

**Universidad de Oviedo**

*Programa de doctorado Química Organometálica*

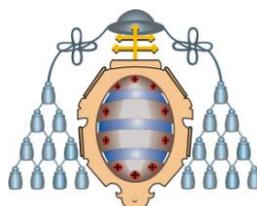
Departamento de Química Orgánica e Inorgánica

# **APLICACIÓN DE FLAVOENZIMAS EN SÍNTESIS ORGÁNICA**

Tesis Doctoral

Ana Rioz Martínez





**Universidad de Oviedo**

*Programa de doctorado Química Organometálica*  
Departamento de Química Orgánica e Inorgánica

## **APLICACIÓN DE FLAVOENZIMAS EN SÍNTESIS ORGÁNICA**

Memoria presentada para optar  
al grado de Doctor en Química  
por Ana Rioz Martínez



*A mis padres y a mi tía Ana*

*Parece que fue ayer cuando María y yo nos encontrábamos en el despacho de Vicente y éste nos propuso pedir una beca de colaboración en su grupo de investigación. A las dos nos salió del alma un: y eso... ¿para qué sirve?. Ese resultó ser el principio de cinco años de tesis doctoral en el grupo de investigación de Bioorgánica. Ahora llega el momento de acabar... pero antes me gustaría agradecer a todas esas personas que han estado a mi lado durante todo este tiempo. La verdad es que me parece una tarea muy complicada transmitir este sentido agradecimiento en una hoja, necesitaría infinitas, porque son infinitas gracias las que quiero dar.*

*Me gustaría empezar dando mis más sinceras gracias a Vicente Gotor, por haberse acordado de mí (de cuando me daba clase en segundo de carrera) y haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación. Gracias Vicente por la confianza depositada.*

*Quiero hacer también especial mención a Gonzalo de Gonzalo porque a él le debo esta tesis. Los comienzos fueron algo complicados, sólo dos becarias y mucho que explorar en un nuevo campo, pero sin duda me alegro de haber acabado donde estoy, formando parte de la pequeña familia de las BVMOs. Gracias Gonzalo por tu orientación y ayuda, tanto en lo científico como en lo personal.*

*Además, he tenido la suerte de tener una compañera de proyecto magnífica. Gracias Cris por ser mentora, compañera, jefa, psicóloga, GPS y sobre todo amiga. Sería imposible imaginar estos cinco años de tesis sin ti.*

*También quiero mostrar mi agradecimiento a Ibo, Egu y Fabri (el grupo de los viejunos) por toda la ayuda que me habéis brindado, tanto en lo personal como en el terreno científico. Por ser como sois y haberme arrancado tantas carcajadas durante estos años.*

*A Alba por su paciencia en la beca de colaboración y a Vicen, por su ayuda durante los primeros días que pisé el laboratorio.*

*A Lara por echarme una mano siempre en todo lo que he necesitado, ya fuera el envío de un paquete, bajar los tubos de una columna para ir a comer o hacer copia de unas llaves, gracias Larita por facilitarnos el trabajo.*

*A todos mis compañeros de laboratorio, mis compis Juan, Anibal y Caroline, mi hermanita Kinga, Mac-Chus, Nico, Kiji, Edu, las chicas de la vitamina (Alba y Tania), Anina y las nuevas y prometedoras incorporaciones (María y Ángela). No quiero olvidar tampoco a los que ya acabaron, Rober, Sergio y Tati. Muchas gracias a todos y a cada uno, por haber llenado los días de trabajo de buenos momentos. Nunca olvidaré las cenas en el Grano de Oro, los partidillos de fútbol (aunque mi tobillo no los eche de menos) y de pádel, los congresos, los vinitos....Gracias por hacerme sentir como en casa, sin ninguna duda os echaré de menos, me parece difícil encontrar un ambiente de trabajo que iguale al del grupo de Bioorgánica.*

*Hay personas como Saúl y María, que además de haber compartido todos estos momentos en el laboratorio, empezaron conmigo la carrera. A ellos junto con Sandra y Fran, quiero agradecerles el haber estado ahí, durante ya diez años. No se me borrarán de la mente los maratones de estudio hasta las tantas y los intercambios de dudas. Parecía que la carrera nunca iba a acabar y ya terminamos hace cinco años. Ojalá que el futuro os depare lo mejor.*

*I would like to thank Marco Fraaije and Jan van Hest for giving me the opportunity of being in their groups. Thank you for your nice welcoming and your scientific discussions. I would also like to thank the Baeyer-Villiger team, Hanna, Anette and Danny, for their help with Biochemistry and above all for fun during my stay in Groningen. My thanks also go to Silvie, Iria, Morten, Sanne and Michal. Thank you for introducing me to the polymersome's world and for all the great moments that I spent in Nijmegen. It is amazing that in only 6 months, all of you have made me consider The Netherlands a second home!!!!!! Thank you for everything!!!!*

*Ik wil graag Marco Fraaije en Jan van Hest bedanken voor de mogelijkheid om in hun onderzoeksgroepen te werken. Dank voor het warme welkom en onze wetenschappelijke discussies. Verder wil ik het Baeyer-Villiger team, Hanna, Anette en Danny, bedanken voor hun hulp met de biochemie en vooral voor de fijne tijd die ik in Groningen heb gehad. Mijn dank gaat ook uit naar Silvie, Iria, Morten, Sanne en Michael voor het mij wegwijs maken in de wereld van de polymersomes en voor de gezelligheid en alle leuke momenten in Nijmegen. Het is wonderbaarlijk dat jullie allen mij in slechts 6 maanden het gevoel hebben gegeven dat Nederland mijn tweede thuis is!! Bedankt voor alles!!!*

*Fuera del terreno profesional quiero dedicar unas líneas a mis amigas de toda la vida, Leti, Silvia, Marta, Ángela, Elena y MariaLui. Gracias por vuestra eterna amistad, por hacerme reír y disfrutar de todos los momentos cotidianos. Y también, a Pablo y su familia por haberme apoyado y animado durante los últimos años.*

*Finalmente, quiero destinar las palabras más profundas y especiales a mis padres y a mi tía Ana. Muchas gracias de corazón por vuestra paciencia, apoyo, dedicación y cariño. Sin vosotros nada de esto hubiera sido posible.*



# ÍNDICE



<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
I.1. Historia de las flavinas.....	4
I.2. Estructura química de las flavinas .....	5
I.3. Propiedades de las flavinas .....	6
I.3.1. Propiedades físicas .....	6
I.3.2. Propiedades espectrales .....	6
I.3.3. Propiedades químicas y redox .....	7
I.4. Papel biológico de las flavinas .....	7
I.5. Versatilidad catalítica de las flavoproteín-monooxigenasas .....	10
I.6. Clasificación de las flavoproteín-monooxigenasas.....	12
I.7. Baeyer-Villiger monooxigenasas.....	14
I.8. Tipos de Baeyer-Villiger monooxigenasas.....	15
I.9. Reacción de oxidación de Baeyer-Villiger .....	20
I.10. Mecanismo de reacción de BVMOs .....	23
I.11. Estructura cristalina (PAMO vs CHMO) .....	24
I.12. Nuevas BVMOs con potencial sintético.....	26
I.12.1. 4-Hidroxiacetofenona monooxigenasa (HAPMO) .....	27
I.12.2. Fenilacetona monooxigenasa ( <i>wt</i> PAMO).....	32
I.12.3. Mutante de la fenilacetona monooxigenasa (PAMO <sub>M446G</sub> ).....	35
 <b>CAPÍTULO 1. Reacción enzimática de Baeyer-Villiger sobre cetonas benzofusionadas</b> .....	 <b>39</b>
<b>Sección 1: Reacción enzimática de Baeyer-Villiger sobre cetonas benzofusionadas aquirales</b>	
<b>Antecedentes</b> .....	<b>41</b>
1.1. Las Baeyer-Villiger monooxigenasas gobiernan la regioselectividad .....	41
1.2. Reacciones catalizadas por BVMOs sobre cetonas benzofusionadas .....	49
1.3. Importancia de los parámetros de reacción en la biocatálisis ....	50
1.4. Enzimas en disolventes orgánicos.....	51
1.5. Baeyer-Villiger monooxigenasas en medios no acuosos .....	53
<b>Resultados y discusión</b> .....	<b>57</b>
1.6. Oxidación enzimática de tetralonas .....	58
1.6.1. Oxidación enzimática de la 1-tetralona.....	58
1.6.2. Oxidación enzimática de la 2-tetralona.....	59
1.7. Oxidación enzimática de indanonas.....	59
1.7.1. Oxidación enzimática de la 2-indanona .....	59
1.7.2. Oxidación enzimática de la 1-indanona .....	62
1.7.3. Oxidación enzimática de derivados de la 1-indanona.....	68
1.8. Oxidación enzimática de la benzociclobutanona .....	71

## Índice

---

<b>Conclusiones</b> .....	<b>73</b>
<b>Parte experimental</b> .....	<b>75</b>
1.9. Técnicas instrumentales .....	75
1.10. Reactivos generales.....	76
1.11. Procedimientos sintéticos .....	77
- Síntesis química de la benzociclobutanona ( <b>11a</b> ) .....	77
- Oxidación de las cetonas benzofusionadas <b>1-10a</b> . Síntesis de sus correspondientes lactonas .....	77
- Síntesis de la 1-isocromanona ( <b>4c</b> ) .....	78
1.12. Procedimientos experimentales .....	78
- Oxidación de las cetonas benzofusionadas <b>1-11a</b> catalizada por BVMOs .....	78
- Reacción enzimática de Baeyer-Villiger a escala multimiligramo. Síntesis enzimática de 6-cloro-1-isocromanona ( <b>5c</b> ), 6-bromo-1-isocromanona ( <b>7c</b> ) y 5-metoxi-1-isocromanona ( <b>8c</b> ) .....	79
1.13. Determinación de las conversiones.....	79
1.14. Datos experimentales .....	80
<b>Sección 2: Reacción enzimática de Baeyer-Villiger sobre cetonas benzofusionadas racémicas</b> .....	<b>97</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>97</b>
1.15. Resolución cinética (KR) y resolución cinética dinámica (DKR) .....	97
1.16. Resolución cinética dinámica catalizada por enzimas .....	100
1.16.1. Resolución cinética dinámica en medio básico .....	100
1.16.2. Resolución cinética dinámica en presencia de resinas de intercambio iónico .....	102
1.17. Resolución cinética dinámica catalizada por BVMOs .....	103
1.18. Síntesis y función biológica de las 3,4-dihidroisocumarinas... ..	105
<b>Resultados y discusión</b> .....	<b>109</b>
1.19. Oxidación enzimática de la (±)-2-metil-1-tetralona.....	109
1.20. Oxidación enzimática de la (±)-2-metil-1-indanona .....	110
1.20.1. Estudio en el tiempo de la resolución cinética dinámica de la (±)-2-metil-1-indanona con la PAMO <sub>M446G</sub> .....	111
1.20.2. Resolución cinética dinámica de la (±)-2-metil-1-indanona en presencia de disolventes orgánicos ...	112
1.20.3. Otros parámetros de reacción que afectan a la resolución cinética dinámica de la (±)-2-metil-1-indanona .....	113
1.21. Resolución cinética dinámica de (±)-2-alquil-1-indanonas catalizadas por la PAMO <sub>M446G</sub> .....	116
1.22. Oxidación enzimática de la (±)-3-metil-1-indanona catalizada por BVMOs.....	118

<b>Conclusiones .....</b>	<b>121</b>
<b>Parte experimental .....</b>	<b>123</b>
1.23. Técnicas instrumentales .....	123
1.24. Reactivos generales .....	124
1.25. Procedimientos sintéticos.....	125
- <i>Síntesis química de la cetona racémica</i>	
<i>(±)-2-isopropil-1-indanona [(±)-15a]</i> .....	125
- <i>Método general para la preparación de las lactonas racémicas</i>	
<i>(±)-12-17b y (±)-16c</i> .....	125
- <i>Método general para la síntesis de las lactonas racémicas</i>	
<i>(±)-13-15c y (±)-17c</i> .....	126
1.26. Asignación de configuraciones absolutas .....	128
1.27. Procedimientos experimentales.....	128
- <i>Oxidación de las cetonas benzofusionadas racémicas</i>	
<i>(±)-12-17a catalizada por BVMOs</i> .....	128
- <i>Oxidación de la cetona racémica 2-metil-1-indanona</i>	
<i>[(±)-13a] catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub> usando como</i>	
<i>medio de reacción diferentes tipos de disoluciones tampón</i> .....	129
- <i>Oxidación de la cetona racémica 2-metil-1-indanona</i>	
<i>[(±)-13a] catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub> en presencia de resinas</i>	
<i>de intercambio aniónico</i> .....	129
- <i>Preparación enzimática de</i>	
<i>3-alkuil-3,4-dihidroisocumarinas quirales (13-16c) a</i>	
<i>escala multimiligramo catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub></i> .....	129
- <i>Protocolo para la obtención del extracto libre de</i>	
<i>células que contiene PAMO<sub>M446G</sub> (PAMO<sub>M446G</sub>-CFE)</i> .....	130
- <i>Preparación enzimática de la lactona quiral</i>	
<i>3-metil-3,4-dihidroisocumarina [(R)-13c] a escala de</i>	
<i>250 mg mediante el extracto libre de células que</i>	
<i>contiene PAMO<sub>M446G</sub></i> .....	130
1.28. Determinación de las conversiones y excesos enantioméricos	131
1.29. Datos experimentales .....	132
<b>CAPÍTULO 2. Síntesis biocatalítica simultánea de compuestos</b>	
<b>ópticamente activos a través de transformaciones cinéticas asimétricas</b>	
<b>interconectadas. Metodología PIKAT .....</b>	<b>155</b>
<b>Antecedentes .....</b>	<b>157</b>
2.1. Catálisis concurrente .....	157
2.2. Regeneración de cofactor en oxidorreductasas .....	159
2.3. Procesos concurrentes con oxidorreductasas .....	161
2.3.1. Sistemas de regeneración de cofactor	
con aplicabilidad sintética.....	164

## Índice

---

2.3.2. Sistemas de regeneración de cofactor con aplicabilidad sintética. Combinación de ADH y BVMO .....	166
<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>169</b>
2.4. Doble resolución enzimática de la (±)-2-fenilpentan-3-ona [(±)- <b>18a</b> ] y del (±)-2-octanol [(±)- <b>21a</b> ] empleando BVMOs y ADHs .....	170
2.5. Doble resolución enzimática de la (±)-4-fenilhexan-3-ona [(±)- <b>19a</b> ] y del (±)-2-octanol [(±)- <b>21a</b> ] empleando BVMOs y ADHs .....	173
2.5.1. Eficacia del cofactor .....	176
2.6. Doble resolución enzimática de la (±)-2-fenilpentan-3-ona [(±)- <b>18a</b> ] y de diferentes alcoholes secundarios empleando BVMOs y ADHs.....	177
2.7. Experimentos adicionales que corroboran que el PIKAT es un sistema concurrente .....	179
<b>Conclusiones .....</b>	<b>183</b>
<b>Parte experimental.....</b>	<b>185</b>
2.8. Reactivos generales.....	186
2.9. Procedimientos sintéticos .....	186
- <i>Síntesis química de las cetonas racémicas (±)-<b>18-20a</b> mediante alquilación en medio bifásico .....</i>	<i>186</i>
- <i>Procedimiento general para la obtención de los ésteres (±)-<b>18-20b</b> mediante reacción de acilación .....</i>	<i>187</i>
- <i>Procedimiento general para la obtención de los ésteres (±)-<b>21-23c</b> mediante reacción de acilación.....</i>	<i>187</i>
2.10. Asignación de configuraciones absolutas .....	188
2.11. Procedimientos experimentales .....	188
2.11.1. Cinética enzimática.....	188
2.11.2. Procedimientos para las reacciones enzimáticas catalizadas por BVMOs.....	189
- <i>Procedimiento general para la resolución cinética simultánea de cetonas y alcoholes racémicos catalizada por una BVMO y una ADH de manera acoplada .....</i>	<i>189</i>
- <i>Optimización de la concentración de NADPH en el sistema bienzimático acoplado .....</i>	<i>189</i>
- <i>Reducción de las cetonas racémicas (±)-<b>18-20a</b> catalizada por ADHs.....</i>	<i>189</i>
- <i>Oxidación de las cetonas <b>21-23b</b> catalizada por BVMOs .....</i>	<i>190</i>
- <i>Oxidación de los alcoholes (±)-<b>21-23a</b> empleando la ADH-T.....</i>	<i>190</i>
- <i>Resolución cinética simultánea de la cetona (±)-<b>19a</b> y el alcohol (±)-<b>21a</b> a escala multimiligramo catalizada por la wtPAMO y la ADH-T .....</i>	<i>190</i>

2.12. Determinación de las conversiones y excesos enantioméricos	191
2.13. Datos experimentales .....	192
<b>CAPÍTULO 3. Resolución cinética dinámica de <math>\beta</math>-cetoésteres <math>\alpha</math>-sustituidos catalizada por BVMOs: Síntesis de <math>\alpha</math>-hidroxiésteres quirales .....</b>	<b>199</b>
<b>Antecedentes .....</b>	<b>201</b>
3.1. BVMOs como biocatalizadores en la síntesis de 1,2-dioles .....	201
3.2. BVMOs como biocatalizadores en la síntesis de $\beta$ -aminoácidos y $\beta$ -aminoalcoholes .....	203
3.3. $\alpha$ -Hidroxiésteres y $\alpha$ -hidroxiácidos .....	206
<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>211</b>
3.4. Oxidación enzimática de ( $\pm$ )- $\beta$ -cetoésteres $\alpha$ -sustituidos .....	211
3.4.1. Oxidación enzimática de ( $\pm$ )-2-metil-3-oxobutan- y -pentan-oatos de alquilo .....	211
3.4.2. Oxidación enzimática de ( $\pm$ )-2-etil-3-oxobutanoatos de alquilo .....	215
3.4.3. Oxidación enzimática de otros ( $\pm$ )- $\beta$ -cetoésteres $\alpha$ -sustituidos que poseen grupos más voluminosos .....	217
3.5. Síntesis de $\alpha$ -hidroxiésteres .....	220
<b>Conclusiones .....</b>	<b>223</b>
<b>Parte experimental .....</b>	<b>225</b>
3.6. Reactivos generales .....	226
3.7. Procedimientos sintéticos .....	227
- Síntesis de $\beta$ -cetoésteres $\alpha$ -sustituidos racémicos ( $\pm$ )- <b>25a</b> , ( $\pm$ )- <b>27-28a</b> y ( $\pm$ )- <b>31-34a</b> .....	227
- Síntesis de los diésteres racémicos ( $\pm$ )- <b>25-31b</b> y ( $\pm$ )- <b>33-34b</b> ....	227
- Síntesis del diéster racémico 2-acetoxipenten-4-oato de etilo [( $\pm$ )- <b>32b</b> ] .....	228
3.8. Asignación de configuraciones absolutas .....	229
3.9. Procedimientos experimentales .....	230
- Oxidación de los $\beta$ -cetoésteres $\alpha$ -sustituidos racémicos ( $\pm$ )- <b>25-34a</b> catalizada por BVMOs .....	230
- Estudio de la concentración de sustrato en la oxidación de ( $\pm$ )- <b>31a</b> catalizada por la wtPAMO en dos medios de reacción diferentes .....	230
- Oxidación de los $\beta$ -cetoésteres $\alpha$ -sustituidos racémicos ( $\pm$ )- <b>25-34a</b> a escala multimiligramo catalizada por la wtPAMO .....	230
- Hidrólisis enzimática del diéster (S)- <b>31b</b> .....	231
- Hidrólisis química de los diésteres (S)- <b>27-33b</b> .....	231
3.10. Determinación de las conversiones y excesos enantioméricos	231
3.11. Datos experimentales .....	233

<b>CAPÍTULO 4. Preparación enzimática de sulfóxidos quirales empleando Baeyer-Villiger monooxigenasas.....</b>	<b>257</b>
<b>Antecedentes.....</b>	<b>259</b>
4.1. Importancia de los sulfóxidos.....	259
4.2. Síntesis de sulfóxidos quirales.....	262
4.3. Síntesis de sulfóxidos quirales mediante reacciones catalizadas por BVMOs.....	263
4.4. Oxidaciones de otro tipo de compuestos de azufre catalizadas por BVMOs.....	267
<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>271</b>
4.5. Oxidación enzimática de heteroaril alquil sulfuros.....	271
4.5.1. Oxidación enzimática de (alquiltio)piridinas.....	271
4.5.2. Oxidación enzimática de otros sulfuros heteroaromáticos.....	273
4.6. Oxidación enzimática de ciclohexil alquil sulfuros.....	275
4.6.1. Efecto del pH en la oxidación enzimática del ciclohexil metil sulfuro catalizada por BVMOs.....	276
4.7. Oxidación enzimática de sulfuros alifáticos cíclicos y lineales.....	277
4.8. Oxidación enzimática de sulfóxidos racémicos catalizada por la HAPMO.....	279
4.9. Parámetros cinéticos de la HAPMO para la oxidación de sulfuros proquirales.....	280
<b>Conclusiones.....</b>	<b>281</b>
<b>Parte experimental.....</b>	<b>283</b>
4.10. Reactivos generales.....	284
4.11. Procedimientos sintéticos.....	285
- Síntesis química de los sulfuros <b>35a</b> , <b>37a</b> y <b>42-44a</b> .....	285
- Síntesis química de la 3-(metiltio)piridina ( <b>36a</b> ).....	285
- Síntesis química de los sulfuros <b>38-41a</b> y <b>50-51a</b> .....	286
- Síntesis química de 2-(metiltio)benzoxazol ( <b>47a</b> ).....	286
- Síntesis química de los sulfóxidos ( $\pm$ )- <b>35-40b</b> , ( $\pm$ )- <b>45-46b</b> , ( $\pm$ )- <b>49-50b</b> , <b>52b</b> , <b>53b</b> , ( $\pm$ )- <b>54-56b</b> .....	286
- Oxidación asimétrica de los sulfuros <b>36-38a</b> , <b>40a</b> y <b>50a</b> empleando el método de Kagan.....	287
4.12. Asignación de configuraciones absolutas.....	288
4.13. Procedimientos experimentales.....	289
4.13.1. Cinética enzimática.....	289
4.13.2. Procedimientos para las reacciones enzimáticas catalizadas por BVMOs.....	289
- Oxidación de sulfuros <b>35-56a</b> y sulfóxidos ( $\pm$ )- <b>35-37b</b> , ( $\pm$ )- <b>49b</b> y ( $\pm$ )- <b>56b</b> , catalizada por BVMOs.....	289
- Preparación enzimática de sulfóxidos quirales (S)- <b>35-36b</b> , (R)- <b>37b</b> , (S)- <b>38-40b</b> , (S)- <b>49b</b> y (S)- <b>54-55b</b> a escala	

<i>multimiligramo mediante el extracto libre de células que contiene HAPMO</i> .....	290
4.14. Determinación de las conversiones y excesos enantioméricos	291
4.15. Datos experimentales .....	293
<b>CAPÍTULO 5. Evaluación del potencial biocatalítico de la flavín-monooxigenasa de <i>Methylophaga sp. SK1 (mFMO)</i></b> .....	<b>323</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>325</b>
5.1. Flavín-monooxigenasas .....	326
5.1.1. Historia de las flavín-monooxigenasas .....	326
5.1.2. Tipos, origen y función biológica de las flavín-monooxigenasas .....	327
5.1.3. Flavín-monooxigenasa de <i>Methylophaga sp. SK1 (mFMO)</i> .....	330
5.2. Monooxigenasas autosuficientes .....	332
<b>Resultados y discusión</b> .....	<b>337</b>
5.3. Estudio cinético de las propiedades biocatalíticas de la PTDH-mFMO .....	337
5.4. Oxidación enzimática de derivados de indol catalizada por la PTDH-mFMO .....	338
5.5. Oxidación enzimática de sulfuros catalizada por la PTDH-mFMO .....	340
5.5.1. Oxidación enzimática de derivados de tioanisol .....	341
5.5.2. Estudio de algunos factores que afectan a la catálisis con la PTDH-mFMO .....	342
5.5.3. Oxidación enzimática de otros sulfuros .....	344
5.5.4. Oxidación enzimática catalizada por la PTDH-mFMO en disolventes orgánicos .....	346
<b>Conclusiones</b> .....	<b>349</b>
<b>Parte experimental</b> .....	<b>351</b>
5.6. Reactivos generales .....	352
5.7. Procedimientos sintéticos .....	353
- Síntesis química de los sulfuros <b>68a</b> y <b>70a</b> .....	353
- Síntesis química del feniletil metil sulfuro ( <b>71a</b> ) .....	353
- Síntesis química del acetato de 4-(metiltio)fenilo ( <b>58c</b> ) .....	353
- Síntesis química de los sulfóxidos ( $\pm$ )- <b>57-71b</b> .....	354
- Oxidación asimétrica de la 1-(4-(metiltio)fenil)etanona ( <b>64a</b> ) empleando el método de Kagan .....	354
- Oxidación asimétrica del acetato de 4-(metiltio)fenilo ( <b>58c</b> ) empleando el método de Kagan .....	355
5.8. Asignación de configuraciones absolutas .....	355
5.9. Procedimientos experimentales .....	356

## Índice

---

5.9.1. Cinética enzimática.....	356
- <i>Determinación de los parámetros cinéticos</i> .....	356
- <i>Estudio de la actividad enzimática frente a la temperatura</i> .....	357
- <i>Estudio de la estabilidad térmica de la PTDH-mFMO</i> .....	357
5.9.2. Procedimientos para las reacciones enzimáticas catalizadas por la PTDH-mFMO .....	357
- <i>Protocolo para la obtención de la PTDH-mFMO aislada</i> .....	357
- <i>Oxidación de sulfuros 35a, 45-46a, 49a, 53-73a</i> <i>catalizada por la PTDH-mFMO</i> .....	358
- <i>Preparación enzimática del</i> <i>(S)-1-cloro-4-(metilsulfinil)benceno [(S)-61b]</i> <i>a escala multimiligramo catalizada por la PTDH-mFMO</i> .....	358
- <i>Oxidación del indol y sus derivados catalizada por la</i> <i>PTDH-mFMO</i> .....	359
5.10. Determinación de las conversiones y excesos enantioméricos	359
5.11. Datos experimentales .....	361

# **INTRODUCCIÓN**



Desde su descubrimiento en 1879<sup>1</sup> y su caracterización química en los años 30,<sup>2</sup> las flavinas han sido consideradas como compuestos de vital importancia, ya que participan en prácticamente todos los procesos metabólicos. Esto hace que tengan un papel biológico esencial, tanto en pequeños organismos como son las bacterias, como en organismos más complejos como los seres humanos.

Hoy en día las flavinas son consideradas compuestos muy versátiles, ya que debido a su estructura pueden actuar como nucleófilos o electrófilos en numerosos procesos catalíticos. Su principal función biológica es la participación en procesos de transferencia electrónica bien de uno o dos electrones. Debido a su capacidad para generar superóxidos, las flavinas contribuyen al denominado “estrés oxidativo” (desequilibrio celular por la formación de numerosas especies reactivas de oxígeno), aunque al mismo tiempo, están directamente relacionadas con la reducción de hidroperóxidos.<sup>3</sup>

---

<sup>1</sup> Blyth, A. W. *J. Chem. Soc.* **1879**, 35, 530-539.

<sup>2</sup> (a) Kuhn, R.; Reinemund, K.; Weygand, F. *Helv. Chim. Acta* **1934**, 67, 1460-1463; (b) Karrer, P.; Schöpp, K.; Benz, F. *Helv. Chim. Acta* **1935**, 18, 426-429.

<sup>3</sup> Massey, V. *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, 28, 283-296.

## I.1. HISTORIA DE LAS FLAVINAS

Hace aproximadamente unos 130 años un químico inglés llamado, A. Wynter Blyth publicó en la revista Transactions of Chemical Society su trabajo acerca de la composición química de la leche de vaca.<sup>1</sup> Uno de los componentes que había aislado era un pigmento amarillo brillante, al cual llamó lactocromo, para posteriormente recibir el nombre de ovoflavina y finalmente ser conocida como riboflavina. Se necesitaron unos 50 años para que Richard Kuhn y Paul Karrer determinaran su estructura y la corroboraran mediante una síntesis química.<sup>2</sup> Este pigmento amarillo atrajo numeroso interés debido a su fluorescencia verdosa y a su fácil aislamiento desde numerosas fuentes. Este interés aumentó aún más cuando fue reconocido como un sustituyente del complejo de la vitamina B.

La forma fosforilada de la riboflavina, el flavín mononucleótido (FMN), fue identificada como el cofactor del enzima “Old Yellow Enzyme” (OYE) de la levadura de cerveza, una de las primeras flavoproteínas caracterizada bioquímicamente. En 1935 un bioquímico sueco, Hugo Theorell, descubrió que el FMN podía ser químicamente desprendido del enzima, obteniendo por un lado el cofactor libre y por otro la apoproteína (ambos individualmente inactivos). Cuando el cofactor se volvía a unir a la apoproteína mediante un adecuado pH, se obtenía de nuevo la holoenzima coloreada y activa.<sup>4</sup>

Unos años más tarde, Hans Krebs descubrió la existencia de otra flavoproteína, la D-amino ácido oxidasa.<sup>5</sup> En 1938, Warburg y Christian demostraron que esta proteína podía ser también separada en apoproteína y flavina, de la misma manera que se había descrito previamente para la OYE.<sup>6</sup> En este caso la estructura de la flavina era el producto de condensación de FMN y AMP (adenosina monofosfato). Este hecho fue corroborado en 1954 por Todd y colaboradores,<sup>7</sup> siendo conocida esta nueva flavina como flavin-adenín dinucleótido (FAD).

---

<sup>4</sup> Theorell, H. *Biochem. Z.* **1935**, 275, 344-346.

