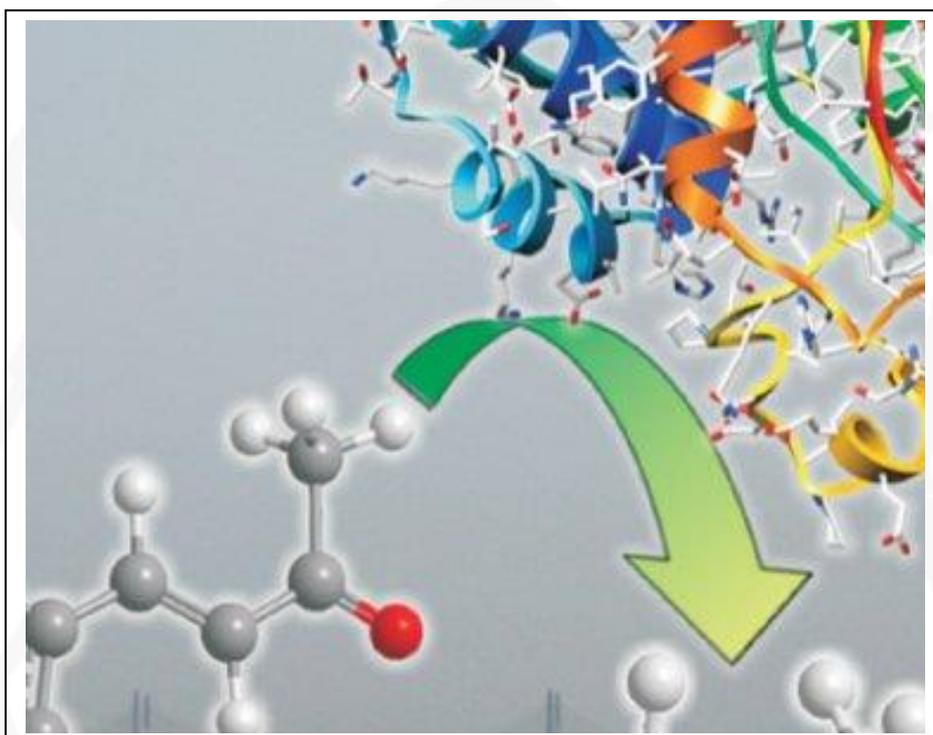


TRABAJO FIN DE GRADO

BIOTECNOLOGÍA

**SÍNTESIS QUIMIO-ENZIMÁTICA DE ÉSTERES Y AMIDAS α,β -
INSATURADOS COMBINANDO LA CONDENSACIÓN DE KNOEVENAGEL Y
PROCESOS CATALIZADOS POR LIPASAS**



Ignacio Roces Gonzalo

**Departamento de Química Orgánica
e Inorgánica- Grupo de Química
Bioorgánica/ Universidad de Oviedo**

Junio 2024



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO
FACULTAD DE BIOLOGÍA**



Abreviaturas

δ	Desplazamiento químico
2-Me-THF	2-Metil-tetrahidrofurano
AcOEt	Acetato de etilo
<i>Asp</i>	Ácido aspártico
c	Cuadruplete, cuartete
CAL A	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> de tipo A (<i>Candida antarctica lipase A</i>)
CAL B	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> de tipo B (<i>Candida antarctica lipase B</i>)
CCL	Lipasa de <i>Candida cylindracea</i> (<i>Candida cylindracea lipase</i>)
DEPT	Mejora sin distorsión mediante transferencia de polarización (<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>)
d	Doblete
dd	Doble doblete
EC	Comisión enzimática (<i>Enzymatic Commission</i>)
equiv	Equivalentes
Et	Etilo
EtOH	Etanol
<i>Glu</i>	Ácido glutámico
<i>His</i>	Histidina
Hz	Hertzios
IR	Infrarrojo
IT	Intermedio tetraédrico
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
(m)M	(mili)Molar
m	Multiplete
Nu	Nucleófilo
ppm	Partes por millón
PSL-IM	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> (<i>Pseudomonas cepacia lipase</i>) inmovilizada
RML	Lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> (<i>Rhizomucor miehei lipase</i>)
RMN	Resonancia magnética nuclear de protón (^1H) o de carbono (^{13}C)
s	Singulete
<i>Ser</i>	Serina
TLL	Lipasa de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (<i>Thermomyces lanuginosus lipase</i>)
t	Triplete o tiempo
TLC	Cromatografía de capa fina (<i>Thin layer chromatography</i>)
UV	Ultravioleta

RESUMEN

Ciertos compuestos orgánicos, como las amidas y los ésteres, han demostrado a lo largo del tiempo su importancia tanto a nivel académico como industrial. Así, se encuentran formando parte habitualmente en compuestos de interés químico, industrial o biotecnológico, como, por ejemplo, fármacos o cosméticos. Por su parte, la química verde, basada en el diseño y optimización de procesos químicos para reducir el uso y la generación de residuos, ha cobrado cada vez más importancia. En ese contexto, el uso de enzimas como biocatalizadores permite acelerar reacciones químicas de una manera eficiente, económica y sostenible.

En este Trabajo Fin de Grado, se aborda la síntesis quimioenzimática de ésteres y amidas derivados del ácido cinámico, con potencial aplicación como bloqueadores de rayos ultravioleta, y por tanto, susceptibles de ser usados en cremas solares. Para ello se ha implementado una aproximación quimioenzimática y directa de dos pasos. Así, partiendo de aldehídos aromáticos y cianoacetatos alquílicos, se realiza en primer lugar la condensación de Knoevenagel empleando una amina como catalizador básico conduciendo a una serie de ésteres derivados del ácido 2-cianocinámico, que han sido empleados como sustratos en el segundo paso en procesos de transesterificación o aminólisis catalizados por lipasas. Finalmente, se plantea la posibilidad de realizar la síntesis de dichas amidas, a través de una aproximación en cascada en un único recipiente de reacción, basándose en la capacidad de las aminas para actuar como catalizadores y nucleófilos de manera simultánea.

Palabras clave: amidas, biocatálisis, condensación de Knoevenagel, ésteres, química verde.

ABSTRACT

Some organic compounds, such as amides and esters, have shown over time their importance both at an academic and industrial level. Thus, they are usually found as part of compounds of chemical, industrial or biotechnological interest, such as, for example, drugs or cosmetics. Lately, green chemistry, based on the design and optimization of chemical processes to reduce the use and generation of waste, has become increasingly important. In this context, the use of enzymes as biocatalysts allows to accelerate chemical reactions in an efficient, economical and sustainable way.

In this Final Degree Project, the chemoenzymatic synthesis of esters and amides derived from cinnamic acid is addressed, with potential application as ultraviolet ray blockers, and therefore, susceptible to being used in sun creams. To achieve this, a two-step chemoenzymatic and direct approach has been implemented. Thus, starting from aromatic aldehydes and alkyl cyanoacetates, the Knoevenagel condensation is first carried out using an amine as a basic catalyst leading to a series of esters derived from 2-cyanocinnamic acid, which have been used as substrates in the second step in transesterification or aminolysis processes catalyzed by lipases. Finally, the possibility of carrying out the synthesis of said amides is proposed, through a cascade approach in a single reaction vessel, regarding the capacity of the amines to act as catalysts and nucleophiles simultaneously.

Keywords: amides, biocatalysis, esters, green chemistry, Knoevenagel condensation.

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo, Ignacio Rocés Gonzalo, con DNI , declaro que todos los contenidos recogidos en este Trabajo Fin de Grado son originales y que todas las fuentes de información empleadas han sido correctamente citadas.

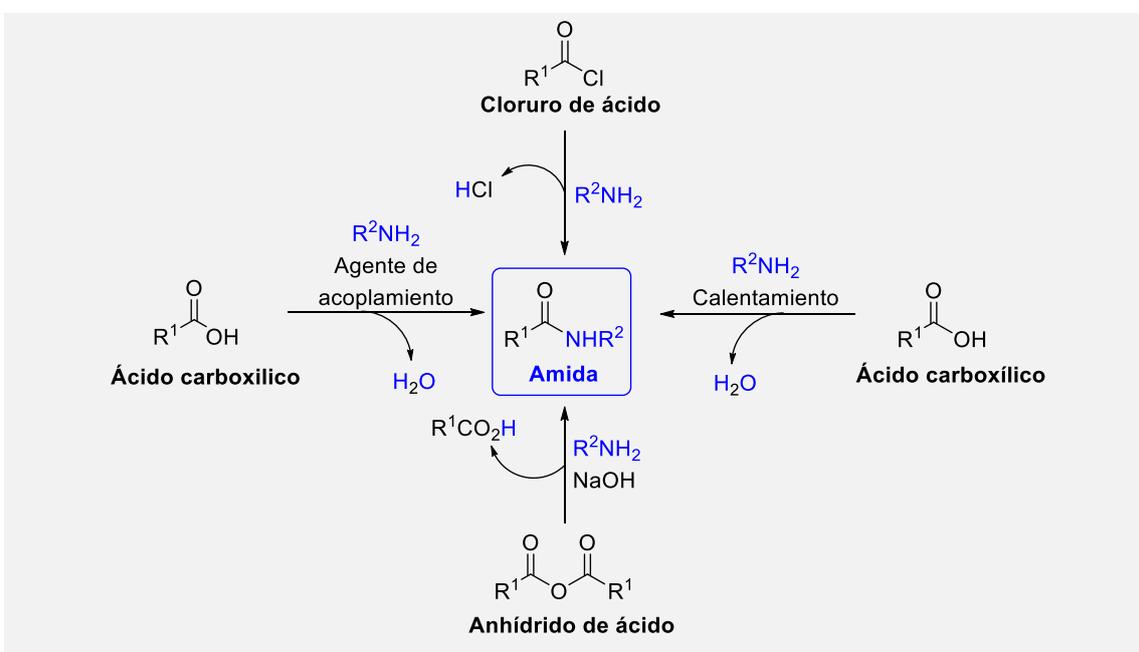
Índice

1. Introducción:.....	1
1.1. Amidas: Estructura e importancia	1
1.2. Compuestos orgánicos como protectores de la radiación UV.....	2
1.3. La Biocatálisis y la Química Verde.....	3
1.4. Las lipasas y la promiscuidad catalítica.....	6
1.5. Condensación de Knoevenagel	8
1.6. Procesos catalizados con lipasas y la condensación de Knoevenagel	9
2. Objetivos.....	12
3. Material y métodos:.....	13
3.1. Reactivos y disolventes	13
3.2. Seguimiento de reacciones y purificación de productos.....	13
3.3. Caracterización de productos de reacción:	14
3.4. Métodos generales de síntesis química y/o enzimática	15
3.4.1 Condensación de Knoevenagel.....	15
3.4.2 Transesterificación/aminólisis	17
3.4.3 Cascada de condensación de Knoevenagel-aminólisis catalizada por la CAL-B ..	19
4. Resultados y discusión	20
4.1 Condensación de Knoevenagel	20
4.2 Transesterificación	22
4.3 Aminólisis.....	23
4.4 Reacción en cascada (<i>one-pot</i>).....	25
5. Conclusión y perspectivas futuras.....	27
6. Referencias	28
7. Anexos:.....	
7.1 Espectros de ¹ H-RMN y ¹³ C-RMN de compuestos sintetizados.....	

1. Introducción:

1.1. Amidas: Estructura e importancia

Las **amidas** son un tipo de moléculas orgánicas que derivan de ácidos carboxílicos, en las que el grupo hidroxilo de estos es reemplazado por un grupo amino (Esquema 1). Son compuestos **químicamente neutros, muy polares y que tienen capacidad de establecer interacciones por enlaces de hidrógeno** lo que explica su estabilidad y reactividad frente a otros tipos de moléculas orgánicas, además de hacer que posean altos puntos de ebullición.



Esquema 1. Estructura química y síntesis de amidas.

Existen diversas aproximaciones para preparar amidas, las más relevantes se muestran en el Esquema 1. Así, se pueden obtener haciendo reaccionar tanto la correspondiente **amina primaria** (R^2NH_2), como una **amina secundaria** (R^2R^3NH) o incluso la amina más simple como es el **amoniaco** (NH_3), con un cloruro de ácido o un anhídrido de ácido que son especies muy reactivas. Además, se pueden sintetizar amidas mediante la reacción de un ácido carboxílico con una amina (en condiciones drásticas de temperatura debido a la alta energía de activación necesaria para este proceso), o bien en condiciones más suaves, pero empleando un agente de acoplamiento como la (*N,N*)-diciclohexilcarbodiimida.



Debido a su estabilización por resonancia, las amidas son **menos reactivas en condiciones fisiológicas que sus correspondientes ésteres**, aunque pueden conducir a muy diversas moléculas orgánicas, generalmente mediante el ataque de restos nucleófilos como tioles, hidroxilos y aminas al grupo carbonilo de la amida. Además, la reacción de amidas primarias con cloruro de tionilo genera intermedios muy reactivos que conducen a la formación de nitrilos, mientras que su reducción con hidruro de litio y aluminio permite obtener las correspondientes aminas. Por otra parte, su importancia en química orgánica radica en su **gran estabilidad y polaridad, así como su alta diversidad**.¹

La estructura del grupo amida se encuentra presente en numerosos compuestos biológicamente activos, teniendo una gran importancia en la **síntesis y reactividad** de moléculas de interés químico, biológico, industrial, médico o biotecnológico. Por ejemplo, los enlaces peptídicos son esenciales en proteínas, péptidos y muchas biomoléculas. En la naturaleza, una parte importante de los enlaces amida se forman en los ribosomas, donde las proteínas complejas se forman aminoácido a aminoácido mediante el enlace peptídico, un enlace covalente de tipo amida. Las proteínas, a su vez, juegan un papel crucial en prácticamente todos los procesos biológicos como catálisis enzimática, transporte/almacenamiento (hemoglobina), protección inmune (anticuerpos) y soporte mecánico (colágeno).²

1.2. Compuestos orgánicos como protectores de la radiación UV

Un análisis conjunto de tres compañías farmacéuticas punteras, reveló que **la formación de enlaces amida se aplica en más del 66% de todos los medicamentos testados**,³ hecho que puede deberse a sus características que incluyen neutralidad, estabilidad y capacidad de establecer enlaces por enlaces de hidrógeno,² todas ellas clave en el desarrollo de medicamentos. En este contexto, los bloqueadores de radiación ultravioleta (UV) son muy interesantes tanto en el campo de la cosmética como en el de la salud, debido a su papel en la eficacia de las cremas solares. Así, desde 1980, han demostrado su utilidad contra las quemaduras, y otros efectos nocivos de la luz solar incluyendo diversos tipos de cáncer de piel.⁴

Estos compuestos, que son capaces de interactuar con la radiación incidente, se pueden dividir según su naturaleza inorgánica u orgánica. Dentro del primer grupo destacan los óxidos metálicos, que reflejan la radiación, mientras que los orgánicos, como el ácido cinámico y sus derivados, algunos de tipo amida (Figura 1), transforman esa radiación UV en infrarroja (IR), disminuyendo su peligrosidad para la salud.⁵

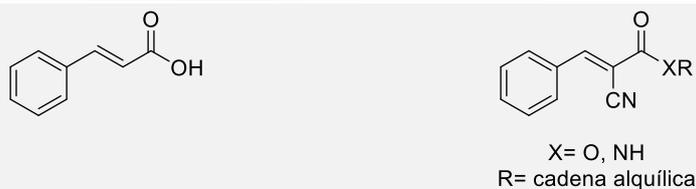


Figura 1. Estructura del ácido cinámico y derivados tipo éster o amida del ácido 2-cianocinámico.

Por todo ello, en este Trabajo Fin de Grado se explorará la posibilidad de llevar a cabo la **síntesis quimioenzimática** de derivados del ácido 2-cianocinámico de tipo **éster o amida**, y en relación con ello a continuación se presenta el uso de enzimas como catalizadores de métodos de síntesis sostenibles en el ámbito de la **Química Verde**.

1.3. La Biocatálisis y la Química Verde.

La **Química Verde** se define como el diseño de productos y procesos químicos que reducen o eliminan el uso y la generación de sustancias peligrosas.⁶

Una declaración de intenciones de la Química Verde es la formulación de sus 12 principios básicos que se desglosan en la **Tabla 1**. Así, se han desarrollado y asentado en las últimas décadas dentro del sector químico tanto a nivel académico como industrial, convirtiéndose en un requisito indispensable para alcanzar la sostenibilidad económica, social y ambiental.⁷ Con el fin de dar una mayor difusión y concienciación, se han recogido bajo el acrónimo inglés **PRODUCTIVELY (PRODUCTIVAMENTE)**.⁸

A continuación, se detallan algunas de las claves para conseguir una alta sostenibilidad química:

- **Reducción de residuos**, que se traduce en beneficios económicos pues todo material que no se transforma en producto o se recicla, incrementa los costes ya que computa, en primer lugar, como materia prima, y posteriormente como residuo que debe eliminarse.⁹
- **Evitar el uso de materiales no reutilizables**, como los disolventes orgánicos convencionales, lo que permite trabajar en condiciones más seguras, ya que muchos de ellos son volátiles, inflamables o están asociados con efectos nocivos para la salud.¹⁰

**Tabla 1.** Los 12 principios de la Química Verde.

P	Prevent waste	Prevenir la generación de residuos
R	Renewable materials	Empleo de materias y energías renovables
O	Omit derivatisation steps	Evitar pasos de protección-desprotección
D	Degradable chemical products	Síntesis de productos biodegradables
U	Use safe synthetic methods	Métodos sintéticos seguros
C	Catalytic reagents	Uso de sustancias en cantidades catalíticas
T	Temperature, pressure ambient	Eficiencia energética
I	In-process monitoring	Monitorización de los procesos en tiempo real
V	Very few auxiliary substances	Disolventes y sustancias auxiliares inocuos
E	E-factor, maximise feed in product	Maximizar la economía atómica en producto
L	Low toxicity of chemical products	Preparación de productos con baja toxicidad
Y	Yes, it is safe	Diseño de procesos inherentemente seguros

La generación excesiva de desechos puede atribuirse parcialmente a la **dependencia de reactivos estequiométricos tradicionales**, tendiendo hoy en día a la búsqueda de **catalizadores eficientes** y versátiles.¹¹ Por ejemplo, las reacciones de reducción de enlaces múltiples (dobles o triples) empleando metales o hidruros metálicos, así como las oxidaciones con óxidos como permanganatos o dicromatos generan cantidades estequiométricas de desechos, que además son altamente tóxicos.

De entre todos los métodos catalíticos que se han desarrollado en los últimos tiempos, merece especial mención la **Biocatálisis**, que puede definirse resumidamente como el empleo de catalizadores biológicos, ya sea aislados o contenidos en el interior de las células, para acelerar transformaciones químicas.¹² La mayoría de los enzimas trabajan a temperatura ambiente en medio acuoso,¹³ garantizando en casi todos los casos condiciones de reacción que cumplen los requisitos de la química verde.

La Biocatálisis se ha convertido recientemente en un área de gran importancia en el campo de la química orgánica, tanto a nivel académico como en la industria química y farmacéutica.¹⁴ Así, desde hace décadas, los enzimas se han utilizado en un **amplio número de procesos y transformaciones químicas**, como por ejemplo, nitrilo hidratasa en la conversión, a escala de toneladas, de acrilonitrilo en acrilamida, reemplazando los métodos químicos tradicionales que



emplean catalizadores de cobre.¹⁵ Por otro lado, la **quiralidad intrínseca** de los enzimas ha permitido la síntesis de numerosas familias de compuestos enantioméricamente puros y con actividad óptica.

A lo largo de las últimas cuatro décadas, el uso de enzimas ha pasado de ser anecdótico a ser una herramienta útil en el desarrollo de múltiples procesos industriales. Así, el uso cada vez mayor de enzimas por parte de la industria farmacéutica se ha visto favorecido por los avances en ingeniería de proteínas, que permiten una rápida optimización de la actividad catalítica, pudiendo definir y cumplir estrictos parámetros de reacción en escalas de tiempo razonables.¹⁶

Los enzimas se clasifican haciendo uso de un sistema de cuatro dígitos (**EC A.B.C.D**) que alude al tipo de reacción (**A**), la clase de sustrato o el grupo funcional transferido (**B**), la naturaleza del cosustrato (**C**) y el número individual de la enzima (**D**). Dependiendo del tipo general de reacción que catalizan, las enzimas se clasifican en seis grandes categorías que vienen dada por ese dígito **A**, y que se detallan en la Tabla 2, existiendo una séptima clase, las **translocasas**, las cuales no tienen actividad catalítica sino simplemente funciones de transporte.

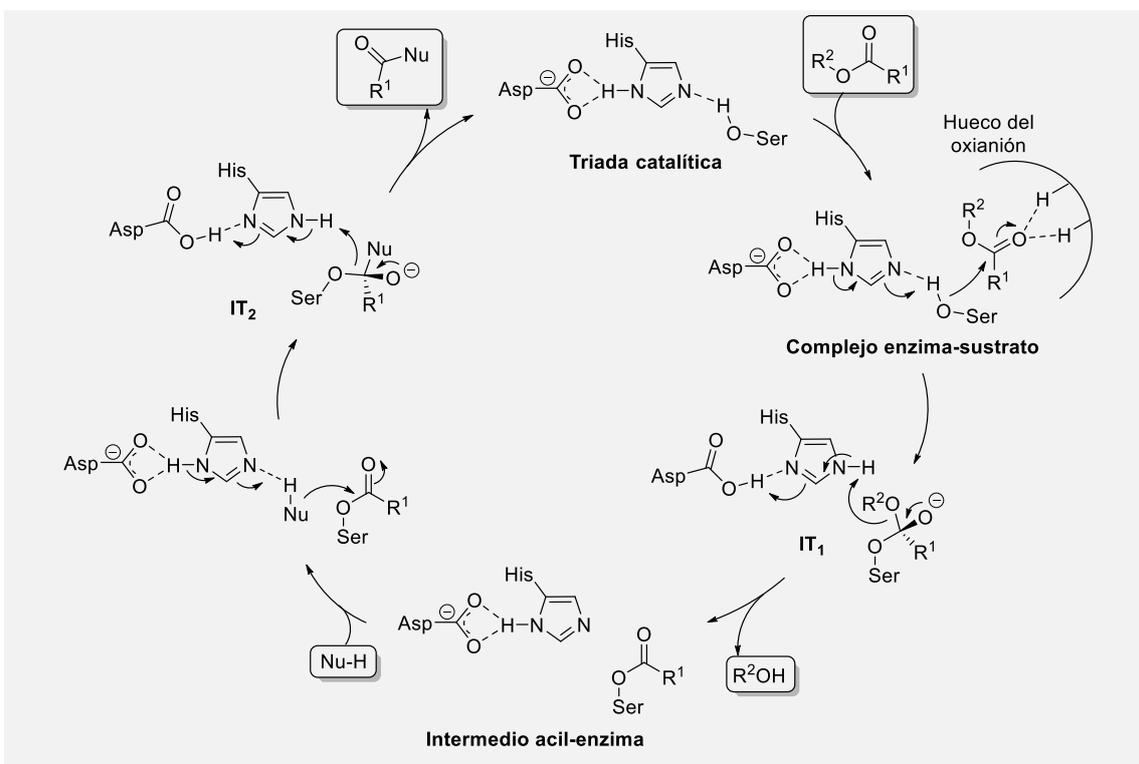
Tabla 2. Clasificación de las enzimas.

<i>Clase de enzima</i>	<i>Tipo de reacción</i>
1. Oxidorreductasas	Oxidación/reducción: oxigenación de enlaces C-H, C-C o C=C, eliminación o adición formal de hidrógeno
2. Transferasas	Transferencia de grupos funcionales: alquilo, amino, cetona, fosforilo...
3. Hidrolasas	Hidrólisis/síntesis de amidas, epóxidos, ésteres, nitrilos, glicósidos...
4. Liasas	Adición/eliminación de pequeños fragmentos en enlaces C=C, C=N o C=O
5. Isomerasas	Isomerizaciones como reagrupamientos, epimerizaciones o racemizaciones
6. Ligasas	Formación/ruptura de enlaces C-O, C-S, C-N o C-C eliminando grupo trifosfato

Por último, cabe mencionar que los enzimas pueden emplearse en **síntesis orgánica** para catalizar un solo paso de reacción, o bien en varias transformaciones formando una secuencia sintética mediante su combinación con otros enzimas (**procesos multienzimáticos**), y con reactivos no biológicos como metales u organocatalizadores (procesos quimioenzimáticos).^{17,18} A este tipo de transformaciones se les conoce como **procesos tándem** y son de gran interés, debido a que pueden generar moléculas complejas a través de varios pasos de reacción, idealmente en un único recipiente.¹⁹

1.4. Las lipasas y la promiscuidad catalítica

Dentro de los enzimas más comúnmente usados en Biocatálisis, se encuentran las **lipasas** (EC. 3.1.1.3), cuya función natural es la hidrólisis de triacilglicerolos a través de la ruptura hidrolítica del enlace éster.²⁰ Se trata por tanto de enzimas que pertenecen a la clase de las hidrolasas, y que al igual que otras (proteasas, esterasas y tioesterasas) se conocen como **serin-hidrolasas**, ya que su centro activo está compuesto por un residuo de serina (*Ser*), uno de histidina (*His*) y otro de ácido aspártico o glutámico (*Asp* o *Glu*) que actúan de manera orquestada en lo que se llama la **triada catalítica** (Esquema 2).²¹



Esquema 2. Mecanismo de actuación de las lipasas.

