
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 85/15

Tiempo de retención: *t_R* [(*S*)-**18h**] = 9.2 min, *t_R* [(*R*)-**18h**] = 11.1 min

Temperatura: 35 °C

Flujo: 0.8 mL·min⁻¹

3-(Bromometil)isobenzofuran-1(3*H*)-ona, (18i)



Fórmula empírica: C₉H₇BrO₂
Masa molecular/g·mol⁻¹: 227.06
Aspecto físico: sólido blanco
Pf: 64–65 °C
R_f: 0.64 (Hexano:AcOEt-6:4)
Rendimiento: 96%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.93 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.78 – 7.54 (m, 3H), 5.70 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 3.77 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 169.5 (CO), 147.3 (C), 134.5 (CH), 130.2 (CH), 126.6 (C), 126.0 (CH), 122.5 (CH), 78.7 (CH), 32.3 (CH₂).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²²⁵

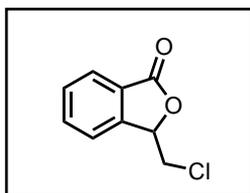
²²⁵ J. Chen, L. Zhou, C. K. Tan, Y.-Y. Yeung, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 999–1009.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20Tiempo de retención: t_R [(*R*)-**18i**] = 26.1 min, t_R [(*S*)-**18i**] = 34.9 min

Temperatura: 30 °C

Flujo: 0.6 mL·min⁻¹**3-(Clorometil)isobenzofuran-1(3*H*)-ona, (**18j**)****Fórmula empírica:** C₉H₇ClO₂**Masa molecular/g·mol⁻¹:** 182.60**Aspecto físico:** sólido blanco**Pf:** 63–64 °C (racémico), 85–86 °C [(*R*) o (*S*)-**18j**]; >99% *ee*]**R_f:** 0.69 (Hexano:AcOEt-6:4)**Rendimiento:** 76%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.91 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.71 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.64–7.50 (m, 2H), 5.67 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H), 3.92 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 169.6 (CO), 146.7 (C), 134.4 (CH), 130.1 (CH), 126.5 (C), 126.0 (CH), 122.6 (CH), 79.2 (CH), 44.6 (CH₂).

Rotación Óptica Específica: $[\alpha]_D^{20} = -20.9$ (*c* 0.77, CHCl₃) [para (*R*)- **18j** con >99% *ee*]

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²²⁶

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

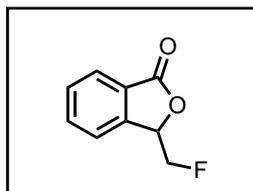
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20Tiempo de retención: t_R [(*R*)-**18j**] = 24.2 min, t_R [(*S*)-**18j**] = 33.4 min

Temperatura: 30 °C

Flujo: 0.6 mL·min⁻¹

²²⁶ T. von Keutz, D. Cantillo, C. O. Kappe, *Org. Lett.* **2020**, *22*, 7537-7541.

3-(Fluorometil)isobenzofuran-1(3*H*)-ona, (18k)



Fórmula empírica: C₉H₇FO₂
Masa molecular/g·mol⁻¹: 166.15
Aspecto físico: sólido blanco
Pf: 79–80 °C
R_f: 0.42 (Hexano:AcOEt-7:3)
Rendimiento: 97%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.91 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.77 – 7.66 (m, 1H), 7.63 – 7.50 (m, 2H), 5.66 (dt, *J* = 18.9, 4.3 Hz, 1H), 4.92 – 4.56 (m, 2H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 169.8 (CO), 145.1 (d, *J* = 5.0 Hz) (C), 134.5 (CH), 130.1 (CH), 126.5 (C), 126.1 (CH), 122.4 (CH), 82.4 (d, *J* = 178.3 Hz) (CH₂), 78.9 (d, *J* = 22.0 Hz) (CH).

¹⁹F {¹H} RMN (282.4 MHz, Cloroformo-*d*): δ -229.0.

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²²⁷

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

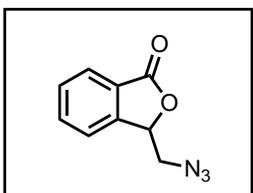
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20

Flujo: 0.6 mL·min⁻¹

Tiempo de retención: *t*_R [(*R*)-**18k**] = 24.8 min, *t*_R [(*S*)-**18k**] = 31.6 min

3-(Azidometil)isobenzofuran-1(3*H*)-ona, (18l)



Fórmula empírica: C₉H₇N₃O₂
Masa molecular/g·mol⁻¹: 189.17
Aspecto físico: aceite amarillo pálido
R_f: 0.6 (Hexano:AcOEt-6:4)
Rendimiento: 99%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.89 (dt, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H), 7.70 (td, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H), 7.63 – 7.44 (m, 2H), 5.58 (dd, *J* = 5.4, 4.2 Hz, 1H), 3.82 (dd, *J* = 13.3, 4.2 Hz, 1H), 3.69 (dd, *J* = 13.3, 5.4 Hz, 1H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 169.7 (CO), 146.4 (C), 134.5 (CH), 130.0 (CH), 126.3 (C), 125.9 (CH), 122.2 (CH), 79.2 (CH), 53.4 (CH₂).

²²⁷ E. M. Woerly, S. M. Banik, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 13858–13861.

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₉H₇N₃NaO₂)⁺ (M+Na)⁺ 212.0430; encontrada 212.0434.

Rotación Óptica Específica: $[\alpha]_D^{20} = -125.7$ (*c* 1.38, CHCl₃) [para (*R*)-**18l** con >99% *ee*]

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

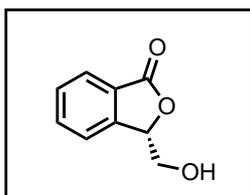
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20

Flujo: 0.6 mL·min⁻¹

Tiempo de retención: *t_R* [(*R*)-**18l**] = 30.0 min, *t_R* [(*S*)-**18l**] = 35.2 min

(*S*)-3-(hidroximetil)isobenzofuran-1(3*H*)-ona, (18m)



Fórmula empírica: C₉H₈O₃

Masa molecular/g·mol⁻¹: 164.16

Aspecto físico: sólido blanco

Pf: 88-90 °C

***R_f*:** 0.31 (Hexano:AcOEt-1:1)

Rendimiento: 85%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.89 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.74 – 7.63 (m, 1H), 7.59 – 7.48 (m, 2H), 5.55 (t, *J* = 3.6 Hz, 1H), 4.12 (dd, *J* = 12.4, 3.6 Hz, 1H), 3.89 (dd, *J* = 12.4, 5.6 Hz, 1H), 2.85 (s, 1H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 171.0 (CO), 146.8 (C), 134.4 (CH), 129.6 (CH), 126.5 (C), 125.8 (CH), 122.4 (CH), 82.1 (CH), 63.8 (CH₂).

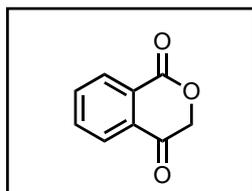
Rotación Óptica Específica: $[\alpha]_D^{20} = +59.1$ (*c* 1.67, CHCl₃) [para (*S*)-**18m** con 98% *ee*]

lit.²¹⁰ $[\alpha]_D^{20} = +52.7$ (*c* 0.21, CHCl₃) [para enantiómero-(*S*) con 97% *ee*]

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²¹⁰

Capítulo 2.

Isocroman-1,4-diona, (19)



Fórmula empírica: C₉H₆O₃

Masa molecular/g·mol⁻¹: 162.14

Aspecto físico: sólido ligeramente amarillento

Pf: 128-131 °C

R_f: 0.41 (Hexano:AcOEt-7:3)

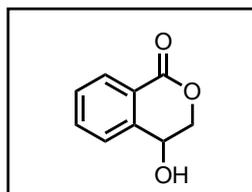
Rendimiento: 77%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 8.30 – 8.20 (m, 1H), 8.10 – 7.96 (m, 1H), 7.92 – 7.78 (m, 2H), 5.11 (s, 2H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 189.6 (CO), 161.6 (CO), 136.0 (CH), 134.8 (CH), 131.9 (C), 131.0 (CH), 128.1 (C), 125.7 (CH), 73.5 (CH₂).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.^{208a}

4-Hidroxiisocroman-1-ona (20)



Fórmula empírica: C₉H₈O₃

Masa molecular/g·mol⁻¹: 164.16

Aspecto físico: aceite incoloro

R_f: 0.17 (Hexano:AcOEt-6:4)

Rendimiento: 83%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 8.09 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.73 – 7.43 (m, 3H), 4.92 (t, *J* = 4.2 Hz, 1H), 4.62 – 4.44 (m, 2H), 3.13 (s, 1H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 164.7 (CO), 140.8 (C), 134.6 (CH), 130.5 (CH), 129.5 (CH), 126.6 (CH), 123.9 (C), 72.0 (CH₂), 64.3 (CH).

Rotación Óptica Específica: [α]_D²⁰ = –22.8 (*c* 0.48, CHCl₃) [para (*S*)-**20** con 98% *ee*]
lit.²¹⁰[α]_D²⁰ = –15.2 (*c* 0.50, CHCl₃) [para enantiómero-(*S*) con 97% *ee*]

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²¹⁰

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

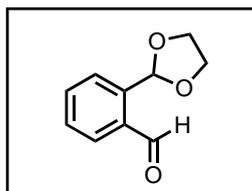
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20

Tiempo de retención: *t_R* [(*S*)-**20**] = 14.0 min, *t_R* [(*R*)-**20**] = 14.9 min

Temperatura: 30 °C

Flujo: 0.6 mL·min⁻¹

2-(1,3-Dioxolan-2-il)benzaldehído, (21)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₀O₃

Masa molecular/g·mol⁻¹: 178.19

Aspecto físico: aceite amarillo

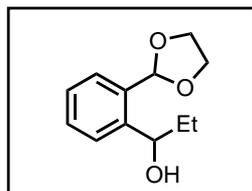
R_f: 0.73 (Hexano:AcOEt-6:4)

Rendimiento: 94%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 10.41 (s, 1H), 7.93 (dd, *J* = 7.6, 1.5 Hz, 1H), 7.73 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.55 (m, 1H), 7.36 (m, 1H), 6.41 (s, 1H), 4.12 (m, 4H).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²²⁸

1-[2-(1,3-Dioxolan-2-il)fenil]propan-1-ol, (22f)



Fórmula empírica: C₁₂H₁₆O₃

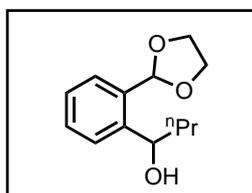
Masa molecular/g·mol⁻¹: 208.26

Aspecto físico: aceite amarillo pálido

Rendimiento: 83%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.66–7.47 (m, 2H), 7.46–7.37 (m, 1H), 7.36–7.26 (m, 1H), 6.09 (s, 1H), 4.97 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.24–4.00 (m, 4H), 2.66 (s, 1H), 2.03–1.76 (m, 2H), 1.01 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

1-[2-(1,3-Dioxolan-2-il)fenil]butan-1-ol, (22g)



Fórmula empírica: C₁₃H₁₈O₃

Masa molecular/g·mol⁻¹: 222.28

Aspecto físico: aceite amarillo

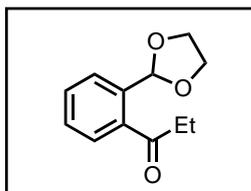
Rendimiento: 86%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.63–7.43 (m, 2H), 7.43–7.21 (m, 2H), 6.06 (s, 1H), 5.12–4.97 (m, 1H), 4.22–3.96 (m, 4H), 2.85 (s, 1H), 1.93–1.70 (m, 2H), 1.65–1.48 (m, 1H), 1.48–1.25 (m, 1H), 0.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

²²⁸ B. Ravindra, B. G. Das, P. Ghorai, *Org. Lett.* **2014**, *16*, 5580–5583.

Capítulo 2.

1-[2-(1,3-Dioxolan-2-il)fenil]propan-1-ona, (23f)

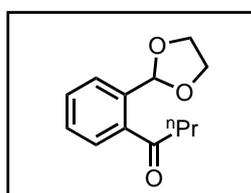


Fórmula empírica: C₁₂H₁₄O₃
Masa molecular/g·mol⁻¹: 206.24
Aspecto físico: aceite marrón
Rendimiento: 91%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.62 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.54–7.20 (m, 3H), 6.21 (s, 1H), 4.06–3.90 (m, 4H), 2.87 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 1.17 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 205.9 (CO), 139.6 (C), 136.3 (C), 130.4 (CH), 128.7 (CH), 127.0 (CH), 126.9 (CH), 101.1 (CH), 65.2 (2 CH₂), 35.7 (CH₂), 8.2 (CH₃).

1-[2-(1,3-Dioxolan-2-il)fenil]butan-1-ona, (23g)

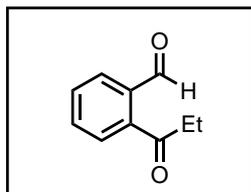


Fórmula empírica: C₁₃H₁₆O₃
Masa molecular/g·mol⁻¹: 220.27
Aspecto físico: aceite amarillo
Rendimiento: 91%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.67 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.50–7.30 (m, 3H), 6.21 (s, 1H), 4.19–4.01 (m, 2H), 4.02–3.90 (m, 2H), 2.83 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.73 (h, *J* = 7.4 Hz, 2H), 0.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 205.4 (CO), 139.7 (C), 136.4 (C), 130.5 (CH), 128.7 (CH), 127.1 (CH), 127.0 (CH), 101.0 (CH), 65.2 (2 CH₂), 44.3 (CH₂), 17.5 (CH₂), 13.8 (CH₃).

2-Propionilbenzaldehído, (24f)



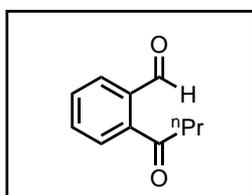
Fórmula empírica: C₁₀H₁₀O₂
Masa molecular/g·mol⁻¹: 162.19
Aspecto físico: aceite marrón
Rendimiento: 99%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 10.06 (s, 1H), 7.85–7.71 (m, 1H), 7.68–7.46 (m, 3H), 2.86 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.16 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

^{13}C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 204.5 (CO), 192.0 (CO), 140.9 (C), 135.6 (C), 133.1 (CH), 131.2 (CH), 129.9 (CH), 127.6 (CH), 34.5 (CH₂), 8.1 (CH₃).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.¹⁸²

2-Butirilbenzaldehído, (24g)

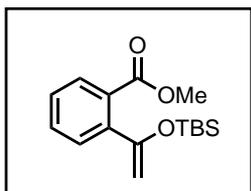


Fórmula empírica: C₁₁H₁₂O₂
Masa molecular/g·mol⁻¹: 176.22
Aspecto físico: aceite marrón
Rendimiento: 85%

^1H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 9.96 (s, 1H), 7.70–7.61 (m, 1H), 7.55–7.37 (m, 3H), 2.73 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.59 (h, *J* = 7.5 Hz, 2H), 0.83 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

^{13}C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 203.5 (CO), 191.6 (CO), 140.7 (C), 135.4 (C), 132.8 (CH), 130.9 (CH), 129.3 (CH), 127.5 (CH), 42.6 (CH₂), 17.2 (CH₂), 13.3 (CH₃).

2-{1-[(*tert* Butildimetilsilil)oxi]vinil}benzoato de metilo, (25)



Fórmula empírica: C₁₆H₂₄O₃Si
Masa molecular/g·mol⁻¹: 292.45
Aspecto físico: aceite amarillo
R_f: 0.88 (Hexano:AcOEt-6:4)
Rendimiento: 99%

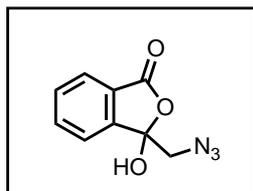
^1H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.65 – 7.25 (m, 4H), 4.52 (dd, *J* = 12.9, 1.4 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 0.87 (s, 9H), 0.09 (s, 6H).

^{13}C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 169.2 (C), 157.3 (CO), 139.6 (C), 130.9 (C), 130.8 (CH), 129.1 (CH), 129.0 (CH), 128.0 (CH), 94.5 (CH₂), 52.2 (CH₃), 25.7 (3 CH₃), 18.2 (C), -4.9 (2 CH₃).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²⁰⁶

Capítulo 2.

3-(Azidometil)-3-hidroxiisobenzofuran-1(3H)-ona, (26)



Fórmula empírica: C₉H₇N₃O₃

Masa molecular/g·mol⁻¹: 205.17

Aspecto físico: aceite marrón (gomoso)

R_f: 0.39 (Hexano:AcOEt-6:4)

Rendimiento: 95% (enzimático)

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.83 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.74 (t, *J* = 7.4, 1H), 7.67 – 7.58 (m, 2H), 3.76 (s, 2H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 168.2 (CO), 146.2 (C), 135.0 (CH), 131.3 (CH), 126.8 (C), 125.9 (CH), 123.0 (CH), 106.9 (C), 56.5 (CH₂).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₉H₇N₃NaO₃)⁺ (M+Na)⁺ 228.0380; encontrada 228.0385.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20

Tiempo de retención: 13.8 min

Temperatura: 30 °C

Flujo: 0.6 mL·min⁻¹

CAPÍTULO 3.

Síntesis enantioselectiva de
3-hidroxipiperidinas mediante
una cascada bi-enzimática
utilizando ene-reductasas y
alcohol deshidrogenasas.

ANTECEDENTES

3.1. Importancia de las piperidinas sustituidas.

Los heterociclos piperidínicos son unidades importantes que están presentes en una gran variedad de productos naturales²²⁹ y sustancias farmacológicamente activas.²³⁰ Además, este tipo de estructuras también se suelen emplear con frecuencia en síntesis asimétrica como ligandos o grupos auxiliares (quirales). Si en el primer Capítulo se mencionó que mencionó que las *piperazinas* ocupan el cuarto lugar entre los sistemas de anillo más utilizados en los medicamentos de molécula pequeña,¹²³ las piperidinas son las terceras en esta clasificación, sólo por detrás de los anillos de benceno y de piridina.

En términos generales, las piperidinas tienen la capacidad de funcionar tanto como parte esencial del farmacóforo, interactuando directamente con el sitio activo requerido, siendo las piperidinas sustituidas o funcionalizadas las que mejor desempeñan esta función; o como un componente estructural para modular la basicidad de las moléculas con precisión.²³¹

Dentro de estas estructuras privilegiadas, encontramos las piperidinas 3-sustituidas y 3,5-disustituidas, presentes en muchos compuestos bioactivos,²³² incluso en multitud de fármacos aprobados y posibles candidatos. Frecuentemente presentan grupos hidroxilo en la posición 3 del anillo (Figura 15).

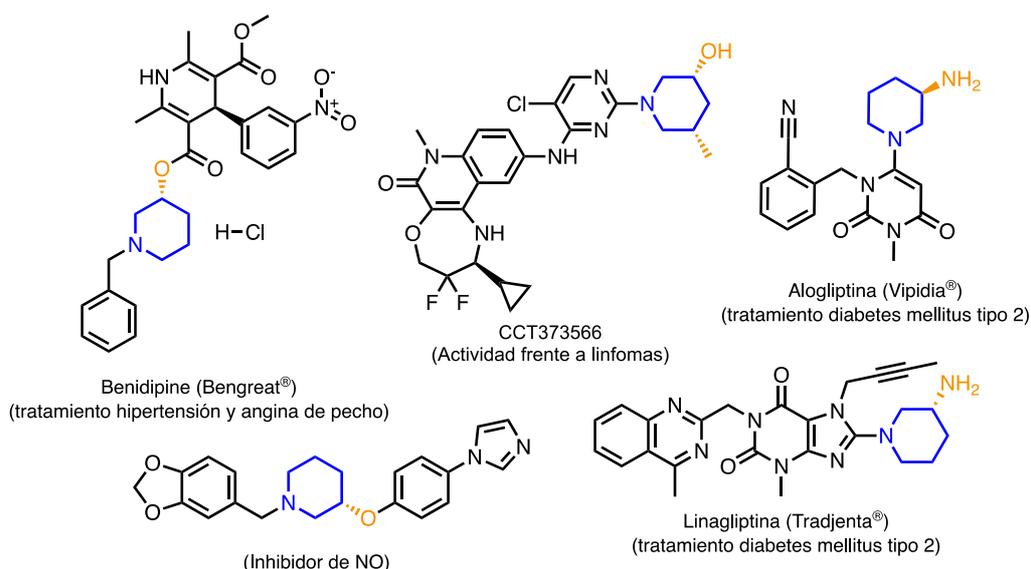


Figura 15. Compuestos bioactivos con la estructura de piperidinas 3- y 3,5-sustituidas en su esqueleto.

²²⁹ D. Dhara, A. Dhara, J. Bennett, P. V. Murphy, *Chem. Rec.* **2021**, *21*, 2958–2979.

²³⁰ M. M. Abdelshaheed, I. M. Fawzy, H. I. El-Subbagh, K. M. Youssef, *Future J. Pharm. Sci.* **2021**, *7*, 188.

²³¹ N. A. Frolov, A. N. Vereshchagin, *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 2937.