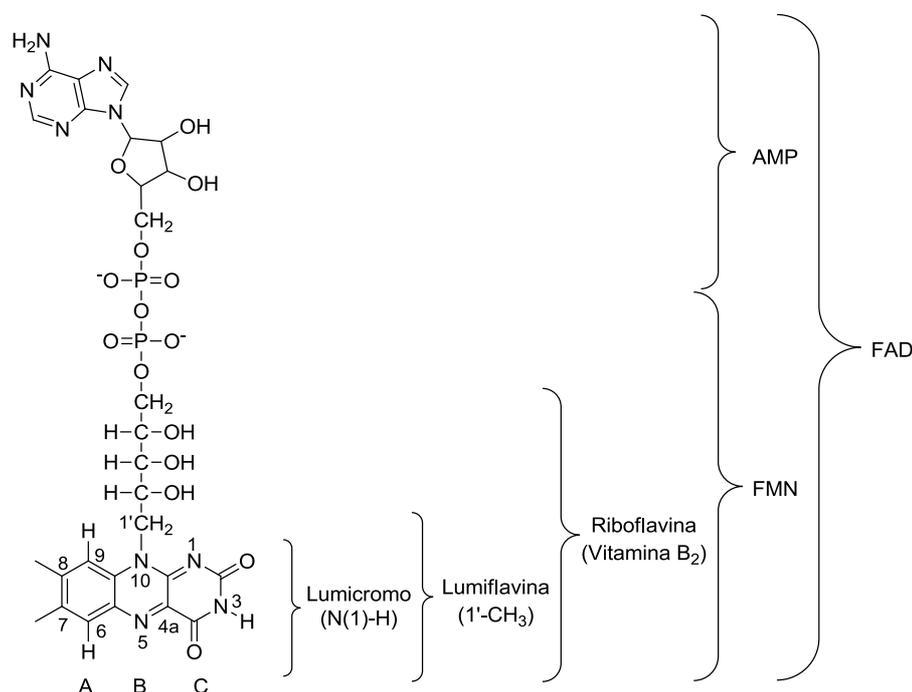
<sup>5</sup> Krebs, H. A. *Biochem. J.* **1935**, 29, 1620-1625.

<sup>6</sup> Warburg, O.; Christian, W. *Biochem. Z.* **1938**, 298, 150-155.

<sup>7</sup> Christie, S. M. H.; Kenner, G. W.; Todd, A. R. *J. Chem. Soc.* **1954**, 46-52.

## I.2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS FLAVINAS

El núcleo de la molécula de flavina es el anillo de isoaloxacina, cuya estructura se muestra en la Figura I.1. Hay que destacar que la isoaloxacina es el tautómero de la termodinámicamente favorecida aloxacina (la cual está protonada en el N(1)), y está constituida por la fusión formal de los elementos xileno (el anillo A), pirazina (el anillo B) y pirimidina (el anillo C).<sup>8</sup> La isoaloxacina es la responsable del color amarillento de las flavinas, cuyo nombre viene del latín (*flavus*, amarillo). La unión de una molécula de ribosa a este heterociclo origina la riboflavina, también conocida como vitamina B<sub>2</sub>. La riboflavina ha de ser fosforilada para que pueda actuar como cofactor, generando el FMN. Cuando el FMN se conjuga con adenosina monofosfato se obtiene el cofactor más común, el FAD.



**Figura I.1.** Estructura y nomenclatura de flavinas y análogos.

<sup>8</sup> Ghisla, S.; Edmondson, D. E. en *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Chichester **2009**, 1-9.

### 1.3. PROPIEDADES DE LAS FLAVINAS

#### 1.3.1. PROPIEDADES FÍSICAS

Todas la flavinas son sólidos cristalinos amarillentos en su estado natural. La solubilidad acuosa de la lumiflavina y la riboflavina es bastante baja ( $<10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>), mientras que la del FMN y FAD es mayor (aproximadamente 0.1 mol L<sup>-1</sup>), debido a la carga negativa de sus cadenas laterales fosforiladas.

#### 1.3.2. PROPIEDADES ESPECTRALES

El color amarillento de la flavinas se debe al estado de transición más bajo de la molécula de isoaloxacina, situado sobre 450 nm. Además de ésta, existen otras 3 transiciones electrónicas importantes más en el espectro de visible ultravioleta (UV). La banda de absorción a 450 nm, que corresponde a la transición de menor energía, se debe a la transferencia de carga del anillo de xileno (A) hacia el anillo pirimidínico (C). El espectro de absorción de estas moléculas depende totalmente del estado de ionización de la isoaloxacina (Figura I.2).

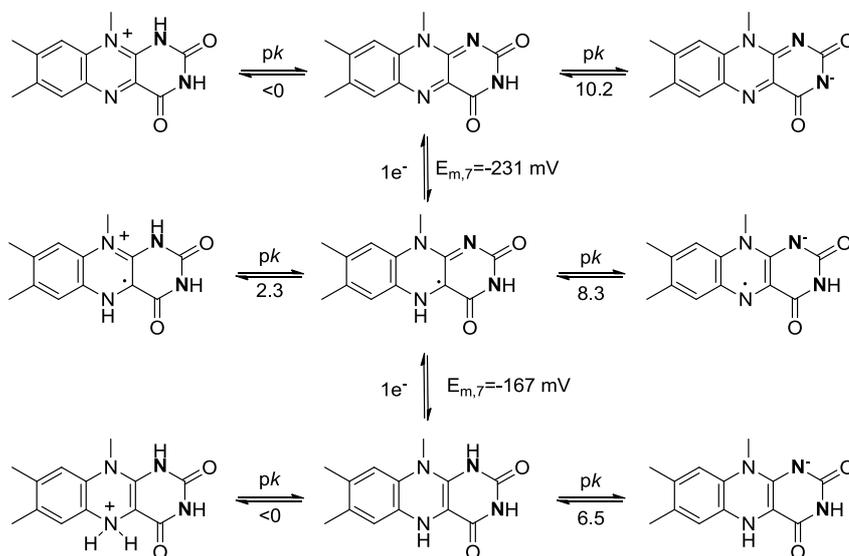


Figura I.2. Diferentes estados redox y de ionización de las flavinas.

Los diferentes estados de oxidación están relacionados con la protonación de N(1) ( $pK \approx 0$ ), y la desprotonación en la posición N(3)-H ( $pK = 10.2$ ). El estado de protonación y desprotonación de las flavinas depende del medio que las rodea, y por tanto no es lo mismo que la flavina se encuentre en disolución, formando parte de una membrana lipídica o bien como cofactor en proteínas.

Las flavinas son compuestos fluorescentes. La emisión de fluorescencia de la flavina oxidada es de un color amarillo-verdoso y su máximo de emisión se encuentra a 520 nm.

### **1.3.3. PROPIEDADES QUÍMICAS Y REDOX**

Las propiedades químicas de las flavinas están determinadas por el sistema formado por los tres anillos. La pirimidina es un heterociclo deficiente en electrones, mientras que la parte correspondiente al anillo de benceno es más rica electrónicamente. La pirazina es el nexo de unión de ambas y el centro reactivo de la mayoría de la química de las flavinas. Las posiciones N(5) y C(4a) tienen un carácter electrófilo, por tanto son puntos clave para un ataque nucleófilo. Por otro lado, la parte pirimidínica es hidrofílica y puede establecer numerosas interacciones de puentes de hidrógeno con las proteínas. Por el contrario la parte del xileno es hidrofóbica y no se han encontrado mayores interacciones específicas que aquellas con la parte aromática de las cadenas laterales de los aminoácidos que forman las proteínas. Por todo esto, la molécula de isoaloxazina puede participar en un gran número de reacciones químicas, siendo objeto tanto de adiciones como de sustituciones.

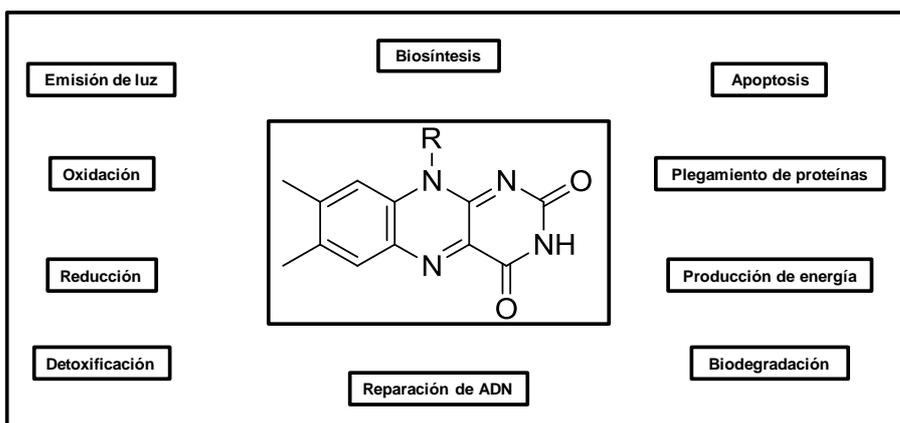
### **1.4. PAPEL BIOLÓGICO DE LAS FLAVINAS**

Las flavinas intervienen en un gran número de fenómenos biológicos (Figura I.3). Estos compuestos juegan un papel muy importante en el metabolismo aerobio, ya que catalizan deshidrogenaciones de numerosos sustratos y participan en la transferencia electrónica a centros metálicos, a través de sus formas radicalarias.

La versatilidad química de las flavinas está claramente controlada por interacciones específicas con las proteínas a las que se encuentran unidas. Por ejemplo, la proteína unida a riboflavina (*riboflavin-binding protein*) está íntimamente relacionada con el desarrollo de ciertas aves y el feto en los

## Introducción

mamíferos.<sup>9</sup> Algunas flavoproteínas encontradas en microsomas hepáticos catalizan reacciones muy similares a las llevadas a cabo por los enzimas citocromo P450.<sup>10</sup> Recientemente se ha descubierto que las flavoproteínas están involucradas en la muerte celular programada (apoptosis celular)<sup>11</sup> y en la regulación del reloj biológico (relacionado con el ajuste del *jet lag*).<sup>12</sup> Además participan en la detoxificación de suelos, mediante la hidroxilación de compuestos contaminantes aromáticos.<sup>13</sup> También están involucradas en procesos dependientes de luz, como por ejemplo la fotosíntesis,<sup>14</sup> el fototropismo en plantas,<sup>15</sup> la reparación de ácidos nucleicos y la producción de luz en bacterias bioluminiscentes.<sup>16</sup>



**Figura I.3.** Funciones biológicas de las flavoproteínas.

<sup>9</sup> (a) Ramana Murty, C. V.; Adiga, P. R. *Science* **1982**, *216*, 191-193; (b) White, H. B.; Merrill, A. H. *Annu. Rev. Nutr.* **1988**, *8*, 279-299.

<sup>10</sup> Lyanagi, T.; Makino, N.; Mason, H. S. *Biochemistry* **1974**, *13*, 1701-1710.

<sup>11</sup> Susin, S. A.; Lorenzo, H. K.; Zamzami, N.; Marzo, I.; Snow, B. E.; Brothers, G. M.; Mangion, J.; Jacotot, E.; Constantini, P.; Loeffler, M.; Larochett, N.; Goodlett, D. R.; Aebersold, R.; Siderovski, D. P.; Penninger, J. M.; Kroemer, G. *Nature* **1999**, *397*, 441-445.

<sup>12</sup> Ishiwaka, H.; Todo, T.; Matsumoto, A.; Tanimura, T.; Togashi, S.; Ueda, R. en *Flavins and Flavoproteins*. Eds. Ghisla, S.; Kroneck, P.; Macheroux, P.; Sund, H. Rudolf Weber Agency for Scientific Publications, Berlin **1999**, 317-320.

<sup>13</sup> Dagley, S. *Annu. Rev. Microbiol.* **1987**, *41*, 1-23.

<sup>14</sup> Zanetti, G.; Aliverti, A. en *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*. Ed. Müller, F. CRC Press, Boca Raton **1991**, 305-351.

<sup>15</sup> Jorns, M. S.; Wang, B.; Jordan, S. P. *Biochemistry* **1987**, *26*, 6810-6816.

<sup>16</sup> Briggs, W. R.; Christie, J. M.; Knieb, E.; Salomon, M. en *Flavins and Flavoproteins*. Eds. Ghisla, S.; Kroneck, P.; Macheroux, P.; Sund, H. Rudolf Weber Agency for Scientific Publications, Berlin **1999**, 299-308.

Debido a la cantidad y diversidad de funciones biológicas en las que intervienen, las flavoproteínas están muy presentes en la naturaleza. La mayoría de flavoproteínas con actividad catalítica (flavoenzimas) pertenecen al grupo de las oxidoreductasas (EC 1.x.x.x).<sup>17</sup> Estos enzimas son los encargados de catalizar procesos de oxidación y reducción mediante la transferencia de electrones entre dos especies químicas. Podemos clasificar a las flavoenzimas en cinco diferentes subclases dentro de las oxidoreductasas.<sup>18</sup>

- Flavoproteín-reductasas: Usan principalmente nicotinamidas como electrón-donores y ceden los electrones de estos cofactores a un sustrato o a otro electrón-aceptor.
- Flavoproteín-deshidrogenasas: Oxidan sustratos orgánicos y usan principalmente quinonas y proteínas de transferencia de electrones como aceptores de electrones. Un ejemplo de este tipo de flavoproteínas es la succinato deshidrogenasa.<sup>19</sup>
- Flavoproteín-disulfuro-oxidoreductasas: Estos enzimas contienen tioles en su centro activo. Utilizan NAD(P)<sup>+</sup> para oxidar éstos a disulfuros y generar NADPH, o bien, utilizan NADPH para reducir los disulfuros a tioles, generando NADP<sup>+</sup>.
- Flavoproteín-oxidasas: Catalizan la oxidación de sustratos mediante una transferencia de electrones, donde la flavina es reducida y posteriormente oxidada por el oxígeno, reduciéndose éste a peróxido de hidrógeno. Ejemplos de estos enzimas son alcohol oxidasas,<sup>20</sup> monoamino oxidasas,<sup>21</sup> o L/D-aminoácido oxidasas.<sup>22</sup>

---

<sup>17</sup> (a) Holland, H. L.; Weber, H. K. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 547-553; (b) Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Allen, C. C. R. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 564-573; (c) van Beilen, J. B.; Duetz, W. A.; Schmid, A.; Witholt, B. *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 170-177; (d) Xu, F. *Ind. Biotechnol.* **2005**, *1*, 38-50.

<sup>18</sup> van Berkel, W. J. H en Chemistry of *Flavoenzymes*, *Chemistry of Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. Ed. Begley, T. P. Wiley-VCH, Weinheim **2009**, 17-27.

<sup>19</sup> Cecchini, G.; Schröder, I.; Gunsalus, R. P.; Maklashina, E. *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1553*, 140-157.

<sup>20</sup> Leferink, N. G. H.; Heuts, D. P. H. M.; Fraaije, M. W.; van Berkel, W. J. H. *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *474*, 292-301.

<sup>21</sup> (a) Binda, C.; Newton-Vinson, P.; Hubalek, F.; Edmonson, D. E.; Mattevi, A. *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 22-26; (b) Rimoldi, J. M.; Puppali, S. G.; Isin, E.; Bissel, P.; Khalil, A.; Castagnoli, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5808-5813.

<sup>22</sup> (a) Ronchi, S.; Minchiotti, L.; Galliano, M.; Curti, B.; Swenson, R. P.; Williams, C. H. Jr.; Massey, V. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 8824-8834; (b) Pollegioni, L.; Molla, G.; Sacchi, S.; Rosini, E.; Verga, R.; Pilone, M. S. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *78*, 1-16.

- Flavoproteín-monooxigenasas: Estos flavoenzimas pertenecen al grupo de las monooxigenasas (EC 1.13.x.x).<sup>23</sup> En los apartados posteriores de la presente Memoria, se describirán las características de estos enzimas con mayor profundidad.

### **I.5. VERSATILIDAD CATALÍTICA DE LAS FLAVOPROTEÍN-MONOOXIGENASAS**

Las monooxigenasas catalizan la introducción de un átomo de oxígeno molecular en un sustrato, mientras que el otro átomo de oxígeno es reducido a agua. Podemos encontrar monooxigenasas unidas tanto a FMN como a FAD. Por lo general, estos biocatalizadores dependen de las nicotinamidas NADH (nicotín-adenín dinucleótido) o NADPH (nicotín-adenín dinucleótido fosfato) para reducir a la flavina, siendo conocidas como flavoproteín-monooxigenasas externas. Existe también un número de monooxigenasas que emplean el propio sustrato para reducir a la flavina, las flavoproteín-monooxigenasas internas.

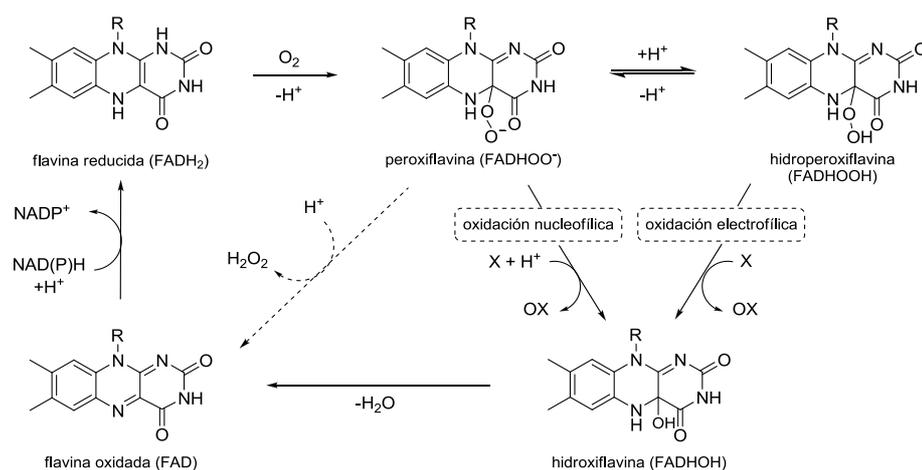
Las flavoproteín-monooxigenasas tienen un mecanismo de reacción típico, ya que siempre se forma un intermedio reactivo (4a-peroxiflavina), que es la especie encargada de reaccionar con el sustrato. Este intermedio se genera mediante la formación de un enlace covalente entre el oxígeno molecular y el C4a de la flavina (Figura I.4). La peroxiflavina formada es inestable en disolución y descompone originando peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dando lugar a la flavina oxidada. Sin embargo, en presencia de un sustrato adecuado, dicho intermedio está estabilizado por el enzima.<sup>24</sup> Dependiendo del estado de protonación de la peroxiflavina, se llevará a cabo la oxidación nucleofílica o electrofílica del sustrato.<sup>25</sup> Esta especie reactiva puede atacar como anión peróxido, actuando como nucleófilo frente a cetonas y el átomo de boro, o bien puede protonarse como hidroperoxiflavina y actuar como electrófilo frente a átomos de azufre, nitrógeno, selenio o fósforo. Como resultado final, un átomo de oxígeno es introducido en el sustrato, mientras el segundo átomo proveniente del O<sub>2</sub> es reducido a H<sub>2</sub>O, que es eliminada como subproducto de la reacción a la vez que se recupera la flavina oxidada.

---

<sup>23</sup> Torres Pazmiño, D. E.; Winkler, M.; Glieder, A.; Fraaije, M. W. *J. Biotechnol.* **2010**, *146*, 9-24.

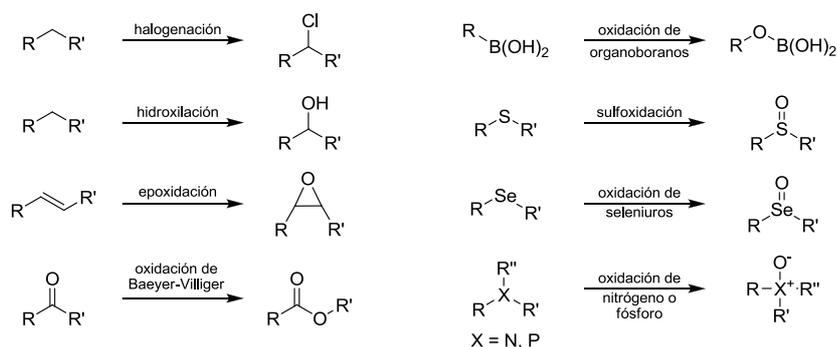
<sup>24</sup> Entsch, B.; van Berkel, W. J. H. *FASEB J.* **1995**, *9*, 476-483.

<sup>25</sup> Ghisla, S.; Massey, V. *Eur. J. Biochem.* **1989**, *181*, 1-17.



**Figura I.4.** Mecanismo de reacción propuesto para la oxidación catalizada por las flavoproteín-monooxigenasas.

Como se muestra en la Figura I.5, las flavoproteín-monooxigenasas son capaces de catalizar reacciones de epoxidación, oxidaciones de heteroátomos, reacciones de Baeyer-Villiger y halogenaciones. Incluso se ha descrito la hidroxilación de alcanos inactivados catalizada por una flavoproteín-monooxigenasa.<sup>26</sup> El tipo específico de oxigenación depende de la forma y la naturaleza química del centro activo de cada monooxigenasa.



**Figura I.5.** Reacciones catalizadas por las flavoproteín-monooxigenasas.

<sup>26</sup> Feng, L.; Wang, W.; Cheng, J.; Ren, Y.; Zhao, G.; Gao, C.; Tang, Y.; Liu, X.; Han, W.; Peng, X.; Liu, R.; Wang, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 5602-5607.

## 1.6. CLASIFICACIÓN DE LAS FLAVOPROTEÍN-MONOOXIGENASAS

Como ya se ha comentado, las flavoproteín-monooxigenasas se denominan externas o internas según empleen NAD(P)H o el propio sustrato para reducir la flavina. Además de las flavoproteín-monooxigenasas externas e internas, hay otro grupo de estos biocatalizadores que catalizan reacciones de hidroxilación. En ellos, la flavina no interviene directamente en la reacción de monooxigenación, pero es necesaria para la oxidación del sustrato. Puesto que la mayoría de flavoproteín-monooxigenasas son externas, nos centraremos en este tipo de enzimas.

Según van Berkel y colaboradores, estas monooxigenasas pueden clasificarse en seis subclases en función de su secuencia y los datos estructurales disponibles hasta el momento.<sup>27</sup>

En las **subclases A y B** se incluyen las monooxigenasas dependientes de FAD que están codificadas por un único gen, es decir, un único componente polipeptídico ( $\alpha$ ) se encarga de reducir la flavina y oxidar el sustrato. Estas enzimas suelen emplear NADPH como cofactor, aunque existe algún miembro de la subclase A que es NADH-dependiente (ej. salicilato 1-monooxigenasa).<sup>28</sup> La principal diferencia entre ambas subclases radica en el número de dominios de unión a dinucleótidos, conocidos como plegamientos de Rossmann, y en la afinidad del NAD(P)<sup>+</sup> durante el ciclo catalítico. Las monooxigenasas de la subclase A únicamente poseen un dominio de unión a FAD. En cuanto al NAD(P)<sup>+</sup>, éste se libera directamente después de la reducción de la flavina. Por el contrario, los miembros de la subclase B poseen dos dominios de unión a dinucleótido (GxGxxG), uno para el FAD y otro para el NADPH.<sup>29</sup>

Además, la nicotinamida oxidada (NADP<sup>+</sup>) permanece unida durante todo el ciclo catalítico. El enzima 4-hidroxibenzoato 3-monooxigenasa (EC 1.14.13.2) o la fenol hidroxilasa (EC 1.14.13.9) son ejemplos de flavoproteín-monooxigenasas de clase A.<sup>24</sup> La clase B engloba a las FMOs (monooxigenasas generalmente eucariotas capaces de oxidar aminas y otros

---

<sup>27</sup> (a) van Berkel, W. J. H.; Kamerbeek, N. M.; Fraaije, M. W. *J. Biotechnol.* **2006**, *124*, 670-689; (b) Joosten, V.; van Berkel, W. J. H. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 195-202.

<sup>28</sup> Yamamoto, S.; Katagiri, M.; Maeno, H.; Hayaishi, O. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 3408-3413.

<sup>29</sup> Wierenga, R. K.; Terpstra, P.; Hol, W. G. J. *J. Mol. Biol.* **1986**, *187*, 101-107.

heteroátomos),<sup>30</sup> a las NMOs (monooxigenasas que catalizan *N*-hidroxilaciones de aminas primarias de cadena larga)<sup>31</sup> y a las BVMOs (Baeyer-Villiger monooxigenasas) de Tipo I.<sup>32</sup> Tanto las BVMOs como las FMOs, serán objeto de estudio en la presente Memoria.

En la **subclase C** nos encontramos con monooxigenasas que requieren FMN como cofactor. Estos enzimas, codificados por varios genes, poseen dos subunidades correspondientes a una monooxigenasa y una reductasa (son heterodímeros de componentes  $\alpha$  y  $\beta$ ). La reductasa es la que reduce el FMN por la acción del NAD(P)H. El enzima luciferasa (EC 1.14.14.3) es un típico ejemplo de este grupo. Este enzima, clasificado como BVMO de Tipo II, es capaz de emitir luz tras oxidar aldehídos alifáticos de cadena larga.<sup>33</sup>

Las flavoproteín-monooxigenasas que constituyen las **subclases D, E y F** son también heterodímeros. La subunidad reductasa proporciona el FAD reducido (FADH<sub>2</sub>) a la subunidad monooxigenasa, que al reaccionar con el

<sup>30</sup> (a) Ziegler, D. M. *Drugs Metabol. Rev.* **2002**, *34*, 503-511; (b) Eswaramoorthy, S.; Bonanno, J. B.; Burley, S. K.; Swaminathan, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 9832-9837.

<sup>31</sup> Stehr, M.; Diekmann, H.; Smau, L.; Seth, O.; Ghisla, S.; Singh, M.; Macheroux, P. *Trends Biochem. Sci.* **1998**, *23*, 56-57.

<sup>32</sup> (a) Walsh, C.; Jack Chen, Y.-C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, *27*, 333-343; (b) Willetts, A. *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 55-62; (c) Roberts, S. M.; Wan, P. W. H. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1998**, *4*, 111-136; (d) Mihovilovic, M. D.; Müller, B.; Stanetty, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 3711-3730; (e) Flitsch, S.; Grogan, G. en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. Eds. Drauz, K.; Waldmann, H. Wiley-VCH, Weinheim **2002**, 1202-1245; (f) Alphand, V.; Carrea, G.; Wohlgemuth, R.; Furstoss, R.; Woodley, J. M. *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 318-323; (g) Kamerbeek, N. M.; Janssen, D. B.; van Berkel, W. J. H.; Fraaije, M. W. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 667-678; (h) Mihovilovic, M. D.; Rudroff, F.; Grötzl, B. *Curr. Org. Chem.* **2004**, *8*, 1057-1069; (i) Mihovilovic, M. D. *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10*, 1265-1287; (j) Torres Pazmiño, D. E.; Fraaije, M. W. en *Future Directions in Biocatalysis*. Ed. Matsuda, T. Elsevier, Dordrecht **2007**, 107-128; (k) Fraaije, M. W.; Janssen, B. D. en *Modern Biooxidation*. Eds. Schmid, R. D.; Urlacher, V. B. Wiley-VCH, Weinheim **2007**, 77-97; (l) Kayser, M. M. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 947-974; (m) Alphand, V.; Fraaije, M. W.; Mihovilovic, M. D.; Ottolina, G. en *Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions*. Eds. Fessner, W. D.; Anthonen, T. Wiley-VCH, Weinheim **2009**, 339-368; (n) Torres Pazmiño, D. E.; Dudek, H. M.; Fraaije, M. W. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 138-144; (o) de Gonzalo, G.; Mihovilovic, M. D.; Fraaije, M. W. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2208-2231; (p) Rehdorf, J. E.; Bornscheuer, U. T. en *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*. Ed. Flickinger, M. C. Wiley, Weinheim **2010**, 594-617; (q) Alphand, V.; Wohlgemuth, R. *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 1928-1965; (r) Leisch, H.; Morley, K.; Lau, P. C. K. *Chem. Rev.* **2011**, *11*, 4165-4222.

<sup>33</sup> (a) Abu-Soud, H.; Mullins, L. S.; Baldwin, T. O.; Raushel, F. M. *Biochemistry* **1992**, *31*, 3807-3813; (b) Villa, R.; Willetts, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1997**, *2*, 193-197.

## Introducción

oxígeno se encargará de oxidar el sustrato. La principal diferencia entre estas tres clases de monooxigenasas es el tipo de reacción que catalizan. Mientras que los enzimas de la subclase D catalizan preferentemente la hidroxilación de compuestos aromáticos (ej. *p*-hidroxifenilacetato monooxigenasa EC 1.14.13.3),<sup>34</sup> los de las subclases E y F catalizan epoxidaciones (ej. estireno monooxigenasa de *Pseudomonas* sp. VLB120)<sup>35</sup> y halogenaciones (ej. triptófano 7-halogenasa),<sup>36</sup> respectivamente.

**Tabla I.1.** Clasificación de flavoproteín-monooxigenasas externas.<sup>27</sup>

Subclase	Prototipo	Reacción
A	<i>p</i> -Hidroxibenzoato monooxigenasa Fenol hidroxilasa Escualeno monooxigenasa	Hidroxilación; Epoxidación
B	Ciclohexanona monooxigenasa Flavín-monooxigenasa Lisina N <sup>6</sup> -hidroxilasa	<i>N</i> y <i>S</i> -Oxidación; Baeyer-Villiger
C	Luciferasa Alcanosulfonato monooxigenasa Nitrilotriacetato monooxigenasa	Emisión de luz; Baeyer-Villiger; <i>N</i> y <i>S</i> -Oxidación
D	<i>p</i> -Hidroxifenilacetato 3-monooxigenasa 2,5-Dicetocanfano 1,2-monooxigenasa	Hidroxilación; Baeyer-Villiger
E	Estireno monooxigenasa	Epoxidación
F	Triptófano 7-halogenasa	Halogenación

## 1.7. BAEYER-VILLIGER MONOOXIGENASAS

El primer indicio de la existencia natural de Baeyer-Villiger monooxigenasas (BVMO, EC 1.14.13.x) data de 1948 y consistió en la biotransformación (vía una oxidación de Baeyer-Villiger) de esteroides (progesterona y colesterol) catalizada por diversos hongos (*Penicillium* sp., *Aspergillus flavus* y *Pseudopterogorgia americana*).<sup>37</sup> En 1965 dos BVMOs fueron purificadas parcialmente de una cepa *Pseudomonas* sp., estando

<sup>34</sup> Prieto, M. A.; García, J. L. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 22823-22829.