La catálisis en el centro activo de las lipasas transcurre siguiendo el mecanismo de las serín-hidrolasas: la serina interacciona covalentemente con los sustratos; la histidina y el ácido aspártico (o glutámico) actúan sinérgicamente aumentando la nucleofilia de la serina. En el Esquema 2 se muestra el mecanismo de reacción de una hidrolasa serínica sobre un éster genérico ($R^1CO_2R^2$), donde el complejo acil-enzima formado a través de un primer intermedio tetraédrico (IT_1) sufre el ataque de un nucleófilo (agua, alcohol, amina, hidracina, tiol o agua oxigenada) para generar un segundo intermedio tetraédrico (IT_2) y liberar el producto final (un ácido carboxílico por ejemplo, si el nucleófilo empleado es el agua). Durante todo el proceso, una serie de residuos del centro activo que conforman el denominado hueco del oxianión intervienen activando al sustrato



o estabilizando las cargas negativas de los diferentes intermedios por medio de enlaces de hidrógeno.

En la actualidad, las lipasas representan una de las **clases de enzimas más usadas** por bioquímicos, farmacéuticos, químicos orgánicos, biofísicos, biotecnólogos y microbiólogos, ya que su actuación en ausencia de cofactores, y la posibilidad de acelerar procesos quimio-, regio- y/o estereoselectivos, las hacen ser catalizadores versátiles en la producción o fabricación de fármacos quirales, biocombustibles, grasas modificadas, cosméticos o potenciadores del sabor, entre otros muchos procesos químicos.²⁰

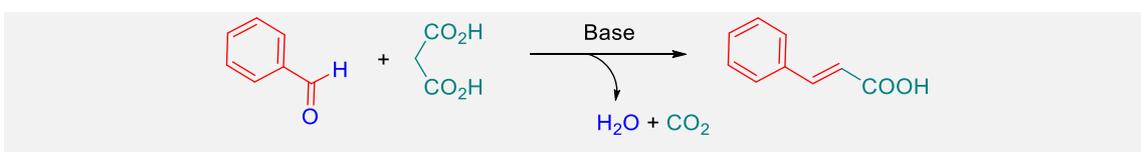
Sin embargo, al igual que otras enzimas, las lipasas tienen **ciertos inconvenientes** en su forma libre, como baja estabilidad operativa, alto coste y la incapacidad para recuperarlas o reutilizarlas fácilmente al final de la reacción, lo que dificulta la separación del producto. Una solución a estas limitaciones es **inmovilizar los enzimas**.²² De esta manera es posible sintetizar diferentes moléculas orgánicas de interés, como alcoholes, aminas, ésteres o amidas entre otros, empleando en estos casos disolventes orgánicos convencionales (hidrófilos o hidrofóbicos) o neotéricos (líquidos iónicos, mezclas eutécticas o condiciones supercríticas) en lugar de medios acuosos.²³ El uso ya hoy en día muy extendido de las lipasas especialmente, ha llevado al descubrimiento de nuevas transformaciones en condiciones variables de reacción y sobre muy diversos sustratos que es lo que se conoce hoy en día como **promiscuidad enzimática**.²⁴ Esta se define como la capacidad de un enzima de mostrar una actividad inesperada, y se puede dividir en tres tipos:

- Promiscuidad **de condición** que es la capacidad del enzima para trabajar en condiciones muy diversas como de temperatura, presión, medio de reacción...
- Promiscuidad **de sustrato** pudiendo reconocer sustratos a priori poco favorables para la especificidad que suele mostrar un determinado enzima.
- Promiscuidad **catalítica** consistente en la capacidad del centro activo de un enzima para catalizar reacciones inesperadas, es decir, distintas a su función natural.²⁵

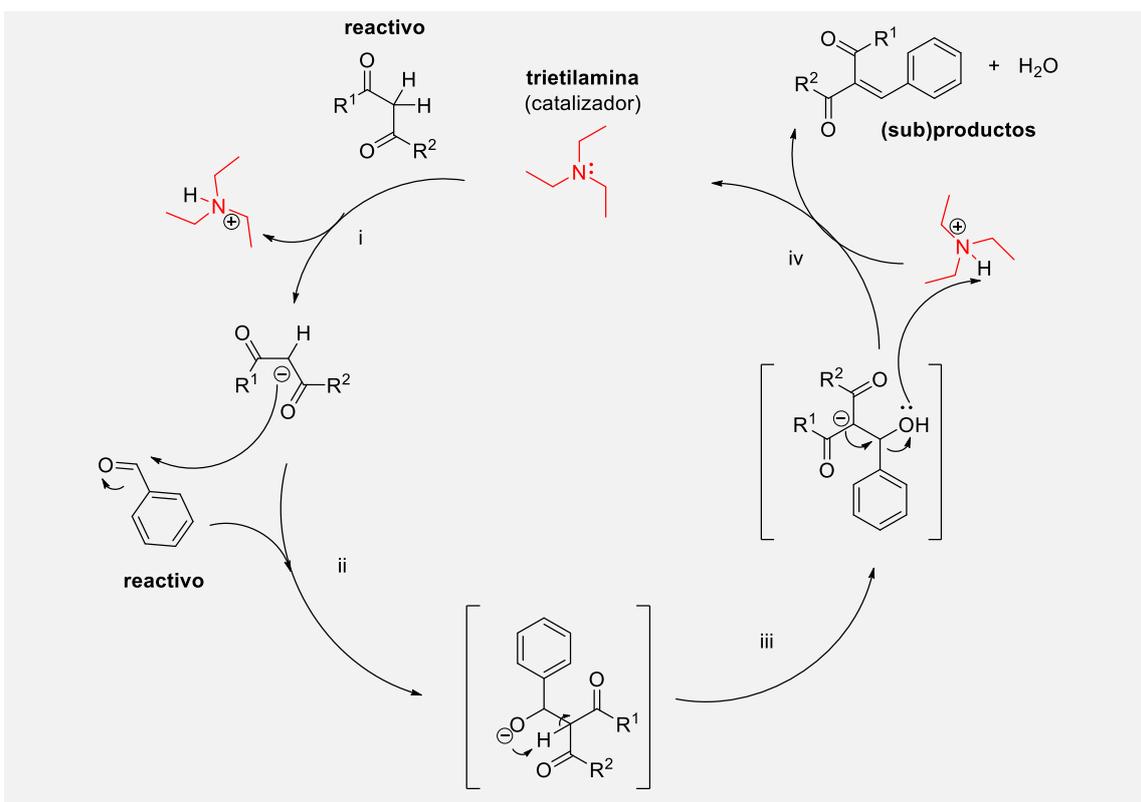
Las lipasas son concretamente las enzimas más promiscuas catalíticamente, habiéndose descrito su papel en la aceleración de reacciones de formación de enlaces carbono-carbono, carbono-heteroátomo, heteroátomo-heteroátomo, así como en procesos oxidativos e hidrolíticos poco esperables.²⁶ En concreto, este Trabajo Fin de Grado abordará una **reacción inicial de formación de enlaces carbono-carbono**, procesos que cuando son catalizados por enzimas lo hacen particularmente las lipasas (EC.4). Sin embargo, **las hidrolasas han demostrado ser capaces de acelerar procesos de formación de enlaces C-C** como condensaciones aldólicas, adiciones de Michael, reacciones de Henry o condensaciones de Knoevenagel, entre otras, estas últimas siendo objetivo de investigación en este trabajo.

1.5. Condensación de Knoevenagel

Esta transformación le debe su nombre a Emil Knoevenagel, descubridor en 1894 de la reacción entre el formaldehído y el malonato de dietilo empleando dietilamina (Et_2NH) como catalizador básico,²⁷ y fue posteriormente extendida al uso de aldehídos aromáticos²⁸ (Esquema 3), otros derivados de ácidos y aminas secundarias básicas como la piperidina. El mecanismo químico propuesto para esta transformación se desglosa en el Esquema 4, ejemplificando el mismo con trietilamina como catalizador.



Esquema 3. Reacción de condensación de Knoevenagel entre el benzaldehído y el ácido malónico catalizada por base.



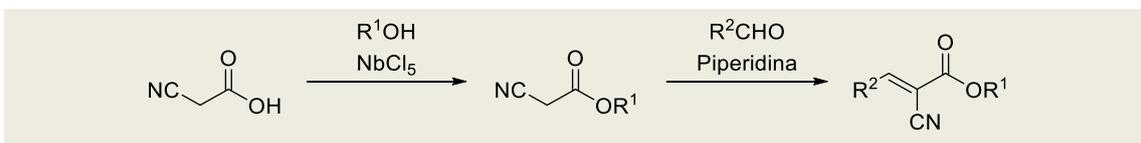
Esquema 4. Mecanismo de la condensación de Knoevenagel utilizando trietilamina como catalizador.

Consiste en la desprotonación del grupo metileno situado ente dos grupos carbonilo (*i*), dando lugar a un carbanión reactivo que realiza un ataque nucleofílico sobre el grupo carbonilo de un



aldehído como el benzaldehído (*ii*), generando un intermedio inestable que conduce a la formación de un grupo hidroxilo por extracción del hidrógeno restante del grupo metileno (*iii*). Finalmente, ocurren la reacción de formación del doble enlace carbono-carbono por mediación de la sal de la trietilamina formada previamente en el ciclo catalítico, generando agua como subproducto (*iv*).

La condensación de Knoevenagel ha sido empleada por **Polonini y colaboradores** en la síntesis de compuestos derivados del octocrileno, que actúan como agentes bloqueadores de los rayos UV y están presentes en cremas de protección solar (Esquema 5).²⁹ Para ello, partieron del ácido cianoacético, que se esterificó con diversos alcoholes empleando óxido de niobio (V), Nb₂O₅ como catalizador y a reflujo de tolueno, seguido de una condensación de Knoevenagel utilizando piperidina como catalizador.



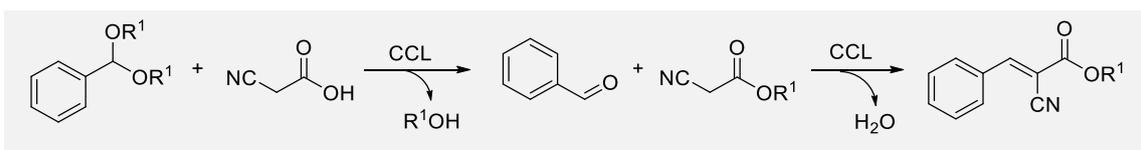
Esquema 5. Condensación de Knoevenagel para la síntesis de derivados del octocrileno.

1.6. Procesos catalizados con lipasas y la condensación de Knoevenagel

La condensación de Knoevenagel ha sido habitualmente catalizada por bases, pudiendo emplearse también como aceleradores tanto ácidos de Lewis como líquidos iónicos.²⁵ No obstante, dichos métodos vienen limitados por la necesidad a menudo de emplear un exceso de productos de partida, y **en ciertos casos**, la generación de subproductos, así como el uso de disolventes peligrosos y condiciones de reacción drásticas, lo que choca directamente con los principios de la Química Verde. Por lo tanto, resulta fundamental el empleo de catalizadores capaces de actuar en condiciones suaves de reacción y que permitan un sencillo aislamiento de los productos deseados.

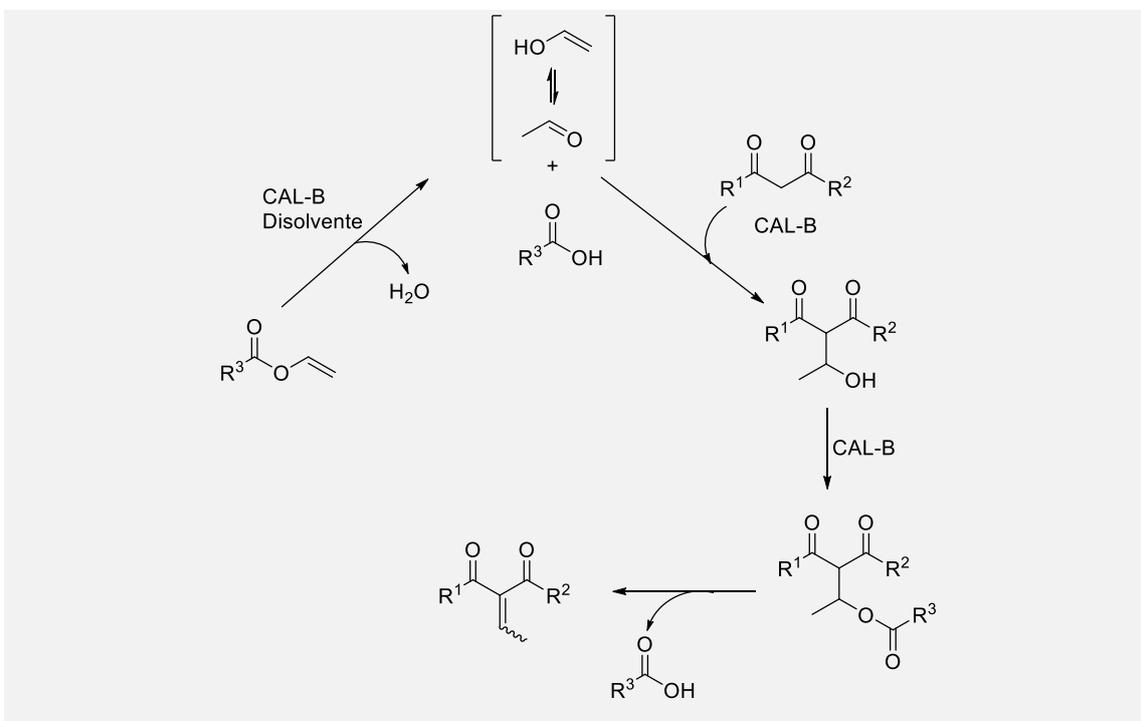
En este sentido, una aproximación interesante es el estudio de la **condensación de Knoevenagel en presencia de lipasas**, con el fin de explorar si estas reacciones pueden ser catalizadas por sistemas proteicos. Por ejemplo, **Li y colaboradores** proponen que estas enzimas **aceleran significativamente la reacción**, en comparación con el uso de proteínas inespecíficas y catalizadores simples,²¹ lo que indica que las enzimas tienen un papel relevante en el mecanismo catalítico. En la bibliografía se pueden encontrar diversos procesos en los que se combina la condensación de Knoevenagel con el uso de lipasas, y como este es el objetivo principal de este Trabajo Fin de Grado, parece necesario discutir en profundidad dichos trabajos a continuación.

Debido a la imposibilidad de separar los isómeros geométricos (*E*) y (*Z*) con la reacción de Knoevenagel sencilla, se ha descrito la síntesis quimioenzimática de ésteres α,β -insaturados mediante una cascada que implica un proceso de esterificación y uno de condensación de Knoevenagel (Esquema 6). Para ello, **Wilk y colaboradores** hicieron reaccionar acetales del benzaldehído con ácido cianoacético llevando a cabo un proceso en tándem de **esterificación-condensación catalizado por lipasas**, donde con la lipasa de *Candida cylindracea* (CCL) permitió alcanzar los mejores resultados para la síntesis selectiva de únicamente los ésteres de isomería de (*E*).³⁰



Esquema 6. Síntesis enzimática que involucra una secuencia de esterificación-condensación de Knoevenagel catalizado por CCL.

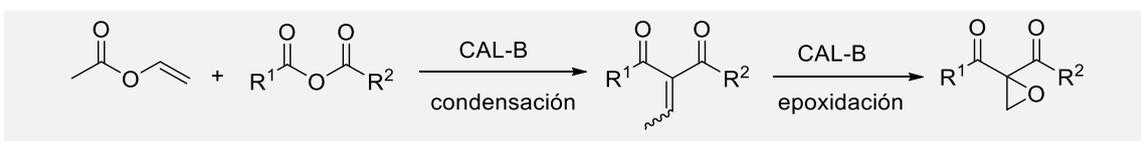
Por su parte, **Koszelewski y colaboradores** han descrito la condensación de Knoevenagel catalizada por lipasas partiendo de aldehídos alifáticos, como el **acetaldehído** (Esquema 7). Las dificultades operacionales de trabajar con el acetaldehído derivadas de su bajo punto de ebullición (20.2 °C) condujeron a emplear ésteres de vinilo ($R^3CO_2CHCH_2$) como precursores del acetaldehído, por ejemplo, acetato de vinilo ($R^3=CH_3$).



Esquema 7. Formación *in situ* de acetaldehído para su posterior la condensación de Knoevenagel con compuestos 1,3-dicarbonílicos en presencia de CAL-B.

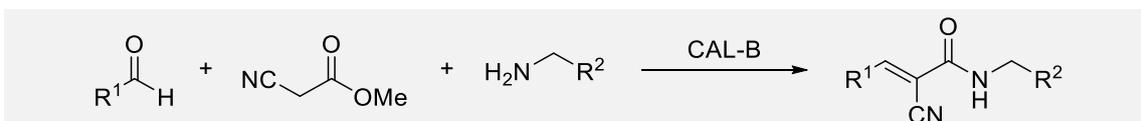
Así, mediante un proceso de hidrólisis del éster catalizado por distintas lipasas, fue posible obtener el acetaldehído, que es más estable que su correspondiente forma enol. Esta aproximación condujo al desarrollo de una **ruta quimioenzimática tándem de hidrólisis-condensación**, ya que el mismo enzima empleado para generar el acetaldehído aceleraba el paso de condensación de Knoevenagel del correspondiente compuesto dicarbonílico ($R^1COCH_2COR^2$) con el acetaldehído generado *in situ*, siendo la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B) la que condujo a los mejores rendimientos en los productos α,β -insaturados deseados.³¹

Se ha descrito también la síntesis de α -ciano epóxidos, mediante **un proceso tándem de condensación de Knoevenagel seguido de un paso de epoxidación mediado por lipasas** (Esquema 8). De nuevo la CAL-B resulto ser la enzima más eficiente para este tipo de procesos, en este caso empleando el complejo comercial de urea-peróxido de hidrógeno para desarrollar la epoxidación de los alquenos intermedios.³²



Esquema 8. Síntesis de α -ciano epóxidos mediante proceso en tándem catalizado por CAL-B.

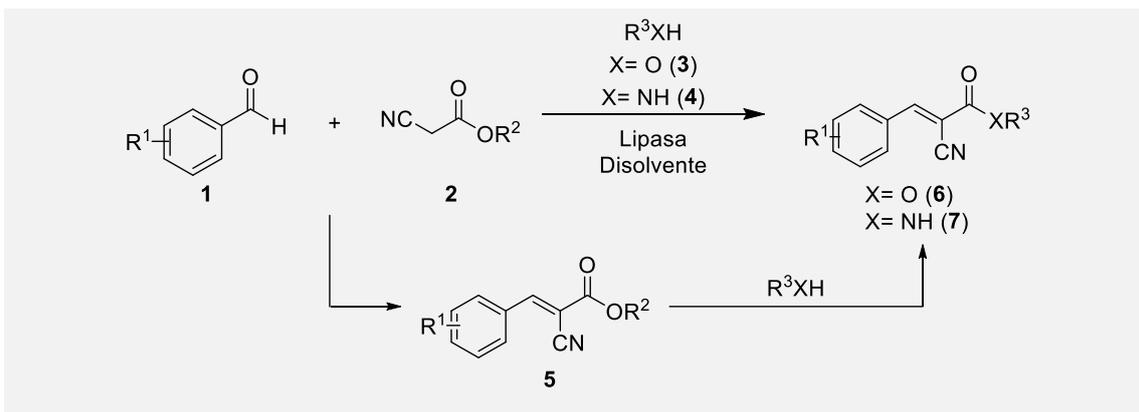
El último ejemplo que se presenta es la **síntesis catalizada por lipasas de amidas α -cianoarílicas** a partir de 2-cianoacetato de metilo, aldehídos y aminas primarias (Esquema 9). Esta **reacción multicomponente** condujo a las correspondientes amidas con rendimientos variables dependiendo de la extensión de la reacción competitiva de hidrólisis frente a la aminólisis, lo que a su vez produce distintas distribuciones de productos de reacción.³³ Los mejores rendimientos se obtuvieron de nuevo empleando la CAL-B como catalizador del proceso.



Esquema 9. Síntesis de amidas α -ciano arílicas catalizado por la CAL-B.

2. Objetivos

Los derivados del ácido cinámico presentan un gran potencial como protectores solares, por ello, el presente Trabajo de Fin de Grado pretende abordar la **síntesis de derivados de este tipo de compuestos empleando una estrategia de dos pasos**, combinando la condensación de Knoevenagel clásica en presencia de un catalizador básico con el empleo de lipasas para acelerar procesos de esterificación o aminólisis dependiendo del nucleófilo empleado (Esquema 10).



Esquema 10. Representación general de los objetivos de este Trabajo Fin de Grado.

Por tanto, los objetivos específicos del trabajo son el estudio de las reacciones de:

- **Condensación de Knoevenagel** entre derivados de benzaldehído (1) y un cianoacetato alquílico (2)
- **Transesterificación** de los ésteres 5 resultantes empleando alcoholes (3) como nucleófilos y lipasas como biocatalizadores
- **Aminólisis** de los ésteres 5 usando aminas (4) como agentes nucleófilicos y lipasas como biocatalizadores.

Los procesos químicos y enzimáticos se estudiarán, analizando la influencia de diversos parámetros que puedan afectar a la catálisis de los procesos, así como al aislamiento y purificación de los ésteres 6 y amidas 7, planteándonos finalmente, si fuera posible, la implementación de la secuencia quimioenzimática en cascada en un único recipiente de reacción.

3. Material y métodos:

3.1. Reactivos y disolventes

Todos los reactivos empleados fueron adquiridos de casas comerciales, y en ningún caso fue necesario su purificación, o cualquier otro tipo de tratamiento previo a su utilización, a excepción del benzaldehído, que se destiló debido a la presencia de ácido benzoico.

Las lipasas inmovilizadas fueron adquiridas a diversas casas comerciales, y en ningún caso fue necesario realizar cultivos celulares para obtenerlas. La lipasa mayoritariamente utilizada durante el trabajo fue la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B) que fue generosamente cedida por la empresa Novozymes (Dinamarca) en su formulación Novozyme435[®] donde la enzima esta soportada a una resina acrílica mediante el método de adsorción. También se emplearon preparativos de lipasas inmovilizadas o liofilizadas de *Candida antarctica* de tipo A (CAL-A), *Pseudomonas cepacia* (PSL-IM), *Thermomyces lanuginosus* (TLL), *Candida rugosa* (CRL) y *Rhizmucor miehei* (RML).

Los disolventes más comúnmente usados fueron acetato de etilo (AcOEt), diclorometano (CH₂Cl₂), etanol (EtOH), y hexano, empleando con menos frecuencia éter dietílico (Et₂O), 2-metil-tetrahidrofurano (2-Me-THF) y metanol (MeOH), mientras que la acetona sirvió para limpiar el material de vidrio. Todos ellos fueron empleados tal cual fueron adquiridos, y sin necesidad de llevar a cabo tratamiento o secado de los mismos.

3.2. Seguimiento de reacciones y purificación de productos

Todas las reacciones fueron analizadas empleando la técnica de Cromatografía de capa fina (TLC), empleando placas de aluminio con gel de sílice tipo 60 F254 en una de sus caras a modo de fase estacionaria y mezclas de AcOEt/Hexano en distintas proporciones como eluyentes. Para su revelado se empleó una lámpara de rayos UV, seguida de reveladores químicos como disoluciones de permanganato potásico (KMnO₄), vainillina o ninhidrina. Para la purificación de los productos, se recurrió a varias técnicas entre las que destacan:

- **Columna cromatográfica** en gel de sílice: Muchos de los productos aislados fueron sometidos a una columna cromatográfica, empleando sílica gel 60, con un tamaño de partícula 240-400 mesh. Como eluyente, se emplearon disoluciones de AcOEt/Hexano, variando la polaridad de sus componentes para eluir los productos deseados. Para evitar la descomposición de ciertos productos, se empleó en varios casos sílica desactivada o alúmina en sustitución de gel de sílice que es de naturaleza ácida.



- **Extracción líquido-líquido:** Algunos de los productos fueron sometidos a una extracción líquido-líquido para intentar purificarlos. Dichas extracciones se llevaron a cabo en embudo de extracción donde se observaron dos fases inmiscibles, una formada por disolventes orgánicos como el AcOEt o el CH_2Cl_2 , y otra por medios acuosos compuestos exclusivamente por agua, o bien disoluciones acuosas de ácido clorhídrico (HCl).
- **Filtrado en placa:**
 - Aislamiento y purificación de productos sólidos. Para ello se llevó a cabo un filtrado de éstos en una placa filtrante conectada a una trompa de vacío previa suspensión de los mismos en EtOH o hexano para eliminar disolventes y otras impurezas en el filtrado.
 - Separación de la lipasa inmovilizada del medio de reacción en las biotransformaciones. Tras filtrar la suspensión en la placa filtrante, se lavó en enzima con CH_2Cl_2 , recuperando los filtrados que fueron llevados al rotavapor para la eliminación de los disolventes y así obtener los correspondientes crudos de reacción.
- **Destilación a presión reducida:** Permitió evaporar los disolventes de las reacciones o procesos de extracción, empleando rotavapores y bombas de alto vacío.

3.3. Caracterización de productos de reacción:

La caracterización de los productos de reacción se realizó mediante experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN) de protón (^1H), carbono (^{13}C) y DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) Estos experimentos se hicieron en un espectrómetro Bruker AV-300 (edificio de los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo), disolviendo las muestras en cloroformo deuterado (CDCl_3) previamente al análisis. Los desplazamientos químicos (δ) se proporcionan en ppm (partes por millón), y se toma como referencia la señal que corresponde al CDCl_3 (7.26 ppm). Se indican las constantes de acoplamiento (J) en hertzios (Hz). Los puntos de fusión se tomaron mediante un aparato Gallenkamp en tubos capilares.



3.4. Métodos generales de síntesis química y/o enzimática

Con el fin de que el lector puede familiarizarse con los compuestos orgánicos empleados y/o sintetizados en este Trabajo Fin de Grado, se desglosa en la Figura 2 la numeración empleada para referirnos a todos ellos.