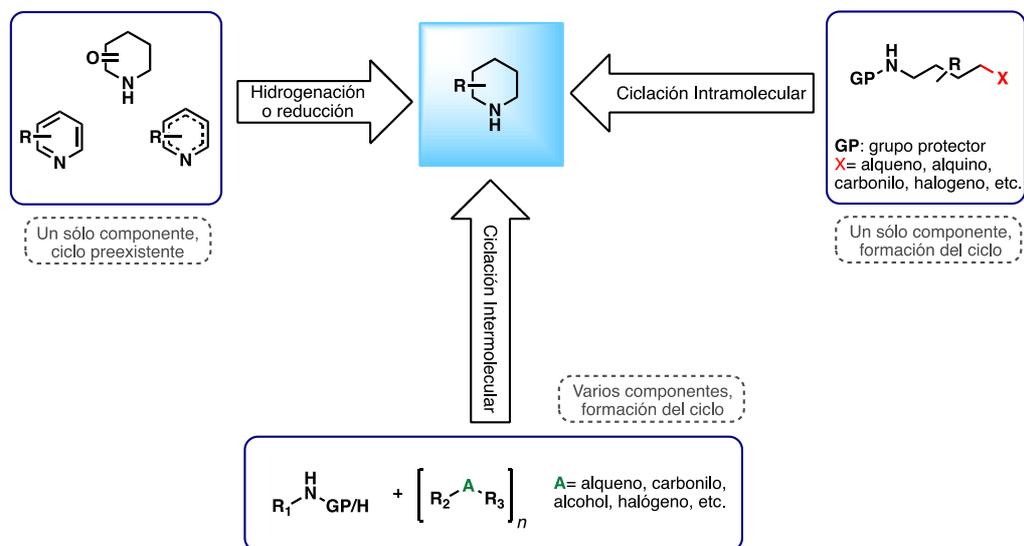
²³² M. A. Wijdeven, J. Willemsen, F. P. J. T. Rutjes, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *2010*, 2831–2844.

Capítulo 3.

En consecuencia, a lo largo de los años se ha dedicado mucha atención al desarrollo de métodos de síntesis de estos compuestos.²³³ En las siguientes secciones, se resumirán las principales rutas de síntesis para preparar derivados de piperidina, con un enfoque particular en las piperidinas 3-sustituidas, ya que este Capítulo se centra en la preparación selectiva de una serie de 3-hidroxipiperidinas. También se ha incluido una sección adicional (3.4.) donde se describen procesos biocatalíticos con una metodología en cascada semejante a la que se empleará a lo largo de este Capítulo.

3.2. Estrategias no enzimáticas para la síntesis de piperidinas sustituidas.

Existen varias revisiones sobre métodos específicos de síntesis de piperidinas^{231,233,234} y sobre su funcionalización.²³⁵ En el Esquema 51 se recogen las principales propuestas presentes en la literatura para formar los anillos de piperidina.



Esquema 51. Principales rutas de síntesis del ciclo de la piperidina. Fuente: Modificado de Vereshchagin *et al.*²³¹

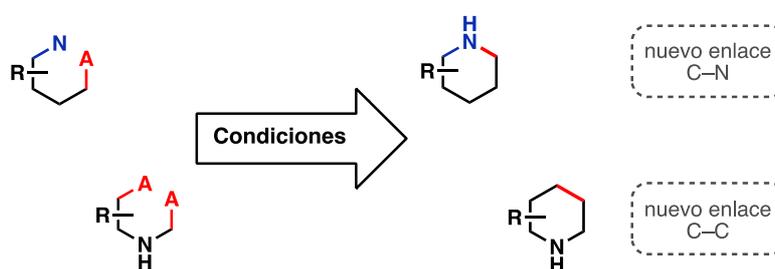
Se puede realizar una clasificación atendiendo a la existencia previa o no del ciclo. En estas últimas, la formación del ciclo puede ocurrir mediante una reacción intra- o intermolecular.

²³³ M. G. P. Buffat, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 1701–1729.

²³⁴ P. M. Weintraub, J. S. Sabol, J. M. Kane, D. R. Borchering, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 2953–2989.

²³⁵ G.-Q. Liu, T. Opatz (2018). *Advances in Heterocyclic Chemistry*, Volume 125. (Editor: E. F.V. Scriven, C. A. Ramsden). Elsevier Inc. Capítulo 2. pp. 107-234. ISBN: ISBN: 978-0-12-815210-2.

En el cierre de anillo intramolecular, el inicio de la ciclación se produce mediante la activación de uno o varios grupos funcionales de la estructura, mediante la adición de un catalizador, un agente oxidante o un reductor (según el sustrato). Dependiendo de los sitios activos involucrados, se puede formar un nuevo enlace C–N o C–C (Esquema 52).



Esquema 52. Estrategias de ciclación intramolecular.

Dentro de la formación de un enlace C–N, la S_N2 por un nucleófilo de nitrógeno sobre, por ejemplo, un haluro o alcohol previamente activado es un método fiable y bien establecido²³¹ para producir piperidinas. A menudo, la cadena lineal ya contiene el patrón de sustitución deseado, previo al paso de la ciclación, siendo este el paso final, junto con la desprotección de los grupos funcionales, si es necesario.

La aminación reductora intramolecular es otro método común, las piperidinas se pueden sintetizar por ejemplo a partir de aminoaldehídos, ya que estos no suelen ser muy estables. En la mayoría de los casos, el simple almacenamiento conduce a la adición intramolecular y tras el paso de reducción, se obtiene el correspondiente ciclo.²³³ Las reacciones de aminas con alquenos y alquinos, del mismo modo, pueden dar situaciones de adición intramolecular tipo Michael.²³⁶

Respecto a los procesos que involucran la formación de un enlace C–C, principalmente encontramos metodologías que implican la metátesis de olefinas o RCM.²³⁷

En la preparación del anillo de manera intermolecular, destacan los procesos de cicloadición como las reacciones del tipo hetero Diels-Alder. El método se aplica principalmente a la reacción de dienos con iminas. Las reacciones de imino Diels-Alder requieren un dieno rico en electrones y una imina pobre en electrones. En general, la imina se protege como sulfonamida, sililamina, o también como bencilimina. Suelen estar catalizadas por un ácido de Lewis como el $ZnCl_2$.²³³

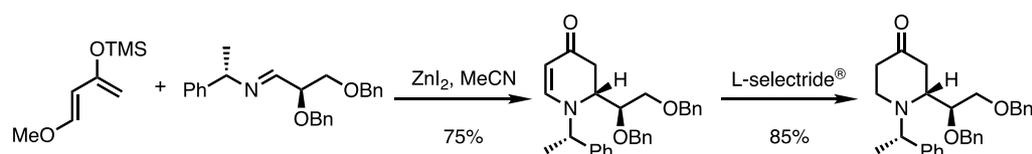
²³⁶ A. Barco, S. Benetti, A. Casolari, G. P. Pollini, G. Spalluto, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 3039–3042.

²³⁷ F.-X. Felpin, J. Lebreton, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, *2003*, 3693–3712.

Capítulo 3.

Díaz-de-Villegas y colaboradores²³⁸ investigaron una reacción de imino Diels-Alder utilizando el dieno de Danishefsky, con una imina enantioméricamente pura (Esquema 53). Se encontró que la reacción en acetonitrilo a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ usando ZnI_2 como ácido de Lewis eran las condiciones óptimas.

En el producto de cicloadición, el éter silílico es un sintón para un grupo carbonilo a través del enol. El grupo metoxi es susceptible a una reacción de eliminación que permite la formación de un nuevo grupo alqueno, generando el compuesto final, una β -enaminona, la cual fue el único diastereoisómero observado por RMN. La reducción posterior con L-selectride[®] a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ obtuvo la piperidin-4-ona correspondiente.



Esquema 53. Reacción imino Diels–Alder para la preparación de piperidinas sustituidas.

Por otro lado, una alternativa a los métodos anteriores consistiría en la modificación o funcionalización de un sistema del anillo preexistente, como por ejemplo los anillos de pirrolidina, piridina, o derivados de piperidinas como las piperidinonas; estas últimas debido a la fácil manipulación del grupo carbonilo para la introducción de diferentes sustituyentes.

Dentro de esta aproximación, los métodos de hidrogenación o hidrogenación por transferencia, especialmente la de piridinas, son comunes para la obtención de piperidinas. Por lo general, estas reacciones se llevan a cabo utilizando catalizadores de metales de transición como el rutenio,²³⁹ rodio²⁴⁰ o iridio;²⁴¹ y en ocasiones bajo condiciones duras (alta temperatura, presión y/o tiempo largo de reacción).

Finalmente, entre los métodos de síntesis a partir de un ciclo preformado cabe destacar por su alto valor sintético, la expansión del mismo, como, por ejemplo, ocurre con los anillos de los aza-heterociclos 2-sustituidos. Este tipo de reordenamiento será de utilidad más adelante en el Capítulo (Sección 3.8), por ello, se trata más en detalle a continuación.

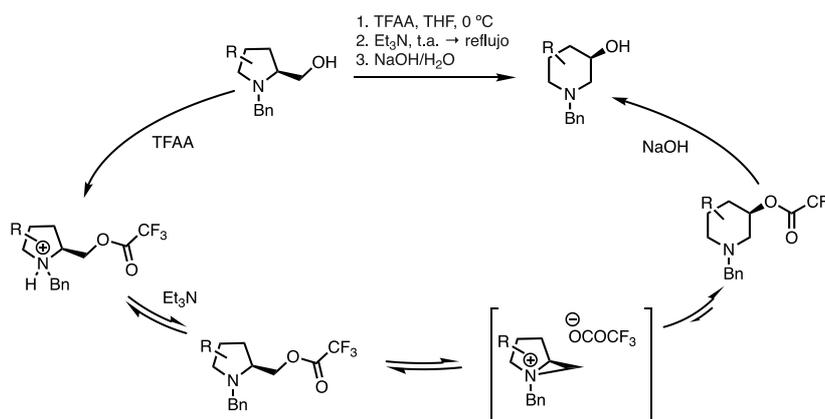
²³⁸ R. Badorrey, C. Cativiela, M. D. Díaz-de-Villegas, J. A. Galvez, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 7601–7612.

²³⁹ F. Bourriquen, J. Hervochon, R. Qu, S. Bartling, N. Rockstroh, K. Junge, C. Fischmeister, M. Beller, *Chem. Commun.* **2022**, *58*, 8842–8845.

²⁴⁰ J. Wu, Z. Chen, J. H. Barnard, R. Gunasekar, C. Pu, X. Wu, S. Zhang, J. Ruan, J. Xiao, *Nat. Catal.* **2022**, *5*, 982–992.

²⁴¹ B. Qu, H. P. R. Mangunuru, S. Tcyrulnikov, D. Rivalti, O. V. Zatolochnaya, D. Kurouski, S. Radomkit, S. Biswas, S. Karyakarte, K. R. Fandrick, J. D. Sieber, S. Rodriguez, J.-N. Desrosiers, N. Haddad, K. McKellop, S. Pennino, H. Lee, N. K. Yee, J. J. Song, M. C. Kozłowski, C. H. Senanayake, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 1333–1337.

Cossy y colaboradores²⁴² consiguieron convertir pirrolidinas 2-sustituidas en 3-hidroxipiperidinas mediante tratamiento con anhídrido trifluoroacético (TFAA) seguido de la adición de trimetilamina (Et_3N) y por último un tratamiento con hidróxido de sodio.



Esquema 54. Preparación de 3-hidroxipiperidinas mediante una reacción de expansión del anillo a partir de pirrolidinas 2-sustituidas.

Esta transformación se inicia con la esterificación del alcohol por el TFAA de la 2-(hidroximetil)pirrolidina de partida, formándose una sal de amonio cuaternario (Esquema 54).

Cuando se añade la trietilamina se produce la *N*-desprotonación, generando un ion de aziridinio bicíclico. Este, mediante el ataque del anión trifluoroacetato, que puede tener lugar intra- o intermolecularmente, libera la tensión del biciclo para producir el compuesto de expansión del anillo en forma de éster de trifluoroacetato. Finalmente, la saponificación con NaOH da como resultado las correspondientes 3-hidroxipiperidinas.

3.3. Estrategias enzimáticas para la síntesis asimétrica de piperidinas.

En los últimos años, han surgido varias estrategias biocatalíticas centradas en la preparación de piperidinas tanto mono- como multisustituidas. El Esquema 55 muestra algunos métodos empleados para su síntesis utilizando distintos tipos de enzimas.

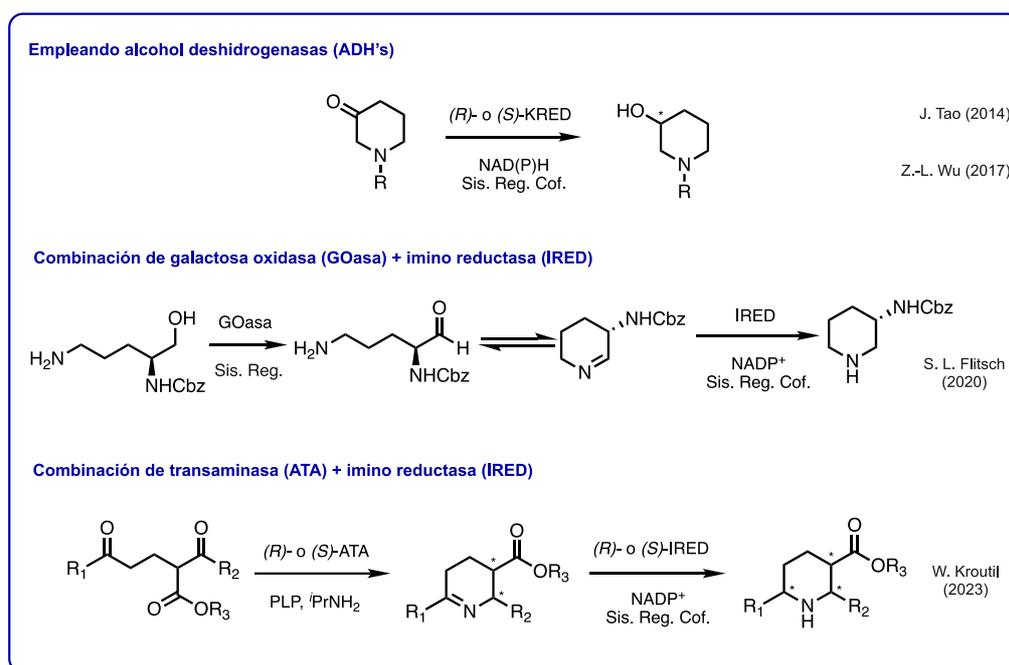
En los dos primeros ejemplos, se sintetizan piperidinas sustituidas en la posición C3; en el caso de Tao^{243a} y Wu^{243b}, se obtienen 3-hidroxipiperidinas a partir de las correspondientes

²⁴² a) J. Cossy, C. Dumas, P. Michel, D. G. Pardo, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 549–552. b) J. Cossy, C. Dumas, D. G. Pardo, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, *1999*, 1693–1699.

²⁴³ a) X. Ju, Y. Tang, X. Liang, M. Hou, Z. Wan, J. Tao, *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18*, 827–830. b) C. Li, Y. Liu, X.-Q. Pei, Z.-L. Wu, *Process Biochem.* **2017**, *56*, 90–97.

Capítulo 3.

cetonas usando ADH's como catalizadores; y en que el caso de Flitsch y colaboradores,²⁴⁴ se sintetizó la 3-aminopiperidina protegida con Cbz, combinando, en una cascada enzimática en un solo paso (*one-pot, three-steps*), una GOasa con una IRED.



Esquema 55. Preparaciones seleccionadas de piperidinas empleando estrategias enzimáticas.

El último de los ejemplos seleccionados se trata del trabajo de Kroutil y colaboradores.²⁴⁵ Con este método se consigue la preparación de piperidinas con tres centros quirales mediante un proceso simultáneo en un único recipiente (*one-pot, two-steps*), utilizando como precursores dicetoésteres aquirales.

El estereocontrol se logra mediante un primer paso de transaminación que conduce a intermedios de enamina o imina ópticamente puros (*ee* >99%), seguido de una reducción diastereoselectiva del *N*-heterociclo formado utilizando una IRED.

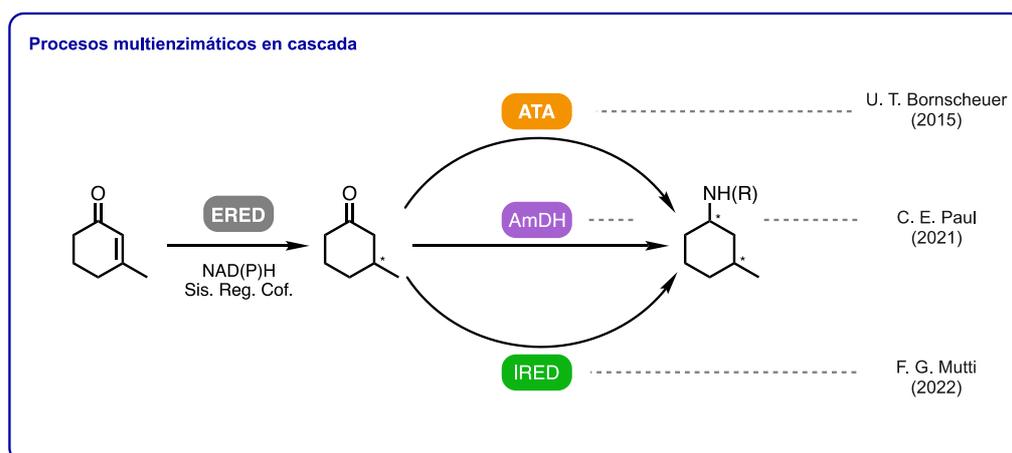
²⁴⁴ G. J. Ford, N. Kress, A. P. Matthey, L. J. Hepworth, C. R. Baldwin, J. R. Marshall, L. S. Seibt, M. Huang, W. R. Birmingham, N. J. Turner, S. L. Flitsch, *Chem. Commun.* **2020**, 56, 7949–7952.

²⁴⁵ P. Petermeier, C. Kohlfuerst, A. Torvisco, R. C. Fischer, A. Mata, D. Dallinger, C. O. Kappe, J. H. Schrittwieser, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.* **2023**, 365, 2188–2202.

Cabe mencionar que, aunque no se hayan incluido en el Esquema 55, en la Introducción (Esquema 15) se mencionaron dos aproximaciones en las que también se sintetizaban piperidinas mono-¹¹³ y disustituidas¹¹² mediante estrategias multienzimáticas.

3.4. Aplicación de procesos bi-enzimáticos en la preparación de estructuras análogas.

Dentro de esta sección destacan tres procesos en cascada en los que se obtienen 3-metilciclohexilaminas ópticamente activas empleando un sistema bi-enzimático compatible (Esquema 56).



Esquema 56. Preparación de 3-metilciclohexilaminas ópticamente activas mediante cascadas bi-enzimáticas.

En todos ellos, la enzima encargada de realizar el primer paso, de la reducción asimétrica de la cetona insaturada inicial, es una ERED de la familia *Old Yellow Enzyme* (OYE, EC 1.6.99.1). En el primero de ellos, Bornscheuer y colaboradores²⁴⁶ presentan un proceso simultáneo de ERED/ATA en el que para la regeneración del cofactor NADP⁺ se emplea un sistema de glucosa/GDH y para el segundo paso, se emplea como donador de amino la alanina y el sistema de LDH/GDH para desplazar el equilibrio de la reacción de aminación, eliminando además el piruvato generado del medio.

En el caso del trabajo de Paul y colaboradores,²⁴⁷ también presentan una cascada concurrente empleando una pareja de enzimas ERED/AmDH.

²⁴⁶ L. Skalden, C. Peters, J. Dickerhoff, A. Nobili, H.-J. Joosten, K. Weisz, M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemBioChem*, **2015**, *16*, 1041–1045.

²⁴⁷ E. P. J. Jongkind, A. Fossey-Jouenne, O. Mayol, A. Zaparucha, C. Vergne-Vaxelaire, C. E. Paul, *ChemCatChem* **2022**, *14*, e202101576.

Capítulo 3.

Al ser ambas enzimas NAD(P)H dependientes, un único sistema de glucosa/GDH es necesario incluir para regenerar el cofactor.

Por último, el equipo de Mutti²⁴⁸ ha desarrollado una cascada que combina enzimas ERED con imino reductasas o aminosas reductoras (IRED's/RedAm's). Esta estrategia permite la síntesis de aminas primarias, secundarias y terciarias mediante el empleo de procesos tanto en cascada concurrente como secuencial. Además, se implementó un sistema de formiato/FDH como regenerador del cofactor. Esto permitió prescindir del sistema de glucosa/GDH ya que, al usar una disolución tampón formada por formiato de amonio o alquilamonio, esta era tanto la fuente de equivalentes reductores para la regeneración del cofactor, como el donante del grupo amina requerido.

En todos estos ejemplos de procesos en cascada se pueden observar resultados que contienen proporciones diastereoméricas que van desde moderadas a muy buenas (hasta >99% de *dr*) y excesos enantioméricos en general elevados (hasta >99% de *ee*).

²⁴⁸ T. Knaus, M. L. Corrado, F. G. Mutti, *ACS Catal.* **2022**, *12*, 14459–14475.