<sup>35</sup> Otto, K.; Hofstetter, K.; Witholt, B.; Schmid, A. en *Flavins and Flavoproteins*. Ed. Scrutton, N. S. Agency for Scientific Publication, Berlin **2002**, 1027-1033.

<sup>36</sup> Keller, S.; Wage, T.; Hohaus, K.; Holzer, M.; Eichhorn, E.; van Pee, K. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2300-2302.

<sup>37</sup> Turfitt, G. E. *Biochem. J.* **1948**, *42*, 376-383.

relacionadas con la lactonización del alcanfor.<sup>38</sup> Unos años más tarde Trudgill y colaboradores aislaron y purificaron totalmente la primera BVMO, que mostró actividad sobre un amplio espectro de cetonas.<sup>39</sup>

En las últimas décadas un gran número de BVMOs han sido purificadas y caracterizadas, además se han descubierto también nuevas rutas biosintéticas que incorporan la reacción de Baeyer-Villiger en alguno de sus pasos, como sucede en la síntesis de aflatoxinas en hongos,<sup>40</sup> la síntesis de esteroides vegetales,<sup>41</sup> o la síntesis de toxinas diarreas (DSP) en dinoflagelados.<sup>42</sup> Asimismo, se han descubierto procesos oxidativos de este tipo en rutas de degradación de compuestos xenobióticos o en diferentes etapas del metabolismo microbiano.<sup>43</sup> Finalmente, se ha descrito que en ciertas rutas catabólicas estas enzimas permiten a las bacterias crecer en gran variedad de cetonas.<sup>44</sup>

## 1.8. TIPOS DE BAEYER-VILLIGER MONOOXIGENASAS

Desde el descubrimiento de las BVMOs, se ha llevado a cabo una gran investigación con objeto de conocer las propiedades biocatalíticas de estas enzimas, utilizando éstas tanto aisladas como en células enteras. Las Baeyer-Villiger monooxigenasas son capaces de catalizar no sólo la reacción de Baeyer-Villiger, sino también la oxidación de ciertos heteroátomos como nitrógeno, fósforo, boro, selenio y azufre, así como la epoxidación de ciertos compuestos. Las oxidaciones se llevan a cabo de

---

<sup>38</sup> Conrad, H. E.; Dubus, R.; Namtvedt, M. J.; Gunsalus, I. C. *J. Biol. Chem.* **1965**, *240*, 495-503.

<sup>39</sup> (a) Donoghue, N. A.; Norris, D. B.; Trudgill, P. W. *Eur. J. Biochem.* **1976**, *63*, 175-192; (b) Griffin, M.; Trudgill, P. W. *Eur. J. Biochem.* **1976**, *63*, 199-209; (c) Williams, P. A.; Gibb, L. E.; Keil, H.; Osborne, D. J. en *Microbial Metabolism and the Carbon Cycle*. Eds. Hagedorn, S. R.; Hanson, R. S.; Kunz, D. A. Harwood Academic Press, Chur **1988**, 339-359.

<sup>40</sup> Townsend, C. A.; Christensen, S. B.; Davis, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6154-6155.

<sup>41</sup> (a) Damtoft, S.; Franzyk, H.; Jenses, S. R. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 773-784; (b) Winter, J.; Schneider, B.; Meyenburg, S.; Strack, D.; Adam, G. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 237-242.

<sup>42</sup> Wright, J. L. C.; Hu, T.; McLachlan, J. L.; Needham, J.; Walter, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8757-8758.

<sup>43</sup> (a) Cheng, Q.; Thomas, S. M.; Rouvière, P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *58*, 704-711; (b) Kotani, T.; Yurimoto, H.; Kato, N.; Sakai, Y. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 886-893.

<sup>44</sup> (a) Britton, L. N.; Markovetz, A. J. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 8561-8566; (b) Ougham, H. J.; Taylor, D. G.; Trudgill, P. W. *J. Bacteriol.* **1983**, *153*, 140-152; (c) Darby, J. M.; Taylor, D. G.; Hooper, D. J. *J. Gen. Microbiol.* **1987**, *133*, 2137-2146; (d) van der Werf, M. F.; Boot, A. M. *Microbiology* **2000**, *146*, 1129-1141.

## Introducción

---

forma regio- y/o enantioselectiva en la mayoría de los casos. Casi sin excepción, las Baeyer-Villiger monooxigenasas son sintetizadas por microorganismos, principalmente bacterias y hongos.<sup>32</sup> Según sus características bioquímicas, las BVMOs pueden clasificarse en dos grupos.

Las **BVMOs de Tipo I** están codificadas por un solo gen, de modo que son proteínas monoméricas o con estructuras cuaternarias homo-oligoméricas (proteínas de unos 500 aminoácidos, con dos o más subunidades idénticas). Contienen FAD como grupo prostético y usan NADPH como donador de electrones. Por lo tanto, pueden considerarse flavoproteínas de subclase B (Tabla I.1). Todas estas monooxigenasas son proteínas solubles, localizadas en el citosol de bacterias u hongos. Las BVMOs de Tipo I presentan una secuencia característica (GxGxxG), localizada cerca del extremo *N*-terminal, que representa el sitio de unión al FAD. Además, presentan otro sitio de unión para el NADPH. Hasta la fecha, todas las BVMOs que han sido clonadas están caracterizadas como Tipo I.

La BVMO de Tipo I más conocida y empleada en biocatálisis es la ciclohexanona monooxigenasa (CHMO, EC 1.14.13.22) de *Acinetobacter* sp. NCIMB 9871, aislada y caracterizada por primera vez en 1976 por Trudgill y colaboradores.<sup>39</sup> En 1988, el gen de la CHMO fue clonado y sobreexpresado.<sup>45</sup> Once años después se publicó la clonación de la esteroide monooxigenasa (SMO, EC 1.14.13.54) de *Rhodococcus rhodochrous*.<sup>46</sup> Desde entonces, son muchas las BVMOs de Tipo I que han sido aisladas y caracterizadas (Tabla I.2). Ejemplos recientes son la 4-hidroxiacetofenona monooxigenasa (HAPMO, EC 1.14.13.84) de *Pseudomonas fluorescens* ACB,<sup>47</sup> la ciclododecanona monooxigenasa (CDMO) de *Rhodococcus ruber*,<sup>48</sup> la ciclopentanona monooxigenasa (CPMO, EC 1.14.13.16) de *Comamonas* sp. NCIMB 9872,<sup>49</sup> la fenilacetona monooxigenasa (PAMO, EC 1.14.13.92) de *Thermobifida fusca*,<sup>50</sup> la ciclopentadecanona

---

<sup>45</sup> Chen, Y. C.; Peoples, O. P.; Walsh, C. T. *J. Bacteriol.* **1988**, *170*, 781-789.

<sup>46</sup> Morii, S.; Sawamoto, S.; Yamauchi, Y.; Miyamoto, M.; Iwami, M.; Itagaki, E. *J. Biochem.* **1999**, *126*, 624-631.

<sup>47</sup> Kamerbeek, N. M.; Moonen, M. J. H.; van der Ven, J. G. M.; van Berkel, W. J. H.; Fraaije, M. W.; Janssen, D. B. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 2547-2557.

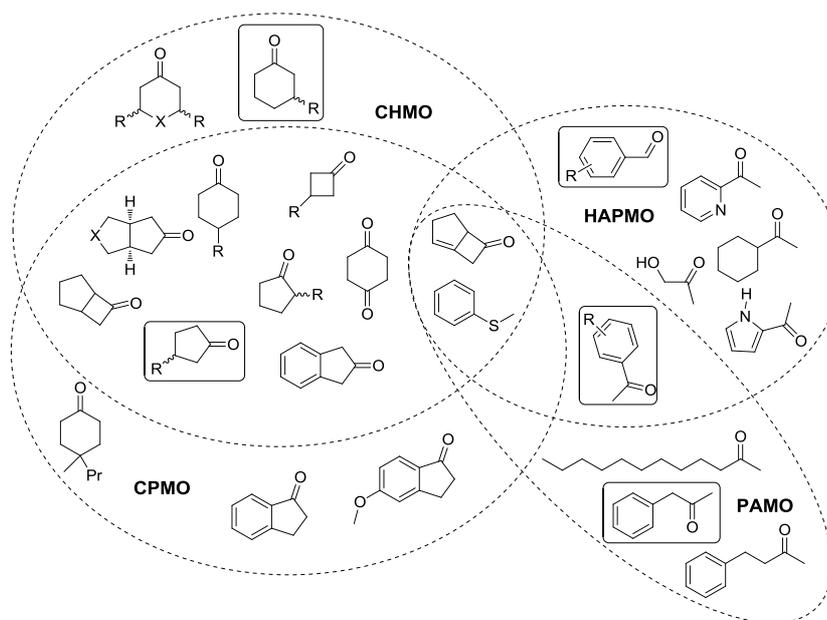
<sup>48</sup> Kostichka, K.; Thomas, S. M.; Gibson, K. J.; Nagarajan, V.; Cheng, Q. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 6478-6486.

<sup>49</sup> Bes, M. T.; Villa, R.; Roberts, S. M.; Wan, P. W. H.; Willetts, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1996**, *1*, 127-134.

<sup>50</sup> Fraaije, M. W.; Wu, J.; Heuts, D. P. H. M.; van Hellemond, E. W.; Lutje Spelberg, J. H.; Janssen, D. B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *66*, 393-400.

monooxigenasa (CPDMO) de *Pseudomonas* sp. HI-70,<sup>51</sup> la acetona monooxigenasa (ACMO) de *Gordonia* sp. TY-5<sup>43</sup> y la alquilcetona monooxigenasa (AKMO) de *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106.<sup>52</sup>

Todos estos enzimas presentan una especificidad de sustrato muy diferente, como se muestra en la Figura I.6. Mientras que la CHMO y la CPMO muestran una alta actividad con cetonas alifáticas cíclicas, la HAPMO y la PAMO prefieren en general sustratos aromáticos. Sin embargo a lo largo de la presente Memoria, se va a demostrar que estos enzimas son también capaces de oxidar con buenos resultados sustratos de naturaleza alifática.



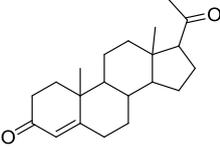
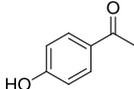
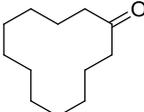
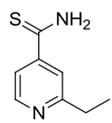
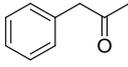
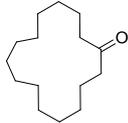
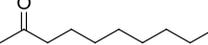
**Figura I.6.** Especificidad de sustrato de cuatro de las BVMOs de Tipo I más empleadas en biocatálisis.

<sup>51</sup> (a) Iwaki, H.; Wang, S.; Grosse, S.; Bergeron, H.; Nagahashi, V.; Lertvorachon, J.; Yang, J.; Konishi, Y.; Hasegawa, Y.; Lau, P. C. K. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 2707-2720; (b) Beneventi, E.; Ottolina, G.; Carrea, G.; Panzeri, W.; Fronza, G.; Lau, P. C. K. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *58*, 164-168.

<sup>52</sup> Kirschner, A.; Altenbuchner, J.; Bornscheuer, U. T. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *73*, 1065-1072.

## Introducción

**Tabla I.2.** BVMOs de Tipo I disponibles en forma recombinante.

BVMO	Año de clonación	Sustrato primario
CHMO	1988	
SMO	1999	
HAPMO	2001	
CDMO	2001	
CPMO	2002	
EtaA	2004	
PAMO	2006	
CPDMO	2006	
ACMO	2007	
AKMO	2007	

Las **BVMOs de Tipo II** están codificadas por al menos dos genes. Poseen dos subunidades, una reductasa que emplea NADH para reducir FMN y una monooxigenasa que emplea la flavina reducida para llevar a cabo la reacción de Baeyer-Villiger. Son flavoproteínas pertenecientes a la subclase C (Tabla

I.1). Algunas de las BVMOs de Tipo II más conocidas, como la 2,5-dicetocanfano 1,2-monooxigenasa y la 3,6-dicetocanfano 1,6-monooxigenasa, fueron aisladas de *Pseudomonas putida* ATCC 17453.<sup>53</sup> Otro ejemplo de este tipo de enzimas es la limoneno monooxigenasa (GI12054950).<sup>54</sup> La luciferasa también ha sido clasificada como BVMO de Tipo II basándose en semejanzas estructurales y en el hecho de que este enzima puede catalizar la reacción de Baeyer-Villiger sobre diferentes cetonas. Hay pocos ejemplos más de este tipo de BVMOs y no hay ninguna estructura cristalina disponible que desglose las características estructurales de este tipo de enzimas. Además, para obtener una BVMO de Tipo II funcional, es necesario añadir a la subunidad monooxigenasa una componente reductasa, lo que complica el clonado y la expresión de estos enzimas y explica su ausencia en forma recombinante.

Existen otros enzimas que pueden catalizar la oxidación de Baeyer-Villiger. Recientemente se ha descubierto una monooxigenasa (MtmOIV) que participa en la síntesis de la mitramicina, un agente antitumoral.<sup>55</sup> Analizando su secuencia no se pudo clasificar a este enzima como una BVMO de Tipo I ó II, sin embargo, presenta homologías con las flavoproteínas de la subclase A,<sup>32</sup> lo cual podría sugerir la existencia de un tercer grupo de BVMO. Algunos enzimas de la familia del citocromo P450 son capaces de catalizar la reacción de Baeyer-Villiger para modificar esteroides vegetales.<sup>56</sup> Asimismo, existen ciertas serín hidrolasas que pueden catalizar este proceso de modo indirecto.<sup>57</sup> Estos enzimas forman perácidos a partir de ácidos carboxílicos mediante el consumo de peróxido de hidrógeno. Dichos perácidos son empleados como agentes oxidantes en la reacción de Baeyer-Villiger, en procesos sin enantioselectividad. Sin embargo, existe un ejemplo en el que se obtienen las lactonas resultantes de la oxidación de 2- y 3-ciclopentan/hexanonas sustituidas con excesos

---

<sup>53</sup> Taylor, D. G.; Trudgill, P. W. *J. Bacteriol.* **1986**, *165*, 489-497.

<sup>54</sup> van der Werf, M. J.; Swarts, H. J.; de Bont, J. A. M. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 2092-2102.

<sup>55</sup> (a) Rodríguez, D.; Quirós, L. M.; Braña, A. F.; Salas, J. A. *J. Bacteriol.* **2003**, *185*, 3962-3965; (b) Beam, M. P.; Bosserman, M. A.; Noinaj, N.; Wehenkel, M.; Rohr, J. *Biochemistry* **2009**, *48*, 4476-4487.

<sup>56</sup> Kim, T.-W.; Hwang, J.-Y.; Kim, Y.-S.; Joo, S.-H.; Chang, S. C.; Lee, J. S.; Takatsuto, S.; Kim, S.-K. *Plant Cell* **2005**, *17*, 2397-2412.

<sup>57</sup> Carboni-Oerlemans, C.; Domínguez de María, P.; Tuin, B.; Bargeman, G.; van der Meer, A.; van Gemert, R. *J. Biotechnol.* **2006**, *126*, 140-151.

enantioméricos moderados mediante el uso de la lipasa B de *Candida antarctica* en presencia de peróxido de hidrógeno y ácido mirístico.<sup>58</sup>

### 1.9. REACCIÓN DE OXIDACIÓN DE BAEYER-VILLIGER

En 1899 Adolf von Baeyer (que había desarrollado la síntesis de índigo y ganador de un premio Nobel en 1905), y su estudiante Victor Villiger describieron el uso de monopersulfato de potasio (KHSO<sub>5</sub>, el ácido de Caro) como un nuevo oxidante para la conversión de cetonas cíclicas como la mentona, carvomentona y alcanfor, en sus correspondientes lactonas, con rendimientos del 50% a las 24 horas.<sup>59</sup> La transformación de cetonas en ésteres o cetonas cíclicas en lactonas mediante el uso de perácidos, se denominó reacción de Baeyer-Villiger, un proceso muy utilizado en síntesis orgánica para la preparación de compuestos de alto interés como esteroides, antibióticos, feromonas y monómeros para polimerizaciones.<sup>60</sup> Las lactonas monocíclicas se emplean con frecuencia como sintones quirales para la preparación de productos naturales y otras sustancias de interés biológico. Las  $\gamma$ -lactonas bicíclicas o policíclicas son importantes debido a su actividad antitumoral y a su capacidad para activar la bomba Ca<sup>2+</sup>-ATPasa del retículo sarcoplásmico en casos de insuficiencia cardíaca. Además, son intermedios en la síntesis de fármacos para el tratamiento del glaucoma y la hipertensión. Las  $\delta$ -lactonas hidroxiladas están presentes en compuestos de acción antihipercolesterolemia y en algunos inmunosupresores.

Hoy en día, más de 100 años después de su descubrimiento, la reacción de Baeyer-Villiger es todavía objeto de estudio y optimización. Se buscan nuevos oxidantes que aporten mayor quimioselectividad y eficiencia.<sup>61</sup> Además, está de plena actualidad la investigación de procesos de Baeyer-Villiger catalizados por complejos con metales de transición y el uso de líquidos iónicos en este tipo de reacciones.<sup>62</sup>

---

<sup>58</sup> Lemoult, S. C.; Richardson, P. F.; Roberts, S. M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.* **1995**, 89-91.

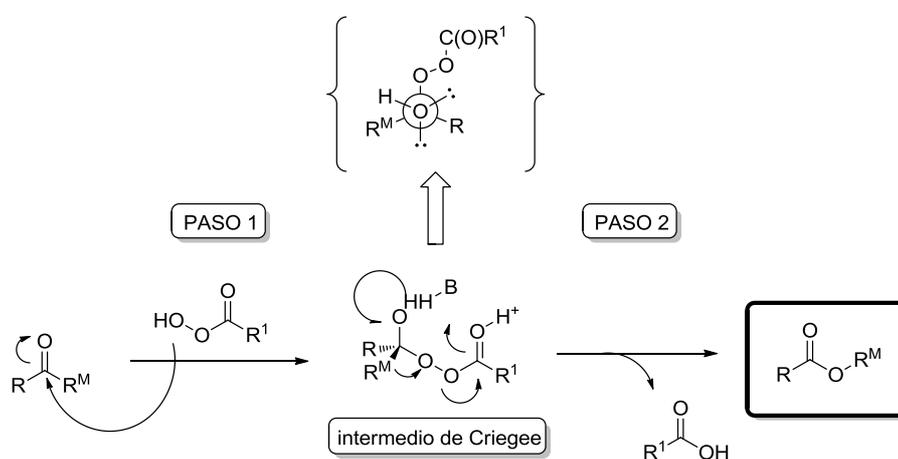
<sup>59</sup> (a) Baeyer, A.; Villiger, V. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1899**, 39, 3625-3633; (b) Huisgen, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, 25, 297-311.

<sup>60</sup> (a) Krow, G. R. *Org. React.* **1993**, 43, 251-296; (b) Strukul, G. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1199-1209; (c) Renz, M.; Meunier, B. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 4, 737-750; (d) ten Brink, G.-J.; Arends, I. W. C. E.; Sheldon, R. A. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 4105-4213; (e) Michelin, R. A.; Sgarbossa, P.; Scarso, A.; Strukul, G. *Coord. Chem. Rev.* **2010**, 254, 646-660.

<sup>61</sup> Corma, A.; Nemeth, L. T.; Renz, M.; Valencia, S. *Nature* **2001**, 412, 423-425.

<sup>62</sup> Conte, V.; Fiorani, G.; Floris, B.; Galloni, P.; Mirruzzo, V. en *Green Chemistry Research Trends*. Ed. Pearlman, J. T. Nova Science Publishers, Nueva York **2009**, 131-160.

Durante muchos años el mecanismo exacto por el cual tiene lugar esta reacción de oxigenación fue debatido. Éste fue finalmente elucidado en 1953 cuando Doering y Dorfman estudiaron la oxidación de Baeyer-Villiger de la benzofenona marcada con  $O^{18}$ .<sup>63</sup> Este estudio fue decisivo para confirmar el mecanismo inicialmente propuesto por Criegee.<sup>64</sup> Así, la oxidación de Baeyer-Villiger tiene lugar en dos pasos (Figura I.7). En primer lugar se produce un ataque nucleófilo del perácido utilizado como oxidante al grupo carbonilo, el cual actúa como electrófilo, formándose un intermedio tetraédrico (intermedio de Criegee), que sufre un posterior reordenamiento concertado para producir el éster o lactona y liberar el ácido carboxílico o carboxilato correspondiente como subproducto. El paso limitante de la velocidad es el último, y hay que destacar que si el carbono que migra es quiral, se retiene la estereoselectividad. En el intermedio de Criegee el grupo migratorio ( $R^M$ ) ha de estar en posición antiperiplanar respecto al enlace O-O y al par de electrones del grupo hidroxilo, dos efectos estereoelectrónicos que permiten la migración. A pesar de que el mecanismo de la oxidación de Baeyer-Villiger fue descrito hace 60 años, todavía hoy en día está siendo investigado.<sup>65</sup>



**Figura.I.7.** Mecanismo propuesto para la reacción de Baeyer-Villiger.

<sup>63</sup> Doering, W. E.; Dorfman, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 5595-5958.

<sup>64</sup> Criegee, R. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1948**, *560*, 127-135.

<sup>65</sup> Mora-Diez, N.; Keller, S.; Alvarez-Idaboy, J. R. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3682-3690.

## Introducción

---

La reacción de Baeyer-Villiger es un proceso muy utilizado en síntesis orgánica debido a sus propiedades:

- Gran versatilidad, ya que permite la oxidación de gran cantidad de compuestos carbonílicos.
- Tolerancia a un gran número de grupos funcionales, que pueden estar presente en las moléculas objeto a oxidar.
- Amplio número de oxidantes disponibles.
- Regioselectividad predecible debido al orden de migración de grupos: alquilo terciario > ciclohexilo > alquilo secundario ≈ bencilo ≈ fenilo > alquilo primario > metilo.<sup>66</sup> Como ya hemos comentado, esta reacción es generalmente estereoselectiva, puesto que el grupo que migra retiene su configuración.

Sin embargo, la reacción de Baeyer-Villiger también tiene una serie de inconvenientes.

- Falta de quimio- y enantioselectividad.
- Los agentes oxidantes más usados en la reacción de Baeyer-Villiger son perácidos. A pesar de la eficacia demostrada por estos agentes oxidantes, su empleo a gran escala representa un riesgo elevado debido a su alta toxicidad y labilidad.<sup>67</sup> Por otra parte, estos reactivos tienen un alto coste, lo cual limita su aplicación a escala industrial.
- Formación de subproductos: El uso de perácidos da lugar a la formación de sales de ácido como subproductos, las cuales han de ser recicladas o eliminadas. Se obtiene un equivalente de sal por cada equivalente de ácido utilizado.
- Estos procesos oxidativos se llevan a cabo con reactivos y/o disolventes halogenados, los cuales son poco respetuosos con el

---

<sup>66</sup> (a) Hawthorne, M. F.; Emmons, W. D.; McCallum, K. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 6393-6398. Para otros grupos funcionales consultar, por ejemplo: (b) Chida, N.; Tobe, T.; Ogawa, S. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 7249-7252; (c) Butkus, E.; Stoncius, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 1885-1888.

<sup>67</sup> Brougham, P.; Cooper, M. S.; Cummerson, D. A.; Heaney, H.; Thompson, N. *Synthesis* **1987**, 1015-1017.

medio ambiente y por tanto, van en contra de los principios de la Química Verde.<sup>68</sup>

Por todos estos inconvenientes, y debido al auge de los procesos biocatalíticos en los últimos años, se ha incrementado el número de oxidaciones de Baeyer-Villiger catalizados por Baeyer-Villiger monooxigenasas. Con estos biocatalizadores, es posible obtener en general mejores resultados en cuanto a quimio-, regio- y enantioselectividad, empleando además condiciones de reacción suaves y respetuosas con el medio ambiente.

### 1.10. MECANISMO DE REACCIÓN DE BVMOs

El mecanismo de las BVMOs ha sido estudiado inicialmente en la CHMO de *Acinetobacter* sp. NCIMB 9871 (Figura I.8). Posteriormente se observó que otros biocatalizadores como la HAPMO y la PAMO comparten algunas propiedades cinéticas con la CHMO.

La investigación del mecanismo de oxidación de la CHMO fue publicada originalmente por Walsh en 1982 y fue corroborada posteriormente por Massey y colaboradores en 2001.<sup>69</sup> Este ciclo catalítico se resume en la Figura I.8. Inicialmente, el FAD del enzima reducido por el NADPH reacciona con el oxígeno atmosférico para formar la C4a-peroxiflavina. Este intermedio es estabilizado por los aminoácidos del centro activo del enzima y por la unión con el NADP<sup>+</sup>, manteniéndose así hasta que se incorpora el sustrato susceptible de ser oxidado. En caso de que no hubiera sustrato, la peroxiflavina se descompone para dar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pero esta reacción no es muy eficiente en BVMOs (<0.1 s<sup>-1</sup>), debido a que la estabilización de dicho intermedio es realmente efectiva.<sup>32k</sup> Mientras que el intermedio C4a-peroxiflavina fue observado en la CHMO, no se ha podido ver el intermedio de Criegee formado tras la unión del sustrato, lo cual indica que se trata de una especie efímera.

El papel que juega la C4a-peroxiflavina es exactamente igual al del perácido en la reacción química de Baeyer-Villiger, actuando ambos como nucleófilos frente al carbono carbonílico del sustrato a oxidar. Una vez

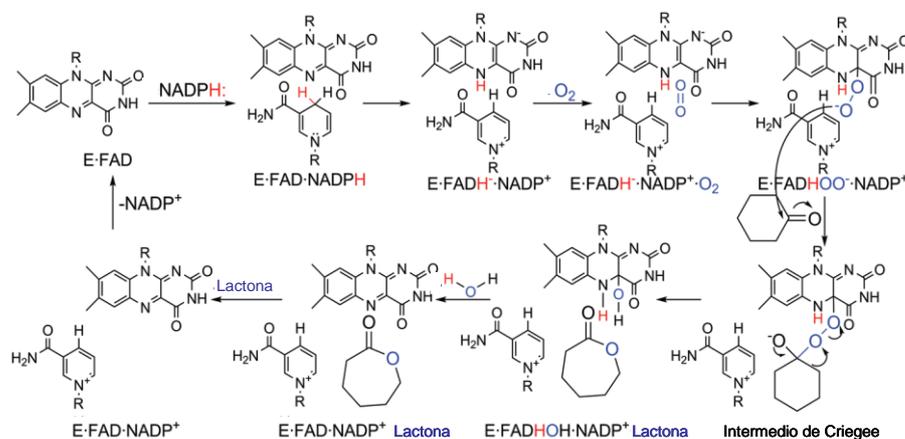
---

<sup>68</sup> (a) Ran, N.; Zhao, L.; Chen, Z.; Tao, J. *Green Chem.* **2008**, *10*, 361-372; (b) Anastas, P.; Eghbali, N. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301-339.

<sup>69</sup> (a) Ryerson, C. C.; Ballou, D. P.; Walsh, C. T. *Biochemistry* **1982**, *21*, 2644-2655; (b) Sheng, D.; Ballou, D. P.; Massey, V. *Biochemistry* **2001**, *40*, 1156-1167; (c) Yamabe, S.; Yamazaki, S. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3031-3041.

## Introducción

formado el intermedio de Criegee, se produce el reagrupamiento, liberándose el éster o lactona final y una molécula de agua, mientras que el FAD se regenera. Hay que resaltar que la molécula de  $\text{NADP}^+$  permanece unida al enzima durante todo el ciclo catalítico hasta la deshidratación del FAD. Este hecho es característico de las flavoproteínas de la subclase B. Se ha comprobado que tanto en la CHMO como en la HAPMO y la PAMO, el  $\text{NADP}^+$  es un inhibidor competitivo con respecto al NADPH.<sup>50,70</sup>



**Figura I.8.** Mecanismo de reacción propuesto para BVMOs de Tipo I.<sup>69</sup>

### I.11. ESTRUCTURA CRISTALINA (PAMO vs CHMO)

En 2004 se publicó la primera estructura cristalina de una BVMO, la de la PAMO.<sup>71</sup> Desafortunadamente, no se consiguieron cristales de este biocatalizador que contuvieran el cofactor NADPH/NADP<sup>+</sup> enlazado con el sustrato o el producto de la oxidación, lo que hubiera ayudado a establecer el tipo de unión que se produce durante la catálisis. Sin embargo, sí se realizaron estudios de modelización con el NADPH enlazado. Los resultados muestran la existencia de dos residuos cruciales para el reconocimiento de la adenina y los grupos 2'-fosfato del NADPH, respectivamente Arg217 y Lys336, por lo que este enzima muestra una mayor preferencia por este cofactor frente al NADH.<sup>32k</sup>

<sup>70</sup> van der Heuvel, R. H. H.; Tahallah, N.; Kamerbeek, N. M.; Fraaije, M. W.; van Berkel, W. J. H.; Janssen, D. B.; Heck, A. J. R. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 32115-32121.

<sup>71</sup> Malito, E.; Alfieri, A.; Fraaije, M. W.; Mattevi, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 13157-13162.