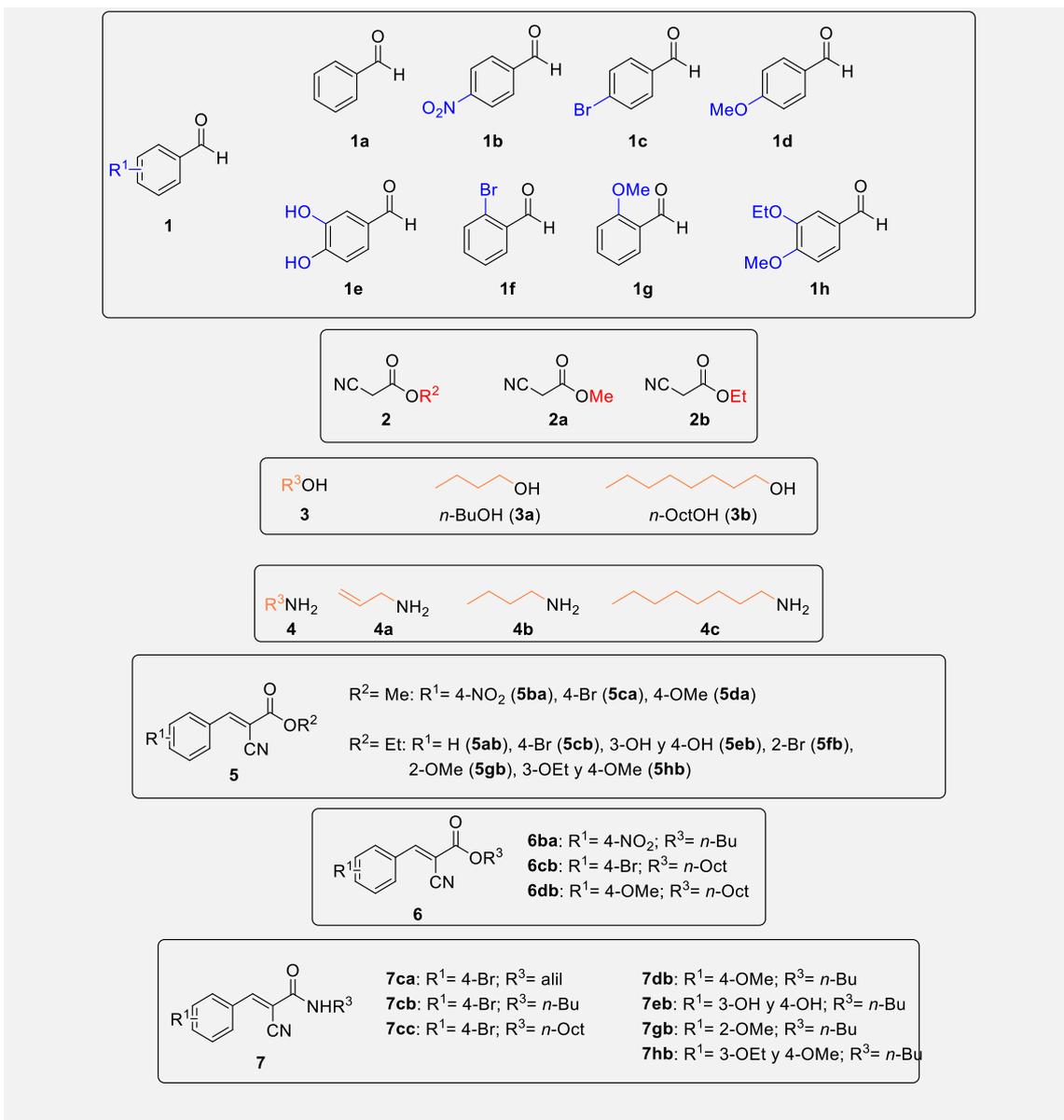


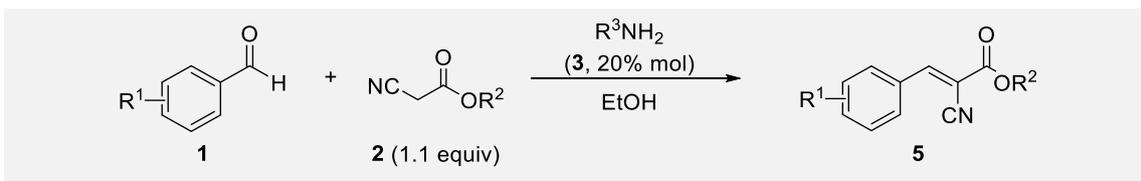
Figura 2. Estructura de los compuestos orgánicos empleados como productos de partida, o bien sintetizados tras la correspondiente transformación química.

3.4.1 Condensación de Knoevenagel

Todas las condensaciones de Knoevenagel que se describen a continuación se desarrollaron de una manera general como sigue, representándose en el Esquema 11. En un matraz de fondo redondo, se preparó una disolución del correspondiente benzaldehído **1** (3 mmol, 400 mM) en



etanol (7.5 mL), al que se adicionó el correspondiente cianoacetato de alquilo (**2**, 1.1 equiv), seguido de una base orgánica (piperidina o trietilamina, 20% mol). La mezcla se agitó magnéticamente durante 5-23.5 h, empleando un baño de aceite para calentar a la temperatura deseada, obteniendo el correspondiente cianoéster **5** que fue purificado mediante un proceso de filtración, lavando el sólido resultante con hexano. El producto obtenido se caracterizó posteriormente por análisis de RMN con el fin de conocer su pureza y ver si era necesario llevar a cabo algún tipo de purificación adicional.



Esquema 11. Síntesis de ésteres **5** a través de condensación de Knoevenagel.

A continuación, se detallan todos los compuestos sintetizados siguiendo este método.

(E)-2-ciano-3-(4-nitrofenil)acrilato de metilo (5ba). $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$. 600 mg (68% rendimiento aislado). Sólido amarillento. Punto de fusión: 177-178 °C. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8.43–8.31 (m, 3H), 8.14 (d, $J = 8.7$, 2H), 4.00 (s, 3H). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 161.9 (C), 152.1 (CH), 149.8 (C), 136.8 (C), 131.6 (2 CH), 124.4 (2 CH), 114.5 (C), 106.9 (C) 53.9 (CH₃).

(E)-2-ciano-3-(4-bromofenil)acrilato de metilo (5ca). $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{BrNO}_2$. 370 mg (40% rendimiento aislado). Sólido blanco. Punto de fusión 131-134 °C. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8.22 (s, 1H), 7.88 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.67 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 3.96 (s, 3H). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 162.7 (C), 153.8 (CH), 132.5 (2 CH), 132.0 (2 CH) 130.1 (C), 128.4 (C), 115.2 (C), 103.1 (C), 53.5 (CH₃).

(E)-2-ciano-3-(4-metoxi)acrilato de metilo (5da). $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_3$. 537 mg (82% rendimiento aislado). Sólido amarillento. Punto de fusión 107-110 °C. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8.20 (s, 1H), 8.02 (dd, $J = 8.8$, 2.6 Hz, 2H), 7.01 (dd, $J = 8.9$, 2.6 Hz, 2H), 3.92 (s, 3H). 3.89 (s, 3H). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 163.9 (C), 159.8 (C), 154.7 (CH), 133.7 (2 CH), 124.3 (C), 116.2 (C), 114.8 (2 CH), 98.8 (C), 55.7 (CH₃), 53.2 (CH₃).

(E)-2-ciano-3-fenilacrilato de etilo (5ab). $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_2$. 488 mg (80% rendimiento aislado). Sólido amarillento. Punto de fusión 35-37 °C. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 8.26 (s, 1H), 8.04–7.95 (m, 3H), 7.52 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 4.39 (c, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.40 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 162.5 (C), 155.1 (CH), 133.4 (C), 131.5 (2 CH), 129.3 (2 CH), 128.2 (CH), 115.5 (C), 103.0 (C), 62.8 (CH₂), 14.2 (CH₃).



(E)-2-ciano-3-(4-bromofenil)acrilato de etilo (5cb). $C_{12}H_{10}BrNO_2$. 653 mg (78% rendimiento aislado). Sólido blanco. Punto de fusión 102-106 °C. 1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.18 (s, 1H), 7.85 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.69–7.59 (m, 2H), 4.39 (c, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.40 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ 162.2 (C), 153.6 (CH), 132.7 (2 CH), 132.3 (2CH), 130.3 (C), 128.3 (C), 115.3 (C), 103.6 (C), 62.9 (CH₂), 14.2 (CH₃).

(E)-2-ciano-3-(3,4-dihidroxifenil)acrilato de etilo (5eb). $C_{12}H_{11}NO_4$. 810 mg (96% rendimiento aislado). Sólido amarillento. Punto de fusión 135-137 °C. 1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.70 (s, 1H), 8.47–8.24 (m, 1H), 7.74 (s, 2H), 4.42 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.42 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ 161.5 (C), 151.9 (CH), 148.6 (C), 132.9 (C), 130.6 (CH), 129.2 (C), 127.1 (CH), 125.9 (CH), 114.6 (C), 106.6 (C), 63.3 (CH₂), 14.1 (CH₃).

(E)-2-ciano-3-(2-bromofenil)acrilato de etilo (5fb). $C_{12}H_{10}BrNO_2$. 807 mg (96% rendimiento aislado). Sólido blanco. Punto de fusión 56-58 °C. 1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.64 (s, 1H), 8.17 (dd, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.83–7.38 (m, 3H), 4.41 (c, $J = 7.1$ Hz, 2H), 1.32 (m, 3H). ^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ 161.8 (C), 153.9 (CH), 135.2 (C), 133.7 (CH), 131.7 (CH), 130.1 (CH), 128.1 (CH), 126.6 (C), 114.7 (C), 106.4 (C), 63.0 (CH₂), 13.9 (CH₃).

(E)-2-ciano-3-(2-metoxifenil)acrilato de etilo (5gb). $C_{13}H_{13}NO_3$. 597 mg (86% rendimiento aislado). Sólido amarillento. Punto de fusión 71-73 °C. 1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.76 (s, 1H), 8.29 (dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, 1H), 7.52 (ddd, $J = 8.8, 7.4, 1.7$ Hz, 1H), 7.14–6.83 (m, 2H), 4.38 (c, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 1.39 (s, 3H). ^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ 162.8 (C), 159.2 (C), 149.8 (CH), 135.0 (CH), 129.3 (2 CH), 120.9 (C), 116.0 (C), 111.2 (CH), 102.3 (C), 62.5 (CH₂), 55.7 (CH₃), 14.21 (CH₃).

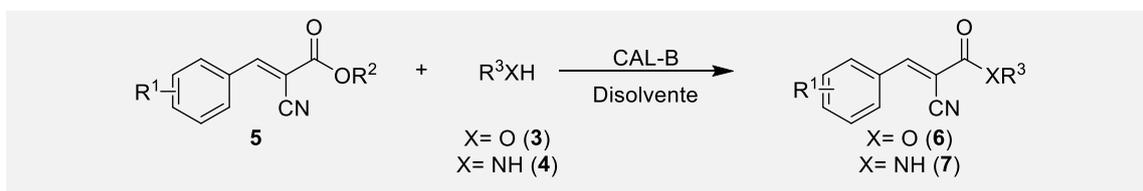
(E)-2-ciano-3-(3-etoxi-4-metoxifenil)acrilato de etilo (5hb). $C_{15}H_{17}NO_4$. 815 mg (98% rendimiento aislado). Sólido amarillento. Punto de fusión 142-144 °C. 1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.14 (s, 1H), 7.79 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.49–7.40 (m, 1H), 6.93 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 4.36 (c, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.17 (c, $J = 7.0$ Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 1.50 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.38 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H). ^{13}C -RMN (75 MHz, $CDCl_3$) δ 163.2 (C), 153.9 (CH), 148.6 (2C), 127.8 (CH), 124.5 (C), 116.4 (C), 112.6 (CH), 111.0 (CH), 99.2 (C), 64.5 (CH₂), 62.4 (CH₂), 56.2 (CH₃), 14.6 (CH₃), 14.2 (CH₃).

3.4.2 Transesterificación/aminólisis

Una vez aislados y purificados los ésteres **5** provenientes de la condensación de Knoevenagel, se pasó a estudiar el segundo paso de la secuencia quimioenzimática (Esquema 12), esto es, las



reacciones de transesterificación o aminólisis, empleando respectivamente alcoholes o aminas como nucleófilos. Todas las reacciones enzimáticas que se describen a continuación se llevaron a cabo mediante el siguiente protocolo. Se preparó una disolución del correspondiente intermedio **5** (50 mg, 0.179-0.230 mmol), junto con la misma cantidad de CAL-B en peso (50 mg) y empleando como disolvente hexano o 2-Me-THF (1.79-2.30 mL, 100 mM). A continuación, se adicionó el alcohol (R^3OH) o la amina correspondiente (R^3NH_2) para las reacciones de transesterificación o aminólisis respectivamente, y la mezcla fue agitada a 250 rpm en un agitador orbital (250 rpm) a 30 o 40 °C. Las reacciones se detuvieron tras el tiempo deseado, y el enzima se filtró en placa filtrante, lavando con CH_2Cl_2 (3 x 5 mL). Una vez evaporado el disolvente, se realizó experimento de 1H RMN del crudo de reacción para la determinación del grado de conversión, y, finalmente, el producto se purificó mediante cromatografía de columna o extracción ácida.



Esquema 12. Reacciones de transesterificación y aminólisis de los ésteres **5** empleando CAL-B.

***N*-alil-(*E*)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrilamida (7ca).** C₁₃H₁₁BrN₂O. 56 mg (92% rendimiento aislado). Sólido amarillento. 1H -RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.26 (s, 1H), 7.66–7.52 (m, 4H), 6.19–5.99 (m, 1H), 5.50–5.18 (m, 2H), 4.42–4.19 (m, 3H).

***N*-butil-(*E*)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrilamida (7cb).** C₁₄H₁₅BrN₂O. 54 mg (84% rendimiento aislado). Sólido amarillo. 1H -RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.21 (s, 1H), 7.69–7.48 (m, 4H), 3.65–3.53 (m, 2H), 1.65 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.48–1.27 (m, 2H), 0.92 (c, $J = 7.4$ Hz, 3H).

***N*-octil-(*E*)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrilamida (7cc).** C₁₈H₂₃BrN₂O. 46 mg (60% rendimiento aislado). Sólido anaranjado. 1H -RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.22 (s, 1H), 7.57 (c, $J = 8.5$ Hz, 4H), 3.59 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.77 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.28 (s, 10H), 0.88 (t, $J = 5.8$ Hz, 3H).

***N*-butil-(*E*)-3-(4-metoxifenil)-2-cianoacrilamida (7db).** C₁₅H₁₈N₂O₂. 48 mg (91% rendimiento aislado). Aceite amarillo 1H -RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.19 (s, 1H), 7.65 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.91 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.57 (s, 2H), 1.74–1.54 (m, 2H), 1.45–1.29 (m, 2H), 0.93 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).



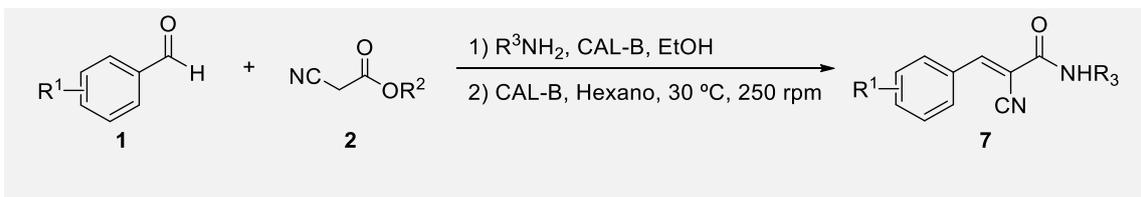
***N*-butil-(*E*)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-cianoacrilamida (7eb).** C₁₄H₁₆N₂O₃. 8 mg (68% rendimiento aislado). Aceite anaranjado. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.55 (s, 1H), 8.34 (s, 1H), 8.33–8.22 (m, 1H), 8.06 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.58 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.66 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.77–1.61 (m, 2H), 1.43–1.32 (m, 2H), 0.94 (c, *J* = 7.1 Hz, 3H).

***N*-butil-(*E*)-3-(2-metoxifenil)-2-cianoacrilamida (7gb).** C₁₅H₁₈N₂O₂. 38 mg (68% rendimiento aislado). Sólido amarillento. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.17 (s, 1H), 7.32–7.16 (m, 2H), 7.10 (s, 1H), 6.88 (dd, *J* = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 3.68 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 3.31 (s, 2H), 1.62–1.43 (m, 2H), 1.21 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 0.89 (dt, *J* = 11.6, 7.4 Hz, 3H).

***N*-butil-(*E*)-3-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-cianoacrilamida (7hb).** C₁₇H₂₂N₂O₃. 39 mg (71% rendimiento aislado). Sólido amarillento. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 8.15 (s, 1H), 7.38 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.12 (dd, *J* = 8.2, 1.8 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.15 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.91 (d, *J* = 13.3 Hz, 3H), 3.56 (s, 2H), 1.72–1.56 (m, 2H), 1.48 (c, *J* = 7.6 Hz, 3H), 1.43–1.29 (m, 2H), 1.02–0.82 (m, 3H).

3.4.3 Cascada de condensación de Knoevenagel-aminólisis catalizada por la CAL-B

En el matraz se introdujo el correspondiente aldehído **1** (50 mg, 400 mM), EtOH (0.675-1.022 mL) y cianoacetato de etilo (1.1 equiv). Posteriormente se añadió la correspondiente amina **4** (3 equiv), CAL-B (50 mg, 1:1 en peso con respecto a **1**) y tras dejar agitar un tiempo, se añadió hexano (hasta una concentración de 100 mM en **1**). La disolución se incubó a 30 °C en un agitador orbital a 250 rpm, y tras el tiempo necesario, la mezcla se filtró en placa, lavando el enzima con CH₂Cl₂ (3 x 5 mL). Posteriormente, tras evaporar el disolvente y realizar el experimento de ¹H RMN del crudo de reacción, se realizó un proceso de purificación mediante columna cromatográfica o extracción líquido-líquido (Esquema 13).



Esquema 13. Proceso de dos pasos consistente en una condensación de Knoevenagel y una reacción de aminólisis.

***N*-butil-(*E*)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrilamida (7cb)** 127 mg, 78% rendimiento aislado. El compuesto obtenido presentó señales de ¹H-RMN idénticas a las descritas en la sección 3.4.2.

***N*-octil-(*E*)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrilamida (7cc)** 129 mg, 77% rendimiento aislado. El compuesto obtenido presentó señales de ¹H-RMN idénticas a las descritas en la sección 3.4.2.

***N*-butil-(*E*)-3-(4-metoxifenil)-2-cianoacrilamida (7db)** 55 mg, 58% rendimiento aislado. El compuesto obtenido presentó señales de ¹H-RMN idénticas a las descritas en la sección 3.4.2.

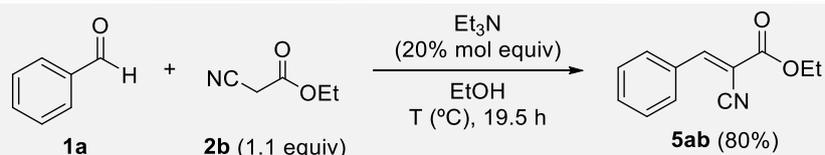
4. Resultados y discusión

Tal como se ha puesto de manifiesto en la sección de objetivos, en este Trabajo Fin de Grado se ha propuesto llevar a cabo el estudio de la condensación de Knoevenagel y la síntesis quimioenzimática de ésteres y amidas en presencia de una lipasa, y sin necesidad de purificar los intermedios de reacción. Por ello, a continuación, se desglosan los resultados obtenidos acerca de los siguientes procesos:

- Condensación de Knoevenagel entre aldehídos y cianoésteres de alquilo catalizados por aminas.
- Transesterificación de ésteres catalizados por lipasas.
- Aminólisis de ésteres catalizadas por lipasas.
- Cascada quimioenzimática en el mismo recipiente, combinando condensación de Knoevenagel con transesterificación o aminólisis.

4.1 Condensación de Knoevenagel

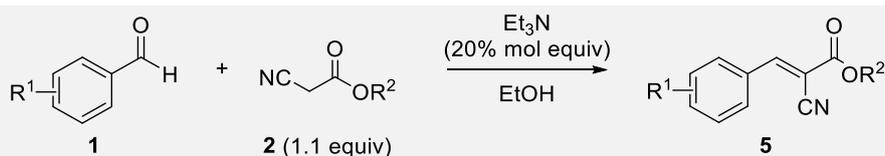
Para estudiar el proceso de condensación de Knoevenagel entre aldehídos aromáticos (**1**) y cianoacetatos de alquilo (**2**) en presencia de aminas como catalizadores básicos, se comenzó estudiando la reacción entre el benzaldehído (**1a**) y el cianoacetato de etilo (**2b**, 1.1 equiv) en presencia de trietilamina (Et_3N , 20% mol) como catalizador (Esquema 14). Para este fin, fue necesaria la purificación previa de **1a** mediante destilación a vacío, como se ha comentado en la sección de *materiales y métodos*, ya que tras largos tiempos de almacenaje la función aldehído se va oxidando, apareciendo grandes cantidades de ácido benzoico en el material de partida. La reacción se llevó a cabo empleando EtOH como disolvente a 25 °C, obteniendo conversión completa por análisis de ^1H RMN. El producto **5ab** obtenido, al ser un sólido amarillento a temperatura ambiente, se aisló tras un proceso de lavado con hexano, obteniendo un 80% de rendimiento aislado y comprobando que en el filtrado solo se encontraban impurezas y una muy pequeña cantidad del éster **5ab** deseado. Cabe destacar que, para la purificación del producto se estudió el uso de varias técnicas como extracción líquido-líquido, purificación mediante columna cromatográfica en gel de sílice y lavado en placa filtrante, resultando esta última la más sencilla y conveniente.



Esquema 14. Condensación de Knoevenagel de aldehídos aromáticos (**1**) con cianoacetatos de alquilo (**2**).

Este proceso se extendió con éxito al empleo de otros aldehídos aromáticos, tanto con el cianoacetato de metilo (**2a**), como de etilo (**2b**), aislando los correspondientes ésteres **5ba**, **5ca**, **5da**, **5ab**, **5cb**, **5eb**, **5fb**, **5gb** y **5hb** con rendimientos entre el 40 y el 96% (Tabla 3), tras un simple proceso de filtración y lavado al ser todos ellos sólidos a temperatura ambiente.

Tabla 3. Condensaciones de Knoevenagel entre aldehídos aromáticos y cianoacetatos de alquilo en presencia de trietilamina y con etanol como disolvente.



Entrada	R ¹	R ²	Tiempo (h)	Rendimiento 5 (%)
1	H	Et	19.5	80 (5ab)
2	4-NO ₂	Me	15	68 (5ba)
3	4-Br	Me	5	40 (5ca)
4	4-Br	Me	15.5	93 (5ca)
5	4-Br	Et	16.5	78 (5cb)
6	4-OMe	Me	15	82 (5da)
7	3,4-(OH) ₂	Et	19.5	96 (5eb)
8	2-Br	Et	23.5	96 (5fb)
9	2-OMe	Et	23.5	86 (5gb)
10	3-OEt y 4-OMe	Et	10.5	95 (5hb)

Como sustratos de partida se emplearon distintos derivados del benzaldehído, considerando distintos sustituyentes en el anillo aromático, tanto de carácter electrón atractor (NO₂ o Br, entradas 2-5 y 8) como electrón dador (OMe, OEt y OH, entradas 6, 7, 9 y 10). Los resultados obtenidos parecen indicar que ni la naturaleza (electrón dador o aceptor) ni la posición de sustitución en el anillo aromático (*orto*, *meta* y/o *para*) afectaron al devenir de la condensación de Knoevenagel, ya que en todos los casos las reacciones transcurrieron a conversión completa, con rendimientos variables (40-96%) dependiendo del éxito del proceso de lavado del sólido resultante. Cabe destacar que el tiempo pudo tener cierta relevancia, ya que, por ejemplo, en la

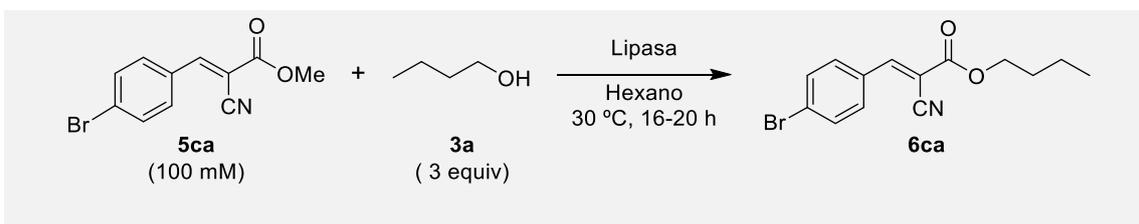


síntesis del éster **5ca** (entradas 3 y 4), tiempos cortos condujeron a menores rendimientos químicos.

Respecto a los procesos de purificación cabe destacar que se probaron lavados de los sólidos con distintos disolventes (hexano y etanol) y a distintas temperaturas (temperatura ambiente y fría con baño de hielo), resultando el uso de hexano a temperatura ambiente el más eficiente, ya que permitía arrastrar las impurezas y disolventes de la reacción en el filtrado, sin disolver el sólido formado (producto de reacción) que se recogía en la placa filtrante, mientras que con etanol, disolvente de la reacción, los productos eran parcialmente solubles.