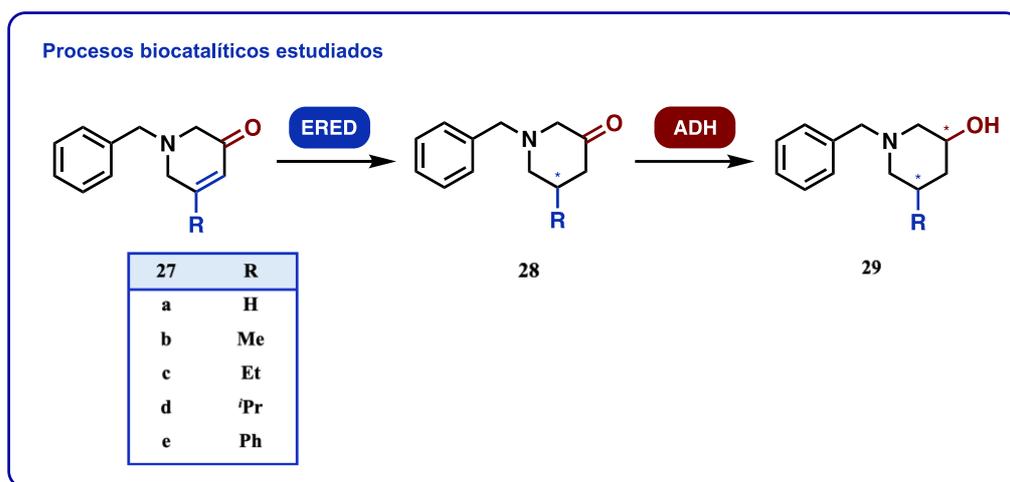
OBJETIVOS

Considerando las ventajas sintéticas que los sistemas catalíticos formados por múltiples enzimas en un solo recipiente ofrecen, así como la importancia de las estructuras piperidínicas quirales, en este Capítulo nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- Diseñar una estrategia bi-enzimática utilizando una ene-reductasa (ERED) y una alcohol deshidrogenasa (ADH) que permita la síntesis enantioselectiva de 3-hidroxpiperidinas con distinta sustitución en la posición C5 (alquil-, fenil-, *H*-) a partir de 1,6-dihidropiridin-3(2*H*)-onas (dihidropiridinonas), bajo condiciones suaves de reacción.
- Preparar un panel de moléculas con diferentes sustituyentes en la posición (C5) de la dihidropiridinona para el estudio del proceso catalizado por las ERED's. Del mismo modo, preparar las correspondientes piperidin-3-onas que serán sustrato del proceso catalizado por las ADH's. Así, como los productos finales de reacción, las piperidinas mono y di-sustituídas en su forma racémica, que se utilizarán como patrones de referencia en el análisis de los procesos enzimáticos.
- Estudiar y optimizar los distintos parámetros de la reacción para ambos catalizadores (ERED y ADH) de forma independiente para las estructuras modelo seleccionadas, que posteriormente se aplicarán en el resto de moléculas que componen el estudio.
- Evaluar la posibilidad de implementar una metodología de catálisis concurrente en la cual, tanto la ADH como la ERED estén presentes desde el inicio. O, en caso de que no fuera factible, optar por un enfoque secuencial, donde los catalizadores se incorporen gradualmente a la mezcla de reacción.
- Identificar parejas de enzimas enantiocomplementarias que permitan acceder a cada estereoisómero de manera selectiva.
- Para demostrar la aplicabilidad del método, se evaluarán las mejores biotransformaciones obtenidas mediante el diseño y la realización de experimentos en una escala semipreparativa.
- Asignar la configuración absoluta a las piperidinas enantioenriquecidas obtenidas y contrastarla con la enantioselectividad esperada de las enzimas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, en el Esquema 57 se proporciona una visión general del proceso bi-enzimático objeto de estudio.



Esquema 57. Estrategia general empleada en el Capítulo. En ella se transforman las dihidropiridinonas **27** en las 3-hidroxipiperidinas **29** aplicando un sistema bi-enzimático.

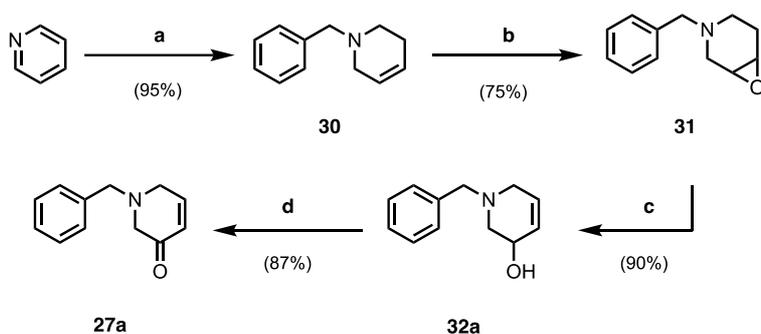
3.5. Preparación de los materiales de partida y los patrones de referencia.

En esta sección se describirán los procedimientos químicos empleados para la preparación de los compuestos que van a componer el panel de moléculas que se estudiarán a lo largo del Capítulo. Los sustratos de partida para las biotransformaciones son las 1,6-dihidropiridin-3(2*H*)-onas, **27**. Tienen, por tanto, una estructura de cetona α,β -insaturada, a la que se incorporan diversos sustituyentes en la posición C5 de anillo. A lo largo del texto se nombrarán simplemente como dihidropiridinonas.

En el Esquema 58 está representada la ruta empleada para la preparación del sustrato **27a**, el cual será el sustrato modelo de este estudio. En primer lugar, se preparó una sal de bencilpiridinio empleando bromuro de bencilo y piridina, después se redujo con NaBH_4 para dar la piperidina bencilada **30**.

En el siguiente paso se formó el epóxido **31** por tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) y *N*-bromosuccinimida (NBS). Bajo estas condiciones se evita la sobreoxidación de la piperidina, observándose un rendimiento elevado en el proceso.

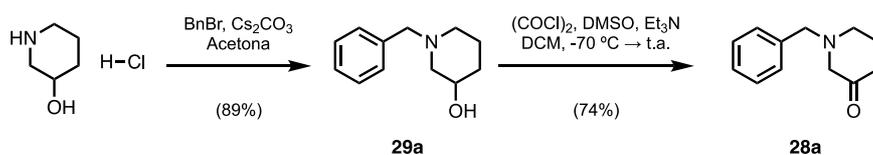
Capítulo 3.



Esquema 58. Reactivos y condiciones para la síntesis de **27a**: **a**) 1. BnBr, acetona, reflujo; 2. NaBH₄, MeOH, 0 °C → t.a., 95% rdto. **b**) 1. TFA, NBS, H₂O, 35 °C; 2. disol. acuosa NaOH, 35 °C, 75% rdto. **c**) LDA, THF -10 °C → t.a., 90% rdto. **d**) (COCl)₂, DMSO, Et₃N, CH₂Cl₂, -70 °C → t.a., 87% rdto.

A continuación tuvo lugar la apertura regioselectiva del epóxido **31** con diisopropilamida de litio (LDA) generando el alcohol α,β -insaturado **32a** (90% rdto.) Por último, la oxidación de **32a** con el protocolo de Swern dio lugar a la dihidropiridinona **27a** con un rendimiento del 87%. Se probaron otros métodos de oxidación alternativos como la oxidación de Jones o la de Anelli (TEMPO/NaOCl) pero fueron procesos con peores rendimientos o no fueron directamente efectivos, respectivamente.

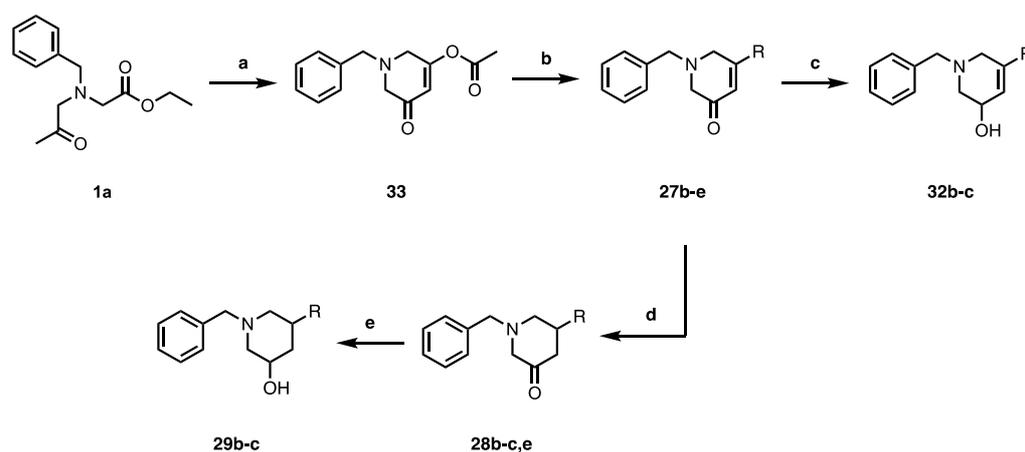
En el Esquema **59**, se muestra la síntesis de la piperidinona **28a** y de la hidroxipiperidina racémica **29a**. Estos compuestos, junto con el anterior **32a**, completarán el método analítico que permite realizar el estudio del proceso biocatalítico de **27a**.



Esquema 59. Preparación del alcohol racémico **29a** y de la cetona **28a**.

Se comenzó con la protección del clorhidrato de 3-hidroxipiperidina racémico comercial con bromuro de bencilo y carbonato de cesio como base, obteniéndose la 3-hidroxipiperidina bencilada **29a**. Seguidamente, se realizó una oxidación de Swern para sintetizar la piperidinona **28a** correspondiente (74% rdto.).

Para la síntesis del resto de los sustratos que conformarán el panel se tomó como punto de partida el compuesto **1a** utilizado anteriormente en el primer Capítulo. Tras un paso de condensación de Claisen intramolecular con *tert*-butóxido potásico, seguido de un tratamiento con anhídrido acético para esterificar el enolato, se sintetizó la acetoxidihidropiridinona **33** con un 82% de rendimiento (Esquema **60**).



Esquema 60. Reactivos y condiciones para la síntesis de los sustratos **27b-e** y sus derivados; **a**: 1. KO^tBu, THF, 0 °C → t.a.; 2. Ac₂O, 0 °C, 82% rdto.; **b**: RMgX, THF, 0 °C; 2. disol. acuosa NaOH, 50 °C, 33-69% rdto.; **c**: NaBH₄, CeCl₃·7H₂O, MeOH, 0 °C, 93-99% rdto.; **d**: H₂, Pd/C o Pd(OH)₂, MeOH o AcOEt:EtOH (1:1), 13-59% rdto.; **e**: NaBH₄, MeOH, 0 °C, 77-99% rdto.

A continuación, se realizaron una serie de adiciones nucleófilas empleando distintos reactivos de Grignard (R= Me-, Et-, ^tPr-, Ph-), seguidas de un paso de hidrólisis del grupo acetato del enol con una disolución acuosa de NaOH, para dar lugar a las correspondientes dihidropiridinonas **27b-e** con un rendimiento entre 33-69%.

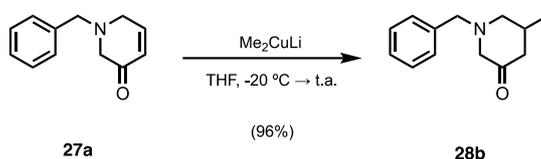
Debido a que las ADH's potencialmente son capaces de actuar sobre estas dihidropiridinonas transformándolas en los correspondientes alcoholes insaturados, se procedió a sintetizar estos compuestos en su forma racémica, como patrones de referencia para el análisis de los resultados, al igual que se hizo previamente con el compuesto **32a**. Para ello se realizó la reducción de Luche de las dihidropiridinonas **27b-c** (paso **c**, Esquema **60**).

La síntesis de las cetonas **28b-c** y **28e**, como patrones de referencia para el análisis de los productos formados (por las ERED's) tras el primer paso biocatalítico y como sustratos (para las ADH's) para el segundo, se realizó a partir de las correspondientes piperidinonas mediante hidrogenación catalizada por paladio. Se emplearon distintos catalizadores (Pd/C y Pd(OH)₂) y disolventes alcohólicos o mezclas de ellos, obteniéndose rendimientos entre bajos y moderados (13-59% rdto.).

Las 3-hidroxipiperidinas (racémicas) **29b-c** se sintetizaron por reducción de las cetonas **28b-c** con NaBH₄ con buenos rendimientos (77-99% rdto.).

Capítulo 3.

El bajo rendimiento en la síntesis del intermedio racémico **28b** (R=Me), clave para analizar y realizar el cribado y la optimización pertinente de las ADH's para el segundo paso de la cascada, nos llevó a plantear un método alternativo para su síntesis. Para su obtención se planteó una reacción de adición nucleófila conjugada utilizando como material de partida la dihidropiridinona **27a** y el dimetilcuprato de litio (o reactivo de Gilman) generado *in situ* (Esquema **61**). Bajo estas condiciones, se obtuvo la cetona **28b** con un rendimiento sustancialmente superior que con la hidrogenación previa (96% rdto.)



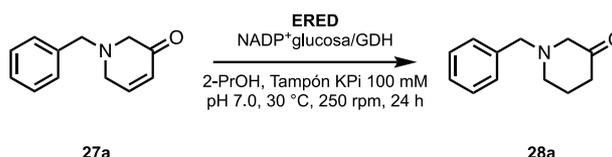
Esquema 61. Adición 1,4 para preparar la cetona **28b**.

3.6. Cribado enzimático inicial y optimización de las condiciones de reacción.

Una vez se han establecido los procedimientos necesarios para la síntesis de las dihidropiridinonas **27** y de los patrones correspondientes, el siguiente paso consistió en desarrollar una metodología capaz de evaluar la viabilidad de un sistema catalítico bi-enzimático formado por la combinación de ERED's-ADH's. Siguiendo la metodología de los Capítulos anteriores, en primer lugar, se llevó a cabo un análisis inicial de los catalizadores, tomando como punto de partida el compuesto **27a**.

En el *screening* inicial se probaron 7 ene-reductasas comerciales de la casa Codexis[®]. La concentración del sustrato **27a** se fijó en 25 mM y como sistema de regeneración del cofactor (NADP^+), el sistema de *enzima acoplada* formado por glucosa/GDH. En todas ellas la mezcla de reacción se completó con una disolución amortiguadora de fosfato de potasio (KPi) 100 mM con pH 7.0 (volumen final 500 μL) que contenían un 2.5% de 2-PrOH (12.5 μL) como cosolvente para ayudar a disolver el compuesto en la fase acuosa.

Después de ser incubadas durante 24 h a $30\text{ }^\circ\text{C}$ con agitación orbital (250 rpm) se analizaron los resultados por HPLC y se seleccionaron los mejores catalizadores bajo estas condiciones (Tabla **15**). La totalidad de ERED's evaluadas fueron capaces de realizar la biotransformación, mostrando en general conversiones entre bajas y moderadas, siendo la enzima P1-H09 (entrada 7) la que logró un mayor rendimiento (45%).

Tabla 15. Cribado inicial de ERED's para el sustrato **27a**.^{a)}

Entrada	ERED	Producto-28a Rdto./% ^{b)}
1	103	10
2	110	28
3	112	10
4	207	34
5	P1-A04	32
6	P1-E01	33
7	P1-H09	45

^{a)} Condiciones de reacción: **27a** (25 mM), ERED: 2.0 mg. Disol. tampón: KPi (100 mM) 438 μL , 2-PrOH (12.5 μL , 2.5% v/v), NADP^+ (50 μL , 1.0 mM), D-Glucosa (7.2 mg, 80 mM), GDH-105 (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Volumen final 500 μL . 30 °C, 24 h y 250 rpm. ^{b)} Rendimiento analítico calculado mediante regresión lineal en HPLC.

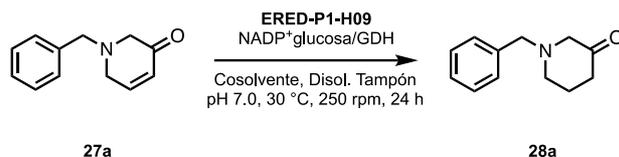
Los siguientes pasos de optimización, teniendo en cuenta los resultados moderados obtenidos durante el cribado inicial, consistieron en estudiar la influencia de algunos de los parámetros de la reacción, en concreto se ensayaron disoluciones amortiguadoras de distinta naturaleza, así como una serie de cosolventes, para ver si existía alguna combinación más favorable para el paso enzimático, utilizando como catalizador seleccionado, la enzima P1-H09.

Se comenzó estudiando el efecto de las distintas disoluciones amortiguadoras, utilizando como cosolvente 2-PrOH. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 16. Los mejores resultados se obtuvieron con las disoluciones amortiguadoras de fosfato de potasio, llegando hasta el 49% de rdto. con una disolución al 200 mM (entrada 1). En el caso de la disolución amortiguadora de tricina (entrada 4), el rendimiento bajó drásticamente resultando en una cuantificación residual.

Una vez optimizado el medio tamponante de la reacción se estudió la influencia del cosolvente añadido a este medio, así como su concentración. Para 2-PrOH, aumentar la concentración hasta un 5 % v/v supuso un aumento del rendimiento casi del 30%, llegando hasta un 76% (entrada 6). Sin embargo, una concentración mayor de este cosolvente (10% v/v), provocó una caída súbita del rendimiento, cuantificándose tan solo un rendimiento del 10% (entrada 7). Por ello, el resto de cosolventes se ensayaron con una concentración de 5 % v/v . Entre los demás cosolventes analizados (entradas 8-12), el mejor resultado fue el obtenido utilizando MTBE, lográndose en estas condiciones un 89% de rendimiento en la biotransformación.

Capítulo 3.

Tabla 16. Optimización de las condiciones de reacción seleccionadas para el sustrato **27a**.^{a)}



Entrada	Disol. Tampón	Cosolvente (v/v)	Producto-28a Rdto./% ^{b)}
1	KPi (200 mM)	2-PrOH (2.5%)	49
2	KPi (300 mM)	2-PrOH (2.5%)	39
3	Mes (100 mM)	2-PrOH (2.5%)	21
4	Tricina (100 mM)	2-PrOH (2.5%)	<3
5	Tris·HCl (100 mM)	2-PrOH (2.5%)	26
6	KPi (200 mM)	2-PrOH (5%)	76
7	KPi (200 mM)	2-PrOH (10%)	10
8	KPi (200 mM)	DMSO (5%)	73
9	KPi (200 mM)	MeCN (5%)	77
10	KPi (200 mM)	2-MeTHF (5%)	47
11	KPi (200 mM)	MTBE (5%)	89
12	KPi (200 mM)	DMF (5%)	<3

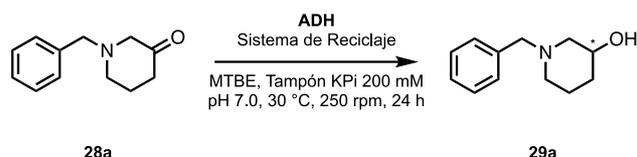
^{a)} Condiciones de reacción: **27a** (25 mM), ERED-P1-H09: 2.0 mg. Disol. tampón, cosolvente (2.5-10% v/v), NADP⁺ (50 μL, 1.0 mM), D-Glucosa (7.2 mg, 80 mM), GDH-105 (1 mg·mL⁻¹). Volumen final 500 μL. 30 °C, 24 h y 250 rpm.

^{b)} Rendimiento analítico calculado mediante regresión lineal en HPLC.

También se realizaron ensayos variando la temperatura (40 °C) o el pH (hasta un valor de 8 y 9), pero no condujeron a mejoras apreciables o se obtuvieron peores resultados que en las condiciones iniciales, por lo que estos resultados no se han incluido en la Tabla 16.

Una vez seleccionada tanto la ERED que se va a utilizar en el primer paso catalítico como las condiciones óptimas para que tenga lugar, se procedió realizar un cribado del panel completo de las ADH's disponibles para el segundo paso, utilizando estas mismas condiciones de reacción. No hay que olvidar que el fin que se persigue es llegar a hacer ambos pasos de forma concertada. Los mejores resultados seleccionados están recogidos en la Tabla 17.

Se identificaron varios catalizadores capaces de convertir de manera selectiva la piperidinona intermedia **28a** en la 3-hidroxi-piperidina **29a**, alcanzándose altos rendimientos para la obtención de ambos enantiómeros. Para la hidroxipiperidina (*R*)-**29a** la enzima P1-B05 logró una conversión completa junto con una enantioselectividad perfecta, logrando un exceso enantiomérico >99% (entrada 2). El enantiómero (*S*)-**29a**, también se obtuvo de forma completamente enantioselectiva con la encima P3-H12 (*ee* >99%) y con un rendimiento del 93% (entrada 6).

Tabla 17. Biotransformaciones seleccionadas para el sustrato **28a**.^{a)}

Entrada	ADH	Cofactor	Producto-29a	
			Rdto./% ^{b)}	ee/% ^{b)}
1	P1-B02	NADP ⁺	>99	97 (<i>R</i>)
2	P1-B05	NADP⁺	>99	>99 (<i>R</i>)
3	P2-H07	NADP ⁺	94	>99 (<i>R</i>)
4	P3-B03	NADP ⁺	89	>99 (<i>S</i>)
5	P3-G09	NADP ⁺	89	>99 (<i>S</i>)
6	P3-H12	NADP⁺	93	>99 (<i>S</i>)
7	NADH-101	NAD ⁺	79	97 (<i>S</i>)
8	NADH-110	NAD ⁺	84	99 (<i>R</i>)
9	<i>E. coli</i>/ADH-A	NAD⁺	80	>99 (<i>S</i>)

^{a)} Condiciones de reacción: **28a** (25 mM), ADH: (2.0 mg para las enzimas de Codexis o 10 mg para *E. coli*). Disol. tampón: KPi (200 mM) 425 μ L, MTBE (25 μ L, 5% v/v), NADP⁺ o NAD⁺ (50 μ L, 1.0 mM), D-Glucosa (7.2 mg, 80 mM), GDH-105 (1 mg·mL⁻¹). Volumen final 500 μ L. 30 °C, 24 h y 250 rpm. ^{b)} Rendimiento analítico calculado mediante regresión lineal, los valores *ee* se determinaron mediante análisis HPLC.

Respecto a las ADH's sobreexpresadas en *E. coli*, la ADH-A fue la más destacada con un rendimiento del 80% y un exceso enantiomérico >99% para la (*S*)-hidroxipiperidina **29a** (entrada 9).

Para diseñar reacciones en cascada mediante una aproximación concurrente, se requiere, además de establecer unas condiciones aptas para todas las enzimas involucradas, comprobar que éstas sean selectivas hacia sus respectivos sustratos sin modificar el resto de los compuestos presentes en el recipiente.

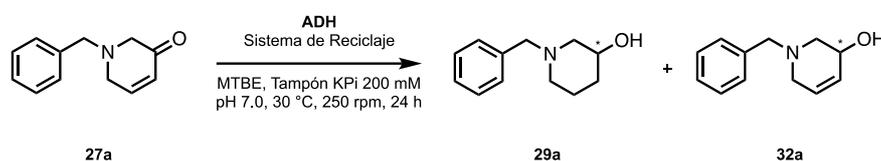
Por ello, una vez seleccionados los catalizadores más eficaces entre las ERED's y ADH's disponibles, se procedió a evaluar la reactividad de las ADH's respecto a la dihidropiridinona **27a**, el sustrato de la primera etapa. El objetivo de estos ensayos es determinar cuáles de las ADH's son capaces de reconocer este sustrato y cuáles no, puesto que, si lo hacen, en la cascada concurrente podría originarse una mezcla de productos. Los resultados obtenidos de este estudio se recogen en la Tabla **18**.