La elucidación de la estructura de la PAMO ha permitido también la identificación de un residuo del centro activo que parece ser clave en la catálisis. El aminoácido Arg337 está localizado en la cara *re* de la flavina y señala hacia la parte reactiva del cofactor FAD. Este residuo se conserva estrictamente en todas las BVMOs de Tipo I y si se reemplaza por cualquier otro aminoácido no se produce la catálisis.<sup>72</sup> En un principio se pensó que este aminoácido estabilizaba a la peroxiflavina durante el proceso catalítico. Sin embargo, un estudio detallado del mecanismo cinético mostró que el intermediario peroxiflavina se forma y estabiliza en ausencia de dicha arginina. Se ha postulado que la Arg337 tiene un doble papel: 1) activar el grupo carbonilo del sustrato, fomentándose el ataque nucleófilo de la peroxiflavina; y 2) estabilizar el intermedio de Criegee, junto a la ribosa del NADP<sup>+</sup>, compensando la carga negativa de éste. La cadena lateral guanidinio de este aminoácido es capaz de establecer dos enlaces de hidrógeno, uno con el oxígeno nucleofílico de la peroxiflavina y otro con el oxígeno del intermedio tetrahédrico que se encuentra cargado negativamente.<sup>73</sup>

Debido a la ausencia de una estructura cristalina de la *wild type* PAMO (*wt*PAMO) enlazada con sustrato o producto, es difícil asignar los residuos que se unen directamente a éstos. Así, se han llevado a cabo distintos estudios en los que se han eliminado de la *wt*PAMO dos residuos que pertenecen a un “loop” (aminoácidos 441-444), próximo a la Arg337, produciéndose una alteración en la especificidad de sustrato por parte de los mutantes generados (PAMO-P1, P2 y P3).<sup>72</sup> Acortando este “loop”, el centro activo del enzima aumenta de tamaño y la *wt*PAMO es capaz de aceptar sustratos más voluminosos. Así por ejemplo, cetonas racémicas estéricamente impedidas, como (±)-2-fenil- ó (±)-2-bencilciclohexanona, que apenas son oxidadas por la *wt*PAMO, son sustratos para el mutante PAMO-P3. Además, este mutante mostró una buena enantioselectividad en la resolución cinética de la 2-fenilciclohexanona. Años más tarde, se obtuvieron nuevos mutantes de la *wt*PAMO focalizándose en ese “loop” pero usando técnicas de CAST (Combinatorial Active-site Saturation Test), una evolución dirigida centrada en una serie de aminoácidos determinados.<sup>74</sup> Los nuevos mutantes fueron capaces de oxidar selectivamente la 2-

---

<sup>72</sup> Bocola, M.; Schulz, F.; Leca, F.; Vogel, A.; Fraaije, M. W.; Reetz, M. T. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 979-986.

<sup>73</sup> (a) Torres Pazmiño, D. E.; Baas, J. B.; Janssen, D. B.; Fraaije, M. W. *Biochemistry* **2008**, *47*, 4082-4093; (b) Orru, R.; Dudek, H. M.; Martinoli, C.; Torres Pazmiño, D. E.; Royant, A.; Weik, M.; Fraaije, M. W.; Mattevi, A. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 29284-29291.

<sup>74</sup> Reetz, M. T.; Wu, S. *Chem. Commun.* **2008**, 5499-5501.

## Introducción

---

fenilciclohexanona así como su análogo 2-(*p*-clorofenilo).<sup>75</sup> De la misma forma, también se observó que una mutación puntual en la prolina que ocupa la posición 440 en la *wt*PAMO dotaba al enzima de una mayor flexibilidad, lo que se tradujo en una actividad y selectividad inusual en la oxidación de cetonas cíclicas y bicíclicas fusionadas.<sup>75</sup> Dichas mutaciones afectaban a la especificidad de sustrato, pero mantenían la estabilidad térmica original de la *wt*PAMO. Este trabajo fue ampliado en 2010, utilizando de nuevo evolución dirigida, pero en este caso no directamente sobre aminoácidos del centro activo, sino sobre otros residuos (Gln93 y Pro94) más alejados capaces de producir efectos alostéricos, cambiando la conformación del centro activo del enzima, debido al movimiento de los dominios de las proteínas.<sup>76</sup>

Más recientemente se ha publicado la estructura cristalina de una CHMO de *Rhodococcus* sp. HI-31 unida a FAD y NADP<sup>+</sup>, la cual ha demostrado cómo las BVMOs adoptan diferentes conformaciones durante la catálisis.<sup>77</sup> Una conformación abierta para la reducción de la flavina, donde el C4 del NADPH está muy próximo al N5 del FAD, y una cerrada para la liberación del NADP<sup>+</sup> tras la catálisis, donde el grupo amida de la nicotinamida se aleja del N5 y el O4 de la flavina. Las dos conformaciones revelan múltiples uniones y movimientos del “loop”, que hacen muy flexible al centro activo de la CHMO, permitiendo el acceso de múltiples sustratos, demostrándose así su baja especificidad de sustrato si comparamos con otras BVMOs. En este trabajo se destaca el papel desempeñado por la nicotinamida a lo largo del ciclo y su efecto sobre la unión del sustrato al centro activo. Asimismo, enfatiza el papel de la arginina (Arg329 en el caso de la CHMO) en la estabilización de los intermedios durante la catálisis.

### 1.12. NUEVAS BVMOs CON POTENCIAL SINTÉTICO

Hasta hace poco tiempo, la CHMO de *Acinetobacter* sp. NCIMB 9871 (CHMO<sub>Acineto</sub>) era la BVMO más utilizada en síntesis orgánica. Debido a su baja especificidad de sustrato, esta CHMO es capaz de oxidar un elevado número de compuestos. Además, la CHMO<sub>Acineto</sub> ha sido empleada no sólo en la reacción de Baeyer Villiger, sino también en la oxidación de

---

<sup>75</sup> Reetz, M. T.; Wu, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 15424-15432.

<sup>76</sup> Wu, S.; Acevedo, J. P.; Reetz, M. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107*, 2775-2780.

<sup>77</sup> Mirza, I. A.; Yachnin, B. J.; Wang, S.; Grosse, S.; Bergeron, H.; Imura, A.; Iwaki, H.; Hasegawa, Y.; Lau, P. C. K.; Berhuis, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8849-8854.

compuestos organoborados y la epoxidación de alquenilfosfonatos,<sup>78</sup> así como la oxidación de heteroátomos como nitrógeno, fósforo, selenio y azufre.<sup>79</sup> Sin embargo, este biocatalizador presenta una baja estabilidad tanto térmica como química. Recientemente Reetz y colaboradores han diseñado nuevos mutantes de la CHMO mediante mutagénesis dirigida, que han solventado este inconveniente, sin afectar a la selectividad enzimática.<sup>80</sup> Hoy en día, se dispone de otras muchas BVMOs recombinantes, que son objeto de estudio para su aplicación en biocatálisis.

#### **1.12.1. 4-HIDROXIACETOFENONA MONOOXIGENASA (HAPMO)**

La HAPMO (EC 1.14.13.84) fue aislada del microorganismo *Pseudomonas fluorescens* ACB en 1999.<sup>81</sup> Dos años más tarde fue caracterizada, clonada y sobreexpresada en *E. coli*. Pertenece al Tipo I de BVMOs,<sup>47</sup> siendo un homodímero de 145 kDa, en el que cada subunidad de 72 kDa está unida a una molécula de FAD. Su pH óptimo está en torno a 8.0 y presenta una fuerte preferencia por el NADPH frente a NADH.<sup>82</sup> Es un enzima versátil con una amplia especificidad de sustrato. Además de la 4-hidroxiacetofenona, que es su sustrato natural, acepta un amplio rango de cetonas aromáticas, heteroaromáticas, alifáticas y sulfuros. Fue la primera BVMO descrita que mostraba una mayor preferencia por sustratos aromáticos en lugar de alifáticos. De hecho, esta monooxigenasa permite a la bacteria *P. fluorescens* ACB crecer en medios con 4-hidroxiacetofenona

<sup>78</sup> Colonna, S.; Gaggero, N.; Carrea, G.; Ottolina, G.; Pasta, P.; Zambianchi, F. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1797-1799.

<sup>79</sup> Ver por ejemplo: (a) Branchaud, B. P.; Walsh, C. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2153-2161; (b) Ottolina, G.; Pasta, P.; Carrea, G.; Colonna, S.; Dallavale, S.; Holland, H. L. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1375-1386; (c) Colonna, S.; Gaggero, N.; Carrea, G.; Pasta, P. *Chem. Commun.* **1998**, 415-416; (d) Stewart, J. D. *Curr. Org. Chem.* **1998**, *2*, 195-216; (e) Mihovilovic, M. D.; Chen, G.; Wang, S.; Kyte, B.; Rochon, F.; Kayser, M. M.; Stewart, J. D. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 733-738; (f) Colonna, S.; Pironti, V.; Pasta, P.; Zambianchi, F. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 869-871; (g) Mihovilovic, M. D.; Rudroff, F.; Kandioller, W.; Grotzl, B.; Stanetty, P.; Spreitzer, H. *Synlett* **2003**, 1973-1976; (h) Brondani, P. B.; de Gonzalo, G.; Fraaije, M. W.; Andrade, L. H. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2169-2173; (i) Andrade, L. H.; Pedrozo, E. C.; Leite, H. G.; Brondani, P. B. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *73*, 63-66.

<sup>80</sup> Opperman, D. J.; Reetz, M. T. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2589-2596.

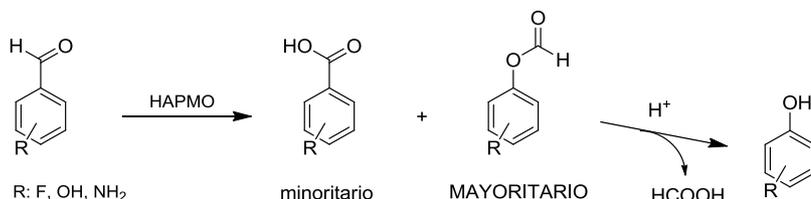
<sup>81</sup> Moonen, M. J. H.; Rietjens, I. M. C. M.; Van Berkel, W. J. H. en *Flavins and Flavoproteins, 13th International Congress on Flavins and Flavoproteins*. Eds. Ghisla, S.; Kroneck, P.; Macheroux, P.; Sund, H. Scientific, Berlin **1999**, 367-370.

<sup>82</sup> Kamerbeek, N. M.; Fraaije, M. W.; Janssen, D. B. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 2107-2116.

## Introducción

como única fuente de carbono y energía, ya que cataliza la oxidación de esta cetona aromática para formar acetato de 4-hidroxifenilo.<sup>83</sup> La HAPMO presenta una mayor actividad en la oxidación de aquellas cetonas aromáticas con un grupo electrón-dador en la posición *para* del anillo aromático. Muestra una eficiencia catalítica ( $k_{\text{cat}}/K_M$ )<sup>84</sup> de  $1400 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para su sustrato natural, (4-hidroxiacetofenona), mientras que cuando el grupo hidroxilo se sitúa en *orto* o *meta* su eficiencia desciende dramáticamente a 20 y  $3.4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , respectivamente.<sup>85</sup>

La HAPMO es capaz de oxidar benzaldehídos (Figura I.9), generando como producto mayoritario los correspondientes formiatos, lo cual indica que al igual que en la oxidación de arilcetonas, el grupo aromático es el que migra. La hidrólisis, bien enzimática o bien química, de los formiatos genera fenoles. Esta ruta biocatalítica ha sido empleada para obtener una serie de fluorofenoles,<sup>86</sup> importantes sintones en la preparación de compuestos farmacéuticos, incluyendo inhibidores de enzimas y antagonistas de receptores.<sup>87</sup> Para algunos de estos compuestos, además del formiato, también se observa la formación minoritaria del correspondiente ácido carboxílico. La proporción de cada uno de los productos finales depende de los sustituyentes presentes en el anillo aromático.



**Figura I.9.** Oxidación de benzaldehídos sustituidos catalizada por la HAPMO.

<sup>83</sup> Higson, F. K.; Focht, D. D. *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, *56*, 3678-3685.

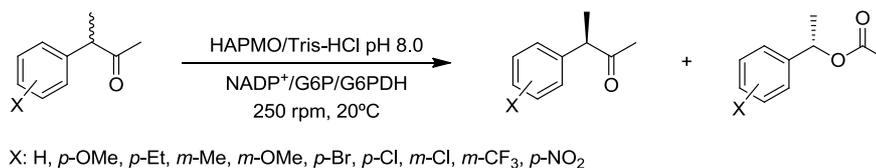
<sup>84</sup> Parámetro cinético que da idea de la eficacia de un enzima frente a un sustrato determinado. Se calcula mediante el cociente entre la constante catalítica ( $k_{\text{cat}}$ ) y la constante de Michaelis o concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima ( $K_M$ ).

<sup>85</sup> Kamerbeek, N. M.; Olsthoorn, A. J.; Fraaije, M. W.; Janssen, D. B. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 419-426.

<sup>86</sup> Moonen, M. J. H.; Westphal, A. H.; Rietjens, I. M. C. M.; van Berkel, W. J. H. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1027-1034.

<sup>87</sup> (a) Tanaka, A.; Terasawa, T.; Hagihara, H.; Ishibe, N.; Sawada, M.; Sakuma, Y.; Hashimoto, M.; Takasugi, H.; Tanaka, H. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4408-4420; (b) Robinson, R. P.; Laird, E. R.; Donahue, K. M.; Lopresti-Morrow, L. L.; Mitchell, P. G.; Reese, M. R.; Reeves, L. M.; Rouch, A. I.; Stam, E. J.; Yocum, S. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1211-1213.

Asimismo este biocatalizador en forma aislada se ha empleado en la oxidación de otros compuestos carbonílicos aromáticos como el ( $\pm$ )-2-fenilpropanaldehído y una serie de bencilcetonas racémicas.<sup>88</sup> La resolución cinética del aldehído se produjo con baja conversión y una enantioselectividad ( $E$ ) de baja a moderada en función de las condiciones.<sup>89</sup> Sin embargo, la HAPMO es capaz de oxidar las cetonas racémicas ( $\pm$ )-4-fenilhexan-3-ona, ( $\pm$ )-3-fenilhexan-2-ona, ( $\pm$ )-3-fenilpentan-2-ona y ( $\pm$ )-2-fenilpentan-3-ona a sus correspondientes ( $S$ )-ésteres, con conversiones moderadas (próximas al 20% después de 14 horas) y con enantioselectividades elevadas (mayores de 78 en todos los casos). Este estudio fue ampliado en la resolución cinética de una serie de 3-fenilbutan-2-onas racémicas sustituidas en el anillo aromático (Figura I.10). Dependiendo del sustituyente en el anillo, se obtuvieron diferentes valores de conversiones y enantioselectividades en los procesos oxidativos.<sup>90</sup> El mejor sustrato para este enzima fue la ( $\pm$ )-3-( $m$ -metilfenil)butan-2-ona, cuya oxidación se produjo con una alta enantioselectividad ( $E=126$ ) y una conversión del 20% tras dos horas. También fue posible conseguir una  $E$  elevada en la oxidación del derivado  $m$ -trifluorometil, mientras que los derivados  $m$ - y  $p$ -cloro fueron oxidados con una  $E$  moderada ( $E\sim 50$ ). Además, se realizó el análisis de los parámetros cinéticos en la oxidación de estos sustratos, observando que esta BVMO presentaba una diferencia alta en los valores de eficiencia catalítica en función de la estructura del sustrato, mostrando una baja actividad en la oxidación de la ( $\pm$ )-3-fenilbutan-2-ona y sus derivados sustituidos en posición *meta*, mientras que los derivados sustituidos en posición *para* eran oxidados con elevadas eficiencias.



**Figura I.10.** Oxidación de cetonas aromáticas racémicas catalizadas por la HAPMO.

<sup>88</sup> Rodríguez, C.; de Gonzalo, G.; Fraaije, M. W.; Gotor, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 1338-1344.

<sup>89</sup>  $E$  (enantioselectividad o razón enantiomérica) se considera un parámetro adecuado para cuantificar la selectividad de las resoluciones cinéticas catalizadas por enzimas. Ver: Chen, C.-S.; Fujimoto, Y.; Girdauskas, G.; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7295-7299.

<sup>90</sup> Rodríguez, C.; de Gonzalo, G.; Torres Pazmiño, D. E.; Fraaije, M. W.; Gotor, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1168-1173.

## Introducción

---

La HAPMO ha sido también empleada como biocatalizador en biotransformaciones con células enteras. Estos procesos tienen entre otras, la ventaja de no requerir la adición del cofactor NADPH, de elevado coste. Sin embargo acarrearán como inconveniente la posibilidad de reacciones secundarias indeseadas. Así, se han utilizado células de *E. coli* recombinantes que contienen el gen de la HAPMO para la oxidación de una serie de ciclobutanonas 3-sustituídas en sus correspondientes butirolactonas,<sup>91</sup> precursores de compuestos de elevado interés biológico (Figura I.11a).<sup>92</sup> Para el derivado 3-fenilo, la lactona obtenida presenta una elevada pureza óptica, mientras que con grupos bencílicos este enzima pierde en gran parte su selectividad.

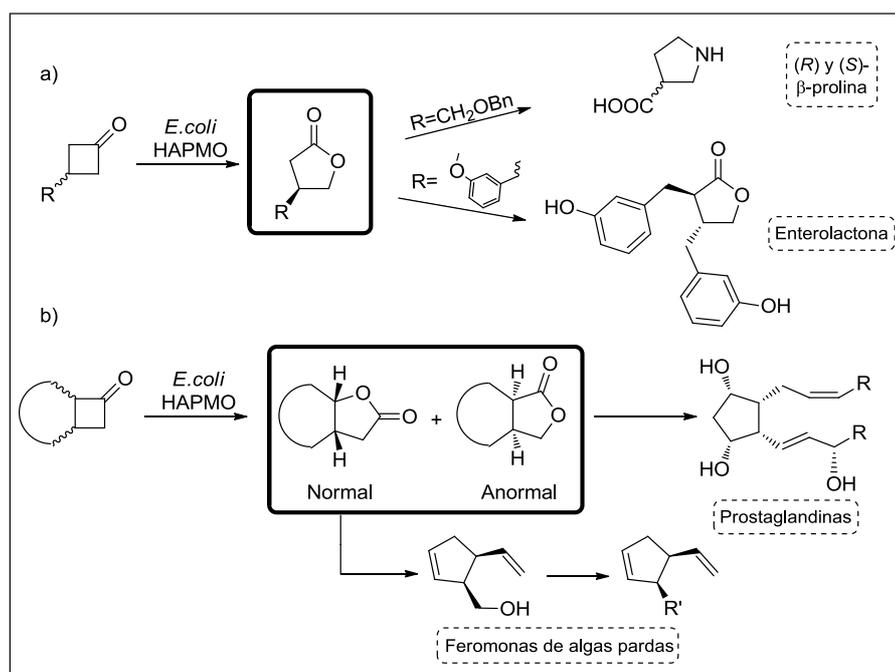
Asimismo, se emplearon distintas cetonas fusionadas como sustratos para la oxidación de Baeyer-Villiger catalizada por células recombinantes que expresan HAPMO (Figura I.11b). Para todos los sustratos se obtuvo una conversión total, generándose mezclas de las lactonas fusionadas normales (aquellas en las que se cumple la regioselectividad esperada de la reacción de Baeyer-Villiger) y anormales (aquellas en las que no se cumple la regioselectividad esperada). La proporción de los productos finales varió en función de la estructura del producto de partida. Las lactonas obtenidas en estos procesos son precursoras de compuestos biológicos de gran interés (feromonas de algas pardas y prostanglandinas).<sup>93</sup>

---

<sup>91</sup> Mihovilovic, M. D.; Kapitán, P.; Rydz, J.; Rudroff, F.; Ogink, F. H.; Fraaije, M. W. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2005**, *32*, 135-140.

<sup>92</sup> (a) Bode, J. W.; Doyle, M. P.; Protopopova, M. N.; Zhou, Q.-L. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 9146-9155; (b) Shiotani, S.; Okada, H.; Yamamoto, T.; Nakamata, K.; Adachi, J.; Nakamoto, H. *Heterocycles* **1996**, *43*, 113-126; (c) Mazzini, C.; Lebreton, J.; Alphand, V.; Furstoss, R. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 5215-5218.

<sup>93</sup> (a) Lebreton, J.; Alphand, V.; Furstoss, R. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1011-1014; (b) Lebreton, J.; Alphand, V.; Furstoss, R. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 145-160; (c) Andrau, L.; Lebreton, J.; Viazzo, P.; Alphand, V.; Furstoss, R. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 825-826.

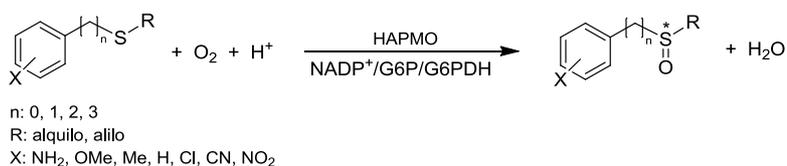


**Figura I.11.** Desimetrización y oxidación regiodivergente de a) ciclobutanonas proquirales; y b) cetonas fusionadas para la síntesis de compuestos con alto interés biológico.

La HAPMO en forma aislada es capaz de catalizar la sulfoxidación de un gran número de sulfuros aromáticos (Figura I.12). Los fenil sulfuros son los mejores sustratos para el biocatalizador, obteniéndose los (S)-sulfóxidos con altas selectividades.<sup>94</sup> La oxidación enzimática de bencil sulfuros genera productos finales con menores excesos enantioméricos, al igual que aquellos sustratos en los que el átomo de azufre está más alejado del anillo aromático. Cuando se emplean fenil sulfuros *para*-sustituidos, se obtienen en general mejores resultados con grupos electrón-dadores, mientras que la presencia de sustituyentes electrón-atractores tiene un efecto negativo en la selectividad y en la eficiencia de la HAPMO. Este biocatalizador es capaz también de oxidar sulfóxidos aromáticos racémicos a las correspondientes sulfonas, pero en procesos sin selectividad.

<sup>94</sup> de Gonzalo, G.; Torres Pazmiño, D. E.; Ottolina, G.; Fraaije, M. W.; Carrea, G. *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 130-135.

## Introducción



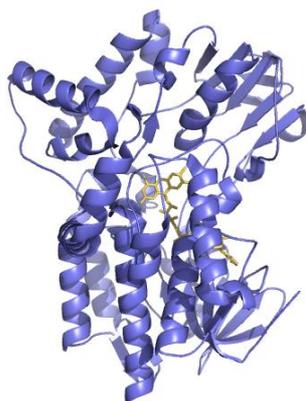
**Figura I.12.** Sulfoxidación de alquil aril sulfuros catalizada por la HAPMO.

### I.12.2. FENILACETONA MONOOXIGENASA (wtPAMO)

La PAMO (EC 1.14.13.92) es un enzima termoestable, aislado de la bacteria mesotermofílica *Thermobifida fusca*. Pertenece al Tipo I de las BVMOs, por lo que tiene FAD como grupo prostético y requiere NADPH como cofactor.<sup>50</sup> Es la primera BVMO cuya estructura ha sido elucidada por rayos X,<sup>71</sup> y la primera BVMO descubierta mediante la técnica de *genome mining* (comparación de la secuencia característica de las Baeyer-Villiger monooxigenasas de Tipo I y posterior análisis bioinformático). La wtPAMO muestra una clara afinidad por sustratos aromáticos, oxidando con una mayor eficiencia catalítica la fenilacetona. Sin embargo, también es capaz de aceptar sustratos alifáticos y de llevar a cabo la oxidación de sulfuros y sulfóxidos orgánicos, aminas y compuestos con boro y selenio.<sup>79h,i,95</sup>

La wtPAMO es una proteína monomérica de 64 kDa cuya estructura cristalina se encuentra representada en la Figura 1.13. Está formada por dos dominios, uno de enlace con el NADPH (residuos 159-389) y otro de enlace con el FAD (residuos 10-158 y 390-542), los cuales son típicos de todas las oxidorreductasas que contienen este grupo prostético. Además posee un tercer subdominio helicoidal típico de las BVMO de Tipo I (residuos 167-177), alejado del centro activo del enzima. Es en esta parte donde se conserva una Arg337, común en todas las BVMOs de Tipo I.<sup>32k</sup>

<sup>95</sup> de Gonzalo, G.; Torres Pazmiño, D. E.; Ottolina, G.; Fraaije, M. W.; Carrea, G. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3077-3083.



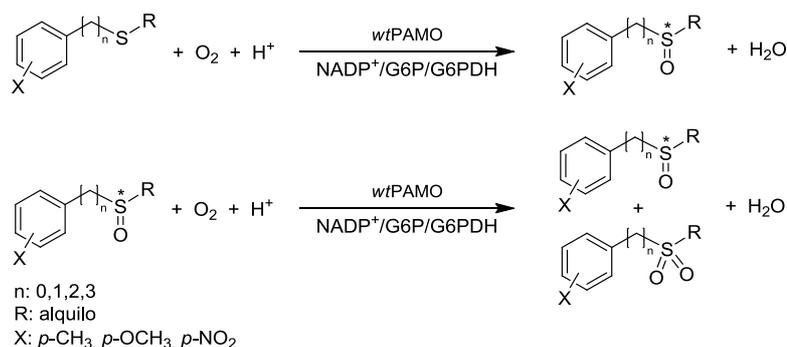
**Figura I.13.** Estructura de la wtPAMO obtenida por rayos X.

Una propiedad interesante de la wtPAMO es su activación cuando es incubada a elevadas temperaturas. Por ello, cuando el enzima se incubaba a 50°C durante una hora, su actividad se dobla.<sup>50</sup> A temperaturas superiores el enzima se desactiva, aunque su estabilidad es superior al de otras BVMOs aisladas. Los tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) para diferentes BVMOs son:  $t_{1/2wtPAMO}=24$  h a 52°C;  $t_{1/2CHMO}=24$  h a 25°C;  $t_{1/2HAPMO}=80$  min a 36°C.<sup>70,96</sup> Este biocatalizador presenta un rango de pH óptimo entre 7.0 y 9.0, alcanzando su actividad máxima a pH 8.0 para la oxidación de la fenilacetona. Como se ha demostrado recientemente, el pH del medio tiene un efecto muy importante en la selectividad de la wtPAMO.<sup>97</sup> Así, el aumento del pH en la oxidación enzimática del tioanisol provoca un aumento de la pureza óptica del (*R*)-fenil metil sulfóxido obtenido. Por el contrario, en la reacción de Baeyer-Villiger catalizada por la wtPAMO sobre el ( $\pm$ )-2-fenilpropanaldehído, se observa un descenso en la selectividad de la resolución enzimática al aumentar el pH. Esta propiedad del enzima puede explicarse por el distinto grado de protonación de ciertos aminoácidos cercanos al centro activo del biocatalizador, así como de la especie activa hidroxiflavina o peroxiflavina implicada en el ciclo catalítico.

<sup>96</sup> Zambianchi, F.; Pasta, P.; Carrea, G.; Colonna, S.; Gaggero, N.; Woodley, J. M. *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *78*, 489-496.

<sup>97</sup> Zambianchi, F.; Fraaije, M. W.; Carrea, G.; de Gonzalo, G.; Rodríguez, C.; Gotor, V.; Otolina, G. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1327-1331.

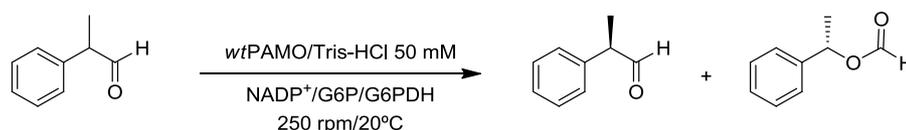
## Introducción



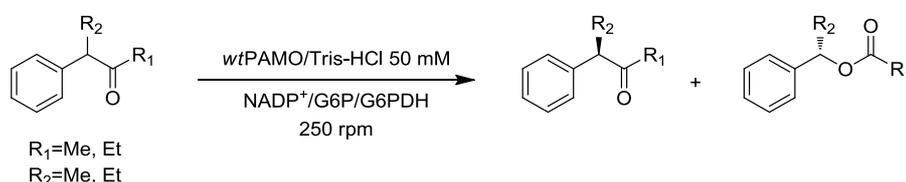
**Figura I.14.** Oxidación de sulfuros y sulfóxidos aromáticos catalizados por la wtPAMO.

Como se muestra en la Figura I.14, la wtPAMO ha sido empleada en la oxidación de una serie de sulfuros aromáticos.<sup>95</sup> La sulfoxidación de fenil sulfuros es generalmente un proceso con bajas o moderadas selectividades. Sin embargo, es posible obtener los correspondientes alquil bencil sulfóxidos con elevadas purzas ópticas. La wtPAMO presenta también buenas selectividades en la oxidación de alquil feniletil y alquil fenilpropil sulfuros. Este enzima es capaz también de catalizar la resolución enzimática de sulfóxidos racémicos, en un proceso en el cual uno de los enantiómeros del sulfóxido es oxidado a sulfona, permaneciendo el otro enantiómero sin reaccionar. Los sustratos bencílicos son los que presentan las mayores enantioselectividades, de modo que se puede establecer que la elevada pureza óptica obtenida en la sulfóxidación de alquil bencil sulfuros es debida a la síntesis asimétrica del sulfóxido más su posterior resolución cinética.

También se ha empleado este biocatalizador en la oxidación enzimática de una serie de compuestos carbonílicos aromáticos. Así, la oxidación de ( $\pm$ )-2-fenilpropionaldehído genera (*S*)-formiato de 1-feniletilo y el (*R*)-aldehído con enantioselectividades moderadas (Figura I.15). Sin embargo, se obtuvieron mejores resultados cuando se oxidaron selectivamente bencilcetonas racémicas con un grupo metilo o etilo en posición  $\alpha$  al carbonilo. En todos los casos estudiados, se obtuvieron los ésteres de configuración *S* con elevadas enantioselectividades (Figura I.16).<sup>88</sup> De esta forma, se consiguió un 19% de (*S*)-acetato de 1-fenilpropilo y un 32% de (*S*)-propionato de 1-feniletilo en forma enantiopura ( $ee_p \geq 99\%$ ,  $E > 200$ ) al cabo de 1 hora de reacción. En el mismo tiempo la ( $\pm$ )-3-fenilbutan-2-ona y la ( $\pm$ )-4-fenilhexan-3-ona fueron oxidadas para obtener (*S*)-acetato de 1-feniletilo y (*S*)-propionato de 1-fenilpropilo con excelentes enantioselectividades ( $E \geq 180$ ) y con buenas conversiones.