4.2 Transesterificación

Una vez sintetizados los 8 ésteres **5**, se estudió inicialmente la reacción de transesterificación para la obtención de ésteres **6** con cadenas alifáticas variadas en el resto alcoxi, y que previamente habían demostrado su utilidad como bloqueadores de la luz ultravioleta.²⁹ Basándonos en los excelentes resultados presentados por la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B) en este tipo de reacciones,²⁹ se eligió esta enzima para los estudios, así como otras lipasas previamente mencionadas en la *sección de materiales y métodos* (CAL-A, PSL-IM, TLL, CRL y RML). Como sustrato de partida se empleó el éster **5ca** y como condiciones de reacción se utilizaron aquellas previamente optimizadas en nuestro grupo de investigación para otro tipo de sustratos, como son una relación enzima sustrato 1:1 en peso, una concentración 100 mM de sustrato en hexano como disolvente, 3 equivalentes de alcohol y 30 °C de temperatura con agitación orbital a 250 rpm (Esquema 15) Tras una noche de reacción, se detuvieron las reacciones filtrando el enzima, y tras evaporar el disolvente se observó por experimento de ¹H RMN que no ninguna de las reacciones había transcurrido en extensión alguna, recuperando en todos los casos el éster de partida.



Esquema 15. Reacción de transesterificación enzimática del éster **5ca** con butanol.

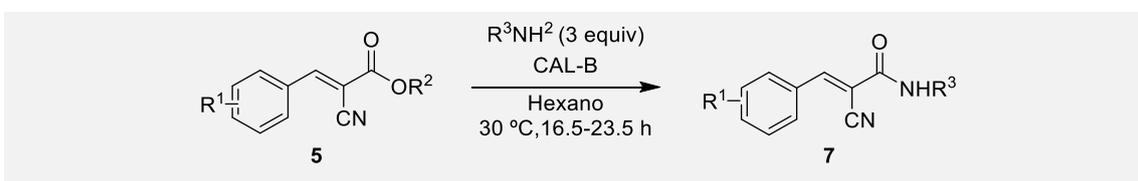
Tomando la CAL-B como enzima, se probaron otras condiciones el uso de un disolvente proveniente de fuentes naturales como el 2-metil-tetrahidrofurano,³⁴ pero no se observó tampoco en este caso la formación de **6ca**. En este punto, se consideró que la naturaleza del sustituyente del anillo aromático pudiera tener una influencia en el transcurso de la reacción, pero ni usando un éster con un sustituyente electrón atractor (4-Br, **5ca**) ni con un electrón donador (4-OMe, **5da**) se observó conversión. Por último, cabe destacar que se estudiaron las reacciones con otros ésteres

variando el resto alcoxi de metoxi a etoxi (**5cb**), así como se estudiaron varios alcoholes como el 1-butanol (**3a**) y el 1-octanol (**3b**) pero tampoco se consiguieron obtener los productos de transesterificación deseados.

4.3 Aminólisis

En este punto, y tras no encontrar los resultados esperados en el proceso de transesterificación de los ésteres **5**, se pasó a estudiar el proceso de aminólisis empleando lipasas como biocatalizadores y aminas como reactivos (Tabla 4) atendiendo a la mayor reactividad que éstas presentan frente a los alcoholes.

Tabla 4. Reacción de aminólisis entre ésteres (**5**, 100 mM) y aminas (3 equiv) catalizadas por la CAL-B (relación 1:1 enzima:**5** en peso) en hexano a 30 °C y 250 rpm.



Entrada	R ¹	R ²	R ³ NH ₂ (4)	t (h)	Rendimiento 7 (%) ^a
1	4-Br	Me	CH ₂ =CHCH ₂ NH ₂ (4a)	21	92 (7ca)
2	4-Br	Me	<i>n</i> -BuNH ₂ (4b)	17	84 (7cb)
3	4-Br	Me	<i>n</i> -OctNH ₂ (4c)	20.5	60 (7cc)
4	4-Br	Et	<i>n</i> -BuNH ₂ (4b)	23.5	87 (7cb)
5	4-OMe	Me	<i>n</i> -BuNH ₂ (4b)	23.5	91 (7db)
6	3,4-(OH) ₂	Et	<i>n</i> -BuNH ₂ (4b)	19.5	68 (7eb)
7	2-OMe	Et	<i>n</i> -BuNH ₂ (4b)	23	68 (7gb)
8	3-OEt y 4-OMe	Et	<i>n</i> -BuNH ₂ (4b)	16.5	71 (7hb)

Para llevar a cabo estos estudios se hicieron reaccionar distintos ésteres **5** (100 mM) con 3 equivalentes de la correspondiente amina, como alilamina (**4a**), butilamina (**4b**) u octilamina (**4c**), empleando hexano como disolvente, la CAL-B como biocatalizador en relación 1:1 enzima:éster a 30 °C y 250 rpm. Tras tiempos entre las 16.5 y las 23.5 h se detuvieron las biotransformaciones, y tras filtración de la CAL-B y evaporación de disolvente, se analizaron los crudos de reacción a través de experimentos de ¹H-RMN. A diferencia de las reacciones de transesterificación, en todas las reacciones de aminólisis se observó formación de las correspondientes amidas con rendimientos entre el 60 y el 92%, que luego se intentaron purificar empleando diversas técnicas. Dichos rendimientos corresponden a los crudos de reacción, que presentaban restos de la amina empleada como nucleófilo. Sin embargo, se aceptan debido a que la poca cantidad de amina presente, unido a su bajo peso molecular (excepto en el caso de la octilamina) permiten asegurar que los rendimientos de los productos puros no serían muy distintos a los obtenidos.

Debido al exceso de amina **4a-c** empleado (3 equiv), el método de purificación que se empleó mayoritariamente fue la columna cromatográfica en gel de sílice. Sin embargo, debido al carácter ácido de la sílice se observó la formación parcial del correspondiente aldehído **1c,d,e,g,h** tras eluir el crudo de reacción por la columna. A modo ilustrativo, se detalla para el ejemplo concreto de la amida **7cb**, donde se observa tras la purificación por cromatografía la aparición de la señal características del hidrógeno del grupo aldehído (CHO) a 10 ppm (señal rodeada), obteniendo un resultado similar con el resto de amidas sintetizadas (Figura 3)

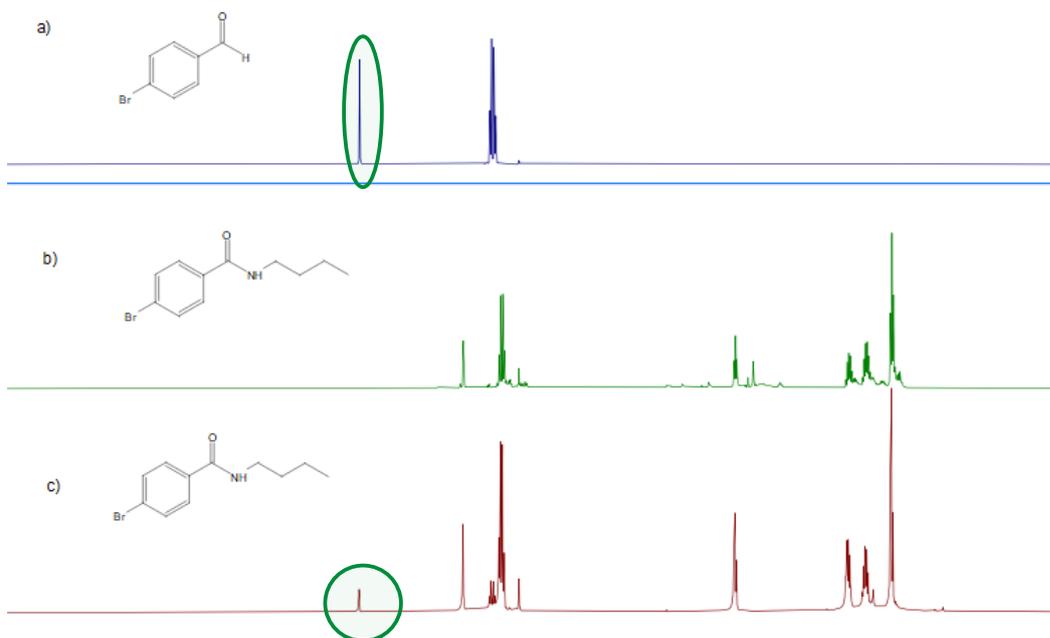


Figura 3. Espectro de ¹H-RMN del aldehído **1c** (a), crudo de reacción (b) y amida **7cb** purificada mediante cromatografía en columna (c)

Por tanto, se deduce que, de alguna manera, el proceso de purificación es responsable de revertir la reacción hacia el aldehído de partida debido a la naturaleza ácida del gel de sílice. Por este motivo, se intentó la purificación del compuesto **7cb** empleando gel de sílice previamente desactivada, así como el uso de otra fase estacionaria como la alúmina que posee un carácter neutro. No obstante, los espectros continuaron mostrando la señal característica del aldehído.

Paralelamente al uso de gel de sílice desactivada o alúmina, se intentó introducir un cambio en el proceso de purificación por cromatografía de columna. En un principio, debido a la insolubilidad del producto en la fase móvil, éste se cargaba sólido, para lo cual se requería impregnar una disolución de la amida **7cb** impura en gel de sílice antes de introducirla en la columna de cromatografía. Este procedimiento se alteró para cargar el producto líquido en un disolvente



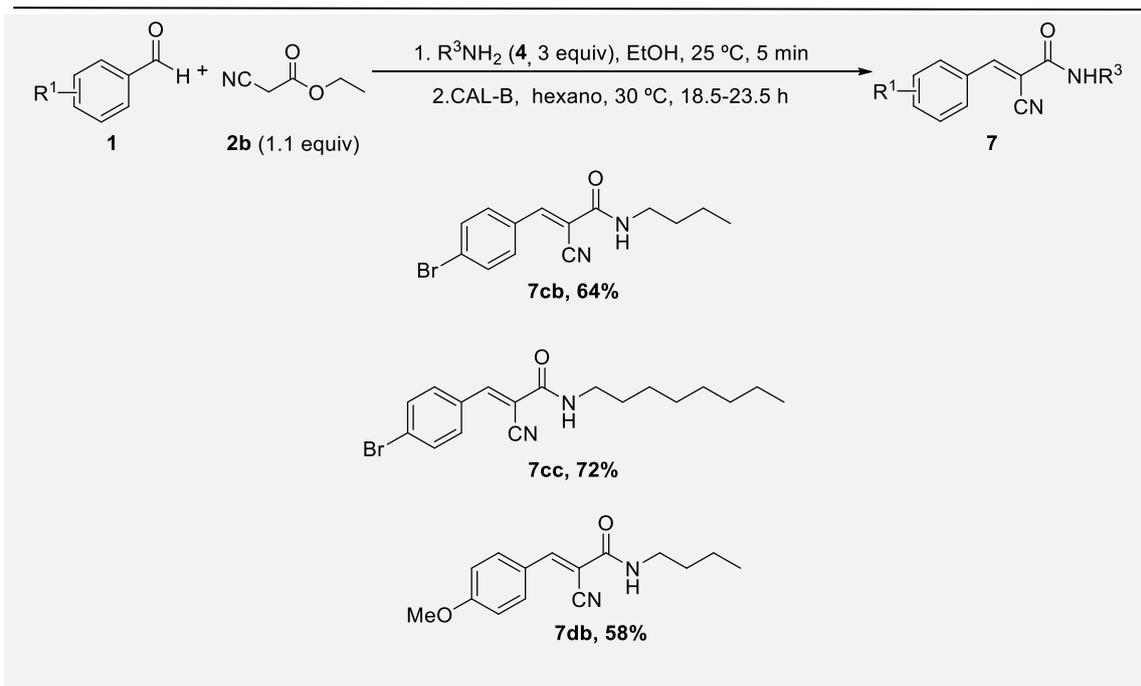
distinto al de la fase móvil, y así reducir el tiempo de contacto de la amida con el gel de sílice, pero se continuó observando cierta cantidad de aldehído en el producto final.

Se probó también el uso de otros métodos de purificación alternativos, como una extracción líquido-líquido empleando una disolución acuosa de HCl 3N como fase acuosa y CH₂Cl₂ como disolvente orgánico. Desafortunadamente, mediante este procedimiento se observó la descomposición del producto de interés. Finalmente se intentó llevar a cabo el lavado del crudo que contenía la amida **7cb** en un disolvente orgánico poco polar como el Et₂O, pero de nuevo el proceso de purificación fue ineficaz.

4.4 Reacción en cascada (*one-pot*)

Si bien no se consiguió obtener las amidas de tipo **7** en forma pura, una vez estudiados los procesos de condensación de Knoevenagel y de aminólisis por separado, el siguiente objetivo consistió en la implementación de ambos pasos en cascada y en un solo recipiente (del inglés *one-pot*). Como primera aproximación para el desarrollo de una cascada para convertir aldehídos en 3-aril-2-cianoacrilamidias, se llevó a cabo la reacción de forma secuencial *one-pot* manteniendo las condiciones previamente descritas para cada paso usando la correspondiente amina primaria de aminólisis como catalizador de la reacción de Knoevenagel (R³NH₂, **4**: alilamina, butilamina u octilamina), siendo esta capaz de catalizar la reacción sin necesidad de agregar trietilamina como catalizador. Posteriormente, la adición de hexano y CAL-B junto con la amina excedente tras catalizar la condensación deberían conducir a la formación de la amida buscada (Esquema 16).

Se realizaron en total 4 reacciones empleando distintos derivados del benzaldehído (**1c** o **1d**), cianoacetato de etilo (**2b**, 1.1 equiv) y **4b** (butilamina) o **4c** (octilamina) como aminas primarias, obteniendo en todos los casos la amida buscada **7cb**, **7cc** y **7db**, si bien impurificada con restos de la correspondiente amina empleada en exceso.



Esquema 16. Cascada consistente en condensación de Knoevenagel y reacción de aminólisis.

Por tanto, se puede afirmar que las aminas primarias son capaces de desempeñar un doble papel en este proceso de síntesis, actuando simultáneamente como catalizador básico y como nucleófilo en el mismo recipiente de reacción. No se encontraron diferencias significativas que afectasen al transcurso de la reacción al cambiar la amina o el aldehído aromático, obteniendo en todos los casos resultados similares. De nuevo, la purificación de los productos se convirtió en la etapa limitante, ya que al igual que en el caso de las amidas obtenidas mediante el proceso en dos pasos, no se consiguió implementar un método eficaz para su aislamiento con gran pureza.

5. Conclusión y perspectivas futuras

En el presente Trabajo de Fin de Grado se ha desarrollado una metodología quimioenzimática general para la síntesis de compuestos con potencial importancia farmacológica como son las amidas, y UV-bloqueante en el caso de los ésteres y amidas. Caben destacar los siguientes resultados alcanzados:

- Se ha implementado y puesto a punto la reacción de condensación de Knoevenagel para la transformación de aldehídos aromáticos en cianoésteres.
- Empleando diversos nucleófilos se han estudiado los procesos de transesterificación y aminólisis de los cianoésteres obtenidos previamente, con el fin de obtener una familia amplia de ésteres y amidas α,β -insaturados, sin alcanzar conversión para el caso de los ésteres pero si para las amidas.
- Se ha estudiado la posibilidad de desarrollar una cascada concurrente quimioenzimática combinando el proceso de condensación de Knoevenagel con uno de aminólisis evitando la purificación de los cianoésteres intermedios

Como perspectivas futuras, se plantea llevar a escala preparativa la síntesis de amidas que permita el estudio de métodos de purificación alternativos a la cromatografía de columna, así como el estudio de una cascada concurrente.

6. Referencias

- (1) Pitzer, J.; Steiner, K. Amides in Nature and Biocatalysis. *J. Biotechnol.* **2016**, *235*, 32–46. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.03.023>.
- (2) Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61* (46), 10827–10852. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2005.08.031>.
- (3) Carey, J. S.; Laffan, D.; Thomson, C.; Williams, M. T. Analysis of the Reactions Used for the Preparation of Drug Candidate Molecules. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4* (12), 2337–2347. <https://doi.org/10.1039/B602413K>.
- (4) Gabard, B. Sunscreens. In *Cosmetics: Controlled Efficacy Studies and Regulation*; Elsner, P., Maibach, H. I., Merk, H. F., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 1999; pp 116–134. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59869-2_9.
- (5) Flor, J.; Davolos, M.; Corrêa, M. Protetores Solares. *Química Nova - QUIM NOVA* **2007**, *30* (1), 153-158. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000100027>.
- (6) Sheldon, R. A. Metrics of Green Chemistry and Sustainability: Past, Present, and Future. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2018**, *6* (1), 32–48. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b03505>.
- (7) Kirchhoff, M. M. Promoting Sustainability through Green Chemistry. *Resour. Conserv. Recycl.* **2005**, *44* (3), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2005.01.003>.
- (8) Tang, S. L. Y.; Smith, R. L.; Poliakov, M. Principles of Green Chemistry: PRODUCTIVELY. *Green Chem.* **2005**, *7* (11), 761–762. <https://doi.org/10.1039/B513020B>.
- (9) Beach, E. S.; Cui, Z.; Anastas, P. Green Chemistry: A Design Framework for Sustainability. *Energy Environ. Sci.* **2009**, *2* (10), 1038–1049. <https://doi.org/10.1039/B904997P>.
- (10) Curzons, A. D.; Constable, D. C.; Cunningham, V. L. Solvent Selection Guide: A Guide to the Integration of Environmental, Health and Safety Criteria into the Selection of Solvents. *Clean Prod. Process.* **1999**, *1* (2), 82–90. <https://doi.org/10.1007/s100980050014>.
- (11) Sheldon, R. A. E Factors, Green Chemistry and Catalysis: An Odyssey. *Chem. Commun.* **2008**, (29), 3352–3365. <https://doi.org/10.1039/B803584A>.
- (12) Arroyo, M.; Acebal, C.; Mata, I. de la. Biocatálisis y biotecnología. *Arbor* **2014**, *190* (768), a156. <https://doi.org/10.3989/arbor.2014.768n4010>.
- (13) Koeller, K. M.; Wong, C.-H. Enzymes for Chemical Synthesis. *Nature* **2001**, *409* (6817), 232–240. <https://doi.org/10.1038/35051706>.
- (14) Bell, E. L.; Finnigan, W.; France, S. P.; Green, A. P.; Hayes, M. A.; Hepworth, L. J.; Lovelock, S. L.; Niikura, H.; Osuna, S.; Romero, E.; Ryan, K. S.; Turner, N. J.; Flitsch, S. L. Biocatalysis. *Nat. Rev. Methods Primer* **2021**, *1* (1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00044-z>.



- (15) Yamada, H.; Kobayashi, M. Nitrile Hydratase and Its Application to Industrial Production of Acrylamide. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1996**, *60* (9), 1391–1400. <https://doi.org/10.1271/bbb.60.1391>.
- (16) Wu, S.; Snajdrova, R.; Moore, J. C.; Baldenius, K.; Bornscheuer, U. T. Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60* (1), 88–119. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anie.202006648>.
- (17) Ascaso-Alegre, C.; Mangas-Sanchez, J. Construction of Chemoenzymatic Linear Cascades for the Synthesis of Chiral Compounds. *Eur. J. Org. Chem.* **2022**, *2022* (22), e202200093. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202200093>.
- (18) González-Granda, S.; Escot, L.; Lavandera, I.; Gotor-Fernández, V. Chemoenzymatic Cascades Combining Biocatalysis and Transition Metal Catalysis for Asymmetric Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62* (18), e202217713. <https://doi.org/10.1002/anie.202217713>.
- (19) Schrittwieser, J. H.; Velikogne, S.; Hall, M.; Kroutil, W. Artificial Biocatalytic Linear Cascades for Preparation of Organic Molecules. *Chem. Rev.* **2018**, *118* (1), 270–348. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00033>.
- (20) Angajala, G.; Pavan, P.; Subashini, R. Lipases: An Overview of Its Current Challenges and Prospectives in the Revolution of Biocatalysis. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2016**, *7*, 257–270. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.07.001>.
- (21) Li, W.; Li, R.; Yu, X.; Xu, X.; Guo, Z.; Tan, T.; Fedosov, S. N. Lipase-Catalyzed Knoevenagel Condensation in Water–Ethanol Solvent System. Does the Enzyme Possess the Substrate Promiscuity? *Biochem. Eng. J.* **2015**, *101*, 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.04.021>.
- (22) Almeida, F. L. C.; Castro, M. P. J.; Travália, B. M.; Forte, M. B. S. Trends in Lipase Immobilization: Bibliometric Review and Patent Analysis. *Process Biochem.* **2021**, *110*, 37–51. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.07.005>.
- (23) *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations, 2nd Edition* / Wiley. Wiley.com. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/3527607544>.
- (24) Busto, E.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V. Hydrolases: Catalytically Promiscuous Enzymes for Non-Conventional Reactions in Organic Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (11), 4504. <https://doi.org/10.1039/c003811c>.
- (25) Dwivedee, B. P.; Soni, S.; Sharma, M.; Bhaumik, J.; Laha, J. K.; Banerjee, U. C. Promiscuity of Lipase-Catalyzed Reactions for Organic Synthesis: A Recent Update. *ChemistrySelect* **2018**, *3* (9), 2441–2466. <https://doi.org/10.1002/slct.201702954>.
- (26) López-Iglesias, M.; Gotor-Fernández, V. Recent Advances in Biocatalytic Promiscuity: Hydrolase-Catalyzed Reactions for Nonconventional Transformations. *Chem. Rec.* **2015**, *15* (4), 743–759. <https://doi.org/10.1002/tcr.201500008>.



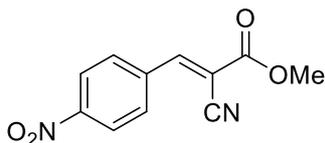
- (27) Van Beurden, K.; De Koning, S.; Molendijk, D.; Van Schijndel, J. The Knoevenagel Reaction: A Review of the Unfinished Treasure Map to Forming Carbon–Carbon Bonds. *Green Chem. Lett. Rev.* **2020**, *13* (4), 349–364. <https://doi.org/10.1080/17518253.2020.1851398>.
- (28) *Condensation von Malonsäure mit aromatischen Aldehyden durch Ammoniak und Amine - Knoevenagel - 1898 - Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft - Wiley Online Library.* <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cber.18980310308> (accessed 2024-05-24).
- (29) Polonini, H. C.; Lopes, R. S.; Beatriz, A.; Gomes, R. S.; Silva, A. O.; Lima, R. V. D.; Nunes, Gláucia. A.; Brandão, M. A. F.; Raposo, N. R. B.; Lima, D. P. D. Synthesis and Evaluation of Octocrylene-inspired Compounds for UV-Filter Activity. *Química Nova* 2007, *37* (6), 1004–1009. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140160>.
- (30) Wilk, M.; Trzepizur, D.; Koszelewski, D.; Brodzka, A.; Ostaszewski, R. Synthesis of (*E*)- α,β -Unsaturated Carboxylic Esters Derivatives from Cyanoacetic Acid *via* Promiscuous Enzyme-Promoted Cascade Esterification/Knoevenagel Reaction. *Bioorg Chem.* **2019**, *93*, 102816. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.02.041>.
- (31) Koszelewski, D.; Paprocki, D.; Madej, A.; Borys, F.; Brodzka, A.; Ostaszewski, R. Enzymatic Tandem Approach to Knoevenagel Condensation of Acetaldehyde with Acidic Methylene Compounds in Organic Media. *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017* (31), 4572–4579. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201700936>.
- (32) Fengjuan Yang; Zhang, X.; Li, F.; Wang, Z.; Wang, L. Chemoenzymatic Synthesis of α -Cyano Epoxides by a Tandem–Knoevenagel–Epoxidation Reaction. *Eur. J. Org. Chem.* **2016**, *2016* (7), 1251–1254. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201501501>.
- (33) Remberg, B.; Reiss, G. J.; Muller, T. J. J. A Bifurcating Chemoenzymatic Domino Knoevenagel-Acylation/Hydrolysis- Protonolysis Three-Component Synthesis of α -Cyano (Hetero)Aryl Acrylates and/or Amides. *Curr. Org. Chem.* **2018**, *22* (3), 276–285. <https://doi.org/10.2174/1385272821666170620110830>.
- (34) Pace, V.; Hoyos, P.; Castoldi, L.; Domínguez de María, P.; Alcántara, A. R. 2-Methyltetrahydrofuran (2-MeTHF): A Biomass-Derived Solvent with Broad Application in Organic Chemistry. *ChemSusChem* **2012**, *5* (8), 1369–1379. <https://doi.org/10.1002/cssc.201100780>.