Tras analizar los resultados encontrados con las ADH's seleccionadas se pudo constatar que algunas de ellas presentaban una actividad entre moderada y alta para reducir la dihidropiridinona de partida (entradas 1, 2, 3 y 6); lo que se traduciría en una competencia directa frente a la ERED en el mismo medio, en el caso de combinarlas de manera simultánea. Estos catalizadores han de adicionarse al medio de reacción de forma secuencial. En cambio, otras presentaron una baja o casi nula actividad hacia dicha dihidropiridinona (entradas 4, 5 y 7),

Capítulo 3.

siendo estas últimas, catalizadores potencialmente compatibles con la ERED en una aproximación concurrente.

Tabla 18. Biotransformaciones ensayadas para la dihidropiridinona **27a** empleado ADH's seleccionadas.^{a)}



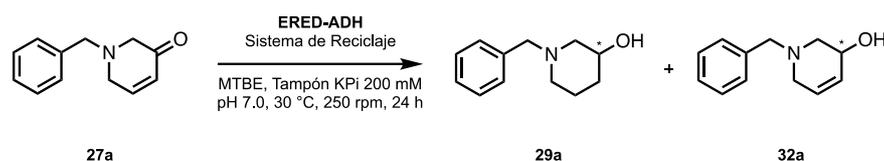
Entrada	ADH	Cofactor	Subproducto-29a		Producto-32b	
			Rdto./% ^{b)}	ee/% ^{b)}	Rdto./% ^{b)}	ee/% ^{b)}
1	P1-B05	NADP ⁺	17	>99 (<i>R</i>)	81	>99 (<i>R</i>)
2	P2-H07	NADP ⁺	14	>99 (<i>R</i>)	86	98 (<i>R</i>)
3	P3-B03	NADP ⁺	31	>99 (<i>S</i>)	45	>99 (<i>S</i>)
4	P3-G09	NADP ⁺	5	91 (<i>S</i>)	<3	n.d.
5	P3-H12	NADP ⁺	16	86 (<i>S</i>)	28	90 (<i>S</i>)
6	NADH-110	NAD ⁺	14	99 (<i>R</i>)	52	97 (<i>R</i>)
7	<i>E. coli</i> /ADH-A	NAD ⁺	37	>99 (<i>S</i>)	9	>99 (<i>S</i>)

^{a)} Condiciones de reacción: **27a** (25 mM), ADH: 2.0 mg para las enzimas de Codexis o 10 mg para *E. coli*. Disol. tampón: KPi (200 mM) 425 μ L, MTBE (25 μ L, 5% v/v), NADP⁺ o NAD⁺ (50 μ L, 1.0 mM), D-Glucosa (7.2 mg, 80 mM), GDH-105 (1 mg·mL⁻¹). Volumen final 500 μ L, 30 °C, 24 h y 250 rpm. ^{b)} Rendimiento analítico calculado mediante regresión lineal, los valores *ee* se determinaron mediante análisis HPLC.
n.d.: no determinado.

En todas las pruebas realizadas bajo estas condiciones, se apreció la formación adicional del alcohol saturado **29a** como 'subproducto'. Esta observación puede atribuirse a la posible presencia de alguna proteína residual (del tipo ERED), aún activa, del microorganismo en el que se ha expresado la ADH. De este modo, se produciría la reducción del doble enlace (reducción 1,4) por parte de esta proteína, y, a continuación, la ADH realizaría la reducción de la cetona formada (reducción 1,2).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, las ADH's P3-G09 y ADH-A (sobrexpresada en *E. coli*) se seleccionaron como aquellos catalizadores candidatos para diseñar un proceso concurrente junto con la ERED-P1-H09. Del mismo modo, las enzimas P1-B05 y P2-H07, fueron las seleccionadas para el correspondiente diseño del proceso secuencial, ya que estos catalizadores no son compatibles con el sustrato **27a** desde el inicio.

En consecuencia, la obtención del enantiómero de configuración *R* se llevaría a cabo mediante la planteada cascada secuencial y, el *S*, por medio de la cascada concurrente. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 19.

Tabla 19. Bioreducciones en cascada de **27a** con la ERED-P1-H09 y ADH's.^{a)}

Entrada	ERED	ADH	Cascada ^c	Producto-29a		Subproducto-32a	
				Rdto./% ^{b)}	ee/% ^{b)}	Rdto./% ^{b)}	ee/% ^{b)}
1	P1-H09	P1-B05	<i>secuencial</i>	62	96 (<i>R</i>)	-	-
2	P1-H09	P2-H07	<i>secuencial</i>	68	96 (<i>R</i>)	-	-
3	P1-H09	P3-G09	<i>concurrente</i>	86	82 (<i>S</i>)	2	n.d.
4	P1-H09	ADH-A	<i>concurrente</i>	85	>99 (<i>S</i>)	3	n.d.

^{a)} Condiciones de reacción: **27a** (25 mM), ERED: 2.0 mg. ADH: (2.0 mg para las enzimas de Codexis o 10 mg para *E. coli*). Disol. tampón: KPi (200 mM), MTBE (25 μ L, 5% v/v), NAD⁺ y/o NADP⁺ (50 μ L, 1.0 mM), D-Glucosa (7.2 mg, 80 mM), GDH-105 (1 mg·mL⁻¹). Volumen final 500 μ L. 30 °C, 24 h y 250 rpm. ^{b)} Rendimiento analítico calculado mediante regresión lineal, los valores *ee* se determinaron mediante análisis HPLC.

^{c)} En las *aprox. sec.*, la ADH se añade tras 12 horas de reacción.
 n.d.: no determinado.

En las primeras dos entradas, se muestran los resultados obtenidos mediante las aproximaciones secuencial para obtener la (*R*)-3-hidroxipiperidina **29a**. En ambos casos el exceso enantiomérico que se alcanzó fue del 96%, lográndose un rendimiento analítico del 68% con la enzima P2-H07 (entrada 2) después de los dos pasos biocatalíticos.

De la misma manera, las entradas 3 y 4, muestran los resultados obtenidos mediante las aproximaciones concurrentes para obtener el enantiómero opuesto, (*S*)-**29a**. En el caso de la enzima comercial P3-G09 se consiguió un rendimiento del 86% pero, el exceso enantiomérico fue tan sólo del 82%. En cambio, la enzima sobreexpresada en *E. coli* ADH-A, catalizó el proceso con total selectividad (*ee* >99%) alcanzando un rendimiento analítico del 85%. En ambos casos la cantidad de alcohol insaturado **32a** formado fue residual ($\leq 3\%$).

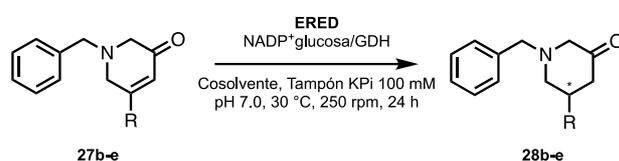
Siguiendo esta línea y teniendo establecidas las condiciones óptimas de trabajo para cada una de las partes de la cascada bi-enzimática, se continuó con el estudio del resto de los sustratos. Para el resto, hay que tener en cuenta que al introducirse un sustituyente en la posición C5, es necesario, además, analizar la enantioselectividad del paso de bioreducción con las ERED's, ya que se crea un centro estereogénico.

Por ende, se comenzó estudiando el primer paso de bioreducción con las ERED's del sustrato **27b**, que presenta un sustituyente metilo en la posición C5. Se ensayaron las ERED's disponibles para este sustrato encontrándose varias posibles candidatas (entradas 1-4, Tabla 20). Los mejores resultados se obtuvieron con el ensayo de la ERED-207 que cataliza la reducción

Capítulo 3.

del doble enlace dando lugar a la cetona (*R*)-**28b**²⁴⁹ con un rendimiento del 93% y un exceso enantiomérico del 96%.

Tabla 20. Ensayos de diferentes ERED's para la preparación de los productos **28b-e**.^{a)}



Entrada	Sustrato		ERED	Cosolvente	Producto		
	R	R			Rdto./% ^{b)}	ee/% ^{b)}	
1	27b	Me	207	MTBE (5%)	28b	93	96 (<i>R</i>)
2	27b	Me	103	MTBE (5%)	28b	76	96 (<i>R</i>)
3	27b	Me	P1-E01	MTBE (5%)	28b	56	96 (<i>R</i>)
4	27b	Me	P1-A04	MTBE (5%)	28b	78	96 (<i>R</i>)
5	27c	Et	207	MTBE (5%)	28c	<3	n.d.
6	27c	Et	207	2-PrOH (5%)	28c	96	>99(<i>R</i>)
7	27c	Et	P1-A04	MTBE (5%)	28c	55	>99(<i>R</i>)
8	27c	Et	P1-A04	2-PrOH (5%)	28c	80	>99(<i>R</i>)
9	27e	Ph	P1-E01	MTBE (5%)	28e	44	98 (<i>S</i>)
10	27e	Ph	110	MTBE (5%)	28e	33	94 (<i>S</i>)

^{a)} Condiciones de reacción: **27b-e** (25 mM), ERED: 2.0 mg. Disol. tampón: KPi (200 mM) 425 μL , cosolvente (25 μL , 5% *v/v*), NADP⁺ (50 μL , 1.0 mM), D-Glucosa (7.2 mg, 80 mM), GDH-105 (1 mg·mL⁻¹). Volumen final 500 μL . 30 °C, 24 h y 250 rpm. ^{b)} Rendimiento analítico calculado mediante regresión lineal, los valores *ee* se determinaron mediante análisis HPLC.

n.d.: no determinado.

En este caso, y al igual que para el resto de sustratos que componen el panel de estudio, las enzimas anti-*Prelog*²⁴⁹ de las que se dispone en el laboratorio, han mostrado una baja o nula actividad en la mayoría de los casos y no se ha podido acceder a las correspondientes piperidinonas **28b-e** con la eficiencia y la enantioselectividad necesarias.

Por ello, al no poder acceder a uno de los enantiómeros en este punto, la segunda parte de la bioreducción estará condicionada y, por consiguiente, no se podrá acceder a todos los posibles estereoisómeros de las hidroxipiperidinas **29b-e**.

Continuando con el compuesto **27c**, se observó que el uso de MTBE (5% *v/v*) como cosolvente, no era suficiente para solubilizar completamente el compuesto. Por ello, los resultados obtenidos tanto con la enzima 207 (entrada 5) como con la P1-A04 (entrada 7)

²⁴⁹ Según las Reglas de Prioridad de Cahn-Ingold-Prelog para los sustratos con R=Me y Et, hay un cambio de la preferencia debido a la presencia del heteroátomo, por lo que con las enzimas *Prelog* se obtienen los enantiómeros *R* y con las anti-*Prelog*, los *S*.

presenta unos valores bajos o prácticamente nulos de transformación. En cambio, al sustituir el cosolvente por 2-PrOH (al 5% v/v), se consiguió solubilizar correctamente el compuesto, mejorando el resultado del proceso.

De esta manera, se consiguió con la enzima 207 obtener el enantiómero de configuración *R* con un rendimiento analítico de 96% y un exceso enantiomérico perfecto (>99%, entrada 6). Del mismo modo, con la enzima P1-A04 (entrada 8) se mejoró el resultado obtenido anteriormente para (*R*)-**28b** y se alcanzó un rendimiento del 80% junto con una selectividad perfecta >99%.

Desafortunadamente, al aumentar el tamaño de la cadena como en el sustrato **27d** (R=^{*i*}Pr), ninguna de las ERED's ensayadas mostró actividad, por lo que estos resultados no se han incluido en la Tabla **20**.

Por último, el compuesto **27e** se consiguió reducir, aunque con rendimientos entre bajos y moderados (entradas 9-10), siendo la enzima P1-E01 con la que se alcanzó el rendimiento más alto (44%) y un *ee* del 98% para el enantiómero *S*.

Teniendo en cuenta estos resultados, la enzima seleccionada para realizar el primer paso catalítico de las cascadas correspondientes para los sustratos **27b** y **27c** fue la ERED-207.

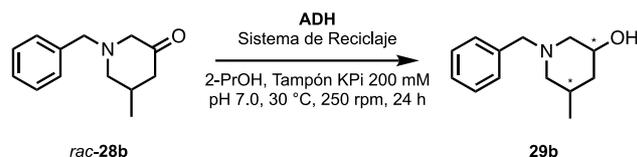
A continuación, se prosiguió con el estudio de la segunda parte de la cascada, la bio-reducción del carbonilo de los compuestos **28b-c** empleando ADH's. Al no haber conseguido obtener el compuesto **28e** con un rendimiento más elevado y, por consiguiente, quedando aún gran cantidad de la dihidropiridinona de partida en el medio de reacción, se decidió no incluir este derivado en adelante.

En este punto, se realizó un cribado con todas las ADH's disponibles para la cetona racémica **28b**, que permitiera seleccionar las más adecuadas para completar el proceso en cascada. En la Tabla **21**, se ha incluido una selección con las biotransformaciones más significativas obtenidas para *rac*-**28b**.

Tras un análisis global de los resultados, las mejores enzimas ensayadas se pueden clasificar en 4 grandes grupos. En el primero de ellos (entradas 1-9) tenemos una serie de enzimas que serían capaces de catalizar preferentemente la formación del alcohol de configuración *3R*, por lo que conducen a los isómeros (*3R,5S*)- y (*3R,5R*)-**29b**.

Capítulo 3.

Tabla 21. Biotransformaciones seleccionadas para el sustrato *rac*-**28b**^{a)}.



Entrada	Enzima	Cofactor	Composición diastereomérica				Ratio <i>cis:trans</i>	Rdto./ % ^{b)}
			<i>cis</i> (3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)	<i>trans</i> (3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)	<i>trans</i> (3 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)	<i>cis</i> (3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)		
1	P1-B02	NADP ⁺	63.3	36.7	-	-	63:37	87
2	P1-B05	NADP ⁺	63.9	35.8	-	0.3	64:36	84
3	P1-B10	NADP ⁺	62.3	37.7	-	-	62:38	97
4	P1-B12	NADP ⁺	64.9	34.8	-	0.3	65:35	78
5	P1-C01	NADP ⁺	63.5	32.9	3.6	-	63:37	75
6	P1-H08	NADP ⁺	84.5	14.5	-	1.0	86:14	34
7	P2-D11	NADP ⁺	56.0	40.1	3.6	0.3	56:44	87
8	P2-D12	NADP ⁺	68.4	28.4	2.6	0.6	69:31	65
9	P2-H07	NADP ⁺	35.7	53.8	10.1	0.4	36:64	60
10	P3-B03	NADP ⁺	0.5	22.5	45.8	31.2	32:68	45
11	P3-H12	NADP ⁺	0.6	30.4	46.4	22.6	23:77	85
12	NADH-101	NAD ⁺	4.2	-	32.9	62.9	67:33	68
13	ADH-A	NAD ⁺	2.9	-	33.4	63.7	67:33	88
14	<i>Ras</i> -ADH	NADP ⁺	65.5	14.0	-	20.5	86:14	79

^{a)} Condiciones de reacción: **28b** (25 mM), ADH: 2.0 mg para las enzimas de Codexis o 10 mg para *E. coli*. Disol. tampón: KPi (200 mM), MTBE (25 μ L, 5% v/v), NAD⁺ o NADP⁺ (50 μ L, 1.0 mM), D-Glucosa (7.2 mg, 80 mM), GDH-105 (1 mg \cdot mL⁻¹). Volumen final 500 μ L. 30 $^\circ$ C, 24 h y 250 rpm. ^{b)} Rendimiento analítico calculado mediante regresión lineal, los valores *ee* se determinaron mediante análisis HPLC.

Del mismo modo, al no mostrar una buena enantioespecificidad entre los enantiómeros en la posición C5, como era de esperar; en el caso de poder acceder a las cetonas (*S*)- o (*R*)-**28b** de manera enantioselectiva tras el primer paso catalizado por una ERED, este conjunto de ADH's serían capaz de dar acceso a los isómeros (3*R*,5*S*)- y (3*R*,5*R*) selectivamente.

El segundo grupo de enzimas, entradas 10 y 11, de acuerdo con la distribución diastereomérica obtenida, permitiría obtener sólo el isómero (3*S*,5*S*) de manera enantioselectiva. Para ello, sería necesario conseguir una ERED, que catalizara la cetona (*S*)-**28b**.

El tercer grupo estaría formado por las enzimas NADH dependientes, NADH-101 y *E. coli*/ADH-A (entradas 12 y 13) que son selectivas para el isómero (3*S*,5*R*) solamente.

Y por último, la enzima *E. coli*/RasADH (entrada 14), solamente sería selectiva para el isómero (3*R*,5*S*).

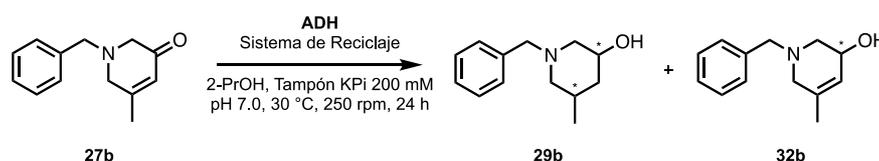
En este punto es relevante señalar que, de entre todas las ADH's ensayadas de las que se dispone, al menos (potencialmente) hay una enzima capaz de dar acceso a cada uno de los cuatro posibles estereoisómeros.

Este mismo estudio se realizó para la cetona **28c** obteniendo resultados similares a excepción de las enzimas NADH dependientes, tanto la NADH-101 como la *E. coli*/ADH-A no tuvieron actividad alguna. Afortunadamente, las enzimas del primer grupo (entradas 1-9), capaces de sintetizar los dos (3*R*)-isómeros sí mostraron actividad, siendo, para esta cetona, la enzima P1-B10 la que mejor resultado proporcionó (95% rdto.).

Dado que, en nuestro caso particular, sólo se ha podido acceder, tras el primer paso de bioreducción con las ERED's, a las cetonas de configuración *R* tanto en el caso de **28b**, como de **28c**, los únicos grupos de enzimas adecuados serían el primero, para acceder al isómero (3*R*,5*R*) tanto para el sustrato **27b** como **27c**; y el formado por las enzimas NADH-101 y *E. coli*/ADH-A para sintetizar el isómero (3*S*,5*R*) en este caso sólo para el compuesto **27b**.

Una vez estudiadas y seleccionadas las ADH's de interés, y antes de iniciar los ensayos de los procesos en cascada, se realizó, al igual que para la dihidropiridinona **27a**, un estudio del grado de compatibilidad del sustrato **27b** con las distintas ADH's, para determinar el tipo de cascada (secuencial o concurrente) más adecuada, en cada caso. En la Tabla **22** se recogen los resultados obtenidos de dicho análisis.

Tabla 22. Biotransformaciones ensayadas para la dihidropiridinona **27b** empleado ADH's seleccionadas.^{a)}



Entrada	ADH	Cofactor	Subproducto-29b	Producto-32b ^{a)}
			Rdto./% ^{b)}	Rdto./% ^{b)}
1	P1-B02	NADP ⁺	-	>99
2	P1-B05	NADP ⁺	-	97
3	P1-B10	NADP ⁺	-	96
4	P1-B12	NADP ⁺	-	68
5	P1-H08	NADP ⁺	-	94
6	NADH-101	NAD ⁺	-	-
7	<i>E. coli</i> /ADH-A	NAD ⁺	-	-

^{a)} Condiciones de reacción: **27b** (25 mM), ADH: 2.0 mg para las enzimas de Codexis o 10 mg para *E. coli*. Disol. tampón: KPi (200 mM), 2-PrOH (25 μ L, 5% v/v), NADP⁺ o NAD⁺ (50 μ L, 1.0 mM), D-Glucosa (7.2 mg, 80 mM), GDH-105 (1 mg·mL⁻¹). Volumen final 500 μ L. 30 °C, 24 h y 250 rpm. ^{b)} Rendimiento analítico calculado mediante regresión lineal en HPLC.

Capítulo 3.

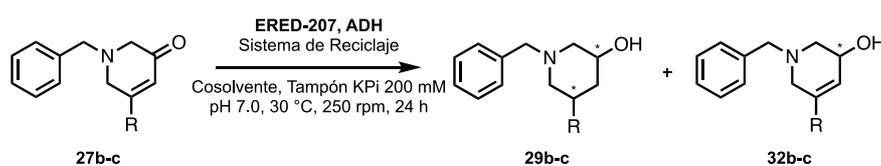
Las enzimas correspondientes a las entradas 1-5 de la Tabla 22, muestran una alta actividad para reducción también el sustrato **27b**, por lo que sólo deberían emplearse en una aproximación secuencial. Por el contrario, con las enzimas NADH dependientes, entradas 6 y 7, no se observó el producto de reducción **32b**, sólo se detectó producto de partida **27b**, lo que significa que podrían incluirse desde el inicio en el medio de reacción, permitiendo la cascada concurrente junto con la ERED correspondiente.

En el caso de la cetona **27c**, también se replicaron estos ensayos. En este caso, la enzima P1-B10 fue con la que se obtuvo el alcohol insaturado **32c** con un rendimiento menor (31%). A pesar de ese resultado, parecía interesante plantear una aproximación concurrente con esta enzima y estudiar la selectividad del proceso, ya que, dependiendo de la velocidad relativa del primer paso catalítico respecto del segundo, la formación de este producto podría ser sólo residual.

En ningún caso de los ensayos se detectó la presencia del compuesto de doble reducción **29b** o **29c** correspondiente.

Tras haber seleccionado los catalizadores de las dos partes que conforman las cascadas para los sustratos **27b** y **27c**, así como de la disposición de partida de cada uno de ellos, se procedió al diseño de los experimentos. En la Tabla 23 se resumen los resultados obtenidos para las distintas cascadas realizadas.