**Figura I.15.** Oxidación de (±)-2-fenilpropionaldehído catalizada por la *wtPAMO*.



**Figura I.16.** Oxidación de bencilcetonas racémicas catalizada por la *wtPAMO*.

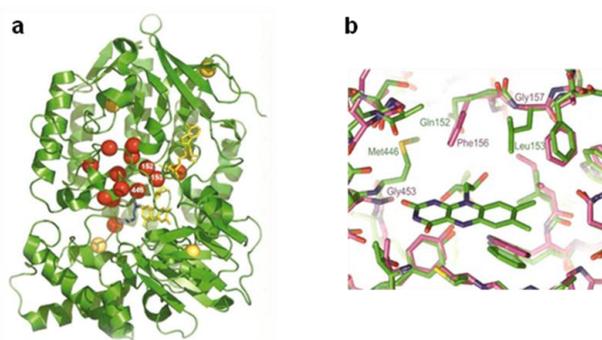
Este estudio fue completado con la oxidación de una serie de 3-fenilbutan-2-onas racémicas presentando algún sustituyente en el anillo aromático.<sup>90</sup> La introducción de sustituyentes en el anillo aromático causó un descenso en la enantioselectividad de la *wtPAMO*. Sólo en la oxidación de la 3-(*m*-metilfenil)butan-2-ona se obtiene una enantioselectividad elevada. Los derivados *p*-OMe, *m*-OMe, *m*-Cl y *p*-NO<sub>2</sub> se oxidan con buenas selectividades. El resto de cetonas estudiadas (*p*-Et, *m*-CF<sub>3</sub>, *p*-Cl, *p*-OMe y *p*-Br) generaron procesos poco selectivos ( $E < 20$ ). Este enzima presenta una actividad similar con la mayoría de los sustratos, con conversiones entre el 20% y 30% después de una hora, a excepción de los sustratos con un grupo electrón-atractor fuerte en el anillo aromático, con los que se obtienen conversiones del 50% en la mitad de tiempo. El análisis de los parámetros cinéticos en la oxidación de estas cetonas reveló que la *wtPAMO* presentaba una actividad catalítica parecida para todos los sustratos. Este hecho sugiere que en la *wtPAMO*, el paso limitante de velocidad es un evento cinético no relacionado con la reactividad del sustrato, lo cual está en concordancia con un estudio cinético previamente publicado.<sup>73a</sup>

### 1.12.3. MUTANTE DE LA FENILACETONA MONOOXIGENASA (*PAMO*<sub>M446G</sub>)

El hecho de conocer la estructura tridimensional de la *wtPAMO* (Figura I.17), ha dado lugar a la preparación de numerosos mutantes de este enzima con el objeto de conocer mejor las propiedades de este biocatalizador y/o

## Introducción

conseguir mejorar sus propiedades.<sup>72,74-76,98</sup> En un reciente estudio, basándose en diferencias estructurales entre el centro activo predicho para la CPMO *Comamonas* sp. NCIMB 9872 (BVMO con una homología del 41% en la secuencia con la *wt*PAMO) y el de la propia *wt*PAMO, se han preparado diferentes mutantes de la *wt*PAMO con una, dos y tres mutaciones.<sup>99</sup> Los residuos escogidos fueron aquellos que no coincidían en ambos enzimas, dentro del centro activo de éstos y que están localizados en la cara *re* de unión del cofactor. Dado que la especificidad de sustrato en ambos enzimas es diferente (la *wt*PAMO oxida preferentemente sustratos aromáticos mientras que la CPMO cetonas cíclicas alifáticas), se postuló que estos tres aminoácidos podrían estar implicados en la especificidad de sustrato. Estos residuos fueron Q152, L153 y M446 en la *wt*PAMO, frente a F156, G157, G453 en la CPMO, por lo que las mutaciones llevadas a cabo fueron: M446G, Q152F/L153G y Q152F/L153G/M446G. Los mutantes doble y triple de la *wt*PAMO no mostraron actividad con sustratos potenciales como fenilacetona, ciclopentanona y ciclohexanona, lo cual indica que las sustituciones Q/F por L/G producen un ajuste no adecuado del sustrato en el centro activo del enzima. Por otro lado, el mutante M446G mostró actividad con la fenilacetona pero no con la ciclopentanona o ciclohexanona. Este resultado ha servido como punto de partida para estudios más exhaustivos de este biocatalizador recombinante.



**Figura I.17.** a) Estructura de rayos X de la *wt*PAMO. b) Centro activo de la *wt*PAMO (la mutación se lleva a cabo sobre el residuo 446).

<sup>98</sup> (a) Dudek, H. M.; Torres Pazmiño, D. E.; Rodríguez, C.; de Gonzalo, G.; Gotor, V.; Fraaije, M. W. *App. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, 88, 1135-1143; (b) Dudek, H. M.; de Gonzalo, G.; Torres Pazmiño, D. E.; Stepniak, P.; Wyrwicz, L. S.; Rychlewski, L.; Fraaije, M. W. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, 77, 5370-5378.

<sup>99</sup> Torres Pazmiño, D. E.; Snajdrova, R.; Rial, D. V.; Mihovilovic, M. D.; Fraaije, M. W. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, 1361-1368.

Además de catalizar la oxidación de la fenilacetona, la PAMO<sub>M446G</sub> también muestra actividad con otras cetonas, además de sulfuros y aminas. En ciertos casos, el mutante M446G presenta actividad en la oxidación de compuestos para los que la PAMO natural no es activa, como por ejemplo, la 3,3-dimetilciclohexanona. También es capaz de catalizar la oxidación del indol, generándose un compuesto oxidado cuya dimerización espontánea da lugar a la formación del azul de índigo, producto de alto interés en química, cuya formación ya había sido descrita por otras oxigenasas.<sup>100</sup> Este tipo de reactividad no ha sido previamente descrita para ninguna otra BVMO.

En la sulfoxidación enzimática de una serie de derivados del tioanisol, el empleo de la PAMO<sub>M446G</sub> produjo un aumento tanto en las conversiones como en las purezas ópticas de la mayoría de los sulfóxidos respecto al enzima *wild type*. Además en sustratos como fenil etil y bencil metil sulfuro, se observa un cambio de selectividad.

La PAMO<sub>M446G</sub> se ha empleado en la resolución enzimática de bencilcetonas racémicas. En este caso, al igual que con la *wild*PAMO, los procesos transcurrieron con altas enantioselectividades (valores de *E* entre 120 y 170), aunque con menores actividades que con la cepa natural (conversiones entre 15-26% en 1 hora), especialmente para los derivados (±)-2-fenilpentan-3-ona y (±)-4-fenilhexan-3-ona.<sup>88</sup> También se estudió la resolución cinética de una serie de 3-fenilbutan-2-onas racémicas sustituidas en el anillo aromático empleando la PAMO<sub>M446G</sub>.<sup>90</sup> Al igual que con las bencilcetonas racémicas no sustituidas, la actividad del mutante es ligeramente inferior a la de la *wild*PAMO. La presencia de un grupo electrón-atractor en el anillo aromático provoca que las resoluciones cinéticas sean más rápidas, como se observa para los derivados *m*-CF<sub>3</sub> y *p*-NO<sub>2</sub>. En cuanto a la selectividad, esta BVMO permite obtener el (*S*)-acetato de 1-(*m*-metilfenil)etilo y el (*S*)-acetato de 1-(*p*-nitrofenil)etilo con elevados excesos enantioméricos en procesos de elevada enantioselectividad (*E*=109 y *E*=121, respectivamente). Los derivados que poseen un grupo metoxi, así como los halogenados en posición *para* y el *m*-CF<sub>3</sub>, son oxidados con buenas o moderadas selectividades. La presencia de sustituyentes *p*-etil o *m*-cloro tiene un efecto negativo en la selectividad (*E*<20). El análisis de los parámetros cinéticos en la oxidación de estas cetonas, demostró que el comportamiento cinético de este biocatalizador es parecido al de la cepa

---

<sup>100</sup> (a) Ensley, B. D.; Ratzkin, B. J.; Osslund, T. D.; Simon, M. J.; Wackett, L. P.; Gibson, D. T. *Science* **1983**, *222*, 167-169; (b) Choi, H. S.; Kim, J. K.; Cho, E. H.; Kim, Y. C.; Kim, J. I. K. S. W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *306*, 930-936; (c) Doukyu, N.; Toyoda, K.; Aono, R. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *60*, 720-725.

## *Introducción*

---

nativa, es decir, su eficiencia catalítica con los diferentes sustratos apenas varía. Su actividad catalítica es similar a la de wtPAMO ( $k_{\text{cat}} \sim 3 \text{ s}^{-1}$ ), sin embargo su afinidad por los sustratos es de 5-10 veces menor, lo que hace que la eficiencia catalítica final sea menor que la de la cepa natural.

Finalmente, la termoestabilidad de este biocatalizador ha sido también estudiada, observando un tiempo de vida medio a 50°C comparable con el de la cepa natural, por lo que la mutación mantiene esta propiedad del enzima.

# **CAPÍTULO 1**

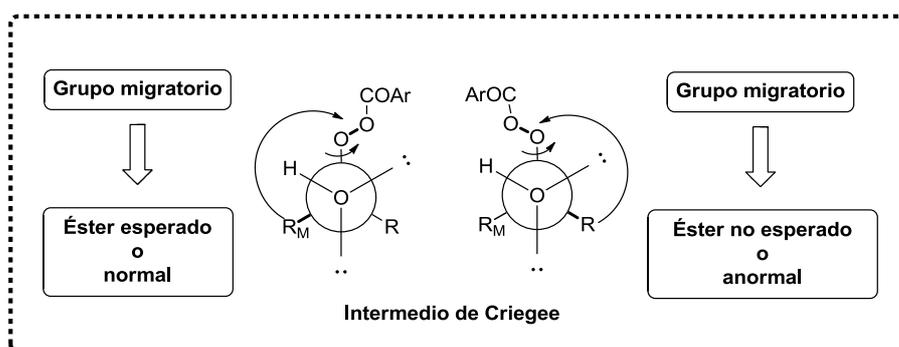
***Reacción enzimática de  
Baeyer-Villiger sobre  
cetonas benzofusionadas***



## **SECCIÓN 1: REACCIÓN ENZIMÁTICA DE BAEYER-VILLIGER SOBRE CETONAS BENZOFUSIONADAS QUIRALES**

### **1.1. LAS BAEYER-VILLIGER MONOOXIGENASAS GOBIERNAN LA REGIOSELECTIVIDAD**

Una de las mayores ventajas del uso de BVMOs en reacciones orgánicas es su capacidad de generar productos regioisoméricos muy difíciles, si no imposibles de obtener mediante las reacciones de oxidación tradicionales. Como ya se ha comentado en la Introducción, en la reacción de Baeyer-Villiger clásica, debido a razones estereoelectrónicas, el reagrupamiento del intermedio de Criegee se produce a través de la migración del grupo alquilo que está en posición antiperiplanar al enlace O-O (Figura 1.1). Cuando la conformación del enlace O-O no está regulada, el grupo alquilo más sustituido (el más nucleófilo) es el que migra preferentemente. Sin embargo, cuando la conformación de este intermedio está impuesta de tal manera que es el grupo menos sustituido el que está en posición antiperiplanar al enlace O-O, es éste el que migra. Podemos concluir que los efectos estereoelectrónicos son más importantes en la estabilización del estado de transición que la migración del carbono más nucleófilo. Así, cuando ambos grupos pueden migrar porque existe rotación libre en la molécula con el grupo carbonílico, lo hará el sustituyente más nucleófilo, generando el éster normal o esperado.



**Figura 1.1.** Migración del grupo antiperiplanar al enlace O-O en el intermedio de Criegee. Si migra el más sustituido se da lugar al éster esperado o normal, si lo hace el menos sustituido se genera el éster no esperado o anormal.

Cuando esta rotación libre esté impedida será el grupo antiperiplanar el que migre. Si éste es el menos sustituido, se generará el éster no esperado o anormal.<sup>321</sup> Este hecho se ha producido en una serie de oxidaciones de Baeyer-Villiger catalizadas por enzimas. El centro activo de un biocatalizador, debido a su ambiente quiral, impone frecuentemente unas restricciones que permiten sólo una conformación del intermedio de Criegee. En ese caso, el grupo que está en antiperiplanar migra, independientemente de que sea el más nucleófilo o no.

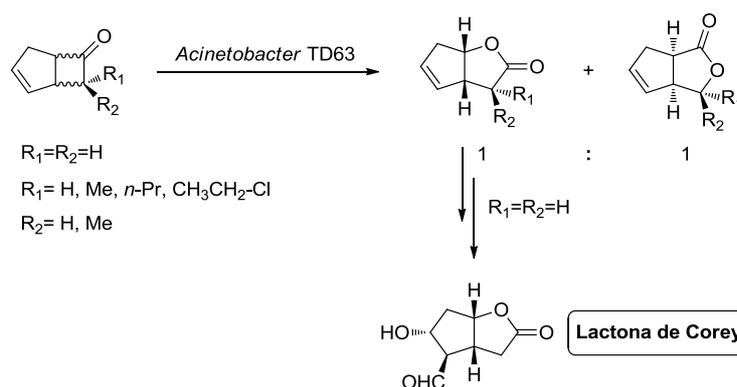
La primera transformación divergente catalizada por una BVMO (células enteras de *Corynebacterium* sp.) data de 1965 y consistió en la oxidación de la fenchona racémica a una mezcla 9:1 de su lactona normal y anormal, respectivamente. Si comparamos este resultado con la oxidación convencional, vemos que la relación de productos finales varía, ya que en este caso es de 4:6.<sup>101</sup>

Años más tarde, Alphand y Furstoss describieron la primera oxidación de Baeyer-Villiger regiodivergente y enantioselectiva catalizada por una BVMO (Figura 1.2).<sup>102</sup> Se trataba de la bioconversión de la [3.2.0]hept-2-en-6-ona con células enteras de *Acinetobacter* TD63, generándose con un buen rendimiento y de forma altamente regio- y enantioespecífica, la mezcla de lactonas regioisoméricas con proporción 1:1. La lactona normal se utilizó

<sup>101</sup> Chapman, P. J.; Meerman, G.; Gunsalus, I. C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1965**, *20*, 104-108.

<sup>102</sup> Alphand, V.; Archelas, A.; Furstoss, R. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 3663-3664.

para la síntesis de la lactona de Corey, un intermedio muy importante en la síntesis de prostanglandinas.



**Figura 1.2.** Oxidaciones regiodivergentes de derivados de la biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona.<sup>102</sup>

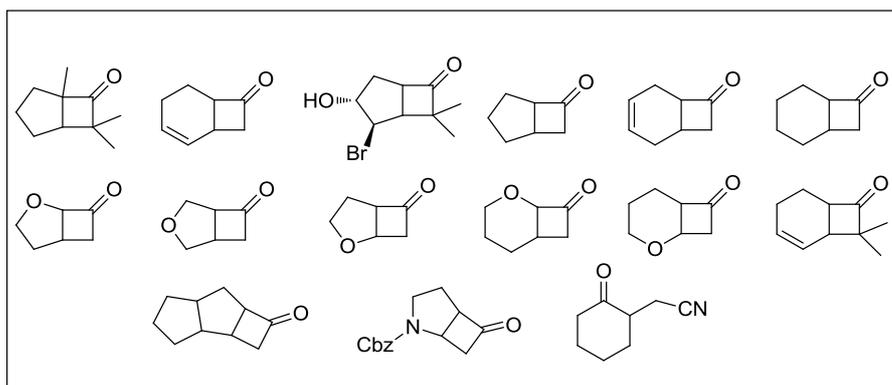
Estos autores también observaron que el microorganismo *Cunninghamella echinulata* era totalmente regioselectivo hacia la lactona no esperada en la oxidación de la biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona. Esta lactona fue utilizada como sustrato de partida para la síntesis de feromonas de algas pardas.<sup>103</sup>

A raíz de estos resultados, numerosos grupos de investigación se centraron en la oxidación con células enteras de hongos y bacterias de un amplio rango de cetonas fusionadas bicíclicas y tricíclicas (Figura 1.3).<sup>104</sup> El grupo de Furstoss llevó a cabo la oxidación de estos sustratos con células enteras de *Acinetobacter* TD 63 y *Acinetobacter* NCIMB 9871, observando en general una alta enantioselectividad y regiodivergencia. De entre los compuestos analizados, hay que destacar la importancia de la 2-oxabicyclo[3.2.0]heptan-7-ona, ya que su lactona esperada es un precursor de derivados de diterpenos de clerodano (con aplicación en síntesis de pesticidas).<sup>105</sup>

<sup>103</sup> (a) Lebreton, J.; Alphand, V.; Furstoss, R. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1011-1014; (b) Lebreton, J.; Alphand, V.; Furstoss, R. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 145-160.

<sup>104</sup> (a) Alphand, V.; Furstoss, R. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1306-1309; (b) Petit, F.; Furstoss, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1341-1352.

<sup>105</sup> Petit, F.; Furstoss, R. *Synthesis* **1995**, *12*, 1517-1520.



**Figura 1.3.** Sustratos empleados en oxidaciones divergentes catalizadas por BVMOs.<sup>104</sup>

Asimismo, la oxidación de estos sustratos se realizó empleando células recombinantes de *E. coli* que contienen el gen de CPMO o CHMO procedentes de distintos microorganismos [*Acinetobacter* (CHMO<sub>Acineto</sub>), *Arthrobacter* (CHMO<sub>Arthro</sub>), *Brachymonas* (CHMO<sub>Brachy</sub>), *Brevibacterium* (CHMO<sub>Brevi1</sub>, CHMO<sub>Brevi2</sub>), *Rhodococcus* (CHMO<sub>Rhodo1</sub>, CHMO<sub>Rhodo2</sub>) y *Comamonas* (CPMO<sub>Coma</sub>)]. En el año 2005, a raíz de un estudio filogenético, estas BVMOs se clasificaron en dos tipos.<sup>106</sup> Por un lado la CPMO<sub>Coma</sub> y la CHMO<sub>Brevi2</sub> forman el grupo “CPMO” y por el otro, el resto de las CHMOs forman el grupo “CHMO”. La CHMO<sub>Brevi1</sub> se encuentra en el medio de ambos, aunque más cerca del grupo CHMO. Se observaron resultados diversos dependiendo del tipo usado.

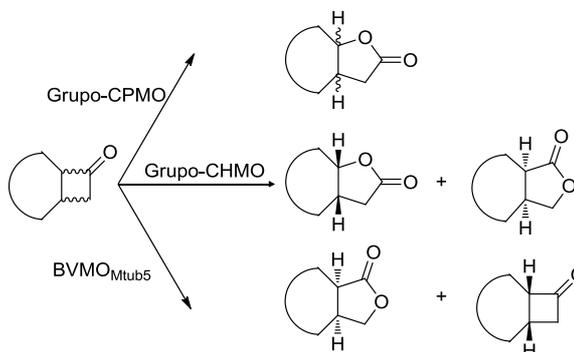
Para el grupo “CHMO” se observa regiodivergencia, es decir que dependiendo la configuración absoluta de la cetona precursora podremos obtener ambos regioisómeros del producto oxidado, mientras que el grupo “CPMO” genera habitualmente la lactona normal de las cetonas estudiadas.<sup>107</sup> Este estudio fue completado con la BVMO de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (BVMO<sub>Mtub5</sub>),<sup>108</sup> con la que se observó un comportamiento diferente, ya que reaccionaba con uno de los enantiómeros de las cetonas racémicas fusionadas, quedando el otro enantiómero sin

<sup>106</sup> Mihovilovic, M. D.; Rudroff, F.; Grötzl, B.; Kapitán, P.; Snajdrova, R.; Rydz, J.; Mach, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 3609-3613.

<sup>107</sup> (a) Mihovilovic, M. D.; Kapitán, P. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2751-2754; (b) Mihovilovic, M. D.; Kapitán, P.; Kapitánová, P. *ChemSusChem* **2008**, *1*, 143-148.

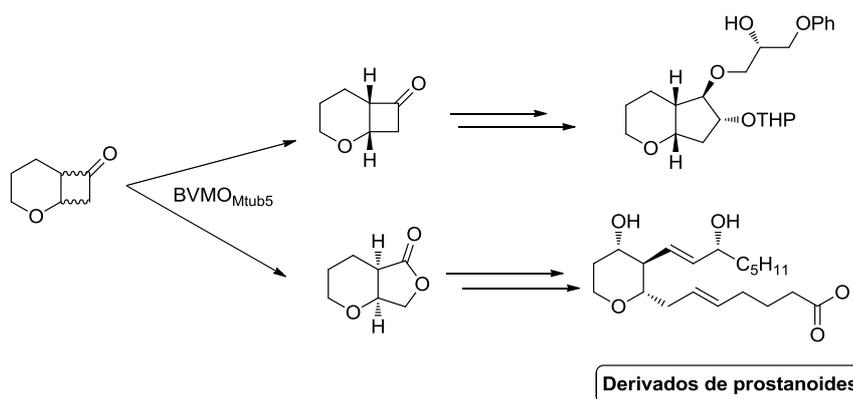
<sup>108</sup> Snajdrova, R.; Grogan, G.; Mihovilovic, M. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4813-4817.

reaccionar. Por tanto, en este caso se produjo la resolución cinética de estos sustratos, en los que la lactona final es el regioisómero no esperado (Figura 1.4). En todos los casos se obtuvieron los productos con muy buenos excesos enantioméricos y altos rendimientos.



**Figura 1.4.** Biooxidaciones regiodivergentes empleando BVMOs del grupo “CPMO”, “CHMO” y *Mycobacterium*.

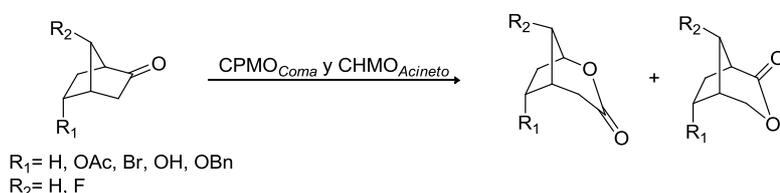
Este enzima fue también empleado en la biooxidación de ( $\pm$ )-2-oxabicyclo[4.2.0]octan-7-ona, llevándose a cabo de nuevo una resolución cinética, donde tanto sustrato como producto (lactona anormal) fueron aislados con muy buenos rendimientos y utilizados en la síntesis de derivados de prostanoides (Figura 1.5).



**Figura 1.5.** Resolución cinética de la ( $\pm$ )-2-oxabicyclo[4.2.0]octan-7-ona empleando BVMO de *Mycobacterium*.

## Capítulo 1

Otras cetonas bicíclicas oxidadas de modo regioselectivo fueron el noralcanfor y algunos de sus derivados 5,7-disustituídos. Estas reacciones fueron catalizadas por células de CPMO<sub>Coma</sub> y CHMO<sub>Acineto</sub> (Figura 1.6).<sup>109</sup> Se observó mayoritariamente la formación de los regioisómeros esperados con altos excesos enantioméricos.



**Figura 1.6.** Biooxidaciones de derivados del noralcanfor mediante células enteras que contienen el gen de diferentes BVMOs.

Las BVMOs también son capaces de mostrar regiodivergencia en la oxidación de ciclopentanonas y ciclohexanonas sustituidas en la posición 3.<sup>110</sup> En este caso es difícil predecir la migración ya que ambos carbonos poseen casi la misma nucleofilia y, por tanto, es fácil obtener mezclas de cuatro posibles productos. En los estudios iniciales sobre estos sustratos se utilizaron células recombinantes de *E. coli* y levadura de panadería que contienen el gen de la CPMO<sub>Coma</sub> y CHMO<sub>Acineto</sub> (Figura 1.7). Para la CHMO<sub>Acineto</sub> se observó que cuando el sustituyente era un resto metilo o etilo, apenas existía regioselectividad y los excesos enantioméricos eran muy bajos. Cuando los sustituyentes eran más voluminosos, tanto la regioselectividad como la enantioselectividad del proceso mejoraban. Para la CPMO<sub>Coma</sub> el comportamiento fue diferente, ya que todas las cetonas cíclicas mostraron regioselectividad hacia la lactona en el que el grupo alquílico está más cerca del oxígeno insertado (lactona proximal).

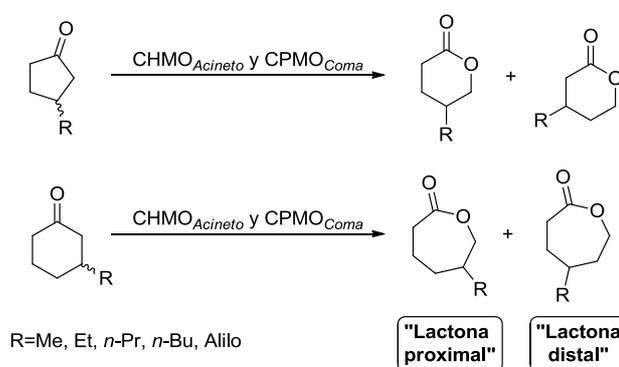
Este estudio fue completado posteriormente empleando células enteras recombinantes de *E. coli* que expresan la BVMO procedente de *Acidovorax* CHX, la CHMO<sub>Arthro</sub>, CHMO<sub>Brevi1</sub>, CHMO<sub>Brevi2</sub>, CHMO<sub>Rhodo1</sub> o CHMO<sub>Rhodo2</sub>.<sup>111</sup> En general los procesos discurrieron con poca enantioselectividad, pero fueron bastante regioselectivos hacia la formación

<sup>109</sup> (a) Sandey, H.; Willetts, A. *Biotechnol. Lett.* **1989**, *2*, 615-620; (b) Levitt, M.; Sandy, H.; Willetts, A. *Biotechnol. Lett.* **1990**, *12*, 197-200.

<sup>110</sup> (a) Martínez, C. A.; Zhu, J.; Chen, G.; Kayser, M. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3541-3548; (b) Stewart, J. D.; Reed, K. W.; Wang, S.; Kayser, M. M.; Jurkauskas, V. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 6222-6228.

<sup>111</sup> Kyte, B. G.; Rouviere, P.; Cheng, Q.; Stewart, J. D. *J. Org. Chem.* **2004**, *67*, 12-17.

de la lactona proximal. Los mejores resultados se obtuvieron con la ( $\pm$ )-3-butilciclohexanona y los enzimas CHMO<sub>Brevi1</sub> y CHMO<sub>Brevi2</sub>, generándose como único producto la (*R*)- o (*S*)-6-butiloxepan-2-ona, respectivamente. También se obtuvo un buen resultado en la oxidación de la ( $\pm$ )-3-propilciclohexanona con la CHMO<sub>Arthro</sub>, generándose exclusivamente la (*R*)-6-propiloxepan-2-ona.



**Figura 1.7.** Oxidación enzimática de 3-alkilciclohexan/pentanonas.

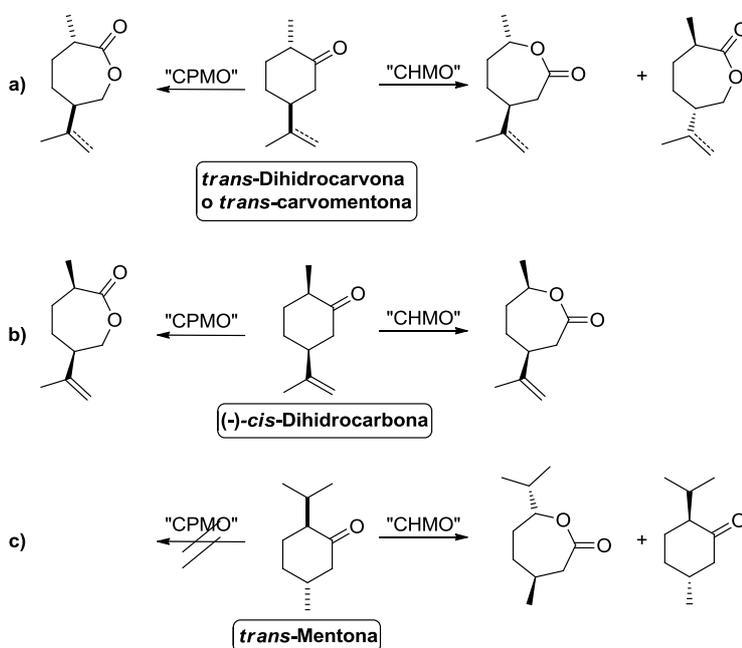
La formación de lactonas regioisoméricas fue también observada en la oxidación de terpenonas. Alphand y Furstoss llevaron a cabo la oxidación de Baeyer-Villiger de dihidrocarvonas empleando células enteras de *Acinetobacter* NCIMB 9871 y *Acinetobacter* TD63.<sup>104a</sup> Ambos enzimas convertían la (*-*)-*trans*-dihidrocarvona a la correspondiente lactona normal, mientras que la (*+*)-*trans*-dihidrocarvona generaba la lactona anormal. Por otro lado, el estudio del metabolismo del carveol y dihidrocarveol en la cepa *Rhodococcus erythropolis* DCL14 permitió descubrir que la oxidación de (*+*)-*trans*- y (*-*)-*cis*-dihidrocarvona genera la lactona normal mientras que la oxidación de los enantiómeros (*-*)-*trans* y (*+*)-*cis*-dihidrocarvona llevó a la formación de las lactonas anormales. Así, dependiendo la configuración absoluta del sustrato se obtiene una u otra lactona.<sup>112</sup>

Estudios más actuales han utilizado células de *E. coli* recombinantes que expresan el gen de la CPMO<sub>Coma</sub>, CHMO<sub>Acineto</sub>, CHMO<sub>Arthro</sub>, CHMO<sub>Brachy</sub>, CHMO<sub>Brevi</sub> o CHMO<sub>Rhodo</sub>, en la biooxidación de *trans*- y *cis*-dihidrocarvonas, carvomentona y mentona (Figura 1.8).<sup>113</sup> Los biocatalizadores del tipo "CHMO" son capaces de oxidar estos sustratos con

<sup>112</sup> Alphand, V.; Furstoss, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 379-382.