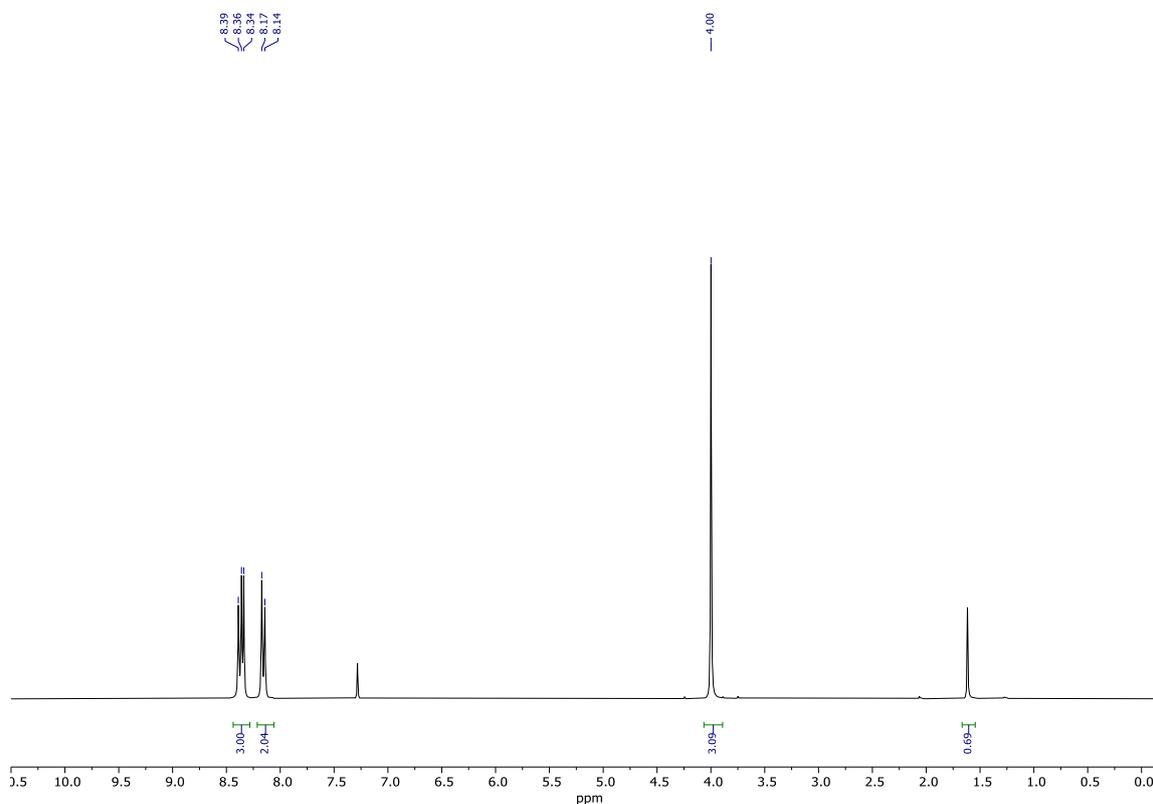
7. Anexos:

7.1 Espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de compuestos sintetizados

(*E*)-2-ciano-3-(4-nitrofenil)acrilato de metilo ($\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$, 5ba)

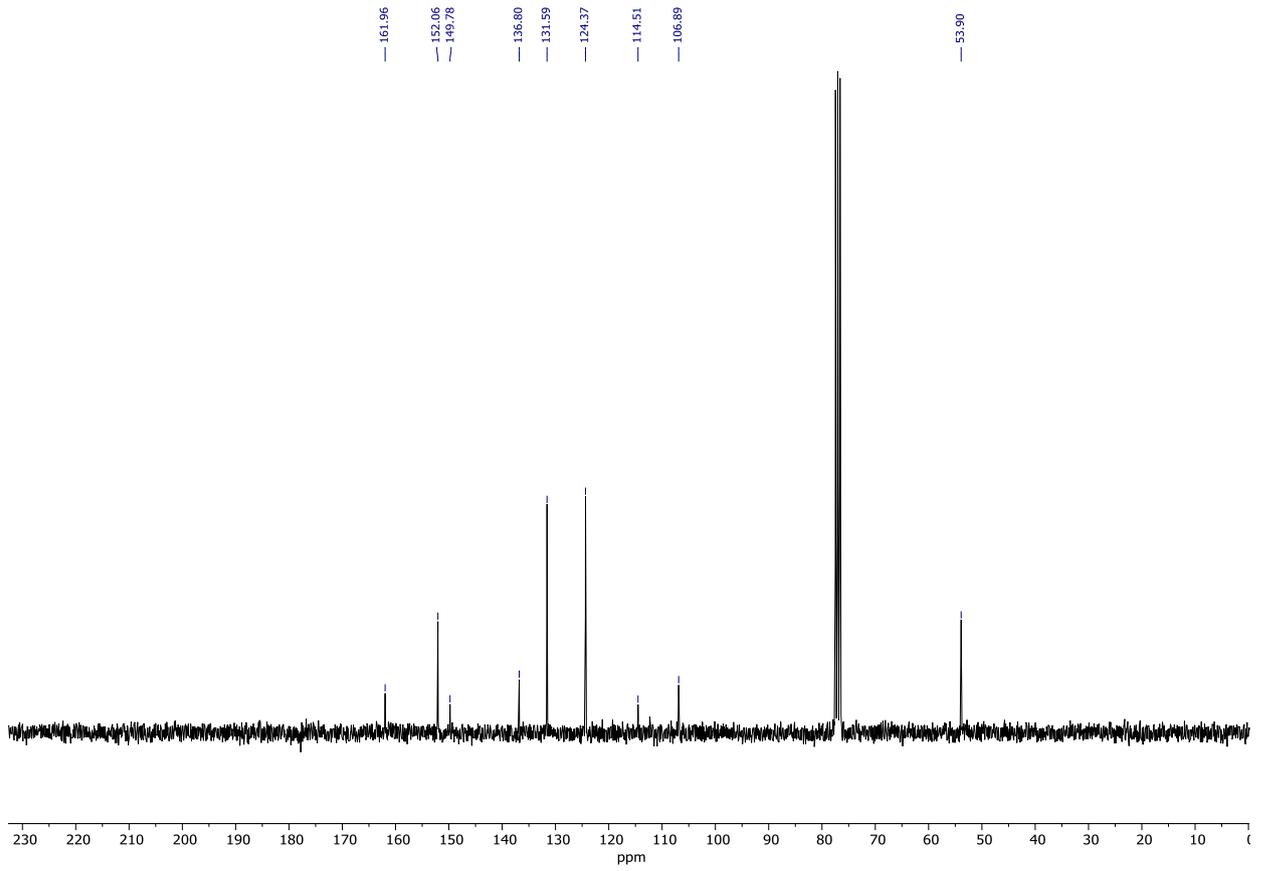


^1H -RMN

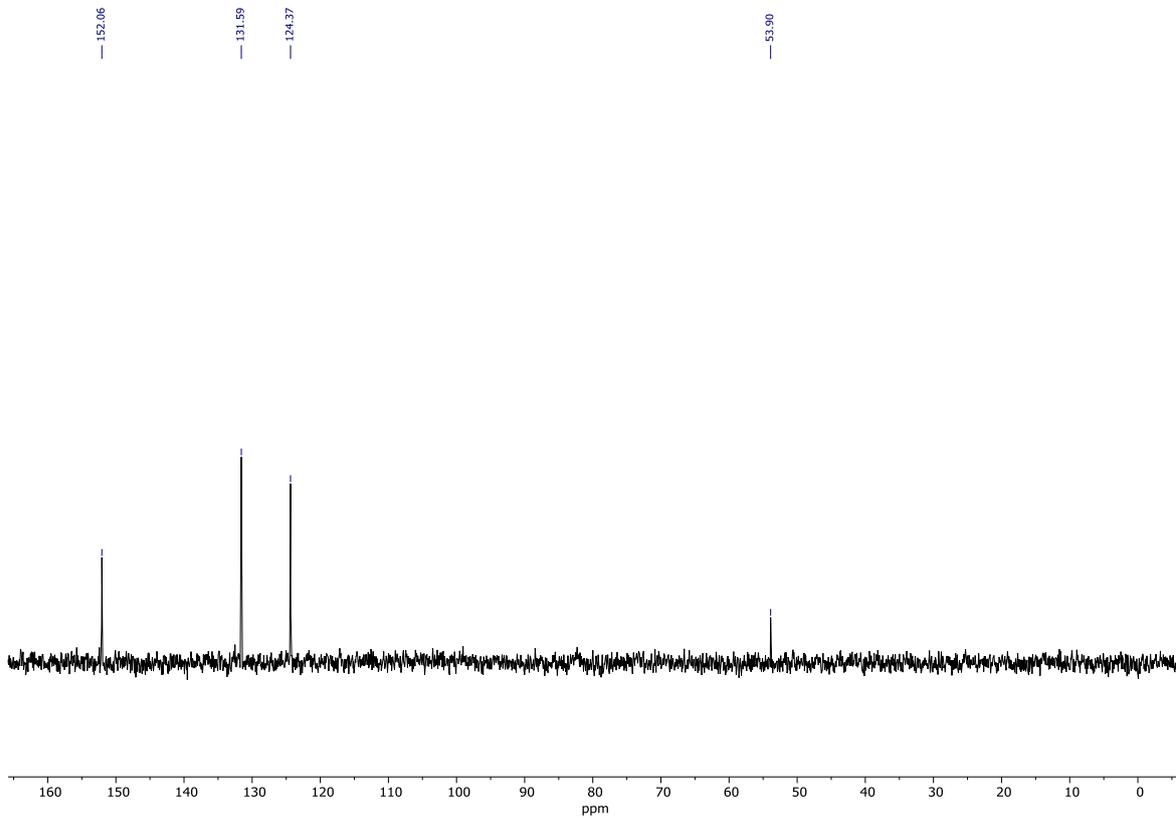




^{13}C -RMN



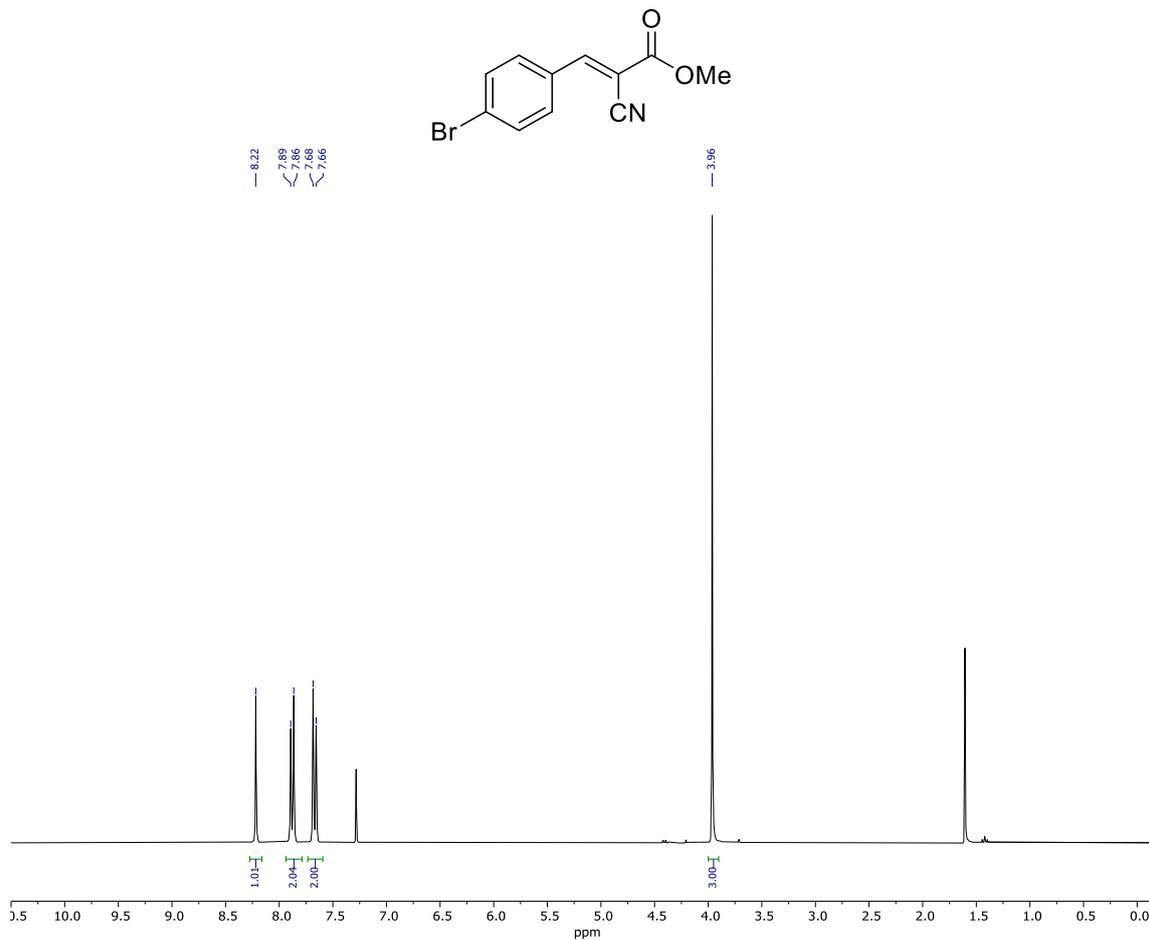
DEPT





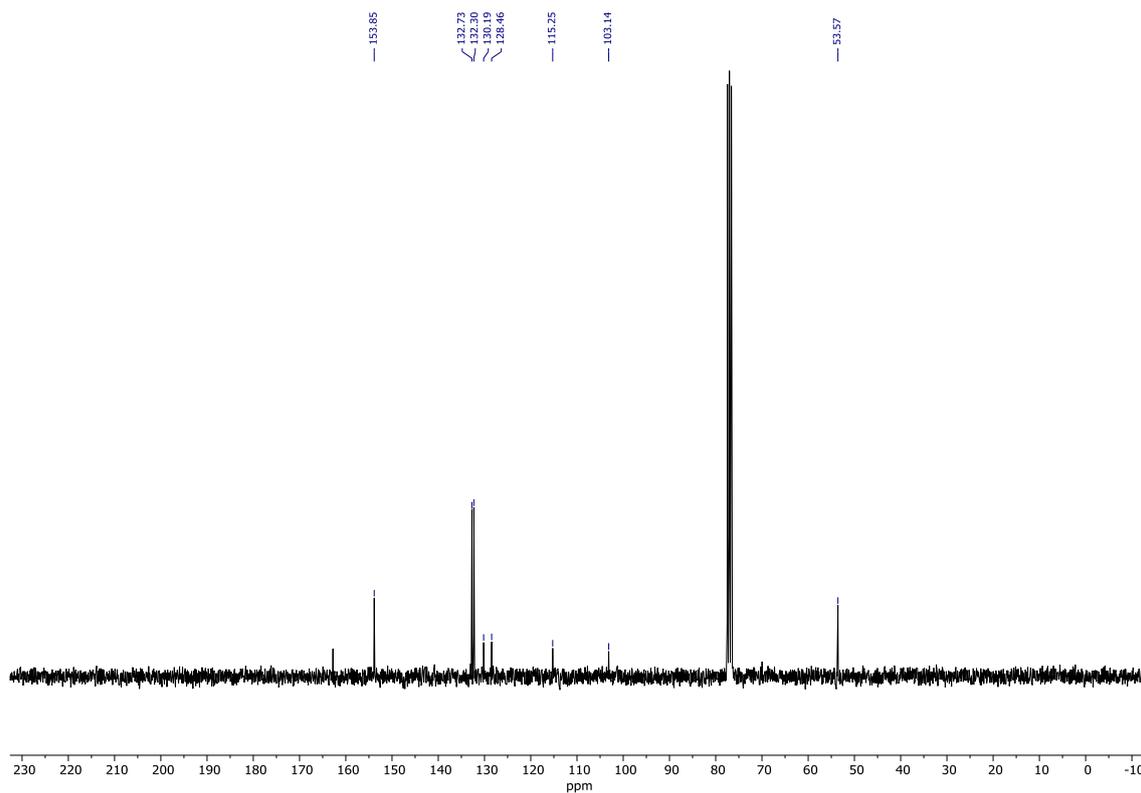
(*E*)-2-ciano-3-(4-bromofenil)acrilato de metilo (C₁₁H₈BrNO₂, 5ca)

¹H-RMN

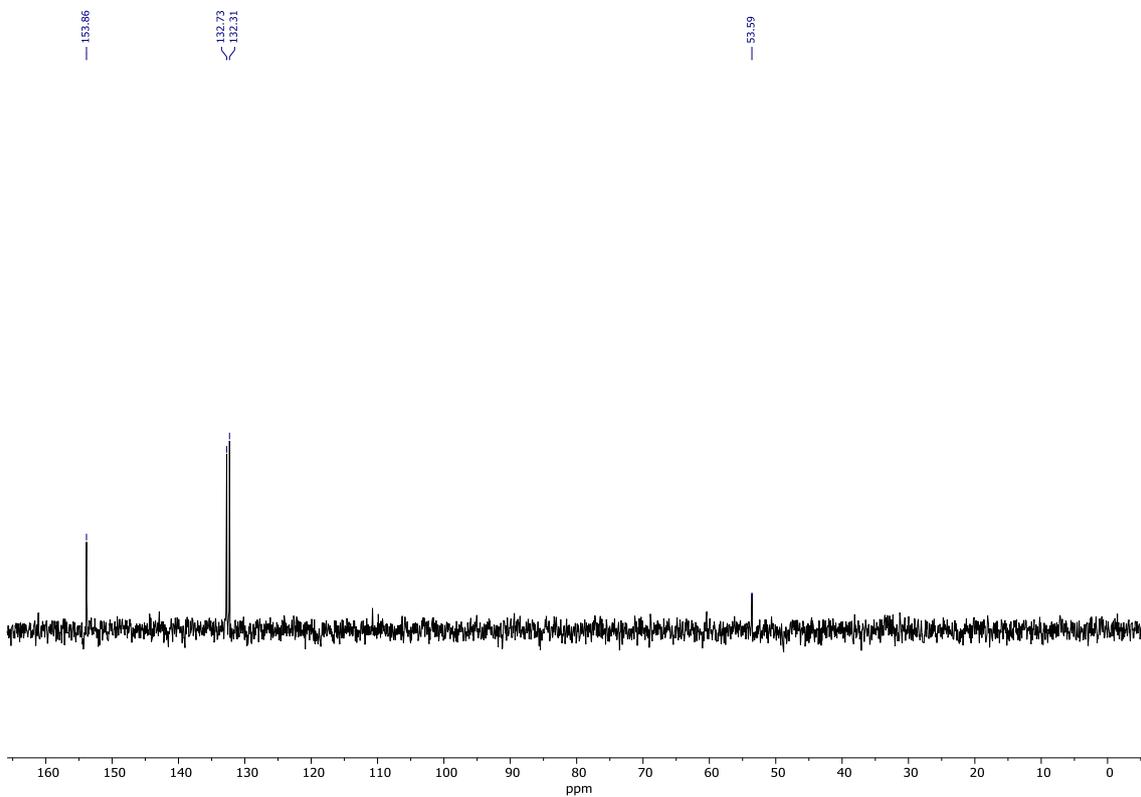




^{13}C -RMN

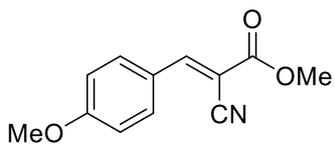


DEPT

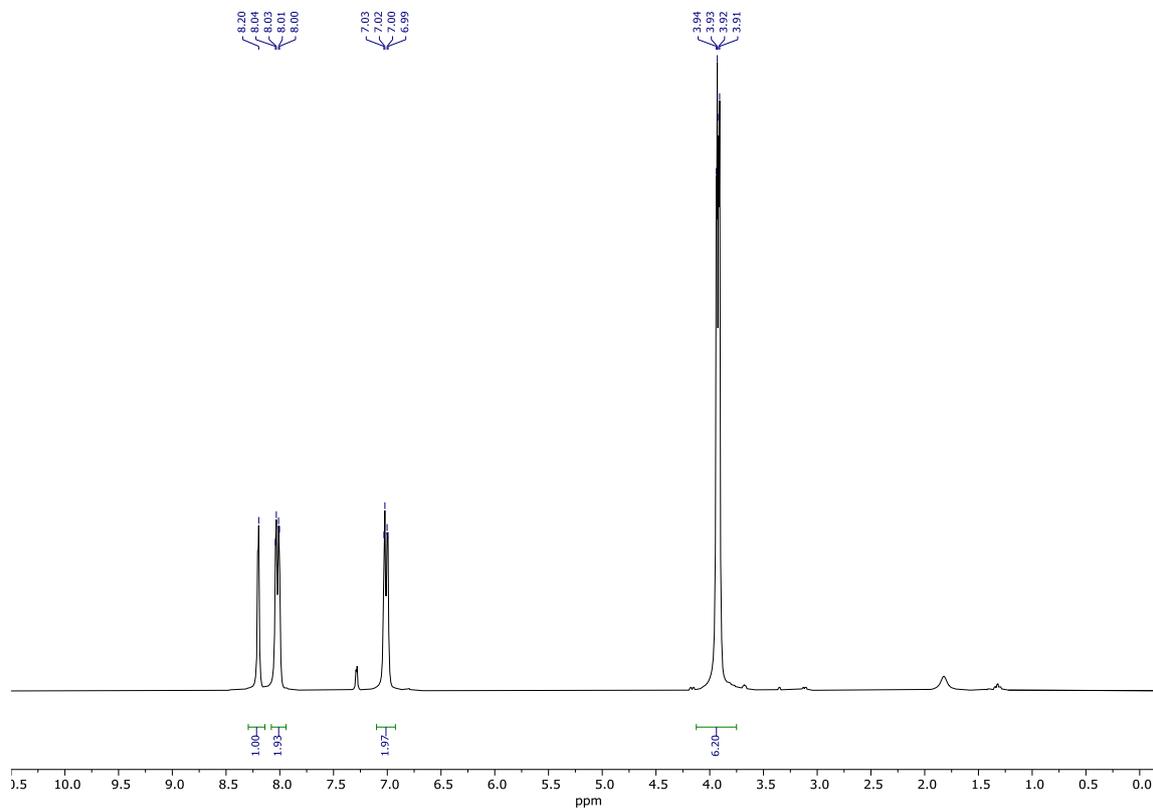




(E)-2-ciano-3-(4-metoxi)acrilato de metilo (C₁₂H₁₁NO₃, 5da)