Tabla 23. Biotransformaciones realizadas para los sustratos **27b** y **27c**.^{a)}



Entrada	Sustrato	ADH	Cosol.	Cascada ^{c)}	Producto-29b-c ^{b)}			32b-c	
					Conf.	Rdto./ %	ee /%	dr ^{d)} /%	Rdto. /%
1	27b	P1-B10	2-PrOH	secuencial	(3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-29b	57	>99	84:16	-
2	27b	NADH-101	MTBE	concurrente	(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-29b	70	>99	87:13	-
3	27b	ADH-A	MTBE	concurrente	(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-29b	78	>99	97:3	-
4	27c	P1-B10	2-PrOH	concurrente	(3 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-29c	75	>99	98:2	-

^{a)} Condiciones de reacción: **27b-c** (25 mM), ERED: 2.0 mg. ADH: (2.0 mg para las enzimas de Codexis o 10 mg para *E. coli*). Disol. tampón: KPi (200 mM), cosolvente (25 μ L, 5% v/v), NAD⁺ y/o NADP⁺ (50 μ L, 1.0 mM), D-Glucosa (7.2 mg, 80 mM), GDH-105 (1 mg·mL⁻¹). Volumen final 500 μ L. 30 °C, 24 h y 250 rpm. ^{b)} Rendimiento analítico calculado mediante regresión lineal en HPLC.

^{c)} En las *aprox. sec.*, la ADH se añade tras 12 horas de reacción. ^{d)} El valor de *dr* indicado es en relación al isómero mayoritario y por ello, puede ser *trans:cis* (entradas 1 y 4) o *cis:trans* (entradas 2 y 3).

En las primeras tres entradas, se muestran los resultados obtenidos para las piperidinas **29b**. En el primero de ellos, la cascada secuencial empleando la ERED 207 y la ADH P1-B10 obtuvo la piperidina (3*R*,5*R*)-**29b** con un rendimiento del 57%, y un exceso enantiomérico perfecto (>99%). La proporción diastereomérica encontrada, en este caso *trans:cis*, fue aproximadamente de 5:1. En las siguientes dos entradas, se recogen los resultados de las cascadas concurrentes realizadas con las enzimas ADH's selectivas solamente para el isómero (3*S*,5*R*)-**29b** (tercer grupo, Tabla **21**). Entre ellas, la enzima sobreexpresada en *E. coli* ADH-A obtuvo un rendimiento del 78%, con un exceso enantiomérico >99 y un *dr* (*cis:trans*) de 97:3 (entrada 3).

En el caso de la piperidina **29c**, como ya se había comentado anteriormente, dado que las ERED's funcionales son todas de naturaleza *Prelog* y que las únicas ADH's activas son (*R*)-selectivas, el único compuesto que se puede adquirir es el (3*R*,5*R*)-**29c**.

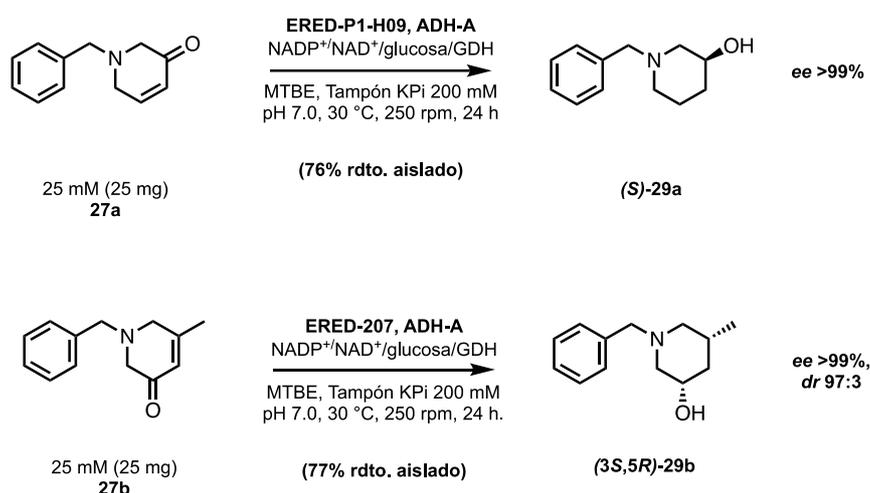
Bajo estas circunstancias, y teniendo en cuenta la relativa baja transformación por parte de la enzima ADH P1-B10 hacia el alcohol insaturado **32c**, se decidió comenzar por una aproximación concurrente de las enzimas ERED-207 y ADH P1-B10 para comprobar la viabilidad de esta cascada.

Como resultado de esta cascada, entrada 4, se obtuvo (3*R*,5*R*)-**29c** con un rendimiento del 75%, y un exceso enantiomérico perfecto (>99%). En este caso la proporción diastereomérica encontrada fue también elevada, siendo de 98:2 (*trans:cis*).

3.7. Experimentos en escala semipreparativa.

Una vez concluidos los ensayos en escala analítica, se evaluaron las mejores biotransformaciones obtenidas y se realizaron los experimentos en una escala semipreparativa para los sustratos **27a** y **27b**. En ambos, los rendimientos aislados tras la purificación de los productos fueron coherentes con los obtenidos en las reacciones analíticas correspondientes. Los resultados obtenidos se resumen en los siguientes esquemas:

Capítulo 3.



Esquema 62. Experimentos en escala semipreparativa realizados en este Capítulo.

3.8. Asignación de la configuración absoluta.

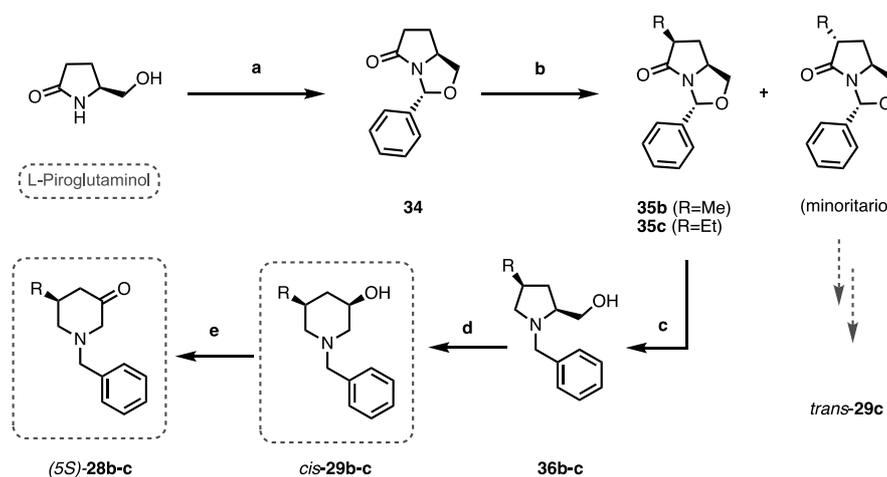
La configuración absoluta del compuesto **29a** se determinó mediante la comparación directa tanto de sus datos físicos (rotación específica) como de los espectrales (cromatogramas) con los disponibles en la bibliografía.^{243b} Por otra parte, la configuración asignada concuerda con la esperada según la enantioselectividad conocida de las alcohol deshidrogenasas empleadas.

Para el compuesto **28e**, su asignación se realizó teniendo en cuenta la selectividad esperada de las enzimas ERED utilizadas.

En el caso de la 3-hidroxi-piperidina **29b** (y por tanto de la piperidinona **28b**), en la bibliografía existen rutas establecidas para sintetizar tanto el compuesto *cis*-²⁵⁰ como el *trans*-²⁵¹ **29b** de manera enantioselectiva utilizando como material de partida un derivado enantiopuro del ácido piroglutámico (Esquema **63**). Para este compuesto, la asignación de la configuración absoluta se basó en replicar una de estas rutas, mediante la cual se sintetizó la (3*R*,5*S*)-**29b**. Utilizado este estereoisómero a modo de patrón, junto con el método analítico desarrollado en HPLC para determinar las distintas composiciones diastereoméricas tras las reacciones enzimáticas ensayadas, se realizó la asignación de los estereoisómeros.

²⁵⁰ Q.-Z. Zhanga, Z.-Y. Lia, L. Zhanga, N. Lva, Q. Panb, C.-Y. Kea, X.-L. Zhanga, *Russ. J. Org. Chem.* **2020**, *56*, 2201–2206.

²⁵¹ S. Hoelder *et al.*, *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 8191–8207.



Esquema 63. Reactivos y condiciones para la síntesis de los compuestos (*3R,5S*)-**29b-c** y (*S*)-**28b-c**; **a**: (a) PhCHO, PTSA·H₂O, tolueno, 150 °C, 16 h, 90% rdto. **b**: LDA, RI, THF, -50 °C, 6 h, 55-69% rdto. respect. **c**: LiAlH₄, THF, t.a.→reflujo, 1 h, 88-89% rdto. respect. **d**: 1. TFAA, Et₃N, THF, 0°C→t.a., 1.5 h. 2. NaOH/H₂O, reflujo, 16 h, 94-83% rdto. respect. **e**: (COCl)₂, DMSO, Et₃N, CH₂Cl₂, -70 °C→t.a., 24-53% rdto. respect.

En el caso del compuesto **29c**, el planteamiento realizado consistió en el mismo procedimiento que para **29b**, es decir, se replicó la ruta sintética establecida (Esquema **63**), y junto con el método analítico desarrollado y la enantioselectividad conocida de las ERED's y ADH's empleadas, se realizó la asignación absoluta expuesta.

Para ello, se eligió de nuevo como material de partida, el L-pirolglutaminol. Este, reaccionó con benzaldehído en presencia de un catalizador ácido (PTSA·H₂O) para proporcionar el producto de condensación **34** con un rendimiento del 90%.

El compuesto **34** se desprotonó con LDA a -50 °C para formar un enolato que, en un segundo paso, se alquiló con yoduro de etilo para producir dos posibles isómeros geométricos, *cis*- y *trans*-**35c**; siendo uno el mayoritario debido al efecto estérico del anillo de benceno. Los dos isómeros se separaron mediante cromatografía en columna.

Como los isómeros **35c**, y sus derivados **28c** y **29c**, no estaban descritos previamente, se consideró oportuno realizar unos experimentos complementarios que apoyaran la asignación relativa de cada uno de los isómeros acorde a los resultados obtenidos del paso sintético. En esta ocasión, para realizar la elucidación estructural correspondiente de dichas estructuras (*cis/trans*-**35c**) se optó por la de técnica de resonancia de nOe 1D-selectivo.

Capítulo 3.

A continuación, en la Figura 16, se ilustran los resultados obtenidos de nOe 1D-selectivo para el compuesto *trans*-35c.

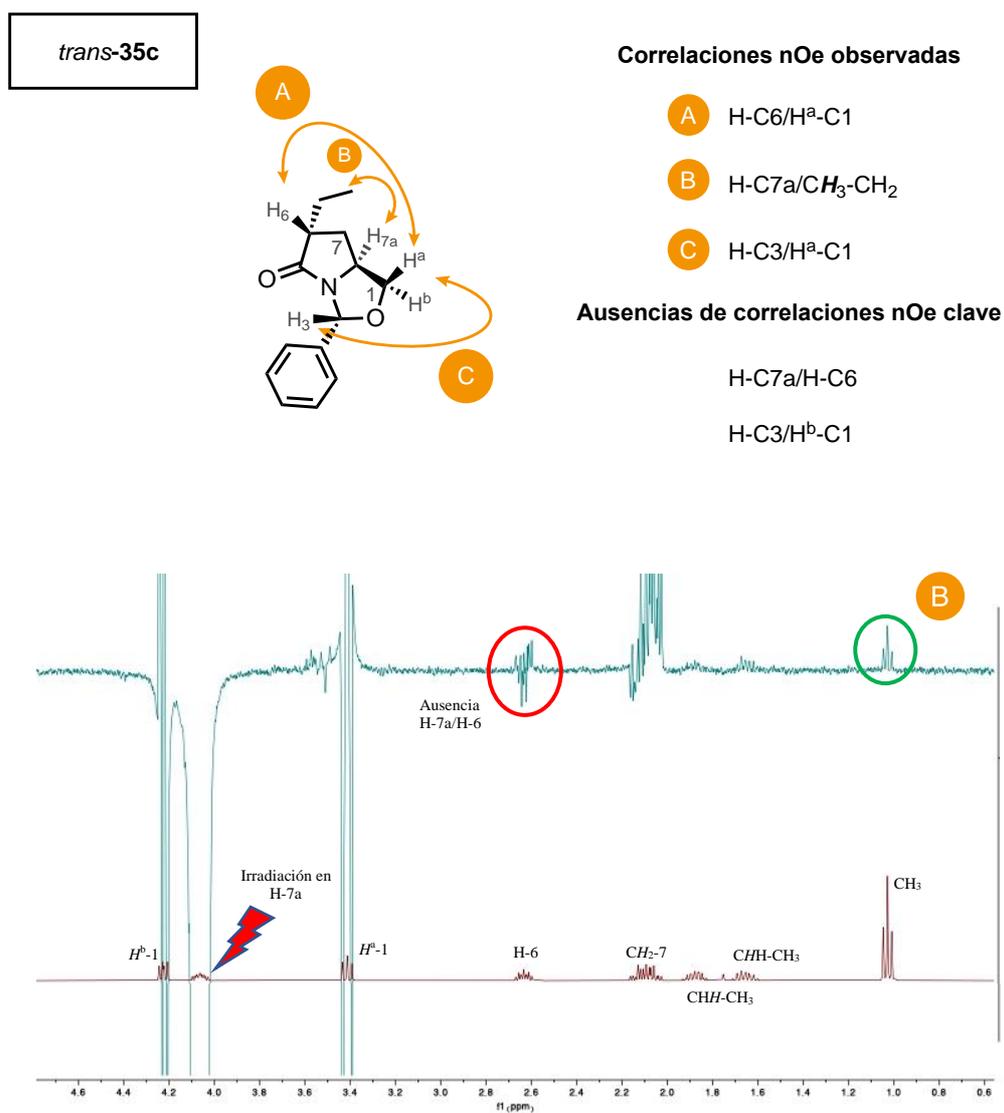


Figura 16. Comparativa de los espectros de ¹H (rojo) y del nOe 1D-selectivo (azul) para la señal H-7a; del compuesto *trans*-35c.

Varias de las señales del compuesto *trans*-**35c** fueron irradiadas en los experimentos de nOe 1D-selectivo, en la Figura **16**, sólo se muestra de manera representativa el espectro correspondiente a la irradiación de la señal del protón del carbono C7a. Dado que ese centro estereogénico viene fijado por el material de partida utilizado (*L*-piroglutaminol) las señales positivas que se detecten, determinarían no sólo la configuración en el espacio tridimensional sino también la absoluta. De este modo se observa señal inequívoca de nOe con los protones CH₃ del etilo. Además, no existe señal nOe con el protón del carbono C6.

Con esta información ya se puede establecer la configuración correcta para el compuesto como *trans*. No obstante, en la parte superior de la figura, se han recogido también otras señales y ausencias de nOe en otras partes de la estructura de la molécula de estudio.

Como se puede apreciar, el protón H-3 solamente da señal de nOe con uno de los protones del CH₂ del carbono C1, el protón H^a-1 (correlación indicada como «C»). Del mismo modo, ese mismo protón, H^a-1, es el único del carbono C1 que presenta nOe con H-6 (correlación indicada como «A»).

En la Figura **17**, del mismo modo, se ilustran los resultados obtenidos de nOe 1D-selectivo para el compuesto *cis*-**35c**.

Capítulo 3.

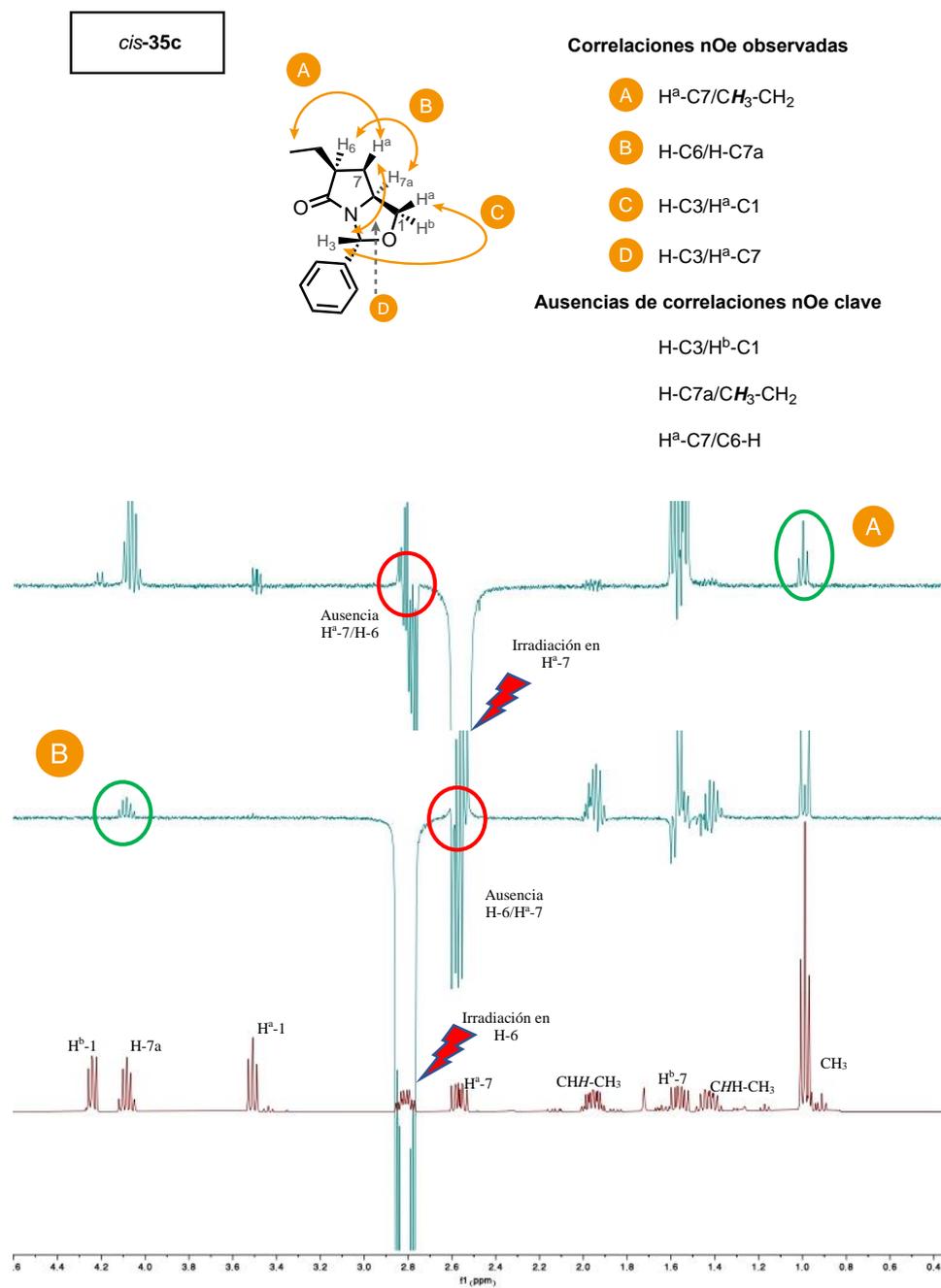


Figura 17. Comparativa de los espectros de ¹H (rojo) con los nOe 1D-selectivo (superior azul) para la señal H^a-7 y nOe 1D-selectivo (medio azul) para la señal H-6; del compuesto *cis*-35c.

Para el compuesto que resultó ser finalmente *cis*-**35c** también se realizaron los correspondientes experimentos de nOe 1D-selectivo, algunos de ellos están recogidos en la Figura 17. De manera representativa, solamente se han incluido las irradiaciones selectivas para los protones de los carbonos H^a-7 y H-6.

Al igual que en el caso anterior, el centro estereogénico C7a tiene la misma configuración. Para el caso de la irradiación en H-6 (esquema medio azul), hay dos señales importantes que destacar, la señal positiva que tiene el protón irradiado (H-6) con H-7a (correlación indicada como «B») y la ausencia de señal nOe de H-6 con uno de los protones del carbono C7, el H^a. La señal de nOe positiva, ya de por sí sería válida para identificar dicha estructura como *cis*, sumado a lo que ya analizado de la estructura *trans*, no obstante, al igual que anteriormente, se han recogido otro grupo de señales (y ausencias) remarcables.

En el otro espectro que se presenta (esquema superior azul), se irradia sobre el mismo protón, H^a, del carbono C7 y se ve señal positiva con el CH₃ del etilo (correlación indicada como «A»). La ausencia de señal con H-6 sale de nuevo, a pesar del cambio de irradiación.

Otra señal de nOe (no incluida en los espectros de la Figura 17) es la que presentan los protones, H^a-7 y H-3.

Por último, merece la pena comentar la ausencia de señal positiva entre cualquiera de los protones del grupo etilo (CH₂-CH₃) con el H de carbono C7a.

Continuando con la ruta, el siguiente paso consistió en la reducción de *cis*-**35c** usando LiAlH₄ (paso **c**, Esquema 63) dando lugar al prolinol sustituido **36c**. Después, el tratamiento con TFAA y Et₃N dio como resultado el producto de expansión del anillo, la 3-hidroxipiperidina (3*R*,5*S*)-**29c**, conservando la configuración de los centros estereogénicos, como habíamos visto en detalle en la sección de Antecedentes de este Capítulo (3.2, Esquema 54). De forma simultánea se realizaron los pasos **c** y **d** al isómero minoritario **35c**.

De forma complementaria, también se realizó la oxidación de Swern a (3*R*,5*S*)-**29c** (al igual que se hizo con su análogo con metilo (3*R*,5*S*)-**29b**). Las piridinonas obtenidas, también sirvieron para corroborar la configuración correspondiente del paso intermedio tras la acción de la ERED.

A su vez, a partir de los alcoholes (3*R*,5*S*)-**29b-c** se obtuvieron las correspondientes piridinonas (*S*)-**28b-c** mediante una oxidación de Swern, las cuales también sirvieron para corroborar la configuración de los intermedios después del primer paso de bioreducción de las ERED's.