<sup>113</sup> Černuchova, P.; Mihovilovic, M. D. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 1715-1719.

buenas conversiones, mientras que las conversiones conseguidas con los enzimas del tipo "CPMO" fueron bajas. Además, el grupo "CHMO" mostró regiodivergencia al oxidar *trans*-dihidrocarvona y *trans*-carvomentona, generándose la lactona esperada para la oxidación de (-)-*trans*-dihidrocarvona y (-)-*trans*-carvomentona, y la lactona no esperada para los correspondientes (+)-*trans*. El grupo "CPMO" generó la lactona anormal de ambos enantiómeros (+)- y (-)-*trans*-dihidrocarvona y carvomentona (Figura 1.8.a). En el caso de los derivados *cis*-dihidrocarvona, la cetona (+) fue oxidada con muy baja regioselectividad por todos los enzimas empleados. En cambio, el enantiómero (-)-*cis* dio lugar a la lactona normal en la biooxidación con el grupo "CHMO" y la lactona anormal con el grupo "CPMO" (Figura 1.8.b), así que, dependiendo del tipo de BVMO, es posible obtener uno u otro regioisómero. La oxidación de la mentona presentó un comportamiento diferente, ya que el grupo "CHMO" únicamente reaccionó con uno de los enantiómeros de la cetona, quedando el otro enantiómero sin reaccionar. En este caso se produce una resolución cinética en la que la lactona final es el regioisómero favorecido (Figura 1.8.c). Este sustrato no es oxidado por los enzimas del grupo "CPMO".

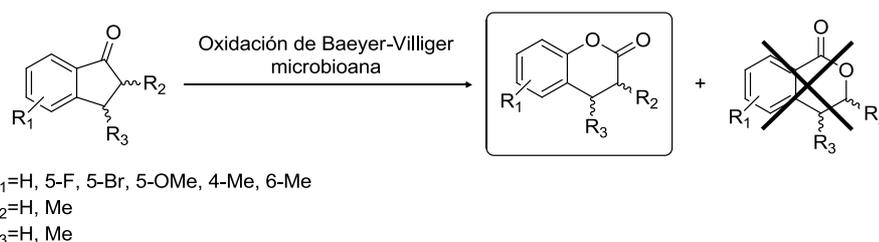


**Figura 1.8.** Biooxidaciones regiodivergentes de *trans*-dihidrocarvona y *trans*-carvomentona (a), (-)-*cis*-dihidrocarbóna (b) y *trans*-mentona (c) mediante distintas BVMOs.

Recientemente se ha llevado a cabo la oxidación de este tipo de sustratos empleando células de *E. coli* recombinantes que expresan el gen de ciclopentadecanona monooxigenasa de *Pseudomonas* sp. HI-70.<sup>114</sup> Este enzima mostró regiodivergencia y alta selectividad al oxidar la *trans*-dihidrocarvona, además de alta actividad en la oxidación de la (-)-*trans*-mentona, generando la lactona esperada con una alta enantioselectividad. Este es el primer ejemplo en el que una BVMO es capaz de transformar este sustrato.

## 1.2. REACCIONES CATALIZADAS POR BVMOs SOBRE CETONAS BENZOFUSIONADAS

En la bibliografía únicamente existe un ejemplo en el que una serie de cetonas benzofusionadas son oxidadas por distintas BVMOs (Figura 1.9).<sup>115</sup> En este estudio se emplearon como sustratos una serie de 1-indanonas sustituidas bien en el anillo aromático o bien en la posición  $\alpha$  o  $\beta$  al grupo carbonilo y como biocatalizadores dos bacterias recombinantes (*E. coli* TOP10 [pQR 239] que sobreexpresa la CHMO<sub>Acineto</sub> y *E. coli* TOP10 [hapE], que sobreexpresa la HAPMO) y la cepa natural *Pseudomonas* sp. NCIMB 9872 que posee el gen de CPMO.



**Figura 1.9.** Oxidación de derivados de la 1-indanona mediante células enteras.

En las pruebas realizadas no fue observada regiodivergencia, formándose siempre las lactonas con inserción del oxígeno en la posición arílica. La 1-indanona y los derivados 5-fluoro, 5-cloro y 5-metoxi fueron oxidados por la cepa de *Pseudomonas* sp. con altas conversiones. Las reacciones se escalaron hasta los 0.5 g de sustrato en 1.0 L de cultivo celular, obteniendo excelentes rendimientos ( $\geq 90\%$ ). Por el contrario, las otras dos BVMOs

<sup>114</sup> Fink, M. J.; Fischer, T. C.; Ruddroff, F.; Dudek, H.; Fraaije, M. W.; Mihovilovic, M. D. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2011**, *73*, 9-16.

<sup>115</sup> Gutiérrez, M. C.; Alphand, V.; Furstoss, R. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *21*, 231-238.

sobreexpresadas en *E. coli* no mostraron actividad alguna con ninguno de estos sustratos.

### 1.3. IMPORTANCIA DE LOS PARÁMETROS DE REACCIÓN EN LA BIOCATÁLISIS

La biocatálisis (el uso de enzimas como catalizadores para llevar a cabo transformaciones químicas en compuestos orgánicos) es una herramienta fundamental y comúnmente empleada en la síntesis enantioselectiva de un gran número de compuestos de interés en farmacia, agricultura e industria alimentaria.<sup>116</sup> El control y optimización de las condiciones de reacción en catálisis enzimática es de vital importancia, ya que éstas influyen decisivamente en la actividad y selectividad de los enzimas. Dentro de los parámetros de reacción más importantes a controlar se encuentran la temperatura, el pH y el medio de reacción.

- **Temperatura:** En general, a mayor temperatura, aumenta la velocidad de los procesos biocatalíticos y se produce una peor enantiodiscriminación entre ambos componentes de una mezcla racémica, lo que hace que disminuya la selectividad enzimática.<sup>117</sup> Sin embargo, existen excepciones, llegándose a aumentar notablemente la selectividad de un enzima con la modificación de la temperatura.<sup>118</sup>
- **pH:** El estado de protonación de los aminoácidos de un enzima es indudablemente un factor importante en la actividad enzimática. Este efecto se acentúa aún más cuando el centro activo del enzima está formado por aminoácidos básicos o ácidos, los cuales son fácilmente protonables o desprotonables. Por tanto, se pueden producir cambios en el entorno proteico, lo que conlleva, a su vez, cambios en la enantioselectividad enzimática.<sup>119</sup>

---

<sup>116</sup> Woodley, J. M. *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 321-327.

<sup>117</sup> (a) Faber, K.; Ottolina, G.; Riva, S. *Biocatalysis* **1993**, *8*, 91-132; (b) Phillips, R. S. *Trends Biotechnol.* **1996**, *14*, 13-16; (c) Canielli, G.; de Matteis, V.; Galletti, P.; Giacomi, D.; Orioli, P. *Chem. Commun.* **2000**, 2351-2352; (d) Takashi, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2749-2756; (e) Takashi, S. en *Future Directions in Biocatalysis*. Ed. Matsuda, T. Elsevier, Dordrecht **2007**, 21-50.

<sup>118</sup> Magnusson, A. O.; Takwa, M.; Hamberg, A.; Hult, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4582-4585.

<sup>119</sup> Lyubimov, A. Y.; Lario, P. I.; Moustafa, I.; Vrieling, A. *Nature Chem. Biol.* **2006**, *2*, 259-264.

- **Medio de reacción:** El medio de reacción más comúnmente usado en biocatálisis es el medio acuoso. Éste se puede modificar con el pH (comentado previamente) o con la fuerza iónica, ya que las interacciones electroestáticas y apolares en la proteína se ven afectadas por la concentración de sales en el medio.<sup>120</sup> Además, se ha observado que la utilización de cosolventes orgánicos altera la estructura tridimensional de los enzimas, ya que rompe numerosos enlaces de naturaleza no covalente como enlaces iónicos, de hidrógeno, de van der Waals e interacciones hidrofóbicas.<sup>121</sup> Asimismo, si el tamaño de molécula del disolvente es adecuado como para introducirse en el centro activo del enzima, puede modificar la unión del sustrato y el producto.<sup>122</sup> Todo esto produce una alteración en la actividad enzimática y en la selectividad.

#### 1.4. ENZIMAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS

La aplicación de biocatalizadores con fines sintéticos se encuentra limitada si únicamente se utilizan disoluciones acuosas como medio de reacción, ya que la mayoría de compuestos orgánicos son insolubles en agua. La necesidad de solventar este inconveniente animó a numerosos científicos a añadir pequeñas cantidades de disolventes orgánicos solubles al medio acuoso (**disolventes orgánicos miscibles**). En este caso el disolvente orgánico actúa como cosolvente para aumentar la solubilidad del sustrato y de esta forma favorecer su conversión. Se observó que en la mayoría de los casos los enzimas seguían siendo activos, aunque el biocatalizador está en contacto directo con el cosolvente y por tanto se puede inactivar fácilmente en función de la concentración de disolvente.

El simple hecho de añadir cosolvente orgánico a la biotransformación desmintió el tópico de que las reacciones enzimáticas sólo se podían llevar a cabo en medio acuoso y fue el primer paso en un largo camino dentro de la llamada ingeniería del medio (*medium engineering*).

<sup>120</sup> (a) Kheiriloom, A.; Ardjmand, M.; Vossoughi, M.; Kazemeini, M. *Biochem. Eng. J.* **1998**, *2*, 81-88; (b) Gorke, J. T.; Sriene, F.; Kazlauskas, R. J. *Chem. Commun.* **2008**, 1235-1237.

<sup>121</sup> (a) Singer, S. J. *Adv. Protein Chem.* **1963**, *17*, 1-68; (b) Schultz, G. E.; Schirmer, R. H. en *Principles of Protein Structure*, Springer Verlag, Nueva York **1979**, 27-45; (c) Olofsson, L.; Nicholls, I. A.; Wikman, S. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 750-755; (d) Öztürk, D. C.; Kazan, D.; Denizci, A. A.; Grimoldi, D.; Secundo, F.; Erarslan, A. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* **2010**, *64*, 184-188.

<sup>122</sup> Ryu, K.; Dordick, J. S. *Biochemistry* **1992**, *31*, 2588-2598.

## Capítulo 1

---

El siguiente paso en esta andanza consistió en la adición de **disolventes orgánicos inmiscibles** con el agua para generar sistemas bifásicos en los cuales el biocatalizador se encuentre disuelto en la fase acuosa y la fase orgánica actúe como reservorio de sustrato y un extractor de producto. En este caso el enzima no se encuentra en contacto directo con el disolvente lo que hace que sea más estable y su actividad no dependa tanto de la cantidad de cosolvente añadido. En estos sistemas las reacciones son más lentas, ya que el sustrato tiene que pasar la interfase para reaccionar.

Más tarde se descubrió que había enzimas, como algunos tipos de hidrolasas, que mostraban actividad incluso en sistemas orgánicos donde apenas hay agua (**disolventes orgánicos anhidros**). Para poder trabajar con enzimas en este tipo de medios, éstos se suelen liofilizar o modificar con aditivos que favorezcan su solubilidad.<sup>123</sup>

Todos estos hechos fueron descubiertos a mediados de los ochenta y supuso el comienzo de la “**enzimología en medio no acuoso**”. Se puede considerar a Klibanov como el padre de este descubrimiento, ya que sus investigaciones supusieron un gran avance para el mundo de la biocatálisis.<sup>124</sup>

Las nuevas propiedades enzimáticas observadas en medios orgánicos han supuesto grandes beneficios en la biocatálisis. Dentro de las ventajas del uso de estos medios no convencionales nos podemos encontrar:

- Aumento de la solubilidad en sustratos no polares.
- Desplazamiento de equilibrio hacia síntesis y no hidrólisis.
- Supresión de reacciones laterales en medio acuoso.
- Alteración de la especificidad de sustrato.
- Facilidad en la recuperación del enzima (vía filtración) y reciclaje.
- Facilidad en la recuperación del producto, debido a un menor punto de ebullición y presión de vapor.
- Eliminación de la contaminación microbiana.
- Cambio en el coeficiente de partición de sustrato/producto.

---

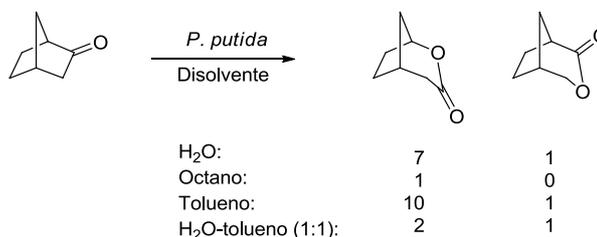
<sup>123</sup> Sheldon, R. A. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289-1307.

<sup>124</sup> (a) Zaks, A.; Klibanov, A. M. *Science* **1984**, *224*, 1249-1251; (b) Zaks, A.; Klibanov, A. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 3192-3196; (c) Zaks, A.; Klibanov, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2767-2768; (d) Klibanov, A. M. *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 141-144; (e) *Enzymatic reactions in organic media*. Eds. Koskinen, A. M. P.; Klibanov, A. M. Blackie Academic & Professional, Glasgow **1996**; (f) Klibanov, A. M. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 427-431.

A pesar de todas estas ventajas, hay que mencionar que casi todos los enzimas exhiben actividades más bajas en disolventes orgánicos, del orden de cuatro o cinco órdenes de magnitud menos que en medio acuoso. Esta pérdida se puede atribuir a numerosos factores como decrecimiento drástico de la polaridad del ambiente, disrupción de la estructura cuaternaria, desnaturalización directa por intrusión del disolvente o pérdida de agua crítica.

### 1.5. BAEYER-VILLIGER MONOOXIGENASAS EN MEDIOS NO ACUOSOS

La primera reacción de Baeyer-Villiger catalizada por BVMOs en presencia de disolventes orgánicos data del año 1998. Células de *Pseudomonas putida* NCIMB 10007 se emplearon en la oxidación de ( $\pm$ )-norbornanona usando octano, tolueno y *n*-decanol en sistemas bifásicos con agua, o como disolventes en sistemas monofásicos. La presencia del cosolvente y su proporción influían en la regioselectividad del proceso, como se muestra en la Figura 1.10.<sup>125</sup>



**Figura 1.10.** Reacción de Baeyer-Villiger catalizada por células enteras de *P. putida* NCIMB 10007 en disolventes orgánicos.

Posteriormente, se describió la producción de lauril lactona a partir de la ciclododecanona empleando células de *E. coli* que expresan la CPDMO de *Pseudomonas* sp. HI-70. La biotransformación se realizó en un biorreactor de dos fases, empleando como medio de reacción hexadecano y una fase acuosa que contenía el biocatalizador y el medio de crecimiento.<sup>126</sup> El proceso realizado en discontinuo permitía una productividad de 2.4 g/L de

<sup>125</sup> Brosa, C.; Rodríguez-Santamarta, C.; Salvá, J.; Barberá, E. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 5781-5788.

<sup>126</sup> Yang, J.; Wang, S.; Lorrain, M.-J.; Rho, D.; Abokitse, K.; Lau, P. C. K. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *84*, 867-876.

## Capítulo 1

---

lauril lactona a las 10 horas, mientras que cuando la biooxidación se realizaba en un reactor semicontinuo, se pudo incrementar este valor hasta los 11 g/L.

Existen otros ejemplos en los que se utilizan BVMOs aisladas en combinación con disolventes orgánicos. Un mutante de PAMO (PAMO-P3) fue empleado en la oxidación en medio bifásico de la ( $\pm$ )-biciclo[3.2.0]hept-2-en-6-ona.<sup>127</sup> A concentraciones de sustrato mayores de 1 g/L se producía la inhibición del enzima, mientras que la adición como cosolvente de dioctil ftalato permitía aumentar la concentración de sustrato hasta los 3 g/L. Este resultado fue mejorado cuando la reacción se llevó a cabo con el enzima aislado y una mezcla 1:1 de ciclohexano y disolución tampón Tris/HCl con 0.1% (v/v) del surfactante Tween-20, pudiendo alcanzar concentraciones de trabajo de 5 g/L. Asimismo, se realizó la resolución cinética de la ( $\pm$ )-2-fenilciclohexanona (5 g/L) usando una mezcla 1:1 de <sup>t</sup>BuOMe y la misma disolución tampón.

La *w*tPAMO también ha sido empleada en la oxidación de sulfuros en mezclas medio acuoso/cosolvente orgánico. Para todos los cosolventes probados, se produce una pérdida en la actividad y selectividad del enzima. Sin embargo, la adición de alcoholes de cadena corta en cantidades entre el 10 y el 30% (v/v) tiene un efecto positivo para la selectividad enzimática, ya que es posible obtener los sulfóxidos finales con excesos enantioméricos mayores que sólo en disolución tampón. Además, para ciertos sustratos, se observó un cambio en la estereopreferencia de la *w*tPAMO, por lo que en función del medio de reacción elegido se pueden obtener ambos enantiómeros del sulfóxido final.<sup>128</sup>

El estudio sobre el efecto de cosolventes en la *w*tPAMO fue ampliado a la reacción de Baeyer-Villiger, analizando el efecto de distintos cosolventes en la oxidación enzimática de una serie de 3-fenilbutan-2-onas racémicas (Figura 1.11).<sup>129</sup> Al igual que ocurre en los procesos de sulfoxidación, la presencia de cosolventes inactiva al enzima parcial o totalmente, produciéndose un descenso en las conversiones obtenidas. Con respecto a la selectividad enzimática, de nuevo se observa un aumento de la

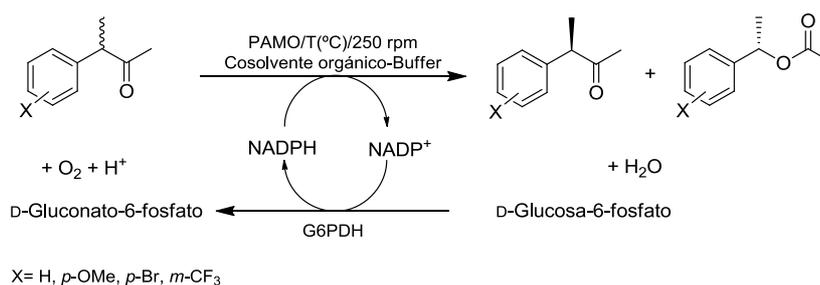
---

<sup>127</sup> Schulz, F.; Leca, F.; Hollman, F.; Reetz, M. T. *Bels. J. Org. Chem.* **2005**, *1*, 1-10.

<sup>128</sup> de Gonzalo, G.; Ottolina, G.; Zambianchi, F.; Fraaije, M. W.; Carrea, G. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *39*, 91-97.

<sup>129</sup> Rodríguez, C.; de Gonzalo, G.; Torres Pazmiño, D. E.; Fraaije, M. W.; Gotor, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 197-203.

enantioselectividad del proceso en presencia de distintas concentraciones de metanol.



**Figura 1.11.** Oxidación de derivados de la (±)-3-fenilbutan-2-ona catalizada por la wtPAMO en medios no convencionales disolución tampón-cosolvente orgánico.

El efecto de una serie de disolventes orgánicos en las propiedades biocatalíticas de la PAMO<sub>M446G</sub> también ha sido investigado.<sup>130</sup> En general, se observa que este biocatalizador aumenta su actividad enzimática en presencia de disolventes orgánicos hidrofílicos, como por ejemplo MeOH o *i*PrOH. Con respecto a la selectividad, ésta se mantiene constante o se incrementa ligeramente en medios de reacción con cosolventes orgánicos. Se ha observado incluso, que la PAMO<sub>M446G</sub> es capaz de catalizar sulfoxidaciones y reacciones de Baeyer-Villiger en estas condiciones de sustratos que no reaccionaban en medio únicamente acuoso.

Recientemente, se ha estudiado la estabilidad y actividad de la wtPAMO frente a la CHMO<sub>Acineto</sub> en presencia de disolventes orgánicos hidrofílicos.<sup>131</sup> La wtPAMO es mucho más estable que la CHMO, ya que la concentración de cosolvente a la cual su actividad se reduce a la mitad varía del 16% al 55% en función del cosolvente utilizado, mientras que para la CHMO es de un 7% como máximo. También se observó que un 20% de metanol produce un aumento de actividad de hasta el 5% para la wtPAMO, sin observarse un cambio significativo en su estructura, por lo que esta activación no se pudo explicar mediante cambios conformacionales en la proteína. Sin embargo, análisis de fluorescencia y discoísmo circular sobre la CHMO demostraron un efecto destructivo de los cosolventes orgánicos en su estructura terciaria

<sup>130</sup> de Gonzalo, G.; Rodríguez, C.; Rioz-Martínez, A.; Gotor, V. *Enzyme Microb. Technol.* **2012**, *50*, 43-49.

<sup>131</sup> Secundo, F.; Fialà, S.; Fraaije, M. W.; de Gonzalo, G.; Meli, M.; Zambianchi, F.; Ottolina, G. *Biotechnol. Bioeng.* **2011**, *108*, 491-499.

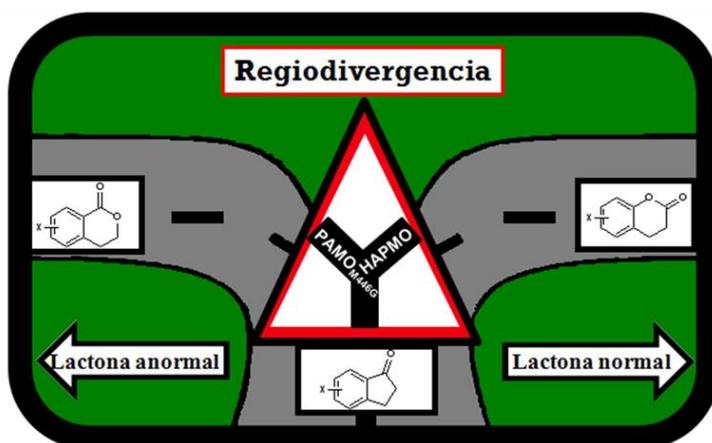
## Capítulo 1

---

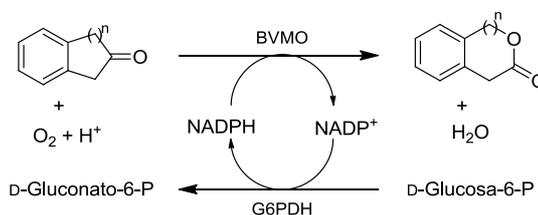
y secundaria. Una posible explicación del diferente comportamiento de estas enzimas puede deberse a que, presentando un tamaño muy similar, la wtPAMO tiene el doble de enlaces iónicos que la CHMO, lo que puede darle una mayor estabilidad.

En la presente sección del capítulo nos hemos planteado el estudio de procesos de oxidación de Baeyer-Villiger sobre una serie de cetonas benzofusionadas en medios de reacción no convencionales disolución tampón-cosolvente orgánico, utilizando para ello tres biocatalizadores aislados: la fenilacetona monooxigenasa (wtPAMO), su mutante (PAMO<sub>M446G</sub>) y la 4-hidroxiacetofenona monooxigenasa (HAPMO). Podemos establecer como objetivos principales:

- 1) Por un lado, la obtención de lactonas benzofusionadas con buenos rendimientos, intermedios útiles en síntesis orgánica y elementos estructurales clave de una amplia variedad de compuestos biológicamente activos, y además,
- 2) Realizar un estudio exhaustivo de los parámetros que influyen en la actividad y regioselectividad de los procesos oxidativos catalizados por estas tres BVMOs, de modo que se pueda adquirir un mayor conocimiento de estas enzimas.



En la presente Memoria se van a emplear Baeyer-Villiger monooxigenasas en forma aislada, por lo que es necesario el acoplamiento de un sistema auxiliar que permita la regeneración del cofactor NADPH (Figura 1.12), imprescindible para que se produzca el ciclo catalítico. Por ello, se ha empleado el sistema D-glucosa-6-fosfato/glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P/G6PDH).<sup>132</sup> Como medio de reacción se ha utilizado una disolución tampón (buffer o disolución reguladora) de tris-(hidroximetil)aminometano ajustada con ácido clorhídrico (Tris/HCl) a diferentes pHs.



**Figura 1.12.** Oxidación enzimática de Baeyer-Villiger de cetonas benzofusionadas empleando un segundo sistema enzimático para la regeneración del cofactor.

<sup>132</sup> Wong, C.-H.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 4890-4899.

## 1.6. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE TETRALONAS

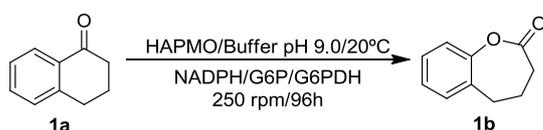
### 1.6.1. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE LA 1-TETRALONA

Nuestros primeros estudios se centraron en la oxidación enzimática de la 1-tetralona (**1a**) catalizada por la *wt*PAMO, su mutante M446G y la HAPMO empleando como medio de reacción una disolución de Tris/HCl a pH 9.0. Las reacciones fueron llevadas a cabo a 30°C para los dos tipos de PAMO, mientras que para la HAPMO, 20°C es una temperatura más apropiada, según los estudios precedentes.<sup>88</sup> Después de 96 horas, no se observó reacción con la *wt*PAMO y su mutante M446G, mientras que sólo un 5% del regioisómero esperado, 4,5-dihidro-1-benzoxepin-2(3*H*)-ona (**1b**), se obtuvo cuando se llevó a cabo la reacción con la HAPMO.

Debido a la baja conversión obtenida en medio acuoso, posiblemente provocada por la escasa solubilidad de **1a**, nos plantemos llevar a cabo la oxidación catalizada por la HAPMO en presencia de un 5% (v/v) de una serie de cosolventes orgánicos con diferentes propiedades físico-químicas. Como se observa en la Tabla 1.1, sólo el uso de cosolventes con un alto carácter hidrofóbico ( $\log P \geq 2.0$ )<sup>133</sup> lleva a un incremento de la formación de **1b**. Así, la adición en el medio de reacción de un 5% de tolueno o 2-octanol (entradas 8 y 9, respectivamente), permiten la obtención de la lactona **1b** con un 25% de conversión. Se puede observar también que la adición de un 5% de hexano (entrada 10) genera una conversión del 15%. Por el contrario, ninguno de los disolventes hidrofílicos empleados ( $\log P \leq 0$ ) fueron capaces de mejorar los resultados obtenidos en disolución tampón.

A la vista de estos resultados, decidimos llevar a cabo la oxidación de **1a** catalizada por la *wt*PAMO y su mutante M446G con diferentes cosolventes. En ninguno de los casos se obtuvo la lactona final después de altos tiempos de reacción.

**Tabla 1.1.** Efecto del medio de reacción en la oxidación catalizada por la HAPMO de la 1-tetralona (**1a**).



<sup>133</sup> Logaritmo del coeficiente de partición de un compuesto dado en un sistema bifásico estándar *n*-octanol/agua. Este parámetro indica el carácter hidrofóbico o hidrofílico de un compuesto.

Entrada	Cosolvente	logP	c(%) <sup>a</sup>
1	--	--	5
2	5% MeOH	-0.76	≤3
3	5% 1,4-dioxano	-0.27	≤3
4	5% <sup>i</sup> PrOH	0.07	≤3
5	5% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.25	≤3
6	5% <sup>t</sup> BuOMe	1.35	7
7	5% <sup>t</sup> Pr <sub>2</sub> O	2.00	≤3
8	5% tolueno	2.50	26
9	5% 2-octanol	2.72	25
10	5% hexano	3.50	15

<sup>a</sup> Determinada por CG.

### 1.6.2. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE LA 2-TETRALONA

Posteriormente, se ha estudiado la oxidación enzimática de la 2-tetralona (**2a**) catalizada por los tres enzimas descritos. Se probaron distintas condiciones de reacción modificando el pH, la temperatura y empleando diferentes cosolventes, pero no se observó reacción en ninguno de los casos.

Podemos establecer que las tetralonas estudiadas no son buenos sustratos para ninguno de los tres enzimas. Este hecho puede deberse bien a su pobre solubilidad en medio acuoso, bien a su mala adaptación en el centro activo del enzima o bien a que la obtención del producto final está desfavorecida, ya que se formaría un ciclo de siete miembros termodinámicamente inestable.

### 1.7. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE INDANONAS

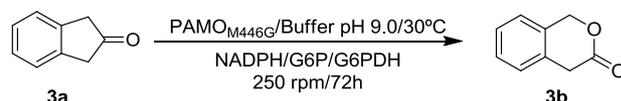
#### 1.7.1. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE LA 2-INDANONA

Una vez estudiada la oxidación de tetralonas, decidimos analizar la reacción de Baeyer-Villiger sobre cetonas benzofusionadas de cinco miembros. Inicialmente, se realizó la oxidación enzimática de la 2-indanona (**3a**) en Tris/HCl a pH 9.0, catalizada por las cepas naturales de HAPMO y PAMO. De nuevo no observamos producto de reacción en ninguno de los casos. Cuando modificamos el medio de reacción mediante la adición de diferentes cosolventes, se observa un aumento de la actividad enzimática en la oxidación catalizada por la HAPMO. Así, después de 72 horas podemos obtener un 10% de 3-isocromanona (**3b**) cuando usamos un 5% de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> o hexano como cosolventes. Con objeto de mejorar estos resultados, llevamos a cabo un estudio de la concentración de este último cosolvente. En todos los casos obtuvimos peores conversiones, por lo que la cantidad de hexano

## Capítulo 1

óptima para este sistema es del 5% (v/v). En la reacción catalizada por la *w*tPAMO también se modificaron otros parámetros de reacción, pero no obtuvimos lactona en ninguno de los casos. A continuación se empleó la PAMO<sub>M446G</sub> en la oxidación de **3a**, observándose la formación de un 50% de lactona **3b** a las 72 horas. Con el fin de optimizar el porcentaje de **3b** obtenido, estudiamos el uso de un 5% (v/v) de distintos cosolventes (Tabla 1.2).