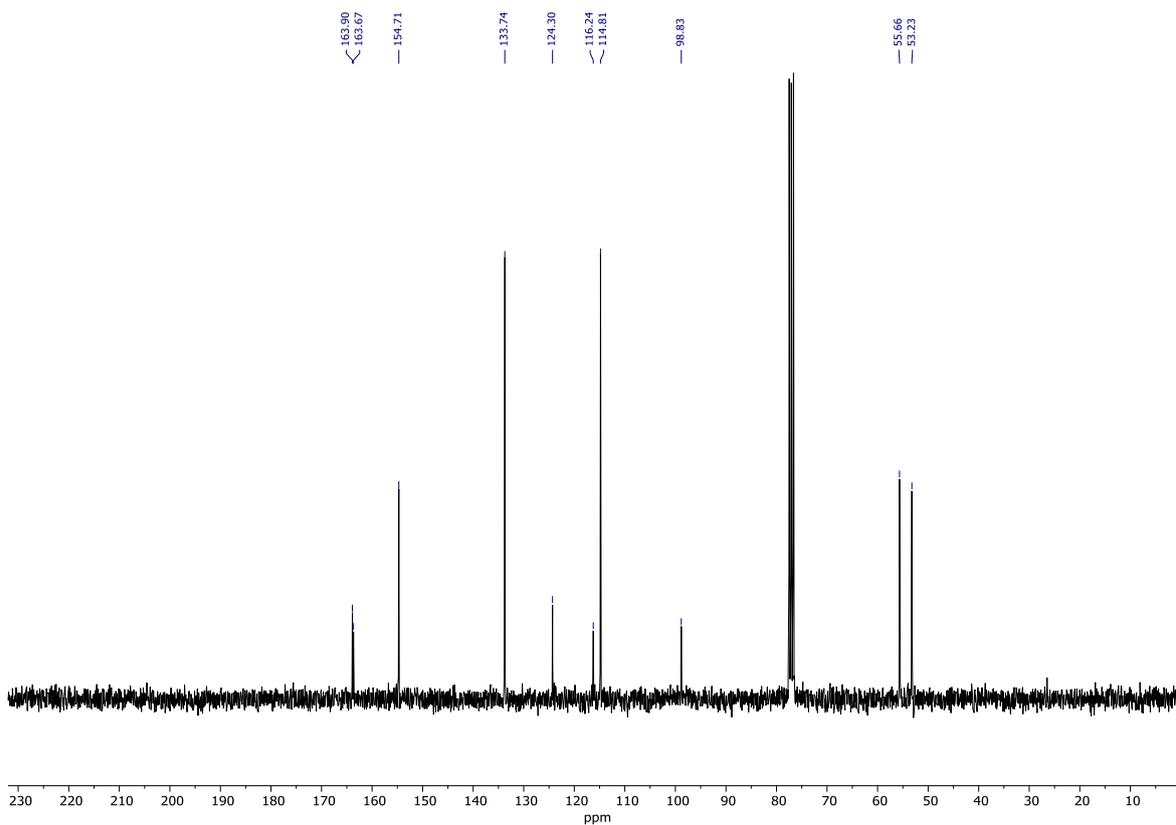


¹H-RMN

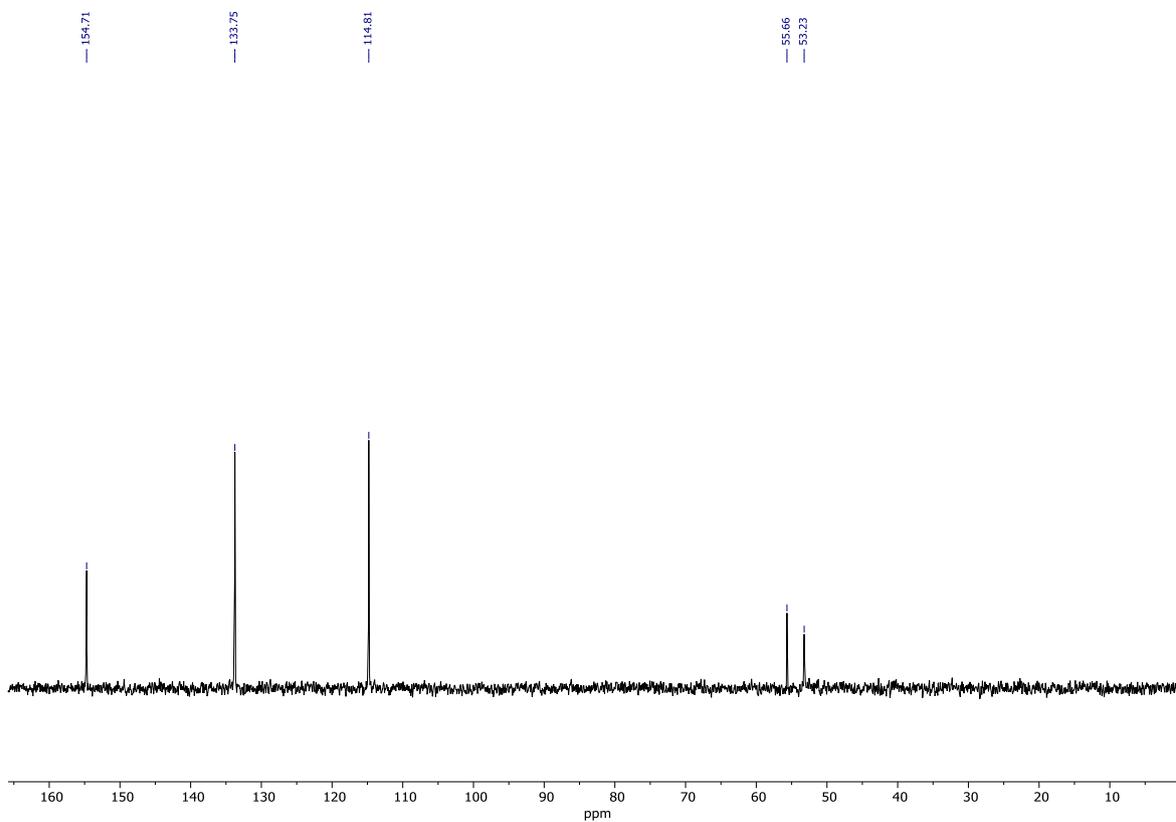




¹³C-RMN

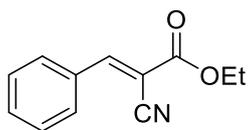


DEPT

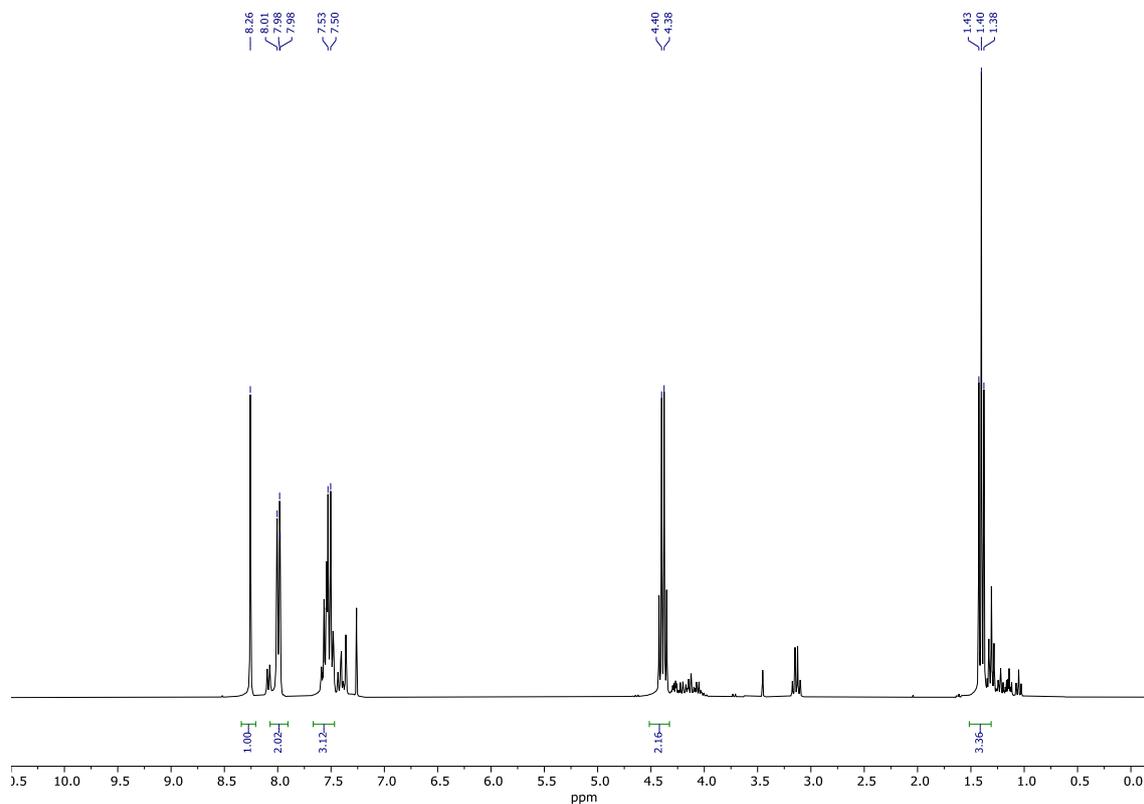




(*E*)-2-ciano-3-fenilacrilato de etilo (C₁₂H₁₁NO₂, 5ab)

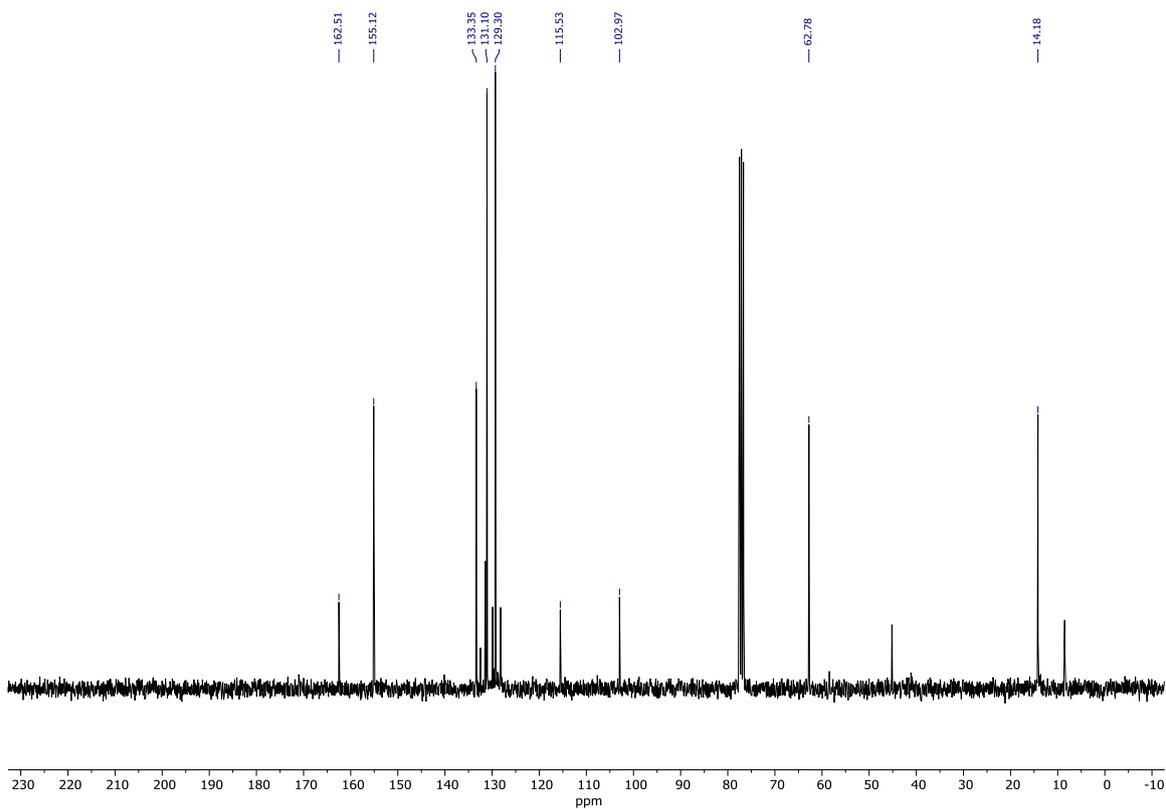


¹H-RMN

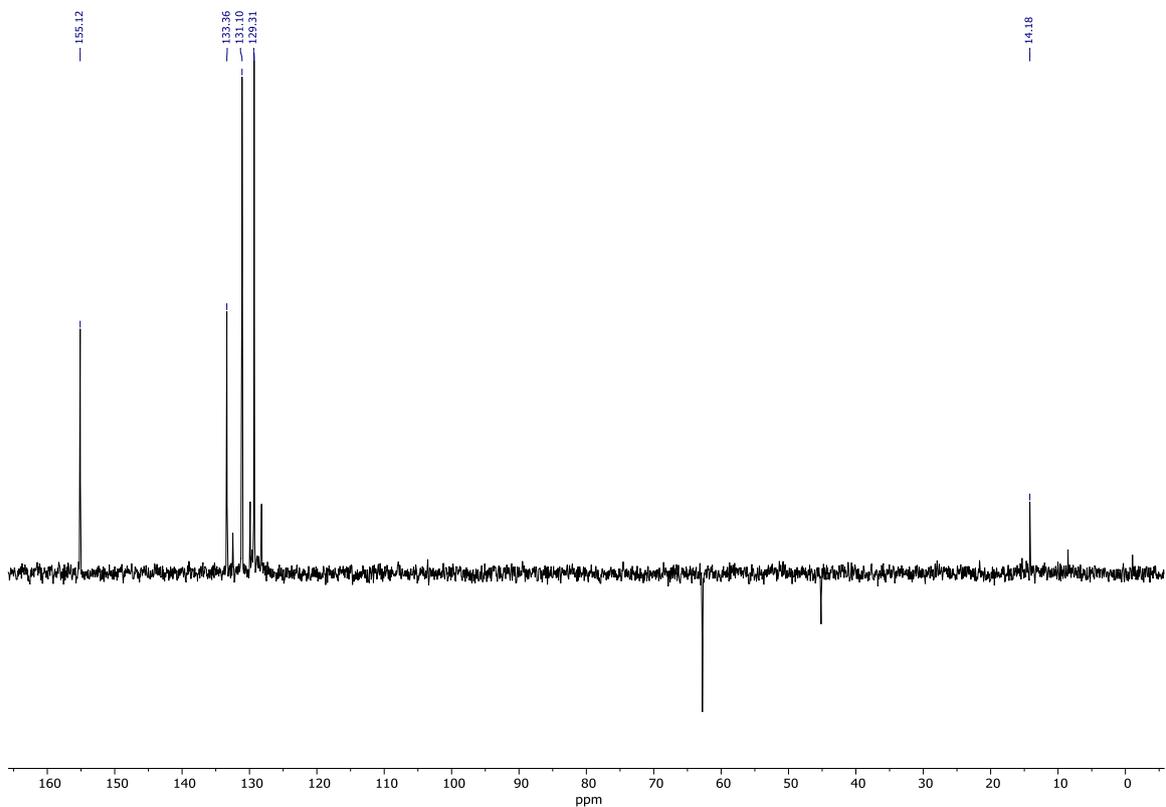




¹³C-RMN

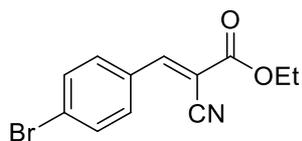


DEPT

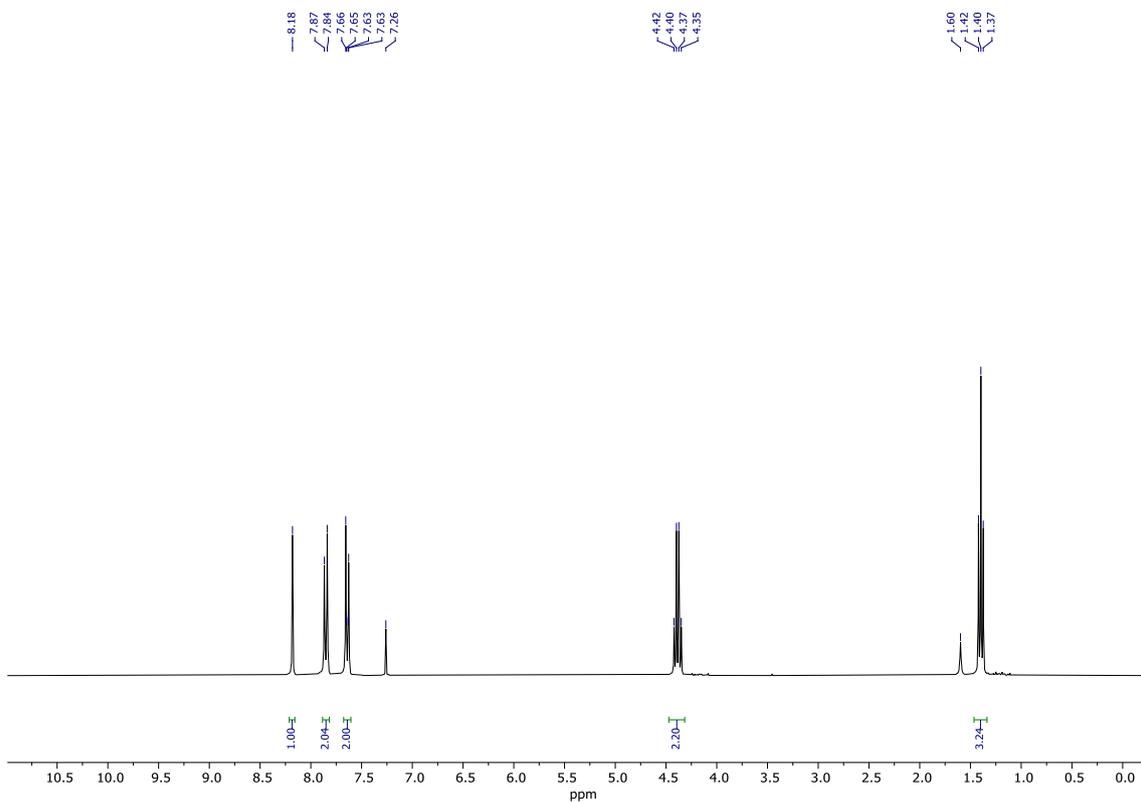




(*E*)-2-ciano-3-(4-bromofenil)acrilato de etilo (C₁₂H₁₀BrNO₂, 5cb)

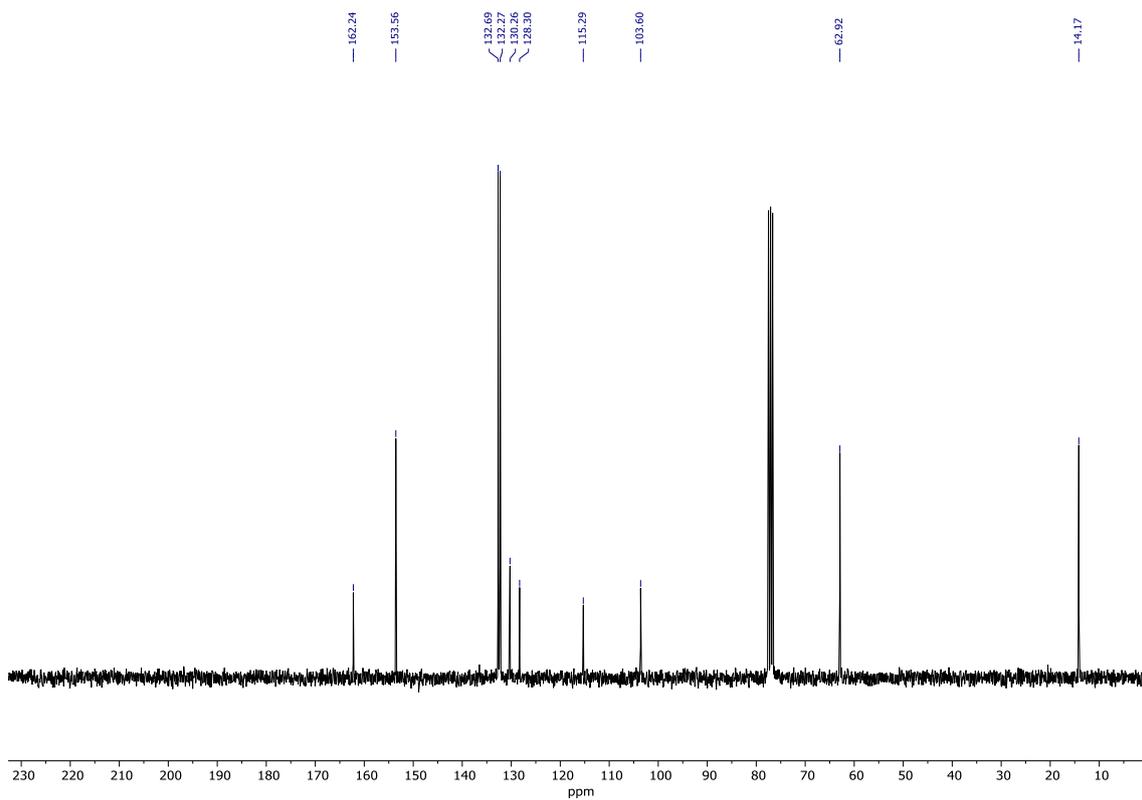


¹H-RMN

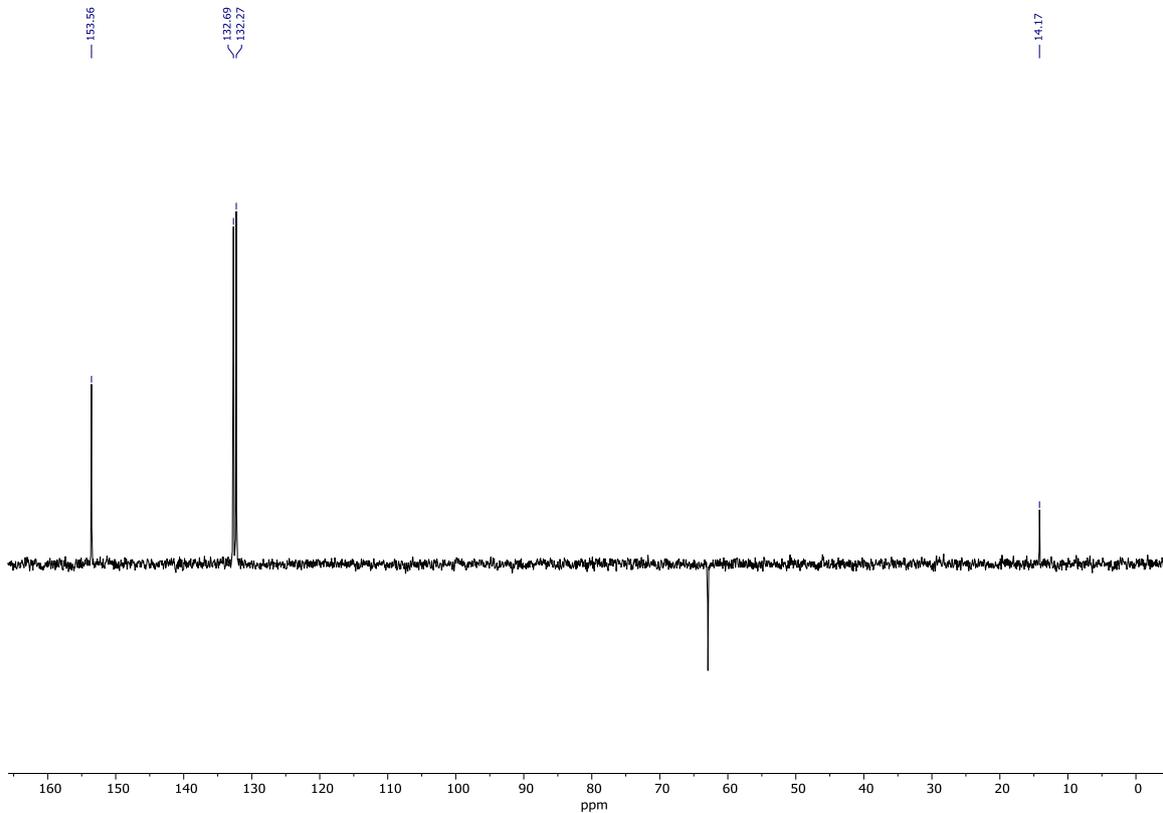




¹³C-RMN



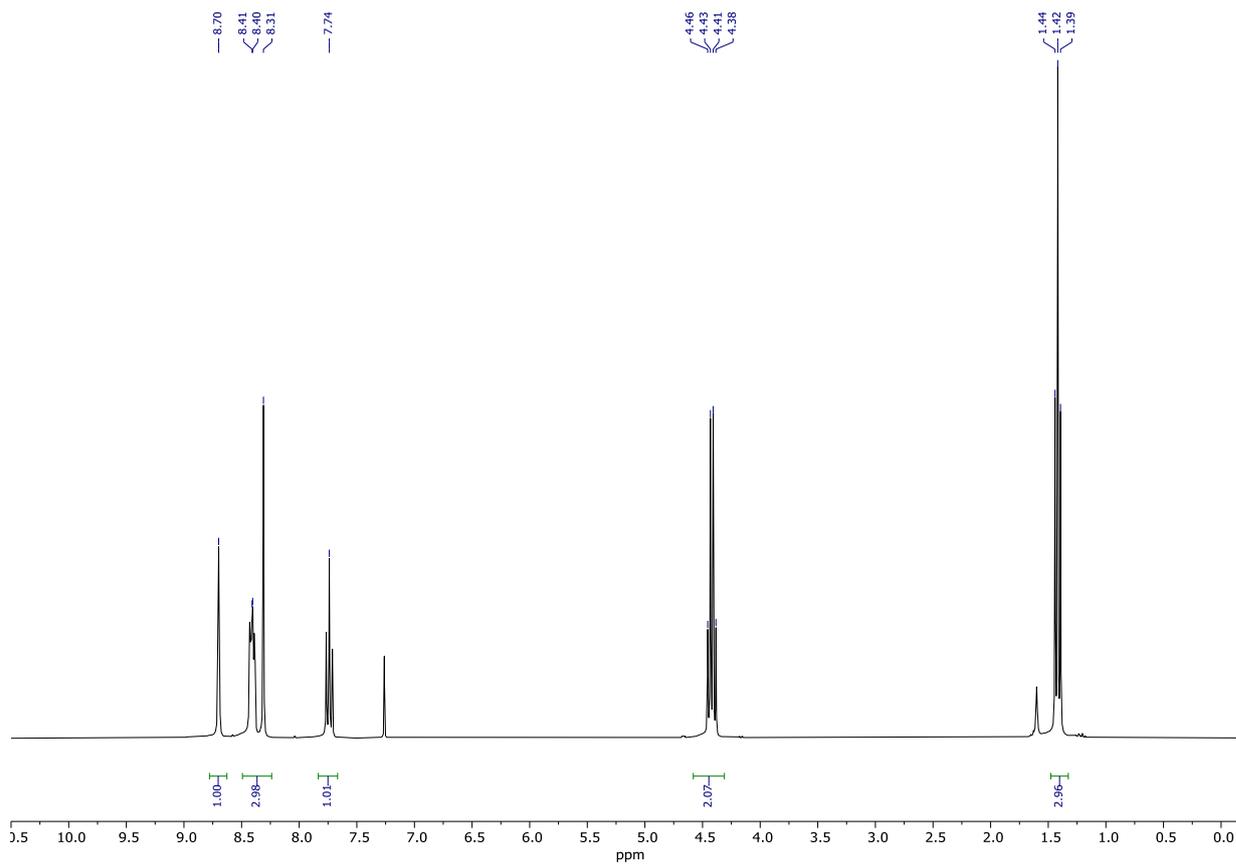
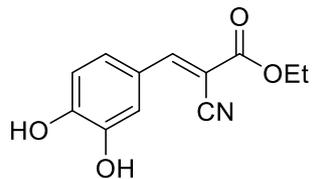
DEPT





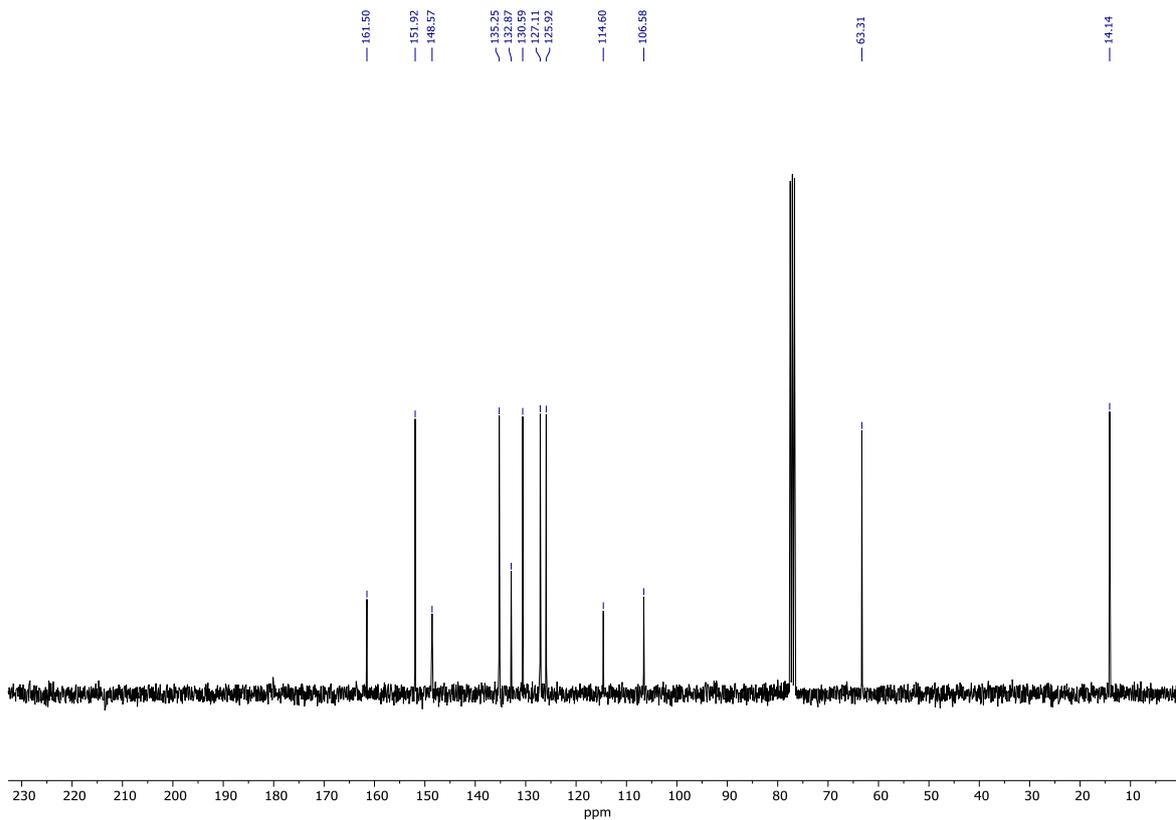
(E)-2-ciano-3-(3,4-dihidroxifenil)acrilato de etilo (C₁₂H₁₁NO₄, 5fb)