CONCLUSIONES

Conclusiones

En resumen, se ha diseñado un sistema catalítico bi-enzimático en un solo recipiente (*one-pot, two-steps*) para la síntesis de 3-hidroxipiperidinas ópticamente activas, bajo condiciones suaves de reacción. Se diseñaron estrategias catalíticas tanto en modo secuencial como concurrente, para ello se utilizaron parejas de enzimas de ene-reductasas (ERED's)/alcohol deshidrogenasas (ADH's) como biocatalizadores.

El primer paso de la cascada catalizado por las ERED's se estudió con un grupo de sustratos **27a-e**, con estructura de 1,6-dihidropiridin-3(2*H*)-ona. Según el sustituyente de la posición C5 del anillo de la dihidropiridinona, se dispuso de una cetona α,β -insaturada simple **27a**, sin ningún sustituyente en el anillo, así como de diferentes dihidropiridinonas con sustituyentes alquílicos **27b-d** o con un grupo fenilo **27e**. El segundo paso, catalizado por las ADH's, se centró en las piperidinonas **28a-c**, que se obtuvieron con buen rendimiento y de forma enantioselectiva tras el primer paso catalítico.

Para la 3-hidroxipiperidina **29a**, la más simple con un único carbono asimétrico, se encontraron ADH's con enantiopreferencia opuesta que permitieron acceder a ambos enantiómeros de forma enantiopura y con elevado rendimiento, mediante cascadas secuenciales o concurrentes dependiendo de la ADH empleada.

Para los sustratos con sustitución en la posición 5, sólo se logró acceder, mediante los procesos catalíticos, a las 3-hidroxipiperidinas de los sustratos **27b** y **27c**. En el caso de **27b**, para el primer paso de bioreducción catalizado por las ERED's, se encontraron varias candidatas capaces de preparar el enantiómero (5*R*)-**28b**, sin embargo, ninguna de las ERED's disponibles con selectividad anti-*Prelog* mostró actividad. Para el segundo paso de las cascadas catalizado por las ADH's se encontraron varios catalizadores funcionales que permitirían acceder a los cuatro estereoisómeros del compuesto **29b**.

Para el compuesto **27c** se encontraron, de igual modo, varias ERED's que catalizaban el primer paso de la cascada con excelentes selectividades. En contraposición, para el segundo paso sólo se encontraron varias ADH's capaces de catalizar la formación del isómero (3*R*)-**29c**.

Se comprobó la compatibilidad de las ERED's y las ADH's para diseñar las mejores aproximaciones posibles que permitieran acceder mediante cascadas concurrentes o secuenciales a las correspondientes 3-hidroxipiperidinas. De este modo, se prepararon mediante una cascada concurrente los compuestos (3*S*,5*R*)-**29b** y (3*R*,5*R*)-**29c** y, con una secuencial, el isómero (3*R*,5*R*)-**29b**.

Se realizaron procesos a escala semipreparativa para los compuestos **27a** y **27b**, ambos mediante un diseño de cascada concurrente, logando aislar el compuesto (*S*)-**29a** con un rendimiento del 76% y en forma enantiopura (*ee* >99%); y el compuesto (3*S*,5*R*)-**29b** con un rendimiento del 77%, un exceso enantiomérico >99% y un *dr* de 97:3.

Capítulo 3.

La asignación de la configuración absoluta de los productos obtenidos se determinó mediante la comparación directa tanto de sus datos físicos como de los espectrales con los disponibles en la bibliografía.

En el caso del compuesto **29c**, se realizaron pruebas complementarias, experimentos de nOe 1D-selectivos para los compuestos *cis*- y *trans*-**35**, que apoyaron la selectividad esperada de acuerdo con los datos bibliográficos así como la enantiopreferencia mostrada por las enzimas.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

3.9. General.

Los reactivos químicos empleados fueron adquiridos de fuentes comerciales (Merck, BLDpharm o TCI) y se utilizaron tal como se recibieron; a excepción de los disolventes, los cuales fueron destilados previamente en atmósfera de nitrógeno según los procedimientos estándar para su secado como en los capítulos anteriores.

Las alcohol-deshidrogenasas (ADH's) fueron las mismas que se presentaron a lo largo del Capítulo 2. Las ene-reductasas (ERED's) fueron adquiridas a la casa comercial Codexis® (*Codex® Ene Reductase Screening Kit*) al igual que los cofactores de nicotinamida (NAD⁺ y NADP⁺) y la glucosa deshidrogenasa (GDH-105, 48 U·mg⁻¹).

Respecto a las técnicas de purificación y análisis empleadas en este capítulo como la cromatografía en gel de sílice, en capa fina o la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), así como los espectros de resonancia magnética nuclear, las rotaciones específicas, los puntos de fusión o los espectros de masas de alta resolución; se han empleado los mismos instrumentos de medida, según se han descrito en los capítulos anteriores, a excepción de los experimentos de nOe 1D-selectivos, los cuales se recogieron en un espectrómetro Bruker AV400 (¹H, 400.54 MHz).

3.10. Procedimientos sintéticos.

Ruta sintética (Esquema 58) para la síntesis de la dihidropiridinona 27a, así como de los intermedios correspondientes.

Primer paso²⁵² (a): La piridina (1 mL, 12.41 mmol) se disolvió en acetona (4 mL, 3 M) y el bromuro de bencilo (1.48 mL, 12.5 mmol, 1.0 equiv.) se añadió gota a gota. La mezcla de reacción se agitó a reflujo durante toda la noche. Transcurrido ese tiempo, se dejó que recuperara la temperatura ambiental y el disolvente se eliminó a presión reducida. El precipitado resultante se lavó con THF frío y se secó a presión reducida.

El crudo resultante se disolvió en MeOH (30 ml, 0.4 M) y se enfrió a 0 °C. Después se añadió en porciones NaBH₄ (567 mg, 15 mmol, 1.2 equiv.) y se dejó agitando a esa temperatura durante 4 h. Transcurrido ese tiempo, se añadió agua y se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera, y se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para proporcionar el producto **30** como un aceite amarillo (2.04 g, 95% rdto.). No fue necesaria purificación adicional para el siguiente paso.

²⁵² S. Yadav, D. Chaudhary, N. K. Maurya, D. Kumar, K. Ishua, M. R. Kuram, *Chem. Commun.* **2022**, 58, 4255–4258.

Capítulo 3.

Segundo paso²⁵³ (b): El compuesto **30** (500 mg, 2.9 mmol, 1.2 equiv.) se añadió gota a gota a una mezcla de TFA (265 μ L, 3.5 mmol) en agua (4.8 mL, 0.6 M). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 min. A continuación, se añadió en porciones NBS (723 mg, 4.06 mmol, 1.4 equiv.) y se dejó en agitación toda la noche a 35 °C. Transcurrido ese tiempo, la mezcla se decantó y se añadió gota a gota a una solución acuosa de NaOH al 20 % *p/v* (10 equiv.). La mezcla se agitó durante toda la noche a 35 °C. Finalmente, el producto se extrajo con CH₂Cl₂, las capas orgánicas se combinaron y se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para obtener el correspondiente epóxido **31** como un aceite marrón (400 mg, 75% rdto.). No fue necesaria purificación adicional para el siguiente paso.

Tercer paso²⁵⁴ (c): A una disolución preparada *in situ* y enfriada con un baño de hielo y sal (de -5 a -10 °C) de LDA (3.0 mmol, 1.5 equiv.) en THF (2.0 mL, 1.5 M), se añadió gota a gota una disolución del epóxido **31** (380 mg, 2.02 mmol) en THF (6 mL, 0.33 M). La mezcla de reacción permaneció a esa temperatura durante 5 minutos y después se dejó que alcanzara la temperatura ambiente para seguir con agitación durante 5 horas. Transcurrido ese tiempo, se agregó una disolución saturada de NH₄Cl y se extrajo varias veces con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron. El material resultante se purificó mediante cromatografía en columna para obtener el compuesto **32a** con un rendimiento del 90% (344 mg) como un aceite marrón.

Cuarto paso (d): El procedimiento llevado a cabo fue un protocolo de oxidación estándar de Swern.

A una disolución de cloruro de oxalilo (36 μ L, 0.40 mmol, 1.5 equiv.) en CH₂Cl₂ anhidro (1.5 mL, 0.27 M) se añadió gota a gota DMSO (38 μ L, 0.52 mmol, 2.0 equiv.) a -70 C. La mezcla resultante se agitó a esa misma temperatura durante 30 min. A continuación, se añadió lentamente una disolución del compuesto **32a** (50 mg, 0.26 mmol, 1.0 equiv.) en CH₂Cl₂ anhidro (0.5 mL, 0.52 M) y se dejó en agitación durante 3-4 horas. Transcurrido este tiempo, se añadió Et₃N (95 μ L, 0.65 mmol, 2.5 equiv.). La mezcla resultante permaneció a esa temperatura durante 5 minutos y después se dejó que alcanzara la temperatura ambiente durante 3 horas. Transcurrido ese tiempo, se agregó una disolución saturada de NH₄Cl y se extrajo varias veces con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron. El material resultante se purificó mediante cromatografía en columna para obtener el compuesto **27a** con un rendimiento del 87% (43 mg) como un aceite amarillo.

²⁵³ H. J. M. Gijzen, M. J. A. De Cleyn, C. J. Love, M. Surkyn, S. F.A. Van Brandt, M. G. C. Verdonck, L. Moens, J. Cuypers, J.-P. R. M. A. Bosmans, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 2456–2464.

²⁵⁴ S. Karabiyikoglu, A. V. Brethomé, T. Palacin, R. S. Paton, S. P. Fletcher, *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 4125–4130.

Ruta sintética (Esquema 60) para la síntesis de las dihidropiridinonas 27b-e, así como de los intermedios correspondientes.

Primer paso²⁵⁵ (a): El compuesto **1a** (1.0 g, 4.0 mmol) se añadió gota a gota a una solución de *tert*-butóxido potásico (473 mg, 4.2 mmol, 1.05 equiv.) en THF (12 mL, 0.33 M) a 0 °C. La mezcla de reacción se dejó alcanzar la temperatura ambiente y se agitó durante toda la noche. Después se enfrió de nuevo a 0 °C y se añadió gota a gota anhídrido acético (416 µL, 4.4 mmol, 1.1 equiv.). Tras agitar a 0 °C durante 1 h, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y agua. La capa acuosa se separó y se lavó con acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron, se lavó con salmuera, y se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para proporcionar el producto **33** correspondiente como un aceite amarillo (807 mg, 82% rdto.). No fue necesaria purificación adicional para el siguiente paso.

Segundo paso (b): El procedimiento utilizado se basa en una modificación de un método ya en la bibliografía.²⁵⁵

A una solución del compuesto **33** (1.0 equiv.) en THF (0.5 M) a 0 °C se añadió gota a gota el reactivo de Grignard apropiado (1.1 equiv.). Después de agitarse a 0 °C durante 1 hora, se le añadió una disolución acuosa de NaOH (3.0 M, 4.1 equiv.) y se agitó a 50 °C durante 4 h.

Transcurrido este tiempo, la reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se separaron las fases. La capa acuosa se lavó con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se lavó con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró al vacío. La purificación mediante cromatografía en columna produjo las correspondientes dihidropiridinonas **27b-e** (33-69% rdto.).

Después de una noche a -20 °C, los productos **27c** y **27e** solidificaron en forma de cristales de color amarillo pálido.

Síntesis del alcohol racémico²⁵⁶ 29a y de la cetona 28a (Esquema 59).

A una suspensión del clorhidrato de 3-hidroxipiperidina (555 mg, 4.03 mmol, 1.0 equiv.) con carbonato de cesio (2.6 g, 8.1 mmol, 2.0 equiv.) en acetona (12 mL, 0.35 M) a temperatura ambiente, se añadió gota a gota bromuro de bencilo (527 µL, 4.43 mmol, 1.1 equiv.). La mezcla de reacción se dejó en agitación durante una noche a la misma temperatura. Después, la suspensión se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. El crudo de reacción se purificó mediante cromatografía en columna obteniéndose el alcohol **29a** como un aceite incoloro (677 mg, 89% rdto.).

²⁵⁵ C. Shu, A. Alcudia, J. Yin, L. S. Liebeskind, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12477–12487.

²⁵⁶ U. Košak, N. Strašek, D. Knez, M. Jukič, S. Žakelj, A. Zahirović, A. Pišlar, X. Brazzolotto, F. Nachon, J. Kos, S. Gobec, *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *197*, 112282.

Capítulo 3.

Para la síntesis de la cetona **28a** se siguió el mismo protocolo de oxidación de Swern, descrito previamente para el paso **d**, Esquema **58**. Las cantidades empleadas en este caso fueron: cloruro de oxalilo (395 μ L, 4.65 mmol, 1.5 equiv.) en CH_2Cl_2 (14 mL, 0.34 M); DMSO (440 μ L, 6.2 mmol, 2.0 equiv.); **29a** (600 mg, 3.1 mmol, 1.0 equiv.) en CH_2Cl_2 (4 mL, concentración final 0.17 M) y Et_3N (1.1 mL, 7.75 mmol, 2.5 equiv.).

El material resultante se purificó mediante cromatografía en columna para obtener el compuesto **28a** con un rendimiento del 74% (435 mg) como un aceite pardo.

Síntesis de los alcoholes insaturados racémicos **32b-c** (paso **c**, Esquema **60**).

El procedimiento llevado a cabo fue el de una reducción estándar de Luche.

A una disolución de la dihidropiridinona **27b-c** correspondiente (1 equiv.) y $\text{CeCl}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (1.05 equiv.) en MeOH (0.15 M) a 0 °C; se añadió NaBH_4 (1.1 equiv.). Después de agitarse a 0°C durante 1 h, la mezcla de reacción se diluyó con AcOEt y agua. Las capas orgánicas se combinaron, se lavó con salmuera, y se secaron sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida para proporcionar los productos **32b-c** correspondientes (93-99% rdto.). No fue necesaria purificación adicional.

Síntesis de las cetonas racémicas **28b-c,e** (paso **d**) y de los alcoholes **29b-c** (paso **e**, Esquema **60**).

A una disolución de **27b** o **27e** (1.0 equiv.) en MeOH (0.15 M), o **27c** (1.0 equiv.) en AcOEt:EtOH (1:1, 0.15 M); se añadió Pd-C (10% en peso) o $\text{Pd}(\text{OH})_2$ (10% en peso) respectivamente. La mezcla resultante se agitó bajo una atmósfera de $\text{H}_2(\text{g})$ durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, la mezcla se filtró a través de una capa de Celite® y el residuo negro se lavó varias veces con más disolvente. A continuación, el disolvente se eliminó a presión reducida. El material resultante se purificó mediante cromatografía en columna para proporcionar los productos **28b-c,e** correspondientes (13-59% rdto.).

Las cetonas **28b-c** (1.0 equiv.) se disolvieron en metanol (0.35 M) a 0 °C y se añadió NaBH_4 (1.5 equiv.). La reacción se dejó agitando durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y agua. La capa acuosa se separó y se lavó con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida para proporcionar los alcoholes (mezclas diastereoméricas) **29b-c** (99-77% rdto. respect.). No se realizó purificación adicional.

Síntesis de la cetona racémica **28b** (mediante adición conjugada con organocuprato, Esquema 61).

En primer lugar, se procedió con la formación *in situ* del reactivo de Gilman.²⁵⁷ Para ello a una suspensión de yoduro de cobre (190 mg, 1.0 mmol, 1.2 equiv.) en THF anhidro (2 mL, 0.5 M) a -20 °C se añadió gota a gota una disolución de metilitio (1.25 mL, 2.0 mmol, 1.6 M en éter dietílico). La adición del primer equivalente resultó en una suspensión amarilla y cuando se terminó de adicionar la disolución de metilitio produjo una disolución transparente, prácticamente incolora. La disolución se dejó en agitación a durante 30 minutos adicionales esa misma temperatura.

A continuación, se añadió lentamente una disolución de **27a** (155 mg, 0.83 mmol, 1.0 equiv.) en THF anhidro (2.4 mL, 0.35 M). La mezcla resultante se agitó a esa misma temperatura durante 5 minutos y se dejó que recuperara la temperatura ambiental, agitándose adicionalmente durante toda la noche. Trascurrido ese tiempo, se añadió una disolución saturada de cloruro de amonio y se extrajo con acetato de etilo. Las capas orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera, y se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para proporcionar el producto **28b** como un aceite pardo (161 mg, 96% rdto.). No fue necesaria purificación adicional para el siguiente paso.

Ruta sintética (Esquema 63) para la determinación de la configuración absoluta de los compuestos **29b-c**, así como de los intermedios correspondientes.²⁵⁰

Primer paso (a): A una disolución de la comercialmente disponible (*S*)-5-(hidroximetil)pirrolidin-2-ona (1.0 g, 8.7 mmol, 1.0 equiv.) en tolueno (13 mL, 0.67 M) se añadió benzaldehído (927 μ l, 9.12 mmol, 1.05 equiv.) y PTSA monohidrato (33 mg, 0.174 mmol, 0.02 equiv.). La mezcla se sometió a reflujo vigoroso durante una noche con una trampa Dean-Stark. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, la mezcla se lavó con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃, salmuera y se secó sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para proporcionar el producto **34** como un aceite marrón (1.59 g, 90% rdto.). No fue necesaria purificación adicional para el siguiente paso.

Segundo paso (b): A una disolución preparada *in situ* y enfriada a -50 °C de LDA (2.0 equiv.) en THF anhidro (2.0 M), se añadió gota a gota una solución del compuesto **34** (1.0 equiv.) en THF anhidro (0.7 M). La mezcla se agitó durante 2 h a -50 °C y, a continuación, se añadió gota a gota una disolución del yoduro de alquilo correspondiente (3.0 equiv.) en THF (3.0 M). La mezcla de reacción permaneció a esa temperatura durante 10 minutos y después se dejó que alcanzara la temperatura ambiente para seguir con agitación durante 6 horas. Trascurrido ese tiempo, se agregó una disolución acuosa de ácido clorhídrico (0.5 M) y se extrajo varias veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron

²⁵⁷ H. Gilman, R. G. Jones, L. A. Woods, *J. Org. Chem.* **1952**, *17*, 1630–1634.

Capítulo 3.

sobre Na₂SO₄ y se concentraron. El crudo resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para obtener los compuestos **35b-c** como aceites amarillos (55 y 69% rdto. respect.).

Tercer paso (c): A una mezcla en agitación de LiAlH₄ (2.0 equiv.) en THF anhidro (1.0 M) a 0 °C, se añadió gota a gota una solución del compuesto **35b-c** (1.0 equiv.) en THF anhidro (0.5 M). La mezcla se dejó que recuperara la temperatura ambiental, se agitó durante 0.5 h y luego se mantuvo a reflujo durante 0.5 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla se enfrió a 0 °C y se diluyó con Et₂O, después se añadió lentamente agua seguida de una solución acuosa de NaOH (15%). A continuación, se dejó que la mezcla resultante alcanzara la temperatura ambiente y se añadió MgSO₄. Después, la mezcla se filtró y las sales se lavaron con más Et₂O. Las fases orgánicas se combinaron y se concentraron para obtener el crudo de reacción **36b-c** correspondiente como un aceite amarillo (88 y 89% rdto. respect.), los cuales se usaron en el siguiente paso sin purificación adicional.

Cuarto paso (d): Una solución del compuesto **36b-c** (1.0 equiv.) en THF (0.4 M) se enfrió a 0 °C, se añadió gota a gota TFAA (1.5 equiv.) y la mezcla se agitó a 0 °C durante 1 h. Luego se añadió gota a gota Et₃N (5.0 equiv.) y la mezcla se agitó durante 0.5 h a temperatura ambiente y, a continuación, se mantuvo a reflujo durante la noche. Transcurrido este tiempo, la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y se trató con una solución acuosa de NaOH (4.0 M, 30 equiv.) y se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo, las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se concentraron. El crudo resultante se purificó mediante cromatografía en gel de sílice para obtener los compuestos **29b-c** correspondientes como aceites amarillos (94 y 83% rdto. respect.).

Quinto paso (e): Para la síntesis de las cetonas **28b-c** se siguió el mismo protocolo de oxidación de Swern, descrito previamente para el paso **d**, Esquema **58**.

3.11. Procedimientos enzimáticos.

Protocolo general para las transformaciones en escala analítica.

- Cribado inicial de ene-reductasas (ERED's):

El sustrato correspondiente **27a-e** (25 mM) se disolvió en 2-PrOH (2.5% v/v), dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 mL. A continuación, se añadió una disolución tampón de fosfato potásico (100 mM, pH 7.0, volumen final 500 µL mL), el cofactor (50 µL de NADP⁺ con una concentración final 1.0 mM), D-glucosa (7.2 mg, 80 mM) y GDH-105 (1 mg·mL⁻¹); seguido de la adición de la ERED correspondiente (2.0 mg). La reacción se agitó a 250 rpm y 30 °C durante 24 h.

Transcurrido este tiempo, las reacciones se extrajeron directamente con acetato de etilo ($2 \times 500 \mu\text{L}$). Las fases orgánicas se separaron por centrifugación (90 s, 13000 rpm), se combinaron y se secaron sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó en un SpeedVacTM, y el crudo de reacción resultante se analizó mediante HPLC para determinar el rendimiento analítico y los valores de exceso enantiomérico.

- Cribado inicial de alcohol deshidrogenasas (ADH's):

El cribado inicial de las ADH's se llevó a cabo utilizando las condiciones optimizadas para el primer paso de la ERED específica de cada sustrato.

El sustrato **28a-c** o en su caso las dihidropiridinonas **27a-c** (25 mM) se disolvieron en el cosolvente apropiado (25 μL , 5% *v/v*), dentro de un tubo Eppendorf de 1.5 mL. A continuación, se añadió una disolución tampón de fosfato potásico (200 mM, pH 7.0, volumen final 500 μL mL), el cofactor (50 μL de NADP^+ o NAD^+ con una concentración final 1.0 mM), D-glucosa (7.2 mg, 80 mM) y GDH-105 (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); seguido de la adición de la ADH correspondiente (2.0 mg para las enzimas de Codexis[®] y 10 mg para las células liofilizadas de *E. coli*: Ras-ADH, Lb-ADH, ADH-A, ADH-T). La reacción se agitó a 250 rpm y 30 °C durante 24 h.