**Tabla 1.2.** Efecto del medio de reacción en la oxidación biocatalizada por la PAMO<sub>M446G</sub> de la 2-indanona (**3a**).



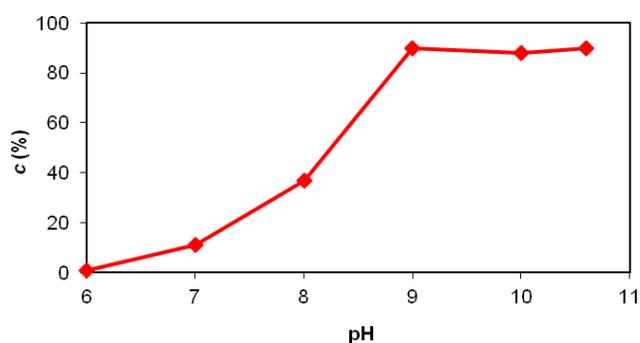
Entrada	Cosolvente	logP	c(%) <sup>a</sup>
1	--	--	50
2	5% MeOH	-0.76	83
3	5% 1,4-dioxano	-0.27	90
4	5% <sup>i</sup> PrOH	0.07	72
5	5% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1.25	69
6	5% <sup>t</sup> BuOMe	1.35	69
7	5% <sup>i</sup> Pr <sub>2</sub> O	2.00	89
8	5% tolueno	2.50	71
9	5% 2-octanol	2.72	55
10	5% hexano	3.50	77

<sup>a</sup> Determinada por CG.

Con todos los cosolventes analizados se produce una oxidación de **3a** más efectiva. Los mejores resultados se obtuvieron con un disolvente hidrofílico como el 1,4-dioxano (entrada 3) y con otro de tipo hidrofóbico como el <sup>i</sup>Pr<sub>2</sub>O (entrada 7) alcanzándose conversiones cercanas al 90% en 72 horas. De esta manera hemos demostrado las ventajas que aporta el uso de un medio parcialmente orgánico en la oxidación de Baeyer-Villiger de la 2-indanona catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub>.

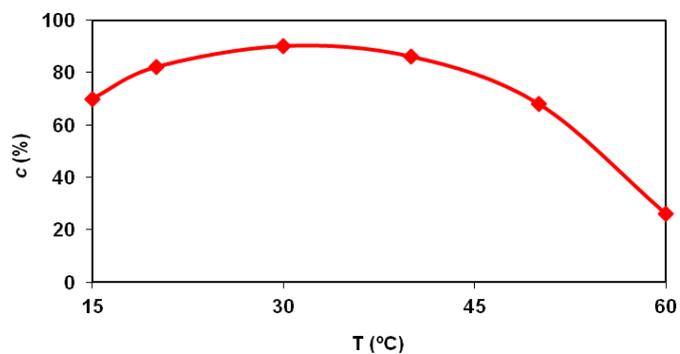
A la vista del excelente resultado en la oxidación de **3a** en Tris/HCl con un 5% de 1,4-dioxano, analizamos el efecto de ciertos parámetros de reacción como el pH y la temperatura. Hay que tener en cuenta que las oxidaciones se llevan a cabo en un doble sistema enzimático, por lo tanto ambos parámetros pueden afectar también a la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Como se puede observar en la Figura 1.13, se produce un incremento de la actividad de la PAMO<sub>M446G</sub> cuando se trabaja a pH altos. A pH 6.0 no se observa reacción alguna, mientras que si incrementamos el pH hasta 9.0, se produce

un aumento importante de la conversión. Finalmente, desde pH 9.0 hasta pH 10.5 se observa un mantenimiento de la actividad enzimática ( $c=88-90\%$ , después de 72 horas). Este comportamiento es muy similar al previamente estudiado para la HAPMO y la *wt*PAMO en otros procesos oxidativos.<sup>88</sup>



**Figura 1.13.** Efecto del pH en la oxidación de la 2-indanona catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub>.

En lo que respecta al efecto de la temperatura en la actividad de la PAMO<sub>M446G</sub>, podemos constatar que sigue un patrón muy parecido al de la *wt*PAMO. Como muestra la Figura 1.14, la conversión de **3b** en la oxidación catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub> es de 70% a 15°C. Ésta aumenta a medida que lo hace la temperatura alcanzándose el valor óptimo a 30°C ( $c=90\%$ ). A partir de este valor, el aumento de temperatura provoca un decrecimiento en la conversión, disminuyendo hasta el 26% a 60°C. De todos modos, es importante señalar que el sistema enzimático puede funcionar a estas temperaturas tan elevadas.



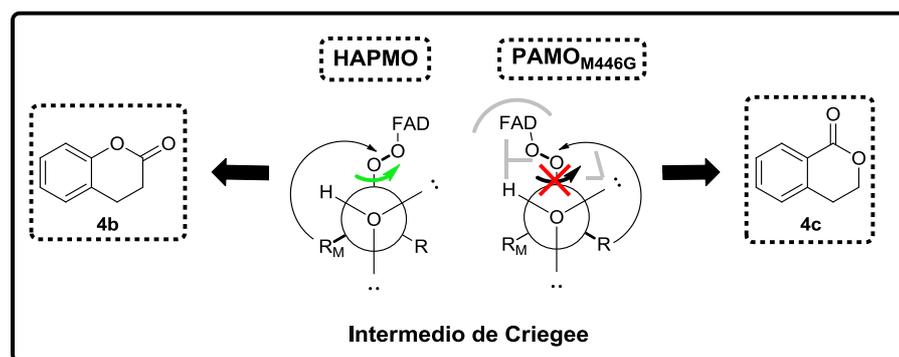
**Figura 1.14.** Efecto de la temperatura en la oxidación de la 2-indanona catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub>.

### 1.7.2. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE LA 1-INDANONA

Una vez optimizada la oxidación de la 2-indanona por BVMOs, decidimos llevar a cabo la oxidación de la 1-indanona (**4a**), una cetona que puede generar las dos lactonas regioisoméricas en el proceso de Baeyer-Villiger. La oxidación de **4a** empleando HAPMO en Tris/HCl pH 9.0 y 20°C forma como producto la lactona normal 3,4-dihidrocumarina (**4b**), con un 26% de conversión después de 72 horas. En la oxidación con la *wt*PAMO no se observa ningún producto en las mismas condiciones. Finalmente, se procedió a la oxidación de la 1-indanona catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub>. Sorprendentemente, se consigue un 67% de un compuesto que presenta la misma masa molecular que **4b**. Este compuesto corresponde al producto obtenido en la oxidación del isocromano con clorito de sodio,<sup>134</sup> y es la lactona no esperada de la oxidación de Baeyer-Villiger de **4a**, la 1-isocromanona (**4c**). Por lo tanto, mediante la elección adecuada del biocatalizador, es posible obtener los dos regioisómeros de la oxidación de la 1-indanona. Este es un ejemplo de regiodivergencia en BVMOs (Figura 1.15), donde la 1-indanona se termina adaptando en el centro activo de la HAPMO de tal manera que el resto más sustituido es el que está situado en antiperiplanar al enlace O-O del hidroperóxido. Este hecho puede ocurrir por dos razones: 1) el enlace O-O tiene su libre giro restringido debido al ambiente quirral del centro activo del enzima y coincide que la 1-indanona se acomoda de tal forma que el resto más sustituido queda en antiperiplanar a este enlace, o 2) el ambiente quirral del centro activo no es capaz de restringir el libre giro del enlace O-O y por tanto éste se dispone en posición antiperiplanar al resto más sustituido, cuya migración se encuentra favorecida por nucleofilia. En cualquier caso, el grupo más sustituido es el que finalmente se encuentra en antiperiplanar y el que migra, dando lugar a la lactona esperada **4b**. En la oxidación catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub>, el sustrato se coloca en el centro activo del enzima de manera que es el grupo menos sustituido el que se encuentra en antiperiplanar al enlace O-O. El giro de éste sí se encuentra impedido, por lo que es el grupo menos sustituido el que migra en la reacción de Baeyer-Villiger, dando lugar a la lactona no esperada, **4c**.

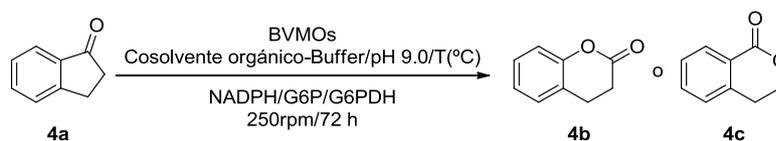
---

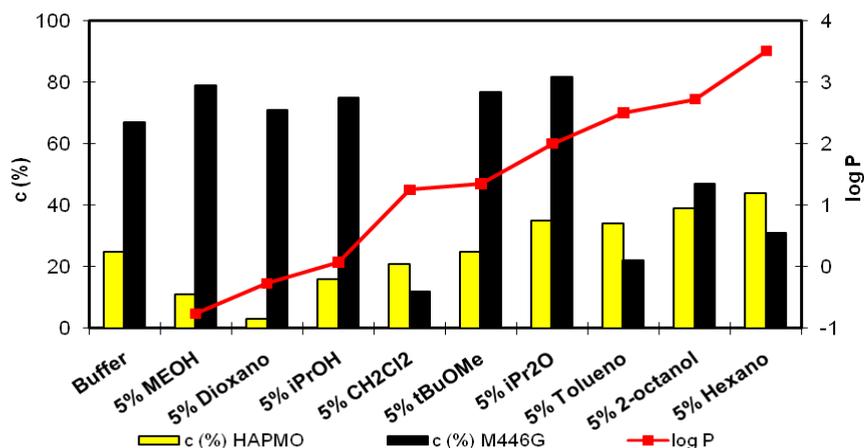
<sup>134</sup> Silvestre, S. M.; Salvador, J. A. R. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 2439-2445.



**Figura 1.15.** Regiodivergencia de la HAPMO y la PAMO<sub>M446G</sub> en la oxidación de la 1-indanona.

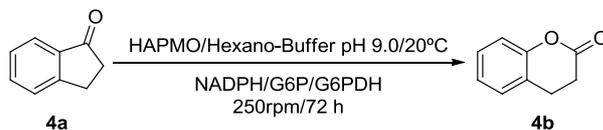
Una vez observada la regiodivergencia de **4a**, se analizó el efecto de distintos cosolventes orgánicos en su oxidación catalizada por ambas enzimas. Como se muestra en la Figura 1.16, el uso de disolventes hidrofóbicos como hexano, 2-octanol o tolueno, incrementan la actividad enzimática de la HAPMO generándose **4b** con un 39, 44 y 34% de conversión, respectivamente. Por otro lado, disolventes hidrofílicos como 1,4-dioxano y metanol producen una importante disminución en la conversión de **4a**. Aquellos cosolventes con un log P intermedio, como CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y <sup>t</sup>BuOMe, dan lugar a conversiones similares a las obtenidas cuando la oxidación se realiza en medio acuoso, en torno al 25%. Por otro lado, la PAMO<sub>M446G</sub> muestra un comportamiento distinto a la HAPMO. Su actividad se incrementa con el uso de disolventes hidrofílicos como metanol, 1,4-dioxano o isopropanol, así como distintos éteres inmiscibles en agua (<sup>t</sup>Pr<sub>2</sub>O o <sup>t</sup>BuOMe), alcanzándose conversiones de **4c** mayores del 70% después de 72 horas. El empleo de cosolventes con un elevado carácter hidrofóbico como tolueno y hexano produce la inactivación de la PAMO<sub>M446G</sub>, obteniéndose **4c** con conversiones alrededor del 30%.

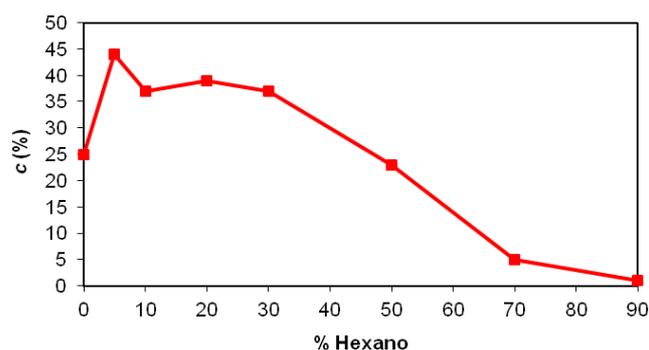




**Figura 1.16.** Efecto del medio de reacción en la biooxidación de la 1-indanona (**4a**) catalizada por la HAPMO y la PAMO<sub>M446G</sub>.

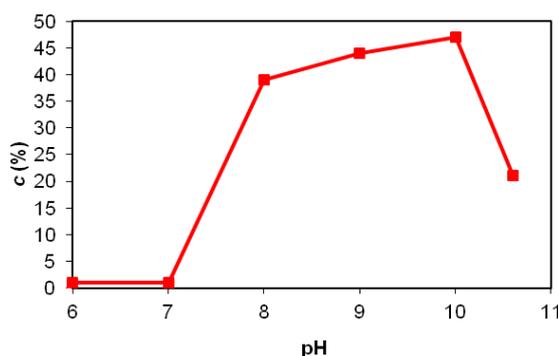
A continuación centramos nuestro estudio en la optimización de otros parámetros que afectan a la biooxidación de **4a**. Las reacciones catalizadas por la HAPMO se llevaron a cabo utilizando hexano como cosolvente, analizando inicialmente el efecto de su concentración en el biocatalizador. La Figura 1.17 muestra un máximo de conversión (44%) a una concentración de 5% de hexano. A medida que aumenta la proporción de cosolvente se produce un ligero decrecimiento de la actividad hasta el 30% de concentración ( $c=37\%$ ). A partir de este porcentaje, la desactivación del enzima es muy pronunciada. Hay que destacar que esta BVMO es capaz de soportar cantidades de cosolvente hasta el 70%.





**Figura 1.17.** Efecto de la concentración de cosolvente en la oxidación enzimática de **4a** catalizada por la HAPMO.

El efecto del pH en la oxidación de **4a** a 20°C con un sistema disolución tampón/5% de hexano fue estudiado. Todas las reacciones se analizaron a las 72 horas. Como se puede observar en la Figura 1.18, a pHs bajos (6.0 y 7.0) no hay oxidación, mientras que a medida que aumentamos el pH se incrementa la actividad enzimática, alcanzando un 47% de **4b** a pH 10.0. Mayores pHs provocan una disminución de la conversión, obteniéndose un valor del 20% cuando trabajamos a pH 10.5.

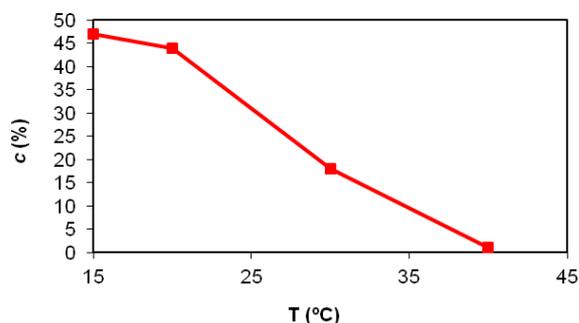


**Figura 1.18.** Efecto de pH en la oxidación enzimática de **4a** catalizada por la HAPMO.

Por último, el efecto de la temperatura en la oxidación de **4a** con 5% de hexano a pH 9.0 fue analizado. Como se puede observar en la Figura 1.19, la reacción catalizada por la HAPMO alcanzó la mayor conversión a 15°C ( $c=47%$  a las 72 horas), mientras que a temperaturas más altas sufre una importante desactivación, no observándose oxidación de Baeyer-Villiger a

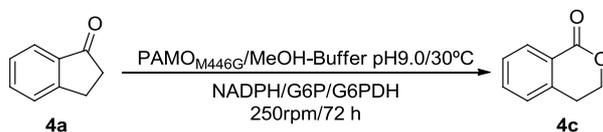
## Capítulo 1

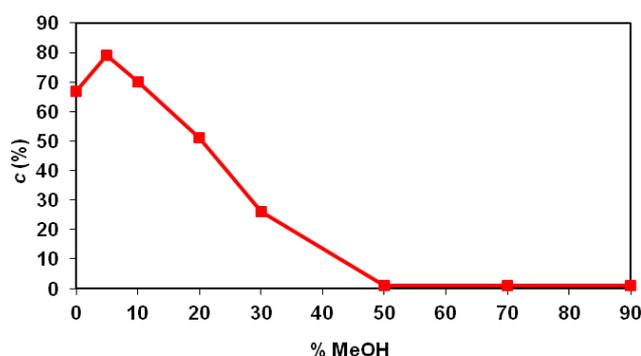
40°C. Este resultado corrobora estudios previos llevados a cabo sobre este biocatalizador, en los que se estableció que el rango de temperatura óptima estaba entre los 15-20°C.<sup>88</sup>



**Figura 1.19.** Efecto de la temperatura en la oxidación enzimática de **4a** catalizada por la HAPMO.

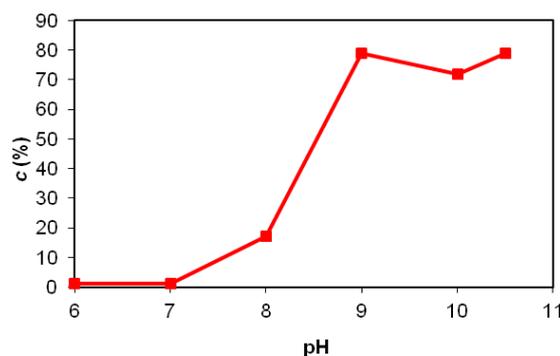
La optimización de parámetros fue repetida en las reacciones empleando la PAMO<sub>M446G</sub>, en este caso en presencia de metanol. Inicialmente nos centramos en el efecto de la concentración de este cosolvente. Como se puede observar en la Figura 1.20, la concentración óptima de metanol resulta ser un 5% ( $c=79\%$  a las 72 horas). A medida que aumentamos la proporción de éste, se produce un descenso drástico en la actividad enzimática. Podemos destacar que la PAMO<sub>M446G</sub> se inactiva totalmente a concentraciones de MeOH del 50%. Este efecto puede deberse al hecho de que al emplear un disolvente miscible con el agua se produce una mayor interacción del disolvente con el enzima.





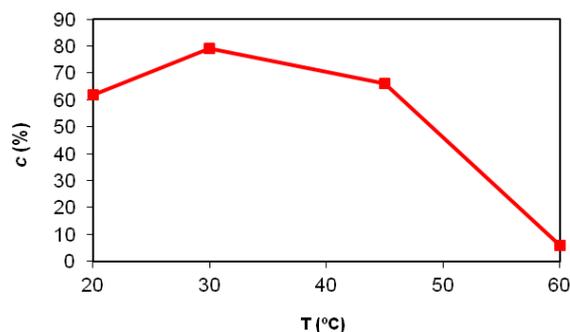
**Figura 1.20.** Efecto de la concentración de cosolvente en la oxidación enzimática de **4a** catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub>.

A continuación estudiamos el efecto del pH en la preparación de **4c** a 30°C y tras 72 horas en un medio Tris/HCl con 5% de MeOH. Como refleja la Figura 1.21, a pHs bajos (6.0-7.0) el enzima no muestra actividad. Según aumentamos el pH, se incrementa la proporción de **4c**, alcanzándose valores máximos a pHs altos (hasta 79% de conversión). A diferencia de la HAPMO, la PAMO<sub>M446G</sub> muestra elevada actividad a pH 10.5.



**Figura 1.21.** Efecto del pH en la oxidación enzimática de **4a** catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub>.

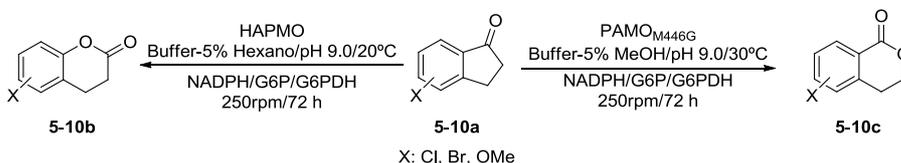
Finalmente, se analizó el efecto de la temperatura (Figura 1.22). Podemos observar un máximo en la actividad enzimática a 30°C, alcanzándose valores de conversión del 79% a las 72 horas. Este biocatalizador es capaz de catalizar la formación de **4c** con buenas conversiones hasta 45°C. Mayores temperaturas provocan un descenso en la conversión, generándose solamente un 6% de **4c** a 60°C.



**Figura 1.22.** Efecto de la temperatura en la oxidación enzimática de **4a** catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub>.

### 1.7.3. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE DERIVADOS DE LA 1-INDANONA

Debido a los buenos resultados en la oxidación de la 1-indanona, extendimos esta metodología a la oxidación de varios derivados de **4a** presentando grupos halogenados y oxigenados en el anillo aromático. Los procesos biocatalíticos se llevaron a cabo con las tres BVMOs, obteniéndose el mismo patrón de oxidación que con **4a**. Las reacciones catalizadas por la HAPMO dieron lugar a las lactonas esperadas, **5-10b**, mientras que la PAMO<sub>M446G</sub> generó las lactonas no esperadas, **5-10c** (Figura 1.23). De nuevo no se observó reacción alguna para ninguno de los sustratos **5-10a** cuando se utiliza la *wt*PAMO.



**Figura 1.23.** Oxidación enzimática de derivados de la 1-indanona catalizada por BVMOs cuando trabajamos en distintos medios de reacción.

En todos los casos la utilización de un 5% (v/v) de cosolvente orgánico, bien hexano en las reacciones catalizadas por la HAPMO o bien MeOH con la PAMO<sub>M446G</sub>, provoca un aumento en las conversiones respecto a las realizadas en disolución tampón.

Respecto a la oxidación de los derivados halogenados **5-7a** (Tabla 1.3), la PAMO<sub>M446G</sub> muestra una mayor actividad que la HAPMO. La oxidación de la 5-cloro-1-indanona (**5a**) catalizada por la HAPMO en disolución tampón transcurre con una conversión del 39% (entrada 1), aumentando ésta hasta un 87% con la presencia de un 5% de hexano (entrada 2). De igual manera ocurre con la PAMO<sub>M446G</sub>. El uso de un 5% de MeOH (entrada 4) permite la obtención de un 92% de la 6-cloroisocroman-1-ona (**5c**) frente al 54% en disolución tampón (entrada 3). En la biooxidación de la 6-cloro-1-indanona (**6a**) se produce el mismo efecto de un modo menos acusado. Así, la adición de un 5% de hexano apenas afecta a la conversión para la HAPMO (entradas 5 y 6), mientras que la presencia de un 5% de metanol en el proceso catalizado por PAMO<sub>M446G</sub> permite la formación de la 7-cloro-1-isocromanona (**6c**) con un incremento de conversión del 27% respecto al medio acuoso (entrada 8).

**Tabla 1.3.** Oxidación enzimática de derivados halogenados de la 1-indanona catalizada por BVMOs.

Entrada	X	Cosolvente	BVMO	5-7b(%) <sup>a</sup>	5-7c(%) <sup>a</sup>
1	5-Cl	No	HAPMO	39	≤3
2	5-Cl	5% hexano	HAPMO	87	≤3
3	5-Cl	No	M446G	≤3	54
4	5-Cl	5% MeOH	M446G	≤3	92
5	6-Cl	No	HAPMO	52	≤3
6	6-Cl	5% hexano	HAPMO	56	≤3
7	6-Cl	No	M446G	≤3	52
8	6-Cl	5% MeOH	M446G	≤3	79
9	5-Br	No	HAPMO	6	≤3
10	5-Br	5% hexano	HAPMO	52	≤3
11	5-Br	No	M446G	≤3	57
12	5-Br	5% MeOH	M446G	≤3	95

<sup>a</sup> Determinada por CG.

Finalmente estudiamos la 5-bromo-1-indanona (**7a**). Cuando llevamos a cabo la oxidación biocatalizada por la HAPMO en disolución tampón obtenemos tan sólo un 6% de la 6-bromo-3,4-dihidrocumarina (**7b**) (entrada 9), mientras que al adicionar un 5% de hexano, la conversión aumenta hasta un 52% (entrada 10). El uso de la PAMO<sub>M446G</sub> como biocatalizador en disolución tampón genera un 57% de la 6-bromo-1-isocromanona (**7c**) (entrada 11). Este compuesto puede obtenerse con una conversión del 95% mediante la adición de un 5% de metanol (entrada 12).

La HAPMO muestra menor actividad para la 5-bromo-1-indanona que para su análogo 5-cloro en los dos medios de reacción estudiados, mientras que la

## Capítulo 1

PAMO<sub>M446G</sub> muestra una actividad similar para ambos sustratos, siendo especialmente elevada en presencia de un 5% de MeOH (entradas 4 y 12).

A continuación analizamos derivados de la 1-indanona con grupos oxigenados en el anillo aromático. Para ambas enzimas, las metoxi-1-indanonas son peores sustratos que sus análogos halogenados. La 4-metoxi-1-indanona (**8a**) no es oxidada por la HAPMO ni en buffer ni en un medio con 5% de hexano (entradas 1 y 2), mientras que la PAMO<sub>M446G</sub> sí es capaz de catalizar la formación del enantiómero no esperado. Se obtiene la 5-metoxi-1-isocromanona (**8c**) con una conversión moderada (entrada 3) después de 72 horas. Un 5% de MeOH no produce variación alguna en la conversión, generándose un 58% de **8c** (entrada 4).

**Tabla 1.4.** Oxidación enzimática de derivados oxigenados de la 1-indanona catalizada por BVMOs.

Entrada	X	Cosolvente	BVMO	8-10b(%) <sup>a</sup>	8-10c(%) <sup>a</sup>
1	4-OMe	No	HAPMO	≤3	≤3
2	4-OMe	5% hexano	HAPMO	≤3	≤3
3	4-OMe	No	M446G	≤3	57
4	4-OMe	5% MeOH	M446G	≤3	58
5	5-OMe	No	HAPMO	13	≤3
6	5-OMe	5% hexano	HAPMO	32	≤3
7	5-OMe	No	M446G	≤3	26
8	5-OMe	5% MeOH	M446G	≤3	36
9	6-OMe	No	HAPMO	32	≤3
10	6-OMe	5% hexano	HAPMO	32	≤3
11	6-OMe	No	M446G	≤3	≤3
12	6-OMe	5% MeOH	M446G	≤3	≤3

<sup>a</sup> Determinada por CG.

La 5-metoxi-1-indanona (**9a**) es oxidada por ambas BVMOs. Así, la reacción catalizada por la HAPMO en disolución tampón (entrada 5) permite obtener un 13% de la 3,4-dihidro-6-metoxicumarina (**9b**). La adición de un 5% de hexano incrementa la conversión hasta un 32% (entrada 6). En el caso de emplear la PAMO<sub>M446G</sub>, existe una ligera influencia del cosolvente orgánico obteniéndose un 10% más de la 6-metoxi-1-isocromanona (**9c**) en presencia de un 5% de MeOH (entradas 7 y 8). Finalmente, estudiamos la 6-metoxi-1-indanona (**10a**). Este compuesto es oxidado por la HAPMO con conversiones moderadas en ambos medios de reacción analizados (entradas 9 y 10). Sin embargo, la PAMO<sub>M446G</sub> no muestra actividad en la oxidación de esta cetona (entradas 11 y 12).

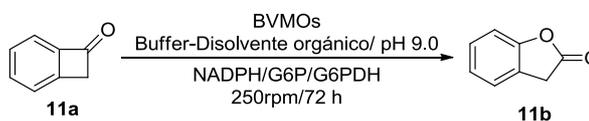
Podemos destacar que la actividad enzimática de la PAMO<sub>M446G</sub> se ve muy afectada por la posición del grupo metoxi. Esta BVMO muestra una mayor

aceptación de sustrato cuando el resto metoxi se encuentra en la posición cuatro del anillo aromático. Si el sustituyente está en cinco, la actividad decrece, mientras que si está en seis no muestra actividad alguna. El comportamiento de la HAPMO es diferente, no mostrando actividad cuando el grupo metoxi se encuentra en posición cuatro, y presentando actividades moderadas cuando el grupo está en cinco o seis.

### 1.8. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE LA BENZOCICLOBUTANONA

Otro de los objetivos de este capítulo fue llevar a cabo la oxidación enzimática de la benzociclobutanona (**11a**). En este caso, el ciclo fusionado al grupo aromático es de cuatro miembros con lo que se formaría una lactona benzofusionada de cinco miembros. Las tres BVMOs mostraron actividad con este sustrato, generándose únicamente el regioisómero esperado, la 2-cumaranona (**11b**).

**Tabla 1.5.** Oxidación enzimática de la ciclobutanona **11a** catalizada por BVMOs.



Entrada	Cosolvente	BVMO	T(°C)	c(%) <sup>a</sup>
1	No	HAPMO	20	87
2	5% hexano	HAPMO	20	93
3	No	<i>w</i> tPAMO	30	51
4	5% MeOH	<i>w</i> tPAMO	30	42
5	5% hexano	<i>w</i> tPAMO	30	81
6	No	M446G	30	14
7	5% MeOH	M446G	30	31

<sup>a</sup> Determinada por CG.

Como se muestra en la Tabla 1.5, cuando llevamos a cabo la biooxidación catalizada por la HAPMO a 20°C en disolución tampón pH 9.0 o bien en presencia de un 5% de hexano, se obtiene **11b** con excelentes conversiones (entradas 1 y 2). La *w*tPAMO es capaz de oxidar **11a**, a diferencia de su nula actividad en la oxidación de indanonas y tetralonas. Este enzima cataliza la oxidación de este sustrato con un 51% de conversión en disolución tampón de pH 9.0 (entrada 3). Además se estudió esta oxidación en presencia de un 5% de metanol y de hexano, observándose que el primer disolvente no afecta a la conversión del proceso (entrada 4), mientras que el hexano tiene un efecto beneficioso en la actividad enzimática, generándose un 81% de la

## Capítulo 1

---

2-cumaranona (entrada 5). A diferencia de la HAPMO y la *wt*PAMO, la PAMO<sub>M446G</sub> muestra una baja actividad frente a **11a**. Tan sólo se obtiene un 14% de **11b** tras 72 horas de reacción cuando la biooxidación se lleva a cabo a pH 9.0 y 30°C. Esta conversión se duplica cuando se adiciona un 5% de MeOH. De nuevo, al igual que para el resto de sustratos estudiados en este capítulo, este cosolvente favorece la actividad enzimática del mutante.