¹H-RMN

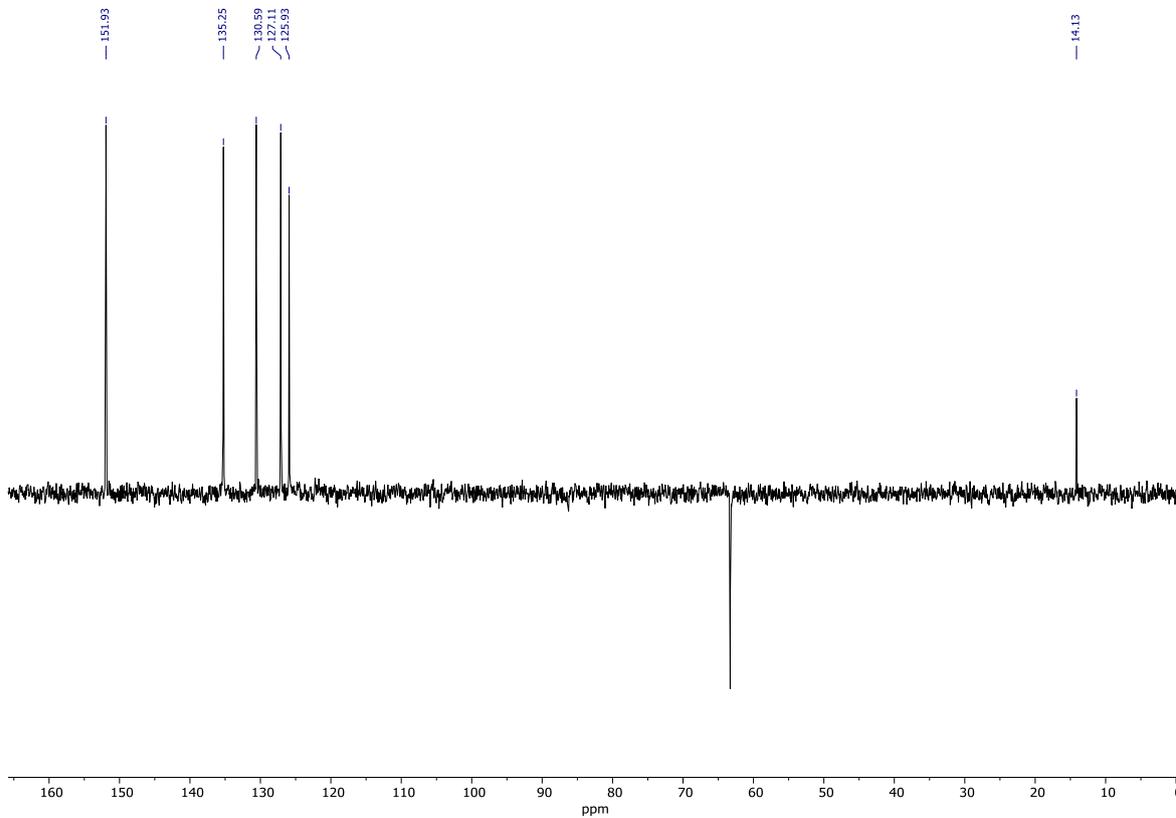




¹³C-RMN

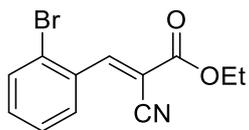


DEPT

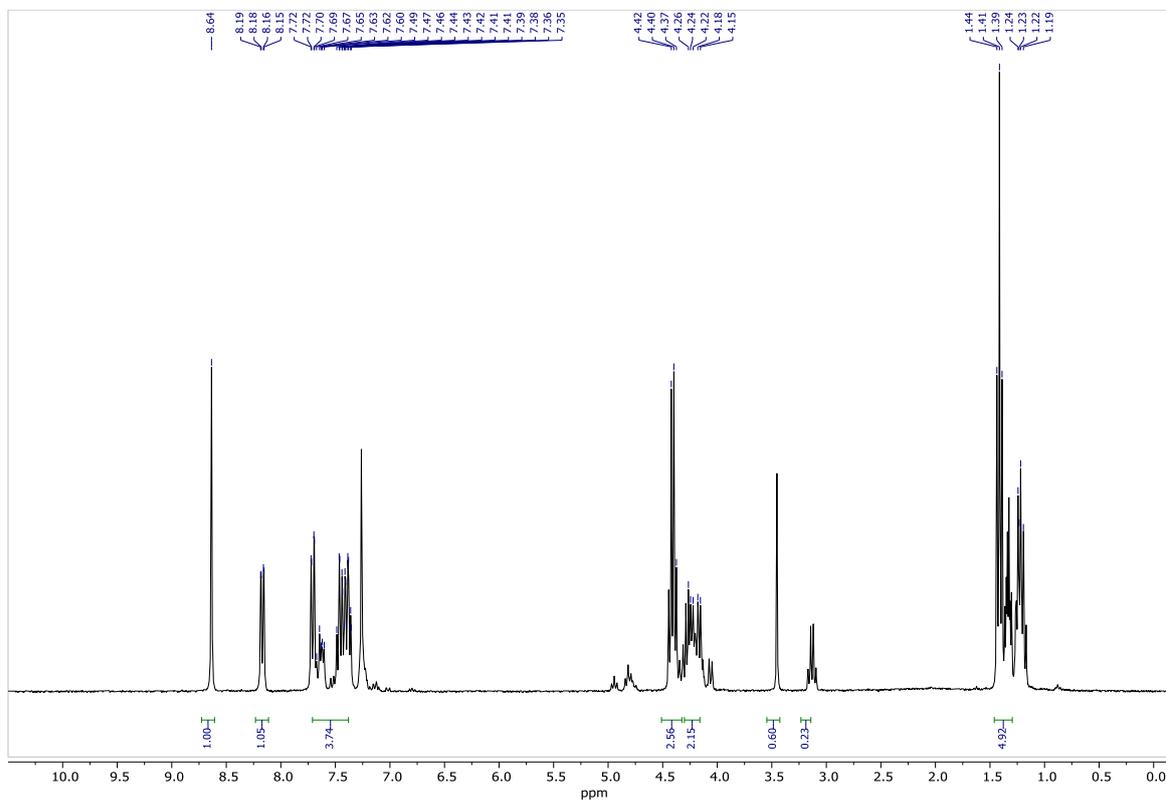




(E)-2-ciano-3-(2-bromofenil)acrilato de etilo (C₁₂H₁₀BrNO₂, 5gb)

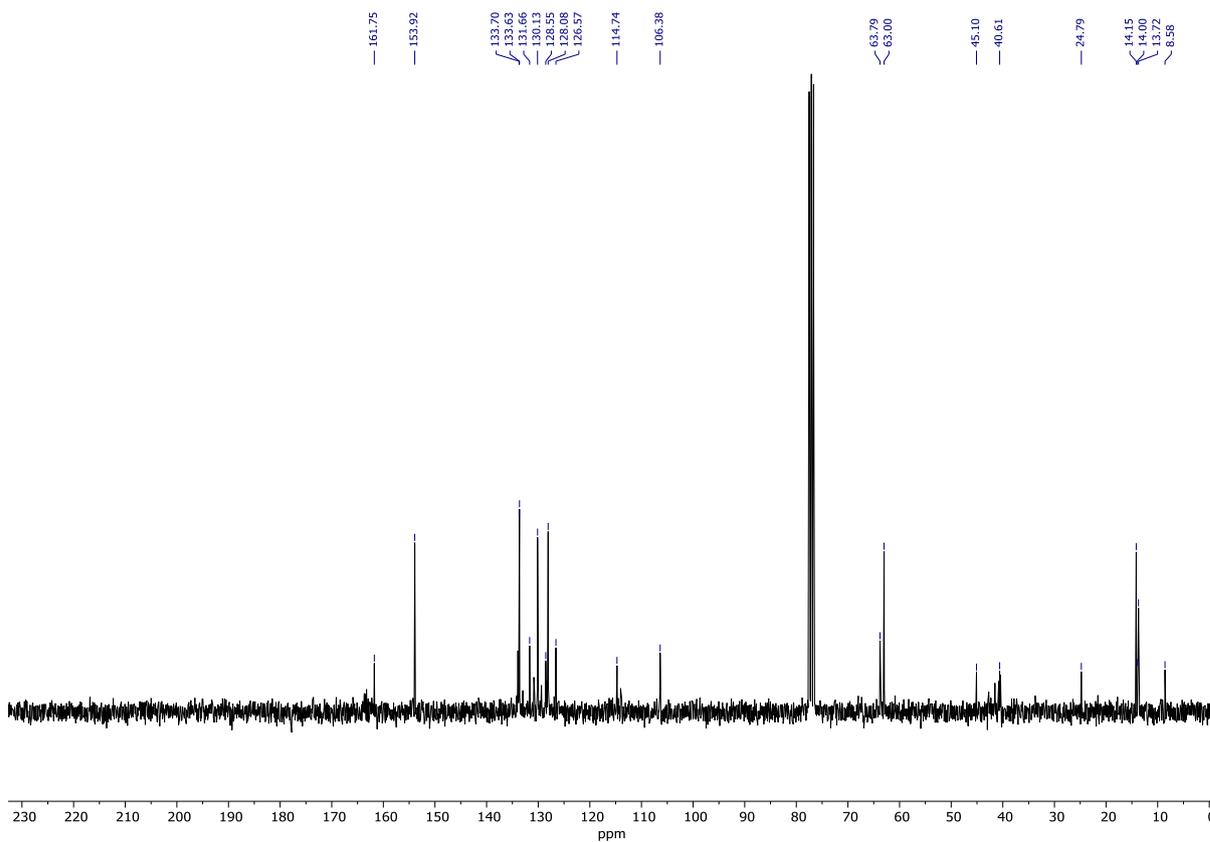


¹H-RMN

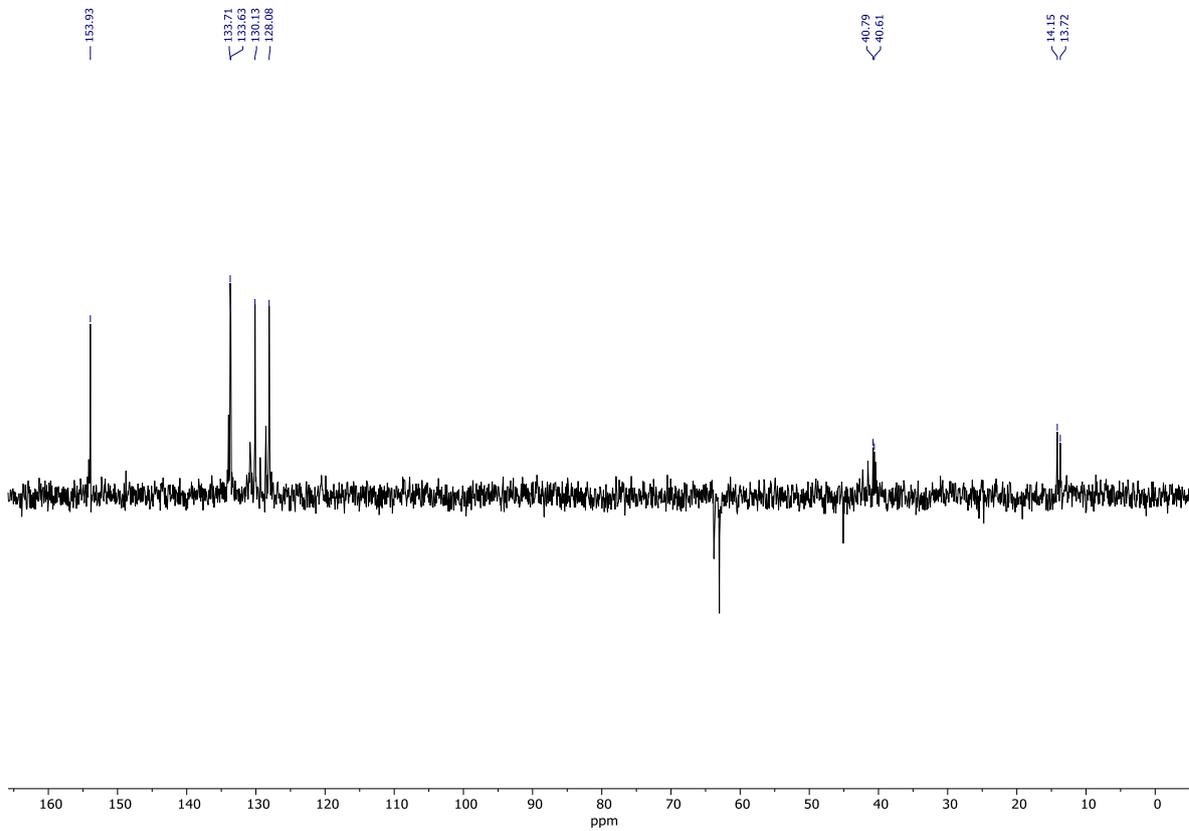




¹³C-RMN

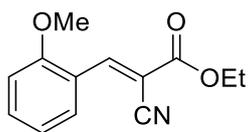


DEPT

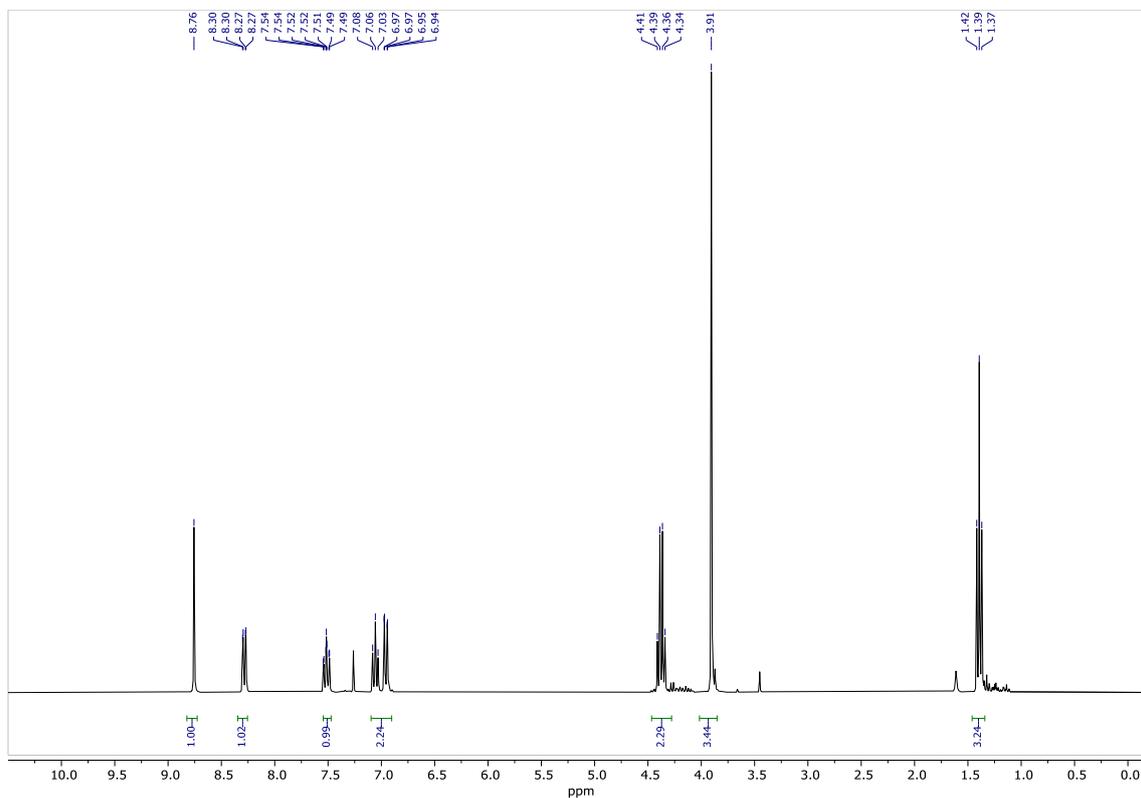




(E)-2-ciano-3-(2-metoxifenil)acrilato de etilo (C₁₃H₁₃NO₃, 5hb)

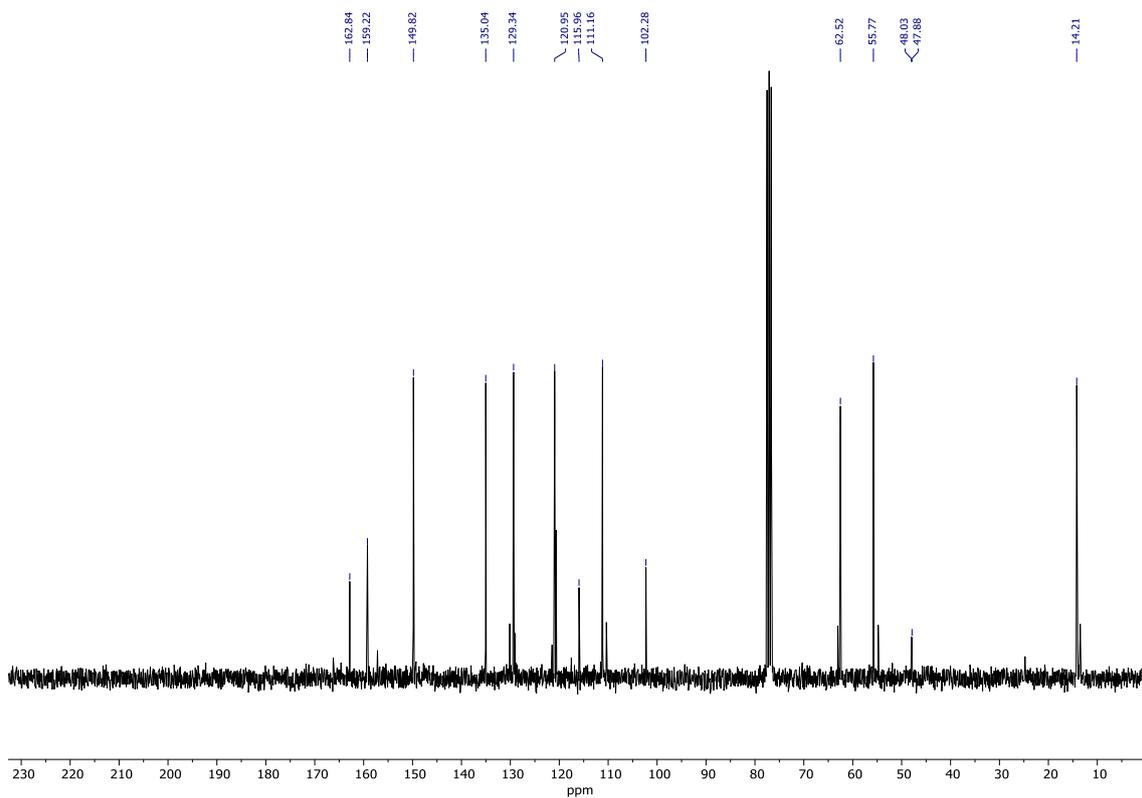


¹H-RMN

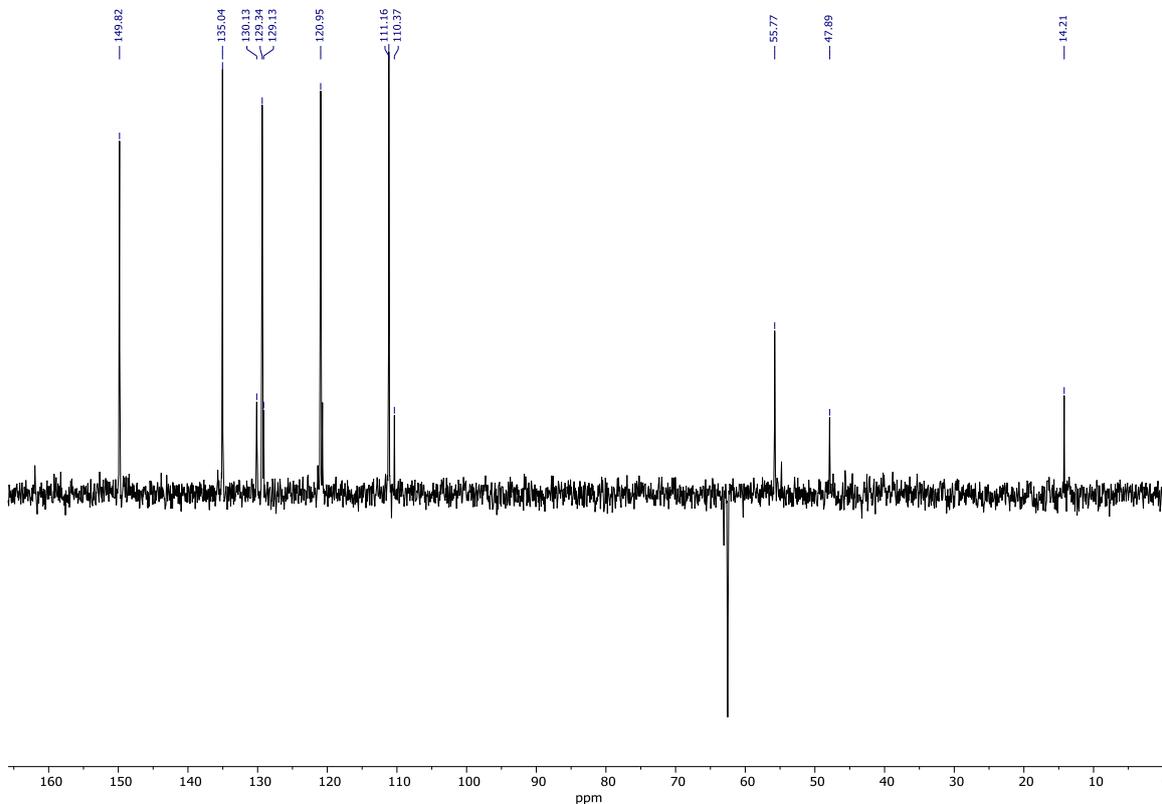




¹³C-RMN

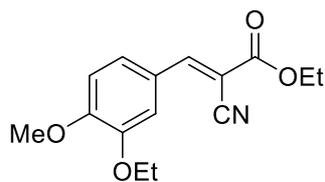


DEPT

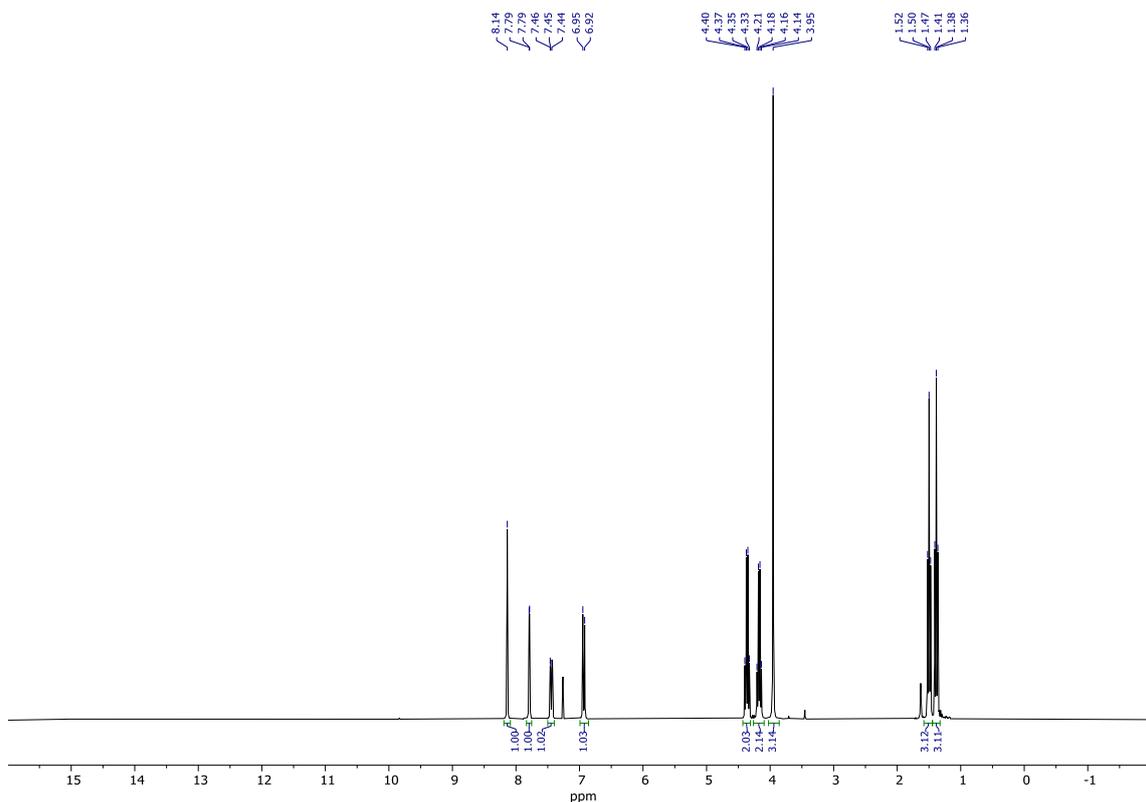




(E)-2-ciano-3-(3-etoxi-4-metoxifenil)acrilato de etilo (C₁₅H₁₇NO₄, 5ib)