Transcurrido este tiempo, las reacciones se extrajeron directamente con acetato de etilo ($2 \times 500 \mu\text{L}$). Las fases orgánicas se separaron por centrifugación (90 s, 13000 rpm), se combinaron y se secaron sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó en un SpeedVacTM, y el crudo de reacción resultante se analizó mediante HPLC para determinar el rendimiento analítico y los valores de exceso enantiomérico. En algunos casos (compuestos **29b** y **29c**) se llevó a cabo una derivatización con Ac_2O para la determinación del *ee* y del *dr*.

- Acetilación:

Se tomó una alícuota o la totalidad de la muestra de los alcoholes obtenidos en el paso de biorreducción y se disolvió en AcOEt (0.5 mL) y se añadió posteriormente DMAP (cat.), anhídrido acético (5 gotas) y K_2CO_3 (cat.). La mezcla se agitó a 30 °C y 250 rpm durante 12 h. Después, se añadió una disolución acuosa de NaOH 4 M (200 μL). La fase orgánica se separó por centrifugación (90 s, 13000 rpm), se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó y el crudo de reacción resultante se analizó mediante HPLC para realizar el análisis enantiomérico.

- Aproximación secuencial:

Para este protocolo, inicialmente se llevó a cabo el primer paso utilizando la ERED adecuada, incluyendo en el medio el cofactor o cofactores necesarios para realizar el segundo paso. Transcurrido el tiempo requerido para completar el primer paso, se introdujo la ADH correspondiente en el medio de reacción y se dejó durante otras 24 h de reacción a la misma agitación y temperatura.

Capítulo 3.

Transcurrido este tiempo, el procedimiento de extracción, secado y posterior análisis del crudo de reacción resultante, se realizó de manera análoga al explicado en los casos anteriores.

- Aproximación concurrente:

En el caso de este protocolo, ambas enzimas, la ERED y la ADH correspondiente, se añadieron desde el comienzo al medio de reacción, el cual se agitó a 250 rpm y 30 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, el procedimiento de extracción, secado y posterior análisis del crudo de reacción resultante, se realizó de manera análoga al explicado en los casos anteriores.

Protocolo para las transformaciones en escala semipreparativa en modo concurrente para los sustratos **27a** y **27b**.

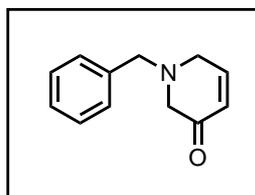
En un tubo cónico Falcon de tamaño apropiado, se rehidrató la ERED correspondiente junto con la ADH-A en una disolución tampón de fosfato potásico (200 mM, pH 7.0) con NADP⁺ y NAD⁺ (1.0 mM de concentración final ambos) durante 10 min a 30 °C y 250 rpm en un agitador orbital. A continuación, se añadió la cetona correspondiente y el MTBE (5% v/v). Se cerró el vial y se incubó a la temperatura y agitación anteriores durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo, la mezcla se extrajo con acetato de etilo (tres veces), las capas orgánicas se separaron por centrifugación (3 min, 4900 rpm), se combinaron y finalmente se secaron sobre Na₂SO₄. El disolvente se eliminó a presión reducida para dar el correspondiente crudo de reacción, el cual se purificó mediante cromatografía en columna para, finalmente, obtener la 3-hidroxipiperidina enantioenriquecida deseada.

A continuación, se presentarán de forma resumida las cantidades y los resultados obtenidos:

- **(S)-1-Bencilpiperidin-3-ol, (S)-29a.** Sustrato: **27a** (25 mg, 0.13 mmol, concentración final: 25 mM). MTBE: (270 µL, 5% v/v). Disol. tampón: KPi 200 mM, pH 7.0, 5.1 mL. ERED: P1-H09 (22 mg), ADH: ADH-A (109 mg), glucosa: 77 mg, GDH: 5 mg. *T*: 30 °C. Producto (*S*)-**32a**: aceite amarillo (19.4 mg, **76%** rdto., *ee* >99%).
- **(3S,5R)-1-Bencil-5-metilpiperidin-3-ol, (3S,5R)-29b.** Sustrato: **27b** (25 mg, 0.12 mmol, concentración final: 25 mM). MTBE: (250 µL, 5% v/v). Disol. tampón: KPi 200 mM, pH 7.0, 4.75 mL. ERED: 207 (20 mg), ADH: ADH-A (100 mg), glucosa: 72 mg, GDH: 5 mg. *T*: 30 °C. Producto (*3S,5R*)-**32b**: aceite marrón (19.6 mg, **77%** rdto., *ee* >99%, *dr* 97:3).

3.12. Datos experimentales de los compuestos sintetizados en este Capítulo.

1-Bencil-1,6-dihidropiridin-3(2*H*)-ona, (27a)**Fórmula empírica:** C₁₂H₁₃NO**Masa molecular/g·mol⁻¹:** 187.24**Aspecto físico:** sólido amarillo**Pf:** 59–60 °C**R_f:** 0.30 (Hexano:Acetona-5:1)**Rendimiento:** 87%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.39 – 7.21 (m, 5H, Ph), 7.00 (dt, *J* = 10.1, 3.6 Hz, 1H, H-5), 6.11 (dt, *J* = 10.1, 2.1 Hz, 1H, H-4), 3.66 (s, 2H, CH₂-Ph), 3.30 – 3.21 (m, 2H, H-6), 3.18 (s, 2H, H-2).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 196.1 (CO), 148.7 (C), 136.6 (C), 129.2 (2 CH), 128.6 (2 CH), 128.0 (CH), 127.7 (CH), 61.8 (CH₂), 61.2 (CH₂), 51.8 (CH₂).

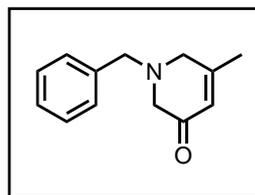
Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²⁵⁸

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 75/25Tiempo de retención: *t*_R = 6.3 min

Temperatura: 30 °C

Flujo: 1.0 mL·min⁻¹**1-Bencil-5-metil-1,6-dihidropiridin-3(2*H*)-ona, (27b)****Fórmula empírica:** C₁₃H₁₅NO**Masa molecular/g·mol⁻¹:** 201.27**Aspecto físico:** aceite marrón**R_f:** 0.81 (AcOEt)**Rendimiento:** 69%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.41 – 7.17 (m, 5H, Ph), 5.94 (s, 1H), 3.65 (s, 2H), 3.15 (s, 2H), 3.10 (s, 2H), 1.93 (s, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 195.9 (CO), 160.8 (C), 136.6 (C), 129.1 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.6 (CH), 125.0 (CH), 61.6 (CH₂), 60.2 (CH₂), 56.2 (CH₂), 21.7 (CH₃).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²⁵⁵

²⁵⁸ L.-C. Chen, E.-C. Wang, J.-H. Lin, S.-S. Wu, *Heterocycles* **1984**, 22, 2769–2773.

Capítulo 3.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: AS

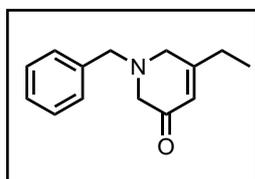
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20

Tiempo de retención: $t_R = 18.0$ min

Temperatura: 35 °C

Flujo: 1.0 mL·min⁻¹

1-Bencil-5-etil-1,6-dihidropiridin-3(2*H*)-ona, (27c)



Fórmula empírica: C₁₄H₁₇NO

Masa molecular/g·mol⁻¹: 215.30

Aspecto físico: sólido amarillo

Pf: 89–90 °C

R_f: 0.6 (Hexano:AcOEt-6:4)

Rendimiento: 66%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.37 – 7.15 (m, 5H, Ph), 5.97 – 5.90 (m, 1H), 3.63 (s, 2H), 3.15 (s, 2H), 3.10 (s, 2H), 2.20 (q, *J* = 7.4 Hz, 3H), 1.07 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 196.2 (CO), 166.1 (C), 136.6 (C), 129.0 (2 CH), 128.4 (2 CH), 127.5 (CH), 122.7 (CH), 61.6 (CH₂), 60.6 (CH₂), 55.3 (CH₂), 28.3 (CH₂), 11.0 (CH₃).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²⁵⁹

Separación Analítica (HPLC):

Columna: AS

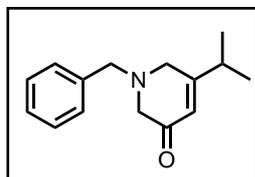
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20

Tiempo de retención: $t_R = 16.2$ min

Temperatura: 30 °C

Flujo: 0.8 mL·min⁻¹

1-Bencil-5-isopropil-1,6-dihidropiridin-3(2*H*)-ona, (27d)



Fórmula empírica: C₁₅H₁₉NO

Masa molecular/g·mol⁻¹: 229.32

Aspecto físico: aceite pardo (gomoso)

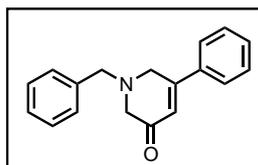
R_f: 0.69 (Hexano:AcOEt-6:4)

Rendimiento: 33%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.43 – 7.18 (m, 5H, Ph), 6.00 – 5.92 (m, 1H), 3.67 (s, 2H), 3.21 (s, 2H), 3.12 (s, 2H), 2.50 – 2.30 (m, 1H), 1.10 (d, *J* = 6.9 Hz, 6H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 196.8 (CO), 170.1 (C), 136.8 (C), 129.2 (2 CH), 128.6 (2 CH), 127.7 (CH), 122.0 (CH), 61.8 (CH₂), 60.9 (CH₂), 54.2 (CH₂), 34.0 (CH), 20.8 (2 CH₃).

²⁵⁹ F. E. Ziegler, G. B. Bennett, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 7458–7464.

1-Bencil-5-fenil-1,6-dihidropiridin-3(2H)-ona, (27e)**Fórmula empírica:** C₁₈H₁₇NO**Masa molecular/g·mol⁻¹:** 263.34**Aspecto físico:** sólido amarillo**Pf:** 58–59 °C**R_f:** 0.66 (Hexano:AcOEt-6:4)**Rendimiento:** 35%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.70 – 7.20 (m, 10H, 2 Ph), 6.55 – 6.48 (m, 1H), 3.80 (s, 2H), 3.71 (s, 2H), 3.28 (s, 2H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 196.2 (CO), 158.3 (C), 136.6 (C), 136.4 (C), 130.4 (CH), 129.1 (2 CH), 128.9 (2 CH), 128.6 (2 CH), 127.7 (CH), 126.0 (2 CH), 123.4, 61.7 (CH₂), 60.3 (CH₂), 53.8 (CH₂).

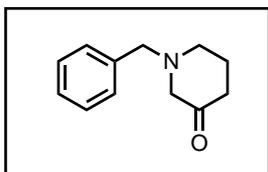
HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₈H₁₇NNaO)⁺ (M+Na)⁺ 286.1202; encontrada 286.1204.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 85/15Tiempo de retención: *t_R* = 19.3 min

Temperatura: 30 °C

Flujo: 0.7 mL·min⁻¹**1-Bencilpiperidin-3-ona, (28a)****Fórmula empírica:** C₁₂H₁₅NO**Masa molecular/g·mol⁻¹:** 189.26**Aspecto físico:** aceite pardo**R_f:** 0.45 (Hexano:AcOEt-6:4)**Rendimiento:** 74%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.40 – 7.15 (m, 5H, Ph), 3.53 (s, 2H), 2.95 (s, 2H), 2.59 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 2.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.96 – 1.80 (m, 2H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 206.5 (CO), 137.1 (C), 128.8 (2 CH), 128.1 (2 CH), 127.1 (CH), 64.3 (CH₂), 62.3 (CH₂), 51.3 (CH₂), 38.5 (CH₂), 23.8 (CH₂).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²⁶⁰

²⁶⁰ M. Kuriyama, S. Nakashima, T. Miyagi, K. Sato, K. Yamamotoa, O. Onomura, *Org. Chem. Front.* **2018**, *5*, 2364–2369.

Capítulo 3.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

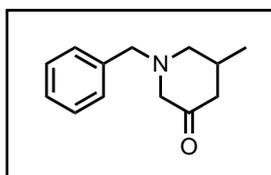
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 75/25

Tiempo de retención: $t_R = 5.5$ min

Temperatura: 30 °C

Flujo: 1.0 mL·min⁻¹

1-Bencil-5-metilpiperidin-3-ona, (28b)



Fórmula empírica: C₁₃H₁₇NO

Masa molecular/g·mol⁻¹: 203.29

Aspecto físico: aceite pardo

R_f: 0.7 (Hexano:AcOEt-6:4)

Rendimiento: 96%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.38 – 7.20 (m, 5H, Ph), 3.58 (sistema AB, 2H, ²J = 13.2 Hz, CH₂-Ph), 3.17 (d, ²J = 14.3 Hz, 1H), 2.95 – 2.81 (m, 1H), 2.77 (d, ²J = 14.3 Hz, 1H), 2.48 (dd, ²J = 15.3, ³J = 4.4 Hz, 1H, HH-4), 2.20 – 2.06 (m, 2H), 2.05 – 1.89 (m, 1H, HH-4), 0.99 (d, J = 6.0 Hz, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 207.1 (CO), 137.4 (C), 129.1 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.4 (CH), 63.9 (CH₂), 62.5 (CH₂), 59.1 (CH₂), 47.2 (CH₂), 30.7 (CH), 19.5 (CH₃).

Separación Analítica (HPLC):

Columna: AS

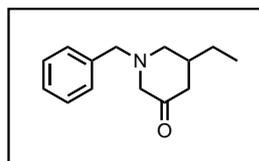
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 80/20

Tiempo de retención: t_R [(*S*)-**28b**] = 6.6 min, t_R [(*R*)-**28b**] = 9.3 min

Temperatura: 35 °C

Flujo: 1.0 mL·min⁻¹

1-Bencil-5-etilpiperidin-3-ona, (28c)



Fórmula empírica: C₁₄H₁₉NO

Masa molecular/g·mol⁻¹: 217.31

Aspecto físico: aceite marrón

R_f: 0.75 (Hexano:AcOEt-6:4)

Rendimiento: 55%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.40 – 7.23 (m, 5H, Ph), 3.65 (d, ²J = 13.1 Hz, 1H, CHH-Ph), 3.56 (d, ²J = 13.1 Hz, 1H, CHH-Ph), 3.17 (d, ²J = 14.4 Hz, 1H), 2.99 – 2.87 (m, 1H), 2.81 (d, ²J = 14.4 Hz, 1H), 2.54 (d, ²J = 11.4 Hz, 1H), 2.27 – 2.11 (m, 1H), 2.10 – 1.88 (m, 2H), 1.53 – 1.27 (m, 2H), 0.90 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

Sección Experimental

^{13}C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 207.5 (CO), 137.3 (C), 129.1 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.5 (CH), 64.2 (CH₂), 62.6 (CH₂), 57.3 (CH₂), 45.1 (CH₂), 37.2 (CH), 27.1 (CH₂), 11.4 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₄H₂₀NO)⁺ (M+H)⁺ 218.1539; encontrada 218.1545.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: AS

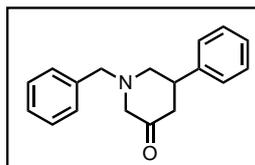
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 99/01

Flujo: 0.8 mL·min⁻¹

Tiempo de retención: *t_R* [(*R*)-**28c**] = 21.3 min, *t_R* [(*S*)-**28c**] = 23.4 min

1-Bencil-5-fenilpiperidin-3-ona, (28e)



Fórmula empírica: C₁₈H₁₉NO

Masa molecular/g·mol⁻¹: 265.36

Aspecto físico: aceite naranja

R_f: 0.42 (Hexano:AcOEt-9:1)

Rendimiento: 59%

^1H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.41 – 7.23 (m, 10H, 2 Ph), 3.67 (sistema AB, 2H, 2J = 13.8 Hz, CH₂-Ph), 3.41 – 3.26 (m, 2H), 3.19 – 3.10 (m, 1H), 2.92 (d, 2J = 14.4 Hz, 1H), 2.73 (dd, 2J = 15.4, 3J = 5.0 Hz, 1H), 2.65 – 2.49 (m, 2H).

^{13}C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 206.4 (CO), 142.1 (C), 137.0 (C), 129.1 (2 CH), 128.8 (2 CH), 128.5 (2 CH), 127.6 (CH), 127.2 (CH), 127.1 (2 CH), 63.9 (CH₂), 62.5 (CH₂), 58.8 (CH₂), 46.0 (CH₂), 41.7 (CH).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₈H₂₀NO)⁺ (M+H)⁺ 266.1539; encontrada 266.1541.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

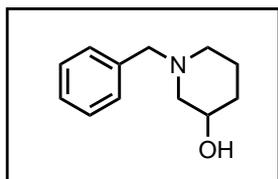
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 85/15

Flujo: 0.7 mL·min⁻¹

Tiempo de retención: *t_R* [(*R*)-**28e**] = 15.0 min, *t_R* [(*S*)-**28e**] = 17.0 min

1-Bencilpiperidin-3-ol, (29a)



Fórmula empírica: C₁₂H₁₇NO

Masa molecular/g·mol⁻¹: 191.27

Aspecto físico: aceite amarillo

R_f: 0.35 (AcOEt)

Rendimiento: 89%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.42 – 7.17 (m, 5H, Ph), 3.85 – 3.73 (m, 1H, H-3), 3.49 (s, 2H, CH₂-Ph), 2.83 – 2.77 (m, 1H), 2.55 – 2.22 (m, 4H), 1.92 – 1.41 (m, 4H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 138.0 (C), 129.1 (2 CH), 128.2 (2 CH), 127.1 (CH), 66.3 (CH), 63.0 (CH₂), 60.3 (CH₂), 53.4 (CH₂), 31.9 (CH₂), 21.9 (CH₂).

Rotación Óptica Específica: [α]_D²⁰ = + 8.2 (c 0.69, CH₃OH) [para (*S*)-**29a** con >99% *ee*]
lit. [α]_D²⁵ = +12.3 (c 1.21, CH₃OH) [para enan.-(*S*) con >99% *ee*] ^{243b}

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía. ^{243b}

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

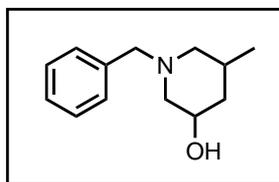
Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 85/15

Tiempo de retención: *t_R* [(*R*)-**29a**] = 7.6 min, *t_R* [(*S*)-**29a**] = 8.1 min

Temperatura: 30 °C

Flujo: 0.6 mL·min⁻¹

1-Bencil-5-metilpiperidin-3-ol, (29b)



Fórmula empírica: C₁₃H₁₉NO

Masa molecular/g·mol⁻¹: 205.30

Aspecto físico: aceite marrón

R_f: 0.36 (AcOEt)

Rendimiento: 94%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*):

- **cis-(29b) ¹H RMN:** δ 7.43 – 7.21 (m, 5H, Ph), 3.77–3.67 m (1H, H-3), 3.56 (d, ²*J* = 13.1 Hz, 1H, CHH-Ph), 3.49 (d, ²*J* = 13.1 Hz, 1H, CHH-Ph), 2.99 (dd, ²*J* = 10.3, ³*J* = 4.3 Hz, 1H), 2.81 – 2.70 (m, 1H), 1.97 (d, ²*J* = 10.3 Hz, 1H), 1.71 (t, ²*J* = 10.1 Hz, 2H), 1.53 (t, ²*J* = 10.9 Hz, 1H), 0.89 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H).

- **trans-(29b)** ^1H RMN: δ 7.43 – 7.22 (m, 5H, Ph), 3.90 (s, 1H, H-3), 3.54 (s, 2H, CH_2 -Ph), 3.00 – 2.85 (m, 1H), 2.85 – 2.66 (m, 1H), 2.16 – 2.09 (m, 1H), 2.05 (m, 1H), 2.01 – 1.81 (m, 1H), 1.64 (t, $J = 10.9$ Hz, 1H), 1.01 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 0.86 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H).

^{13}C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*):

- **cis-(29b)** ^{13}C RMN: δ 137.7 (C), 129.4 (2 CH), 128.2 (2 CH), 127.1 (CH), 67.2 (CH), 62.8 (CH₂), 60.7 (CH₂), 60.5 (CH₂), 42.3 (CH₂), 29.4 (CH), 19.2 (CH₃).

Rotación Óptica Específica: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 5.3$ (c 0.69, CHCl_3) [para (3*S*,5*R*)-**29b** con >99% *ee* y *dr* 97:3]

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.^{250,251}

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 90/10

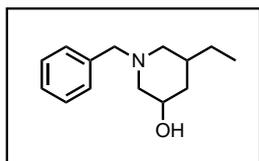
Flujo: 0.6 mL·min⁻¹

Tiempo de retención (**29b-acetilado**): t_R [(3*R*,5*S*)] = 7.0 min, t_R [(3*S*,5*R*)] = 9.5 min

t_R [(3*R*,5*R*)] = 8.2 min, t_R [(3*S*,5*S*)] = 8.8 min

Capítulo 3.