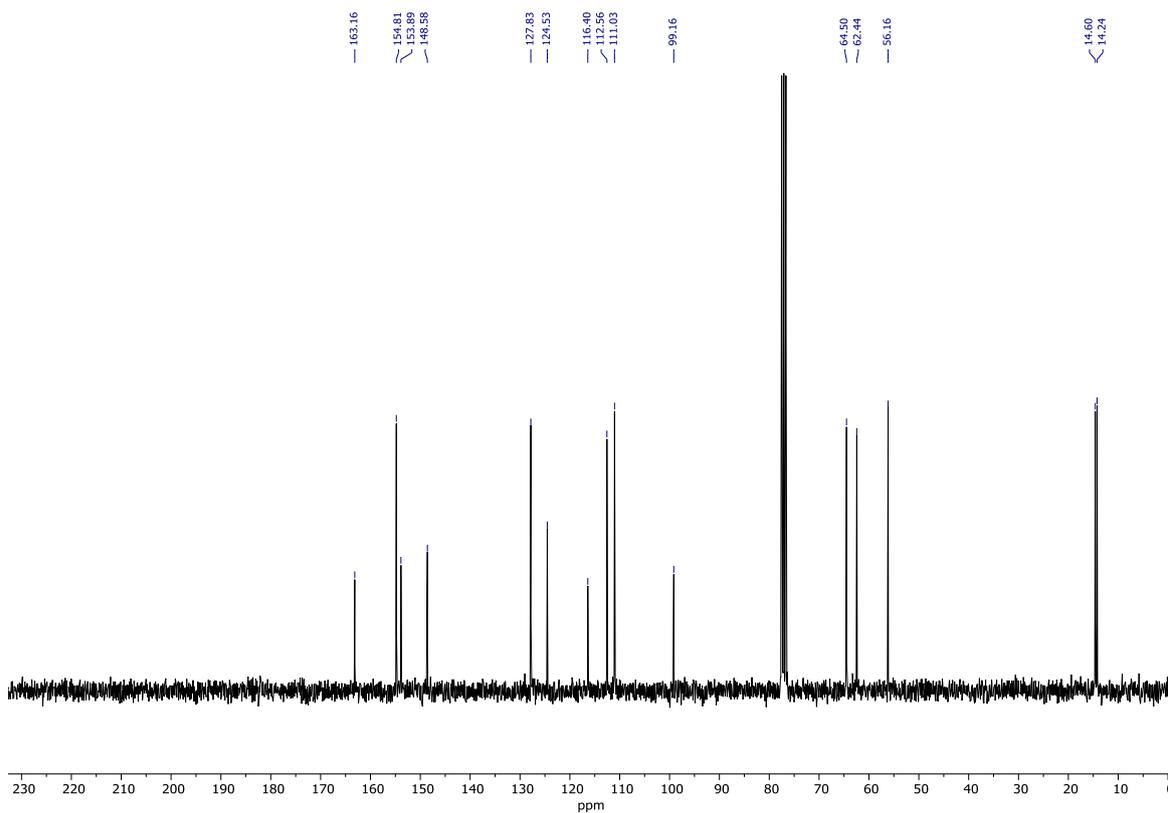


¹H-RMN

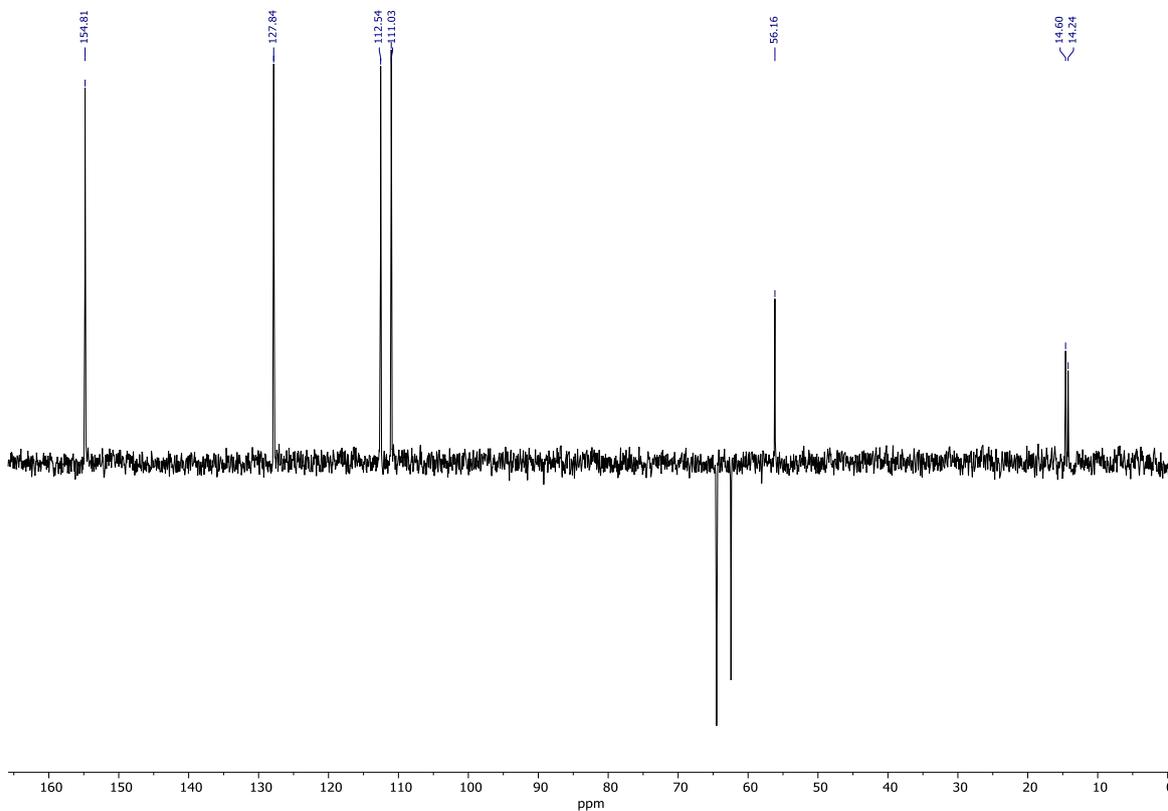




¹³C-RMN

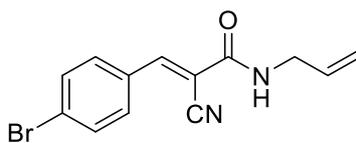


DEPT

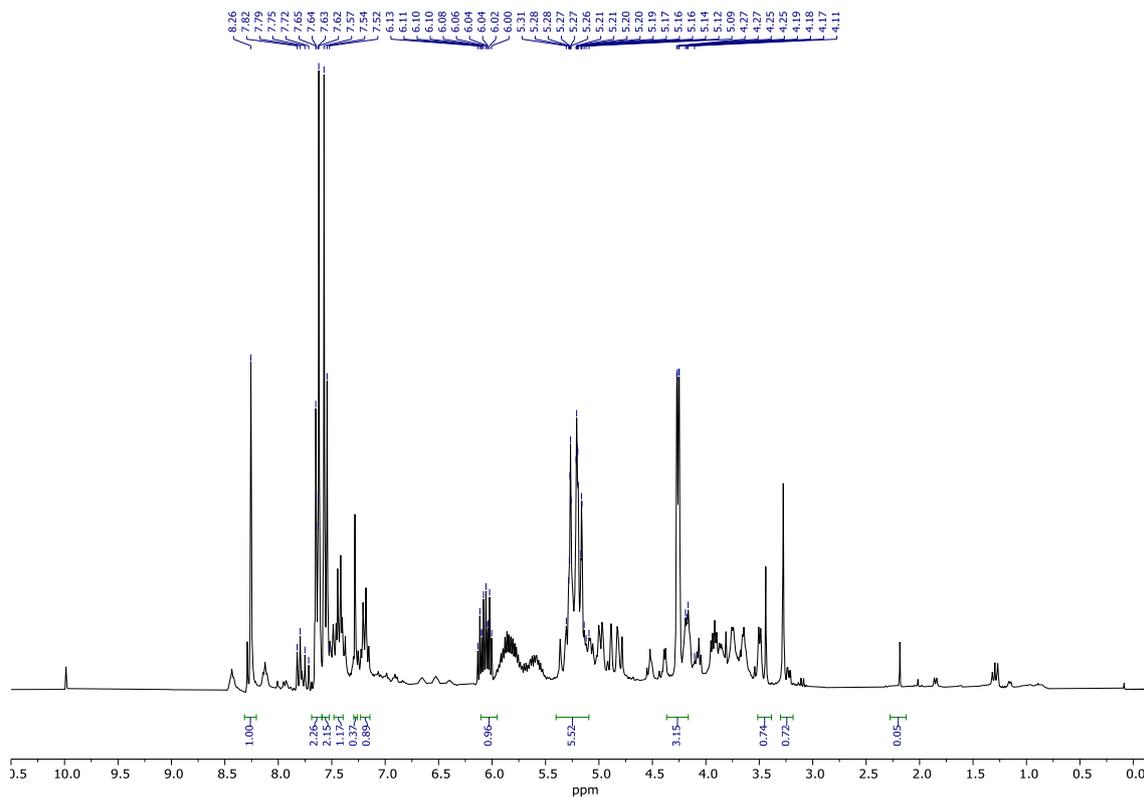




***N*-alil-(*E*)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrilamida (C₁₃H₁₁BrN₂O, 7ca)**

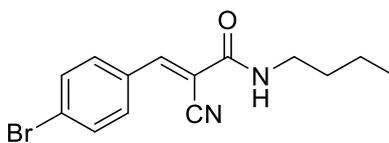


¹H-RMN

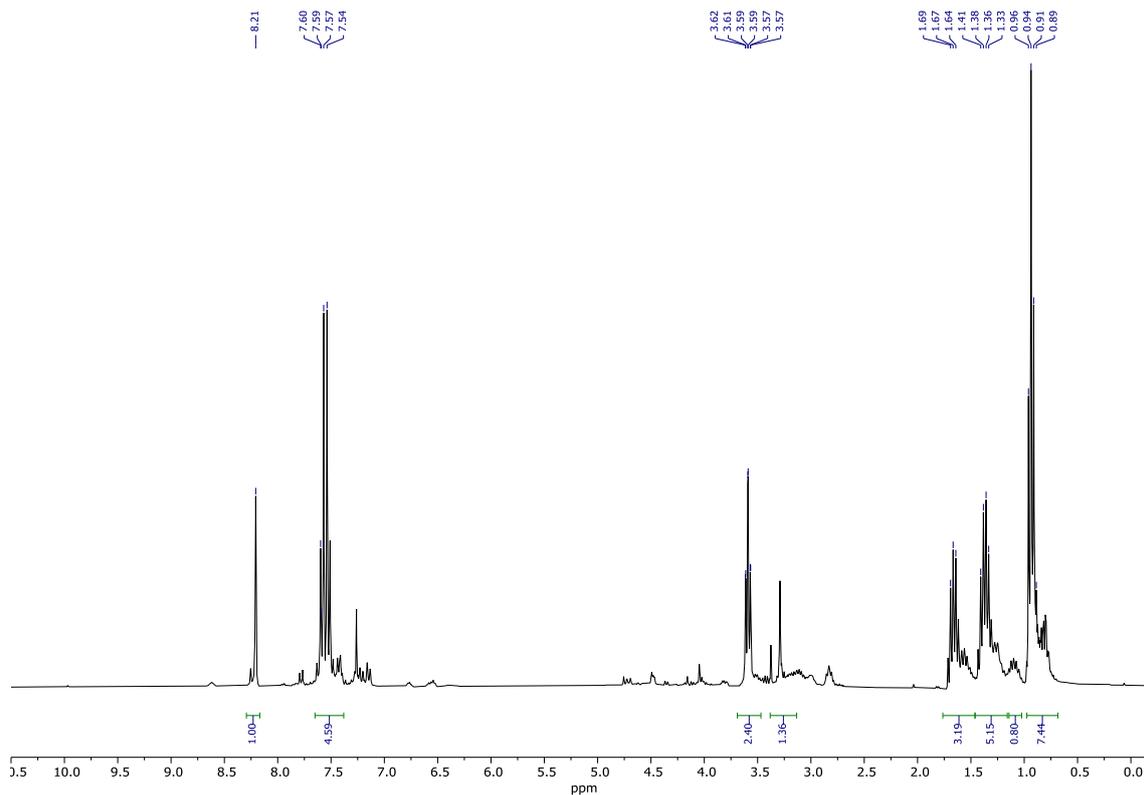




***N*-butil-(*E*)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrilamida (C₁₄H₁₅BrN₂, 7cb)**

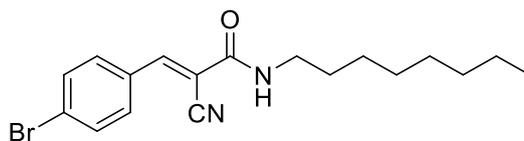


¹H-RMN

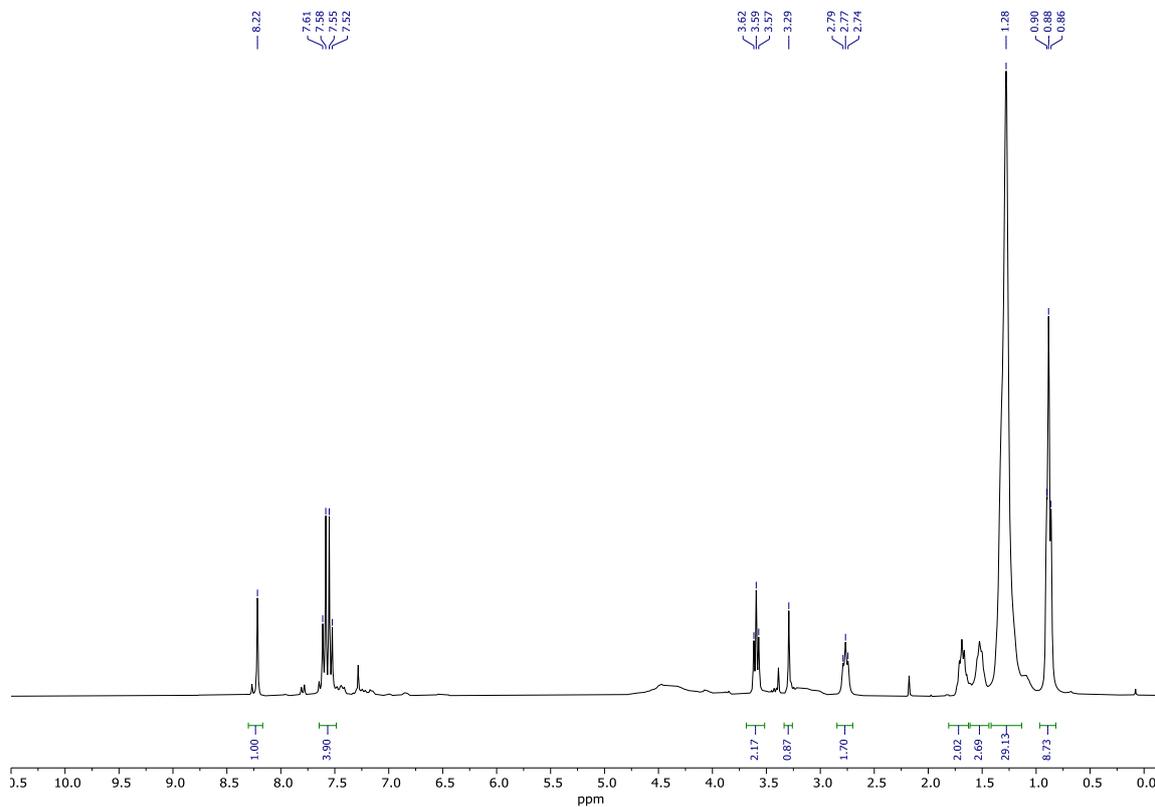




***N*-octil-(*E*)-3-(4-bromofenil)-2-cianoacrilamida (C₁₈H₂₃BrN₂O, 7cc)**

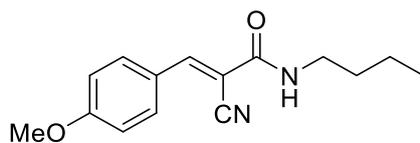


¹H-RMN

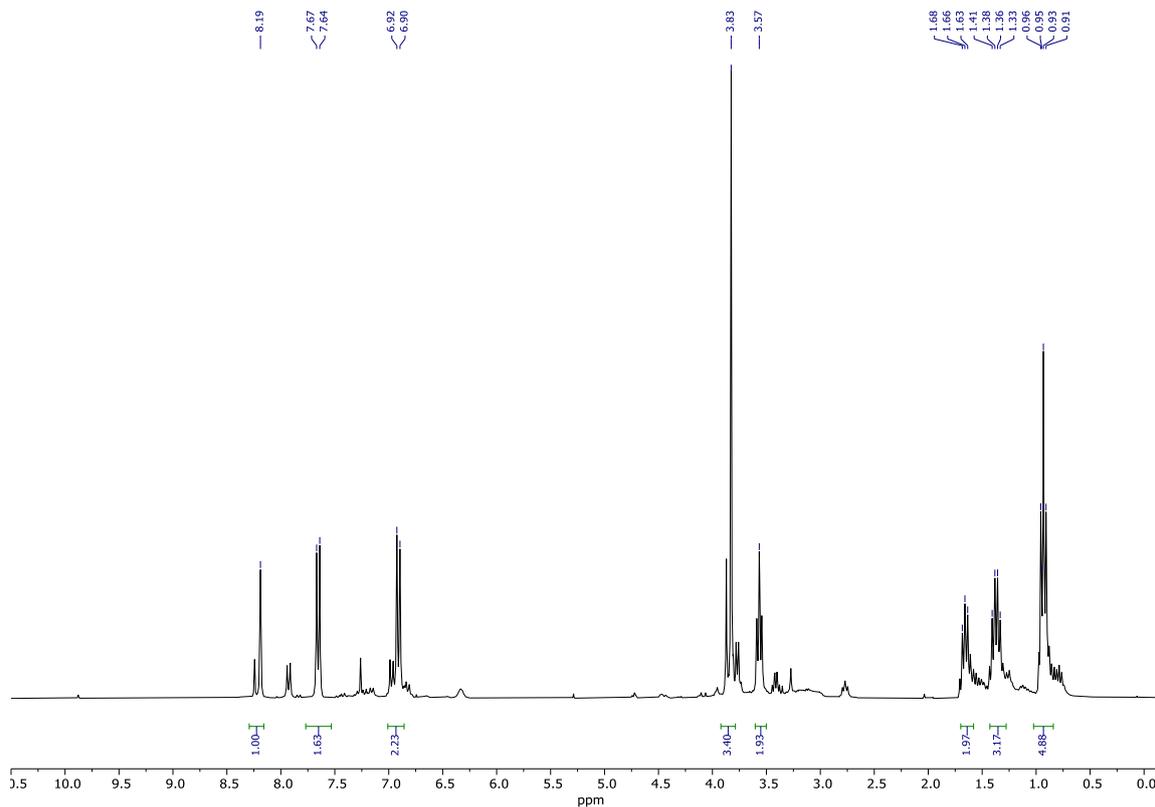




N-butil-(*E*)-3-(4-metoxifenil)-2-cianoacrilamida (C₁₅H₁₈N₂O₂, 7db)

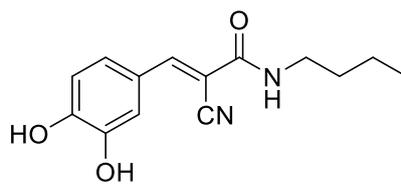


¹H-RMN

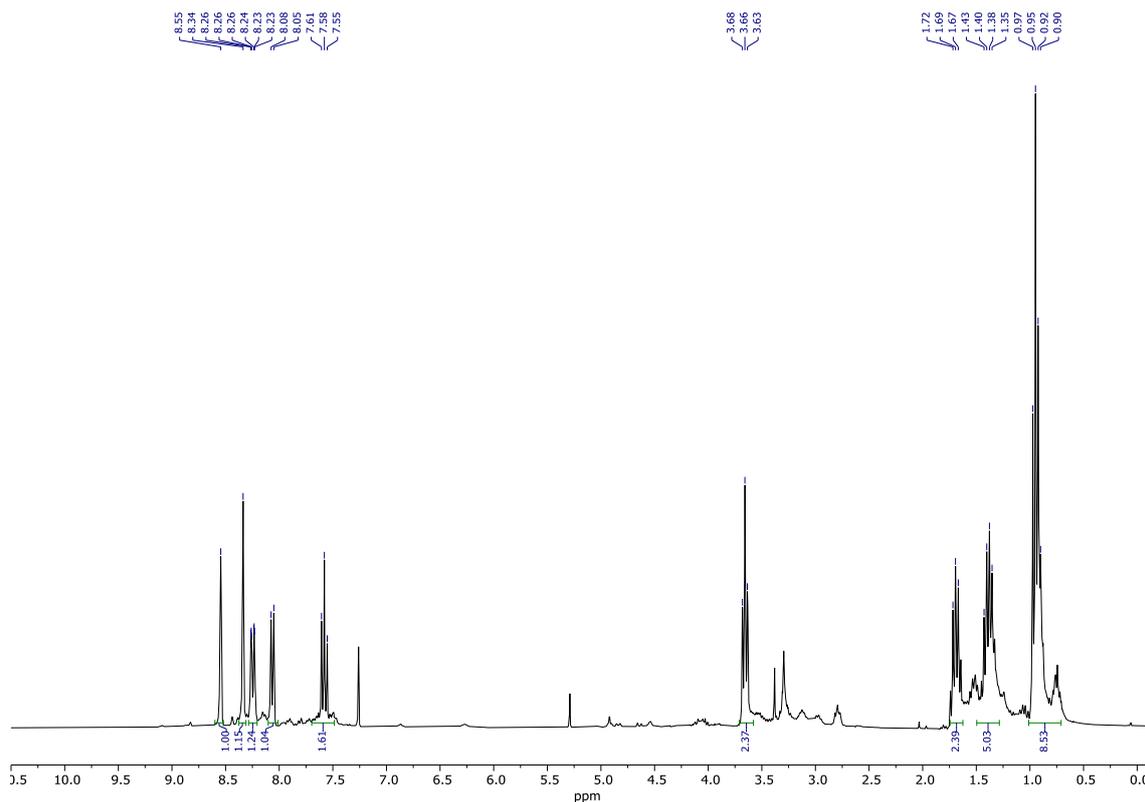




***N*-butil-(*E*)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-cianoacrilamida (C₁₄H₁₆N₂O₃, 7fb)**

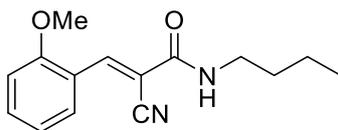


¹H-RMN

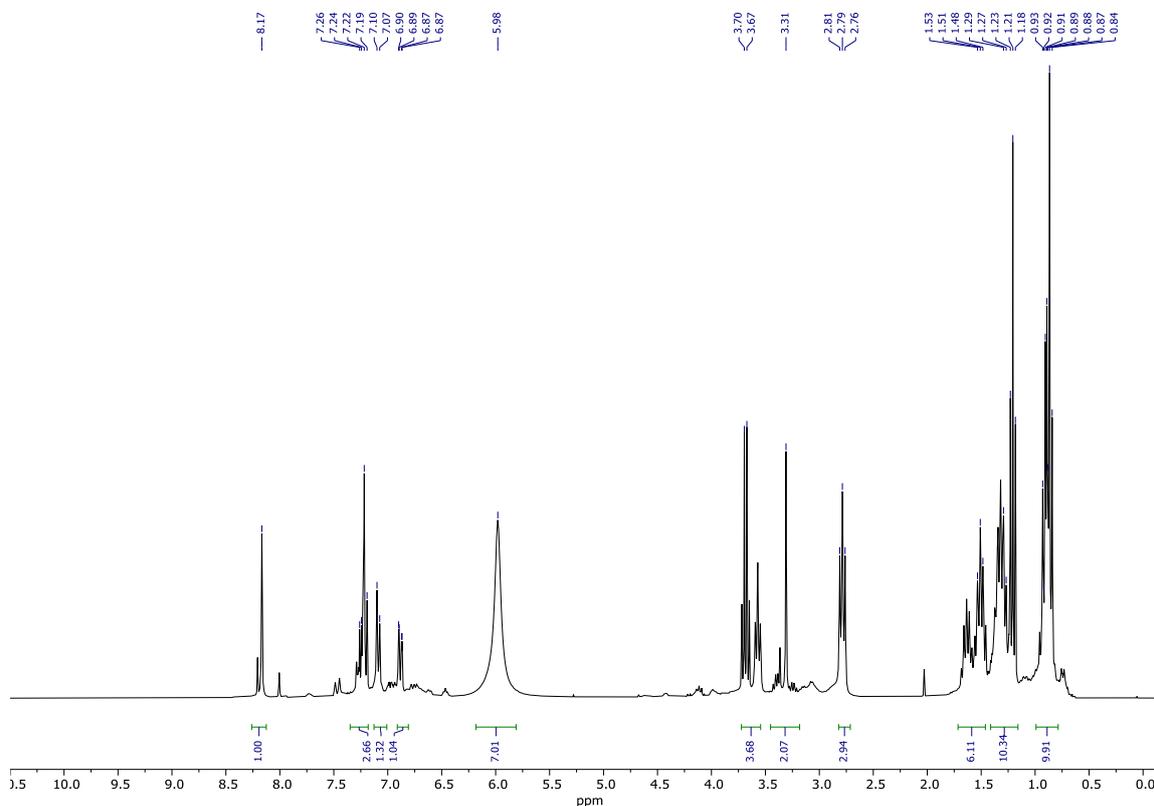




***N*-butil-(*E*)-3-(2-metoxifenil)-2-cianoacrilamida (C₁₅H₁₈N₂O₂, 7hb)**

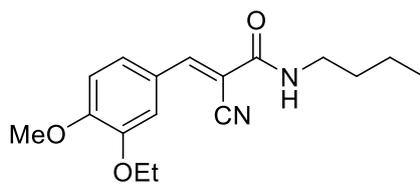


¹H-RMN





***N*-butil-(*E*)-3-(3-etoxi-4-metoxifenil)-2-cianoacrilamida (C₁₇H₂₂N₂O₃, 7ib)**



¹H-RMN