1-Bencil-5-etilpiperidin-3-ol, (29c)



Fórmula empírica: C₁₄H₂₁NO
Masa molecular/g·mol⁻¹: 219.33
Aspecto físico: aceite amarillo
R_f: 0.35 (AcOEt)
Rendimiento: 83%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*):

- **trans-(29c) ¹H RMN:** δ 7.39 – 7.19 (m, 5H, Ph), 3.93 – 3.84 (m, 1H, H-3), 3.56 (d, 1H, ²J = 13.2 Hz, CHH-Ph), 3.48 (d, 1H, ²J = 13.2 Hz, CHH-Ph), 2.91 – 2.77 (m, 2H, H-2), 2.11 (dd, ²J = 11.6, ³J = 1.6 Hz, 1H, HH-6), 2.00 – 1.85 (m, 1H, HH-4), 1.85 – 1.72 (m, 1H, H-5), 1.65 (t, ²J = 10.8 Hz, 1H, HH-6), 1.28 – 1.12 (m, 3H), 1.02 (dt, ²J = 11.7, ³J = 2.6 Hz, 1H, HH-4), 0.86 (t, J = 7.4 Hz, 3H).
- **cis-(29c) ¹H RMN:** δ 7.39 – 7.25 (m, 5H, Ph), 3.84 – 3.67 (m, 1H, H-3), 3.60 (d, 1H, ²J = 13.1 Hz, CHH-Ph), 3.47 (d, 1H, ²J = 13.1 Hz, CHH-Ph), 3.05 – 2.96 (m, 1H), 2.90 – 2.77 (m, 1H), 2.15 – 1.84 (m, 2H), 1.71 (t, J = 10.1 Hz, 1H), 1.59 – 1.50 (m, 2H), 1.37 – 1.15 (m, 3H), 0.88 (t, J = 7.5 Hz, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*):

- **trans-(29c) ¹³C RMN:** δ 138.2 (C), 129.1 (2 CH), 128.4 (2 CH), 127.2 (CH), 65.6 (CH), 62.9 (CH₂), 59.7 (CH₂), 59.6 (CH₂), 37.4 (CH₂), 32.7 (CH), 27.1 (CH₂), 11.4 (CH₃).
- **cis-(29c) ¹³C RMN:** δ 138.1(C), 129.3 (2 CH), 128.3 (2 CH), 127.2 (CH), 68.0 (CH), 63.0 (CH₂), 61.0 (CH₂), 59.3 (CH₂), 40.2 (CH₂), 36.4 (CH), 27.0 (CH₂), 11.6 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₄H₂₁NNaO)⁺ (M+Na)⁺ 242.1515; encontrada 242.1521.

Separación Analítica (HPLC):

Columna: OJ-H

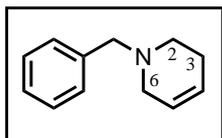
Temperatura: 30 °C

Eluyente: *n*-Hexano/2-PrOH - 98/02

Flujo: 0.8 mL·min⁻¹

Tiempo de retención (**29c-acetilado**): *t_R* [(3*R*,5*S*)] = 7.3 min, *t_R* [(3*S*,5*R*)] = 11.2 min

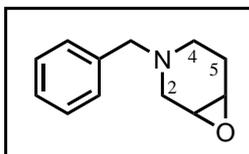
t_R [(3*R*,5*R*)] = 9.6 min, *t_R* [(3*S*,5*S*)] = 10.4 min

1-Bencil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, (30)**Fórmula empírica:** C₁₂H₁₅N**Masa molecular/g·mol⁻¹:** 173.26**Aspecto físico:** aceite amarillo**R_f:** 0.66 (AcOEt)**Rendimiento:** 95%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.38 – 7.20 (m, 5H, Ph), 5.77 (dtd, *J* = 8.6, 3.4, 1.7 Hz, 1H, H-5), 5.68 (dtd, *J* = 7.9, 3.0, 1.5 Hz, 1H, H-4), 3.59 (s, 2H, CH₂-Ph), 3.03 (p, *J* = 2.8, 2H, H-6), 2.57 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, H-2), 2.25 – 2.11 (m, 2H, H-3).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 138.5 (C), 129.3 (2 CH), 128.3 (2 CH), 127.1 (CH), 125.5 (CH), 125.3 (CH), 63.1 (CH₂), 52.9 (CH₂), 49.7 (CH₂), 26.3 (CH₂).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²⁵⁴

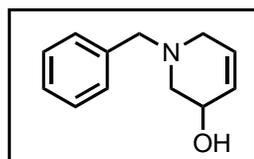
3-Bencil-7-oxa-3-azabicyclo[4.1.0]heptano, (31)**Fórmula empírica:** C₁₂H₁₅NO**Masa molecular/g·mol⁻¹:** 189.26**Aspecto físico:** aceite rojo**R_f:** 0.35 (Hexano:AcOEt-6:4)**Rendimiento:** 75%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.38 – 7.24 (m, 5H, Ph), 3.48 (s, 2H, CH₂-Ph), 3.30 – 3.19 (m, 2H), 3.04 (ddd, |²*J*| = 13.4, ³*J* = 4.0, 1.4 Hz, 1H), 2.70 (d, *J* = 13.4 Hz, 1H), 2.42 – 2.29 (m, 1H), 2.29 – 2.15 (m, 1H), 2.08 – 1.98 (m, 2H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 138.0 (C), 129.1 (2 CH), 128.3 (2 CH), 127.2 (CH), 62.4 (CH₂), 52.4 (CH₂), 51.4 (CH), 50.8 (CH), 45.9 (CH₂), 25.6 (CH₂).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²⁵³

1-Bencil-1,2,3,6-tetrahidropiridin-3-ol, (32a)



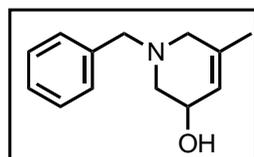
Fórmula empírica: C₁₂H₁₅NO
Masa molecular/g·mol⁻¹: 189.26
Aspecto físico: aceite marrón
R_f: 0.53 (Hexano:Acetona-5:1)
Rendimiento: 90%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.41 – 7.20 (m, 5H), 5.92 – 5.82 (m, 1H), 5.83 – 5.71 (m, 1H), 4.14 – 4.02 (m, 1H, H-3), 3.60 (s, 2H, CH₂-Ph), 3.08 (dd, |²J| = 17.0, ³J = 3.2 Hz, 1H), 2.91 (s, 1H, OH), 2.84 – 2.67 (m, 2H), 2.55 (dd, |²J| = 11.5, ³J = 3.5 Hz, 1H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 137.7 (C), 129.2 (2 CH), 128.5 (CH), 128.3 (2 CH), 128.1 (CH), 127.3 (CH), 64.6 (CH), 62.5 (CH₂), 57.7 (CH₂), 52.6 (CH₂).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²⁵⁴

1-Bencil-5-metil-1,2,3,6-tetrahidropiridin-3-ol, (32b)



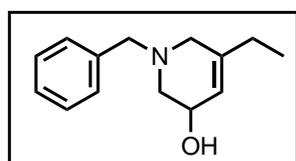
Fórmula empírica: C₁₃H₁₇NO
Masa molecular/g·mol⁻¹: 203.29
Aspecto físico: aceite marrón
R_f: 0.14 (Hexano:AcOEt-6:4)
Rendimiento: 93%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.41 – 7.15 (m, 5H), 5.60 (s, 1H, H-4), 4.03 (s, 1H, H-3), 3.61 (s, 2H, CH₂-Ph), 2.97 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 2.75 (dd, |²J| = 11.4, ³J = 3.3 Hz, 1H), 2.66 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 2.46 (dd, |²J| = 11.4, ³J = 3.3 Hz, 1H), 1.64 (s, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 137.5 (C), 136.5 (C), 129.2 (2 CH), 128.4 (2 CH), 127.3 (CH), 122.9 (CH), 64.7 (CH), 62.3 (CH₂), 57.5 (CH₂), 56.8 (CH₂), 20.7 (CH₃).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²⁵⁵

1-Bencil-5-etil-1,2,3,6-tetrahidropiridin-3-ol, (32c)



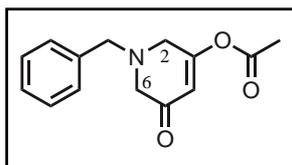
Fórmula empírica: C₁₄H₁₉NO
Masa molecular/g·mol⁻¹: 217.31
Aspecto físico: aceite amarillo
R_f: 0.33 (Hexano:AcOEt-6:4)
Rendimiento: 99%

$^1\text{H RMN}$ (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.46 – 7.19 (m, 5H), 5.69 – 5.62 (m, 1H, H-4), 4.17 – 4.04 (m, 1H, H-3), 3.80 (sistema AB, 2H, $|^2J| = 13.1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 3.15 (d, $|^2J| = 15.9$ Hz, 1H, *HH*-6), 2.97 (dd, $|^2J| = 11.8$, $^3J = 3.0$ Hz, 1H, *HH*-2), 2.85 (d, $|^2J| = 15.9$ Hz, 1H, *HH*-6), 2.60 (dd, $|^2J| = 11.8$, $^3J = 3.5$ Hz, 1H, *HH*-2), 1.97 (q, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.00 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C RMN}$ (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 140.3 (C), 135.1 (C), 129.8 (2 CH), 128.7 (2 CH), 128.2 (CH), 121.0 (CH), 63.9 (CH), 61.9 (CH₂), 57.3 (CH₂), 54.9 (CH₂), 27.4 (CH₂), 11.8 (CH₃).

HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculada para (C₁₄H₂₀NO)⁺ (M+H)⁺ 218.1539; encontrada 218.1545.

5-Acetoxi-1-bencil-3-oxo-1,2,3,6-tetrahidropiridina, (33)



Fórmula empírica: C₁₄H₁₅NO₃

Masa molecular/g·mol⁻¹: 245.28

Aspecto físico: aceite amarillo

R_f: 0.53 (Hexano:AcOEt-6:4)

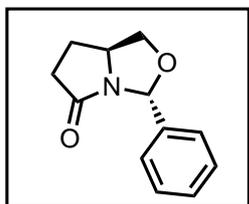
Rendimiento: 82%

$^1\text{H RMN}$ (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.38 – 7.22 (m, 5H), 6.09 (s, 1H, H-4), 3.68 (s, 2H), 3.36 (s, 2H), 3.20 (s, 2H), 2.18 (s, 3H).

$^{13}\text{C RMN}$ (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 196.3 (CO), 167.1 (CO), 167.0 (C), 136.4 (C), 129.1 (2 CH), 128.6 (2 CH), 127.8 (CH), 115.1 (CH), 60.9 (CH₂), 60.3 (CH₂), 52.9 (CH₂), 21.3 (CH₃).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²⁵⁵

(3*R*,7*aS*)-3-Feniltetrahidropirrol-1,2-c[oxazol-5(3*H*)-ona, (34)



Fórmula empírica: C₁₂H₁₃NO₂

Masa molecular/g·mol⁻¹: 203.24

Aspecto físico: aceite ligeramente amarillo

R_f: 0.32 (Hexano:AcOEt-6:4)

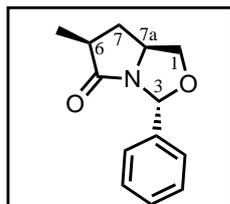
Rendimiento: 90%

$^1\text{H RMN}$ (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.95 – 7.19 (m, 5H), 6.32 (s, 1H), 4.26 – 4.02 (m, 2H), 3.58 – 3.40 (m, 1H), 2.88 – 2.70 (m, 1H), 2.61 – 2.42 (m, 1H), 2.42 – 2.25 (m, 1H), 2.00 – 1.82 (m, 1H).

$^{13}\text{C RMN}$ (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 178.0 (CO), 138.8 (C), 128.4 (CH), 128.3 (2 CH), 125.9 (2 CH), 87.0 (CH), 71.5 (CH₂), 58.7 (CH), 33.3 (CH₂), 22.9 (CH₂).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²⁵⁰

(3*R*,6*S*,7*aR*)-3-Fenil-6-metiltetrahidropirrol-[1,2-*c*]oxazol-5(3*H*)-ona, (35b)**



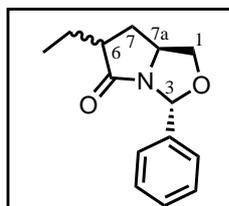
Fórmula empírica: C₁₃H₁₅NO₂
Masa molecular/g·mol⁻¹: 217.27
Aspecto físico: aceite marrón
Rendimiento: 55%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.49 – 7.23 (m, 5H, Ph), 6.32 (s, 1H, H-3), 4.21 (dd, *J* = 8.1, 6.4 Hz, 1H, *HH*-1), 4.06 (q, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-7a), 3.51 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, *HH*-1), 2.99 – 2.86 (m, 1H, H-6), 2.59 (ddd, ²*J* = 12.6, ³*J* = 8.6, 6.8 Hz, 1H, *HH*-7), 1.52 (ddd, ²*J* = 12.6, ³*J* = 11.3, 7.5 Hz, 1H, *HH*-7), 1.22 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 179.2 (CO), 138.7 (C), 128.6 (CH), 128.4 (2 CH), 126.0 (2 CH), 86.8 (CH), 72.5 (CH₂), 56.6 (CH), 40.1 (CH), 34.8 (CH₂), 15.6 (CH₃).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²⁵⁰

6-Etil-3-feniltetrahidropirrol-[1,2-*c*]oxazol-5(3*H*)-ona, (35c)



Fórmula empírica: C₁₄H₁₇NO₂
Masa molecular/g·mol⁻¹: 231.30
Aspecto físico: aceite amarillo
R_f: 0.58 (cis) y 0.33 (trans) (Hexano:AcOEt-6:4)
Rendimiento: 69%

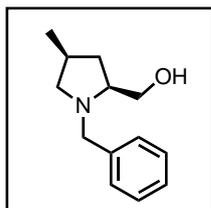
¹H RMN (400.54 MHz, Cloroformo-*d*):

- (3*R*,6*S*,7*a**S*)-**35c**, [*cis*-(**35c**)] **¹H RMN**: δ 7.49 – 7.41 (m, 2H, Ph), 7.41 – 7.27 (m, 3H, Ph), 6.33 (s, 1H, H-3), 4.24 (dd, ²*J* = 8.2, ³*J* = 6.3 Hz, 1H, *HH*-1), 4.08 (p, *J* = 7.0 Hz, 1H, H-7a), 3.51 (dd, ²*J* = 8.2, ³*J* = 7.3 Hz, 1H, *HH*-1), 2.81 (dtd, *J* = 10.9, 8.9, 4.7 Hz, 1H, H-6), 2.57 (ddd, *J* = 12.7, 8.8, 7.0 Hz, 1H, *HH*-7), 1.96 (dq, *J* = 13.9, 7.6, 4.7 Hz, 1H, *CHH*-CH₃), 1.56 (ddd, *J* = 12.7, 10.9, 7.2 Hz, 1H, *HH*-7), 1.43 (ddq, *J* = 14.4, 9.0, 7.3 Hz, 1H, *CHH*-CH₃), 0.99 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H, CH₂-CH₃).
- (3*R*,6*R*,7*a**S*)-**35c**, [*trans*-(**35c**)] **¹H RMN**: δ 7.48 – 7.41 (m, 2H, Ph), 7.45 – 7.27 (m, 3H, Ph), 6.33 (s, 1H, H-3), 4.22 (dd, ²*J* = 8.0, ³*J* = 6.2 Hz, 1H, *HH*-1), 4.12 – 4.01 (m, 1H, H-7a), 3.41 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, *HH*-1), 2.63 (ddt, *J* = 9.2, 8.3, 5.3 Hz, 1H, H-6), 2.18 – 2.00 (m, 2H, CH₂-7), 1.95 – 1.79 (m, 1H, *CHH*-CH₃), 1.73 – 1.58 (m, 1H, *CHH*-CH₃), 1.03 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H, CH₂-CH₃).

^{13}C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ

- (3*R*,6*S*,7*aS*)-**35c**, [*cis*-(**35c**)] ^{13}C RMN: δ 178.6 (CO), 138.8 (C), 128.6 (CH), 128.5 (2CH), 126.1 (2CH), 86.8 (CH), 72.5 (CH₂), 56.7 (CH), 46.7 (CH), 31.9 (CH₂), 23.8 (CH₂), 11.7 (CH₃).
- (3*R*,6*R*,7*aS*)-**35c**, [*trans*-(**35c**)] ^{13}C RMN: δ 181.0 (CO), 139.1 (C), 128.5 (CH), 128.4 (2CH), 125.9 (2CH), 87.3 (CH), 71.3 (CH₂), 57.4 (CH), 46.2 (CH), 27.7 (CH₂), 25.5 (CH₂), 11.5 (CH₃).

[(2*S*,4*S*)-1-Bencil-4-metilpirrolidin-2-il]metanol, (36b)



Fórmula empírica: C₁₃H₁₉NO

Masa molecular/g·mol⁻¹: 205.30

Aspecto físico: aceite amarillo

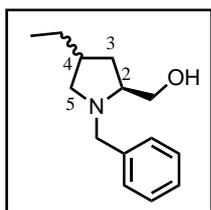
Rendimiento: 88%

^1H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*): δ 7.50 – 7.17 (m, 5H, Ph), 3.98 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{-Ph}$), 3.76 – 3.64 (m, 1H), 3.47 (dd, *J* = 10.8, 2.3 Hz, 1H), 3.35 (d, *J* = 13.2 Hz, 1H), 2.88 – 2.70 (m, 1H), 2.67 – 2.47 (m, 2H), 2.28 – 2.03 (m, 2H), 1.54 – 1.42 (m, 2H), 1.03 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H).

^{13}C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*): δ 139.5 (C), 128.6 (2 CH), 128.4 (2 CH), 127.0 (CH), 65.7 (CH), 61.3 (CH₂), 60.8 (CH₂), 58.5 (CH₂), 36.4 (CH₂), 30.3 (CH), 20.7 (CH₃).

Los datos físicos y espectrales concuerdan con los datos disponibles en la bibliografía.²⁵⁰

(1-Bencil-4-etilpirrolidin-2-il)metanol, (36c)



Fórmula empírica: C₁₄H₂₁NO

Masa molecular/g·mol⁻¹: 219.33

Aspecto físico: aceite amarillo

R_f: 0.39 (Hexano:AcOEt-6:4)

Rendimiento: 89%

¹H RMN (300.13 MHz, Cloroformo-*d*):

- ***trans*-(36c)** ¹H RMN: δ 7.41 – 7.19 (m, 5H), 3.99 (d, |²J| = 12.9 Hz, 1H, CHH-Ph), 3.66 (dd, J = 10.8, 3.4 Hz, 1H, CHH-OH), 3.53 – 3.34 (m, 2H, CHH-Ph, CHH-OH), 3.10 (s, 1H, HH-5), 2.90 – 2.79 (m, 1H, H-2), 2.10 – 1.93 (m, 3H, H-4, HH-3, HH-5), 1.62 – 1.53 (m, 1H, HH-3), 1.41 – 1.25 (m, 3H, CH₂-CH₃, O-H), 0.87 (t, J = 7.4 Hz, 3H, CH₂-CH₃).

¹³C RMN (75.5 MHz, Cloroformo-*d*):

- ***trans*-(36c)** ¹³C RMN: δ 138.9 (C), 128.6 (2 CH), 128.0 (2 CH), 126.8 (CH), 64.0 (CH), 62.5 (CH₂), 60.5 (CH₂), 58.7 (CH₂), 38.8 (CH), 34.5 (CH₂), 27.0 (CH₂), 12.5 (CH₃).
 - ***cis*-(36c)** ¹³C RMN: δ 139.2 (C), 128.3 (2 CH), 128.0 (2 CH), 126.6 (CH), 65.2 (CH), 61.1 (CH₂), 59.0 (CH₂), 58.3 (CH₂), 37.4 (CH), 34.2 (CH₂), 28.1 (CH₂), 12.4 (CH₃).
-

CONCLUSIONES GENERALES

Conclusiones generales

Como conclusiones generales de esta Tesis Doctoral, se puede afirmar que se han desarrollado diversas metodologías para la preparación selectiva de compuestos ópticamente activos, de gran interés. Para ello se han empleado tres tipos de enzimas, de los grupos de las oxidoreductasas (alcohol deshidrogenasas y ene-reductasas) y de las transferasas (transaminasas).

En los dos primeros Capítulos se han desarrollado procesos enzimáticos empleando una única enzima como catalizadores del primer paso de reacción con el que se inicia una *cascada espontánea de cierre de anillo*, mientras que en el último Capítulo se han desarrollado procesos bi-enzimáticos capaces de realizar las transformaciones en el mismo recipiente, minimizando la consecuente formación de residuos y evitar la pérdida de los rendimientos químicos en los procesos de tratamiento de los intermedios de reacción.

Todas las reacciones desarrolladas transcurren con una elevada selectividad y en condiciones suaves de reacción, utilizando generalmente medios acuosos a temperaturas cercanas a la ambiental.

En el primer capítulo, se ha llevado a cabo la preparación estereoselectiva piperazinonas y 1,4-diazepanonas obteniéndose en forma enantiopura y con buenos rendimientos aislados. Para ello se han empleado como catalizadores las transaminasas y como materiales de partida, compuestos sencillos y económicos.

Esta metodología se ha aplicado a diversos ésteres derivados de glicina y alanina, que han permitido acceder a productos heterocíclicos nitrogenados de una gran diversidad estructural. Al poder disponer de transaminasas con opuesta estereopreferencia, se han podido sintetizar ambos enantiómeros en la mayoría de los productos.

En el segundo capítulo, se prepararon en forma enantiopura ftalidas 3-sustituidas en una sola etapa de reacción bajo condiciones suaves. Se utilizaron alcohol deshidrogenasas como biocatalizadores.

La metodología se ha aplicado a un variado grupo de *cetoésteres*, abarcando una amplia diversidad estructural tanto en la posición C3 de la ftalida, como en el anillo aromático. En todos los casos, se pudieron preparar ambos enantiómeros mediante la identificación de alcohol deshidrogenasas complementarias.

Finalmente, en el tercer capítulo, se ha diseñado un sistema bi-enzimático en un solo recipiente (*one-pot, two-steps*) para la síntesis de piperidinas 3-sustituidas y 3,5-disustituidas ópticamente activas. Se diseñaron estrategias catalíticas tanto en modo secuencial como concurrente, y para ello, se utilizaron ene-reductasas y de alcohol deshidrogenasas como biocatalizadores. En este contexto se comprobó la compatibilidad entre sí de las parejas de enzimas formadas para diseñar las mejores aproximaciones posibles.

Conclusiones generales

En todos los Capítulos, varios de los procesos enzimáticos optimizados, se ha realizado en una escala semipreparativa y se ha comprobado con éxito la reproducibilidad de los métodos diseñados obteniéndose los compuestos deseados en forma enantiopura y con buenos rendimientos aislados.