*En esta sección se ha llevado a cabo la oxidación de una serie de cetonas benzofusionadas biocatalizada por tres BVMOs, así como el estudio de distintos parámetros de reacción que pueden afectar a las propiedades catalíticas de los enzimas.*

*A la vista de los resultados obtenidos, las tetralonas no son sustratos adecuados para los tres enzimas, mientras que la biooxidación de las indanonas catalizada por la HAPMO y la PAMO<sub>M446G</sub> permite obtener las lactonas correspondientes con conversiones de moderadas a buenas. Además, la elección apropiada del medio de reacción, mediante la adición de cosolventes orgánicos a la disolución tampón empleada, permitió un incremento de las conversiones obtenidas con respecto al medio acuoso.*

*Cada enzima muestra una distinta preferencia por determinados cosolventes, siendo los hidrofóbicos más adecuados para los procesos catalizados por la HAPMO y los hidrofílicos para las reacciones en las que se emplea la PAMO<sub>M446G</sub>.*

*La HAPMO y la PAMO<sub>M446G</sub> presentan una regioselectividad divergente en la oxidación de la 1-indanona y sus derivados. Por un lado la HAPMO da lugar a las lactonas esperadas, mientras que los regioisómeros no favorecidos son obtenidos con la PAMO<sub>M446G</sub>. La cepa natural de la PAMO no mostró actividad con ninguna de las indanonas, por tanto su mutación es determinante para la aceptación de este tipo de sustratos.*

*Las condiciones de reacción fueron optimizadas para la biooxidación de la 1-indanona. Así, empleando la HAPMO, las mayores conversiones se consiguen con un medio de reacción disolución tampón con 5% de hexano, 15°C y pH 10.0, mientras que la PAMO<sub>M446G</sub> muestra una mayor actividad en presencia de un 5% de MeOH como cosolvente, 30°C y pH 9.0. Los derivados de la 1-indanona con sustituyentes de tipo halógeno en el anillo aromático son mejores sustratos para ambos enzimas que los análogos oxigenados, consiguiendo en la mayoría de los casos incrementar las conversiones al emplear un 5% de hexano en las reacciones catalizadas por la HAPMO y un 5% de metanol en los procesos biocatalizados por la PAMO<sub>M446G</sub>.*

*Además, ha sido estudiada la biooxidación de la benzociclobutanona mediante las tres BVMOs. La cepa natural de la PAMO y la HAPMO son capaces de catalizar la síntesis de la 2-cumaranona con elevadas conversiones.*



### 1.9. TÉCNICAS INSTRUMENTALES

Para la cromatografía en capa fina (TLC, del inglés *Thin Layer Chromatography*) se han utilizado cromatofolios de gel de sílice 60 de 0.25 mm de espesor, soportados en aluminio y con un revelador ultravioleta incorporado, comercializados por Merck. Se empleó como revelador una disolución 1% (p/v) de  $\text{KMnO}_4$ , 5% de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  y 5% de  $\text{NaOH}$ . La cromatografía de columna se realizó sobre gel de sílice 60 (230-400 mesh), comercializado también por esta casa.

La espectroscopía infrarroja se registró en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 1720-X con una resolución de  $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$ . Las muestras se prepararon en pastillas de  $\text{KBr}$  o  $\text{NaCl}$  dependiendo de la naturaleza del compuesto. Los valores indicados se refieren a  $\nu_{\text{máx}}$  y se expresan en  $\text{cm}^{-1}$ .

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN y secuencia de pulsos DEPT, se hicieron en los espectrómetros Bruker AC-300 y Bruker AC-300 DPX (300.13 MHz para  $^1\text{H}$  y 75.5 MHz para  $^{13}\text{C}$ ), empleando tetrametilsilano (TMS) como estándar interno y  $\text{CDCl}_3$  o  $\text{CD}_3\text{OD}$  como disolventes. Para los experimentos bidimensionales se ha utilizado un Bruker NAV-400 (400.13 MHz para el  $^1\text{H}$  y 100.6 MHz para el  $^{13}\text{C}$ ). Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) se dan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) en hertzios (Hz).

Los espectros de masas (EM) se realizaron en un equipo LC-MS Hewlett Packard 1100 (utilizando la técnica de ionización química a presión atmosférica,  $\text{APCI}^+$ , o electrospray,  $\text{ESI}^+$ ) o en un Hewlett Packard 5973 (empleando impacto electrónico,  $\text{IE}^+$ ). Las masas exactas (EMAR) se han realizado en un espectrómetro Bruker Microtof Q.

## Capítulo 1

Los puntos de fusión de los compuestos sólidos fueron medidos en tubos capilares abiertos usando un instrumento Gallenkamp y no fueron corregidos.

En la Figura 1.24 se representan las cetonas benzofusionadas utilizadas en esta sección.

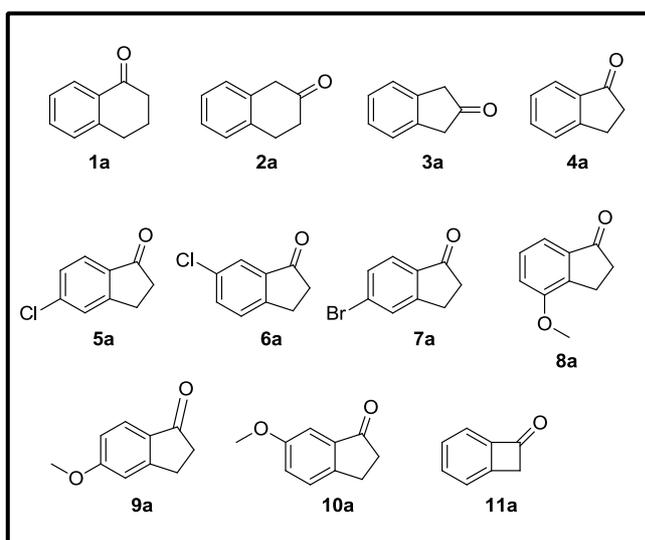


Figura 1.24. Compuestos empleados en el Capítulo 1 (Sección 1).

### 1.10. REACTIVOS GENERALES

Las proteínas recombinantes *wt*PAMO,<sup>50</sup> PAMO<sub>M446G</sub><sup>99</sup> y HAPMO<sup>47</sup> han sido sobreexpresadas y purificadas de acuerdo con los métodos descritos. Las reacciones de oxidación se han llevado a cabo con el enzima aislado en disolución. Se ha definido una unidad enzimática de BVMO como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1.0  $\mu\text{mol}$  de fenilacetona a acetato de bencilo por minuto, a pH 9.0 y 25°C, en presencia de NADPH. El enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH 640 U/mg) de *Leuconostoc mesenteroides* y la D-Glucosa-6-fosfato (G6P) son productos de Sigma-Aldrich-Fluka. Los coenzimas NADP<sup>+</sup>/NADPH (pureza  $\geq 99\%$ ), obtenidos como sales de sodio, son comercializados por Codexis.

Las cetonas de partida **1-6a** y **8a**, así como la lactona **11b** son comercializadas por Sigma-Aldrich-Fluka. La cetona **7a** fue adquirida en TCI Europe y los compuestos **9a** y **10a** provienen de Acros Organics. El resto de reactivos y disolventes fueron suministrados por Sigma-Aldrich-Fluka y presentan el mayor grado de pureza posible.

## 1.11. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS

### Síntesis química de la benzociclobutanona (**11a**).<sup>135</sup>

De acuerdo con la metodología descrita en la literatura, se agita a reflujo una mezcla de bromobenceno (1.0 g, 6.4 mmol), amiduro de sodio ( $\text{NaNH}_2$ ) (0.5 g, 2.0 eq.) y 1,1-dimetoxietileno (1.2 mL, 2.0 eq.) en THF (20 mL). La reacción se sigue por TLC (90% hexano/AcOEt). Una vez observada la desaparición del producto de partida, la mezcla se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se añaden cuidadosamente 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  para destruir el exceso de  $\text{NaNH}_2$ . Posteriormente se efectúa una extracción con  $\text{Et}_2\text{O}$  (5x10 mL). La fase orgánica es lavada con  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL) y una disolución saturada de NaCl (10 mL). Finalmente se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Sin purificación previa, el crudo se hidroliza en una mezcla THF-HCl 2.0 M (5:1) (65 mL) durante 6 horas. El THF se elimina a presión reducida y el residuo se extrae con  $\text{Et}_2\text{O}$  (5x10 mL). La fase orgánica se lava con  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL) y una disolución saturada de NaCl (10 mL), se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El producto final **11a** fue obtenido con un rendimiento global del 83% (623.3 mg).

### Oxidación de las cetonas benzofusionadas 1-10a. Síntesis de sus correspondientes lactonas.

Se disuelve la correspondiente cetona **1-10a** (250 mg, 1.18-1.89 mmol) en 5 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se añade el ácido *m*-cloroperbenzoico (*m*-CPBA) (1.5 eq.) a 0°C. La reacción se sigue mediante TLC. Una vez concluida, se lava varias veces con una disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$  (5x10 mL). La fase orgánica se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Posteriormente se purifica el crudo mediante cromatografía de columna con una mezcla de eluyentes (80% hexano/AcOEt) para los compuestos **1b** y **2b**, y (80%  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /hexano) para las lactonas **3b-10b**. Los rendimientos obtenidos fueron desde el 30 al 85%. Se aislaron 121.9 mg de **1b** (44%), 85.9 mg de **2b** (31%), 128.9 mg de **3b** (46%), 238.0 mg de **4b** (85%), 82.2 mg de **5b** (30%), 178.1 mg de **6b** (65%), 80.3 mg de **7b** (30%), 115.2 mg de **8b** (42%), 104.2 mg de **9b** (38%), y finalmente 83.0 mg de **10b** (30%).

<sup>135</sup> Stevens, R. V.; Bissacchi, G. S. *J. Org. Chem.* **1982**, *47*, 2393-2396.

### Síntesis de la 1-isocromanona (**4c**).<sup>134</sup>

A una mezcla de isocromano (100 mg, 0.74 mmol) y *n*-hidroxifitalimida (0.09 eq.) en 4 mL de una mezcla CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (3:1), se le añade lentamente clorito de sodio (NaClO<sub>2</sub>) (1.5 eq.) y el sistema se pone a reflujo durante 18 horas, siguiendo la reacción por TLC (60% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/hexano). Una vez concluida, se vierte sobre una disolución al 10% de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (10 mL), se extrae con Et<sub>2</sub>O (5x5 mL) y se lava con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (5 mL) y H<sub>2</sub>O (5 mL). La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtuvieron 72.8 mg de la 1-isocromanona (**4c**) (Rdto. 66%).

Los compuestos previamente descritos, **11a**, **1-5b**, **7b**, **9-10b** y **4c** exhiben propiedades físicas y espectrales de acuerdo con los datos publicados. Las lactonas **6b** y **8b** fueron debidamente caracterizadas.<sup>136</sup>

## 1.12. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

### Oxidación de las cetonas benzofusionadas 1-11a catalizada por BVMOs.

Las cetonas de partida **1-11a** (15-30 mM) se disuelven en 0.5 mL del medio de reacción disolución tampón Tris/HCl (50 mM, pH 6.0 a 10.5) conteniendo el correspondiente cosolvente orgánico, junto con D-glucosa-6-fosfato (2.0 eq.), G6PDH (5.0 U), NADPH (0.2 mM) y 1.0 unidad de la correspondiente BVMO. La mezcla se agita a 250 rpm en un agitador orbital a diferentes tiempos y temperaturas. Se detiene la reacción extrayendo con AcOEt (2x0.5 mL), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se analiza por cromatografía de gases (CG), con el fin de determinar la conversión de los procesos de oxidación.

---

<sup>136</sup> Las referencias de los compuestos ya descritos, así como la caracterización completa de los no descritos pueden consultarse en el Apartado 1.14.

**Reacción enzimática de Baeyer-Villiger a escala multimiligramo. Síntesis enzimática de 6-cloro-1-isocromanona (5c), 6-bromo-1-isocromanona (7c) y 5-metoxi-1-isocromanona (8c).<sup>137</sup>**

Las cetonas **5a**, **7a** y **8a** (50 mg, 0.29-0.31 mmol) fueron disueltas en una disolución tampón Tris/HCl (50 mM, pH 9.0, 10 mL) en presencia de un 5% de MeOH junto con D-glucosa-6-fosfato (2.0 eq.), G6PDH (100.0 U), NADPH (0.2 mM) y 20.0 unidades de PAMO<sub>M446G</sub>. La mezcla se agita a 30 °C y 250 rpm, en agitador orbital, durante 72 horas. La fase acuosa se extrae con AcOEt (3x25 mL). La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente a presión reducida. Los crudos fueron purificados por cromatografía de columna (80% hexano/AcOEt), obteniéndose 39.4 mg de **5c** (72%) y 34.9 mg de **7c** (65%), y con 70% hexano/AcOEt para obtener 15.4 mg de **8c** (28%). Las lactonas **5c**, **7c**, y **8c** fueron debidamente caracterizadas y los datos se encuentran recogidos en el Apartado 1.14.

**1.13. DETERMINACIÓN DE LAS CONVERSIONES**

La determinación de los valores de conversión se ha llevado a cabo mediante cromatografía de gases empleando un cromatógrafo Hewlett Packard 6890 Series II equipado con una columna aquiral Hewlett-Packard HP1 (metil siloxano entrecruzado, 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, 1 bar, N<sub>2</sub>) para la cetona **7a** o la columna quiral Restek Rtβ-DEXse (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, 1 bar, N<sub>2</sub>) para el resto de compuestos. En todos los casos la temperatura del inyector fue de 225°C y la del detector, de tipo FID, de 250°C.

<sup>137</sup> La formación de las lactonas **6c** y **9c** también fue observada por CG en las reacciones llevadas a cabo en 0.5 mL. No se prepararon a escala multimiligramo debido a que habían sido previamente descritas: (a) Ordasso, G.; Winters, G. *Farmaco, Ed. Sci.* **1978**, *33*, 148-155 para **6c** y (b) Mohr, P.; Decker, M.; Enzensperger, C.; Lehmann, J. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2110-2116 para **9c**.

**Tabla 1.6.** Determinación de conversiones mediante CG.

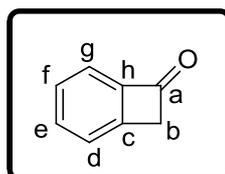
Sustrato	Programa <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> (min) 1-11a	t <sub>R</sub> (min) 1-11b	t <sub>R</sub> (min) 1-11c
<b>1</b>	70/5/3/180/5	37.1	42.2	--
<b>3</b>	70/5/3/180/10	32.0	45.5	--
<b>4</b>	70/5/3/180/5	33.5	40.1	44.1
<b>5</b>	70/5/3/200/5	41.9	48.8	51.8
<b>6</b>	70/5/3/200/5	41.5	48.0	51.9
<b>7</b>	100/5/2/160/0	12.7	17.4	23.9
<b>8</b>	100/5/3/200/5	34.4	39.3	44.5
<b>9</b>	100/5/3/200/15	36.1	41.0	50.1
<b>10</b>	100/5/3/200/10	33.5	39.8	42.8
<b>11</b>	70/5/3/180/0	22.3	29.6	--

<sup>a</sup> Programa: T<sub>inicial</sub> (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/ min)/ T<sub>final</sub> (°C)/ tiempo (min).  
t<sub>R</sub>: tiempo de retención.

#### 1.14. DATOS EXPERIMENTALES

En este apartado se encuentra la caracterización de todos aquellos compuestos utilizados en el Capítulo 1 (Sección 1) de la Memoria que no han sido adquiridos comercialmente, excepto las lactonas **6c** y **9c**, las cuales no se prepararon a escala multimiligramo debido a que habían sido previamente descritas,<sup>137</sup> y su presencia había sido corroborada por CG-MS. Las propiedades de los compuestos ya descritos están de acuerdo con lo descrito por ellos en la bibliografía. Para la caracterización de las sustancias descritas por primera vez, se han incluido los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN, ver soporte digital), así como los datos de Espectroscopía de Masas de Alta Resolución (EMAR).

**Benzociclobutanona, 11a<sup>135</sup>**



Aceite marrón

**Rendimiento:** 83%

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>O

**Peso Molecular:** 118.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.30

**IR** (KBr): 3087, 2960, 1700, 1648, 1489, 1492 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 4.25 (s, 2H<sub>b</sub>), 7.23-7.80 (m, 4H<sub>d,e,f,g</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 52.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 119.8 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 126.3 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 127.0 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 135.7 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 147.8 (C<sub>ar</sub>, C<sub>c</sub>), 151.2 (C<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 188.7 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 118 (M<sup>+</sup>, 90%), 89 (100)

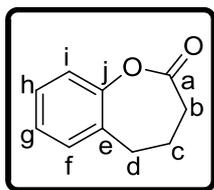
---

---

4,5-Dihidro-1-benzoxepin-2(3H)-ona, **1b**<sup>138</sup>

---

---



Sólido amarillo

**Rendimiento:** 44%

**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 162.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.62

**P<sub>f</sub>**: 46.7-48.1°C

**IR** (KBr): ν 3058, 2987, 1766, 1680, 1480 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.20 (q, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 2H<sub>c</sub>), 2.49 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 2H<sub>d</sub>), 2.84 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 2H<sub>b</sub>), 7.08-7.30 (m, 4H<sub>f,g,h,i</sub>)

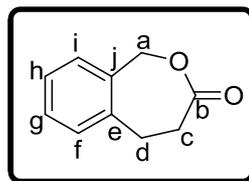
**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 26.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 28.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 31.0 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 119.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 125.8 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 128.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 129.6 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 130.0 (C<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 151.7 (C<sub>ar</sub>, C<sub>j</sub>), 171.6 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 162 (M<sup>+</sup>, 32%), 107 (100), 91 (15), 77 (15)

---

<sup>138</sup> Gorka, P.; Miller, S. J. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3049-3052.

**4,5-Dihidrobenczo[c]oxepin-3(1H)-ona, 2b<sup>139</sup>**



Sólido marrón

**Rendimiento:** 31%

**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 162.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.32

**P<sub>f</sub>**: 49.5-51.1°C

**IR** (KBr):  $\nu$  3068, 2989, 1732, 1646, 1461 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  3.06 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.9 Hz, 2H<sub>c</sub>), 3.22 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.9 Hz, 2H<sub>d</sub>), 5.27 (s, 2H<sub>a</sub>), 7.09-7.33 (m, 4H<sub>f,g,h,i</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  28.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 31.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 70.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>a</sub>), 126.5 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 126.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 127.6 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 129.8 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 133.0 (C<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 134.7 (C<sub>ar</sub>, C<sub>j</sub>), 174.0 (C=O, C<sub>b</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 162 (M<sup>+</sup>, 71%), 117 (100), 104 (65), 91 (54), 77 (32)

<sup>139</sup> Metay, E.; Leonel, E.; Sulpice-Gaillet, C.; Nedelec, J. *Synthesis* **2005**, *10*, 1682-1688.

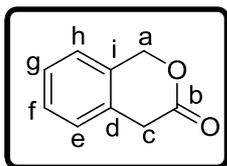
---

---

**3-Isocromanona, 3b**<sup>140</sup>

---

---



Sólido blanco

**Rendimiento:** 46%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 148.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.28

**P<sub>f</sub>**: 79.0-81.0°C

**IR** (KBr): ν 3056, 2987, 1750, 1648, 1495, 1386 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 3.72 (s, 2H<sub>c</sub>), 5.31 (s, 2H<sub>a</sub>), 7.22-7.53 (m, 4H<sub>e,f,g,h</sub>)

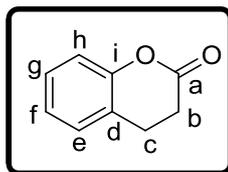
**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 36.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 70.0 (CH<sub>2</sub>, C<sub>a</sub>), 124.6 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 127.0 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 128.7 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 128.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 130.8 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 131.4 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 170.6 (C=O, C<sub>b</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, m/z): 148 (M<sup>+</sup>, 77%), 104 (100), 91 (73), 78 (70)

---

<sup>140</sup> Lindsell, E. W.; Edward, W.; Palmer, D. D.; Preston, P. N.; Rosair, G. M.; Jones, R. V.; Whitton, A. J. *Organometallics* **2005**, *24*, 1119-1133.

**3,4-Dihidrocumarina, 4b<sup>141</sup>**



Aceite marrón

**Rendimiento:** 85%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 148.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.51

**IR** (KBr):  $\nu$  3057, 2986, 1761, 1645, 1489, 1348 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.79 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.4 Hz, 2H<sub>b</sub>), 3.01 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.4 Hz, 2H<sub>c</sub>), 7.04-7.29 (m, 4H<sub>e,f,g,h</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  23.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 116.8 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 122.5 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 124.3 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 127.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 128.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 151.9 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 168.5 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 148 (M<sup>+</sup>, 100%), 120 (97), 91 (96), 78 (83)

<sup>141</sup> Kumar, V.; Sharma, A.; Sinha, A. K. *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89*, 483-495.

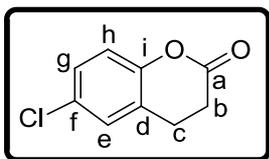
---

---

6-Cloro-3,4-dihidrocumarina, 5b<sup>115</sup>

---

---



Sólido marrón

**Rendimiento:** 30%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>ClO<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 182.6 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.30

**P<sub>f</sub>**: 106.2-108.1°C

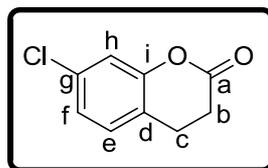
**IR** (KBr): ν 3022, 2965, 1764, 1644, 1480 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.77 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.8 Hz, 2H<sub>b</sub>), 2.99 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.6 Hz, 2H<sub>c</sub>), 6.98 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.6 Hz, 1H<sub>h</sub>), 7.18- 7.26 (m, 2H<sub>g,e</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 23.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 28.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 118.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 124.2 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 127.8 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 128.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 129.3 (C<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 150.5 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 167.7 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, m/z): 182 (M<sup>+</sup>, 100%), 154 (95), 119 (14), 91 (46), 77 (21)

**7-Cloro-3,4-dihidrocumarina, 6b**



Sólido incoloro

**Rendimiento:** 65%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>ClO<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 182.6 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.48

**P<sub>f</sub>**: 53.4-54.0°C

**IR** (KBr):  $\nu$  3086, 2918, 1744, 1645, 1487 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.78 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.8 Hz, 2H<sub>b</sub>), 2.98 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.8 Hz, 2H<sub>c</sub>), 7.07-7.14 (m, 3H<sub>e,f,h</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  23.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 28.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 117.3 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 121.1 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 124.5 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 128.8 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 133.4 (C<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 152.3 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 167.6 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 182 (M<sup>+</sup>, 100%), 154 (94), 147 (21), 119 (56), 77 (56)

**EMAR** (EI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>ClO<sub>2</sub> (M<sup>+</sup>): 182.01346; encontrada: 182.01217

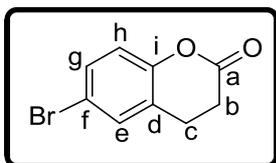
---

---

**6-Bromo-3,4-dihidrocumarina, 7b**<sup>142</sup>

---

---



Sólido marrón

**Rendimiento:** 30%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>BrO<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 227.1 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.31

**P<sub>f</sub>**: 64.1-66.1°C

**IR** (KBr):  $\nu$  3002, 2924, 1765, 1660, 1477 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.78 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.7 Hz, 2H<sub>b</sub>), 3.00 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.7 Hz, 2H<sub>c</sub>), 6.93 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.4 Hz, 1H<sub>h</sub>), 7.34- 7.38 (m, 2H<sub>g,e</sub>)

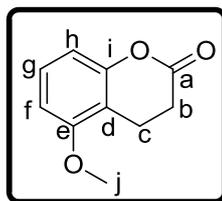
**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  23.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 28.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 116.9 (C<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 118.6 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 124.6 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 130.8 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 131.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 151.0 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 167.6 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 226 (M<sup>+</sup>, 97%), 198 (100), 91 (86), 77 (54)

---

<sup>142</sup> Davies, S. G.; Pyatt, D.; Thompson, C. J. *Organomet. Chem.* **1990**, 387, 381-390.

**3,4-Dihidro-5-metoxicumarina, 8b**



Sólido amarillo pálido

**Rendimiento:** 42%

**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>

**Peso Molecular:** 178.2 g/mol

**P<sub>f</sub>:** 43.1-45.1°C

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.40

**IR** (KBr):  $\nu$  3096, 2965, 1770, 1612, 1489 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.71 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 2H<sub>b</sub>), 2.96 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 2H<sub>c</sub>), 3.85 (s, 3H<sub>j</sub>), 6.67-6.69 (m, 2H<sub>f,h</sub>), 7.19 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.2 Hz, 1H<sub>g</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  17.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 28.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 55.7 (CH<sub>3</sub>, C<sub>j</sub>), 106.1 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 109.3 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 111.2 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 128.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 152.5 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>) 156.6 (C<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 168.5 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 178 (M<sup>+</sup>, 100%), 150 (48), 136 (97), 77 (42)

**EMAR** (EI): calculada para C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub> (M<sup>+</sup>): 178.06299; encontrada: 178.07031

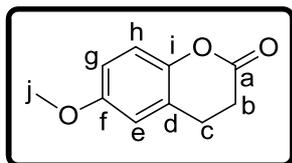
---

---

**3,4-Dihidro-6-metoxicumarina, 9b**<sup>143</sup>

---

---



Sólido marrón

**Rendimiento:** 38%

**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>

**Peso Molecular:** 178.2 g/mol

**P<sub>f</sub>:** 47.3-49.0°C

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.40

**IR** (KBr):  $\nu$  3002, 2957, 1768, 1630, 1496 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.75 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.8 Hz, 2H<sub>b</sub>), 2.96 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.8 Hz, 2H<sub>c</sub>), 3.77 (s, 3H<sub>j</sub>), 6.70-6.78 (m, 2H<sub>e,g</sub>), 6.96 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.8 Hz, 1H<sub>h</sub>)

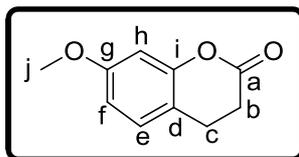
**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  23.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 29.0 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 55.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>j</sub>), 113.0 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 113.1 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 117.5 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 123.4 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 145.8 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 156.0 (C<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 168.7 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 178 (M<sup>+</sup>, 100%), 150 (72), 130 (96), 77 (56)

---

<sup>143</sup> Cambie, R. C.; Mitchell, L. H.; Rutledge, P. S. *Aust. J. Chem.* **1998**, *51*, 1167-1174.

**3,4-Dihidro-7-metoxicumarina, 10b**<sup>144</sup>



Sólido blanco

**Rendimiento:** 30%

**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>

**Peso Molecular:** 178.2 g/mol

**P<sub>f</sub>:** 40.4-42.1°C

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.38

**IR** (KBr):  $\nu$  3056, 2989, 1769, 1627, 1510 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  2.76 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.6 Hz, 2H<sub>b</sub>), 2.93 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.6 Hz, 2H<sub>c</sub>), 3.78 (s, 3H<sub>j</sub>), 6.60-6.66 (m, 2H<sub>h,f</sub>), 7.07 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.3 Hz, 1H<sub>e</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  22.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>e</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 55.4 (CH<sub>3</sub>, C<sub>j</sub>), 102.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 110.3 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 114.3 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 128.3 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 152.6 (C<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 159.5 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 186.5 (C=O, C<sub>a</sub>).

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 178 (M<sup>+</sup>, 100%), 150 (85), 130 (77), 77 (49)

<sup>144</sup> Collins, D. J.; Downes, L. M.; Jhingran, A. G.; Rutschmann, S. B.; Sharp, G. J. *Aust. J. Chem.* **1989**, *42*, 1235-1248.

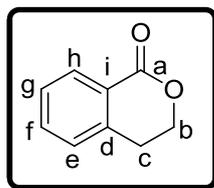
---

---

**1-Isocromanona, 4c<sup>134</sup>**

---

---



Aceite amarillo

**Rendimiento:** 66%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 148.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (60% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.31

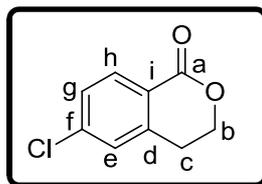
**IR** (KBr): ν 3010, 2955, 1740, 1607, 1460 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 3.06 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.0 Hz, 2H<sub>c</sub>), 4.53 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.0 Hz, 2H<sub>b</sub>), 7.25 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.9 Hz, 1H<sub>e</sub>), 7.39 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.9 Hz, 1H<sub>g</sub>), 7.53 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.9 Hz, 1H<sub>f</sub>), 8.09 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.9 Hz, 1H<sub>i</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 27.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 67.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 125.2 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 127.1 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 127.6 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 130.3 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 133.6 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 139.5 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 165.0 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 148 (M<sup>+</sup>, 93%), 118 (100), 90 (96)

**6-Cloro-1-isocromanona, 5c**



Sólido incoloro

**Rendimiento:** 72%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>ClO<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 182.6 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.27

**P<sub>f</sub>**: 58.8-59.0°C

**IR** (KBr):  $\nu$  3052, 2970, 1742, 1620, 1475 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  3.08 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.5 Hz, 2H<sub>c</sub>), 4.47 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.5 Hz, 2H<sub>b</sub>), 7.17 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 1H<sub>g</sub>), 7.28 (s, 1H<sub>e</sub>), 7.94 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 1H<sub>h</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  24.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 67.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 125.1 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 127.1 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 127.6 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 130.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 132.5 (C<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 143.4 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 164.9 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 182 (M<sup>+</sup>, 90%), 154 (80), 138 (12), 126 (70), 77 (60)

**EMAR** (EI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>ClO<sub>2</sub> (M<sup>+</sup>): 182.01346; encontrada: 182.01504

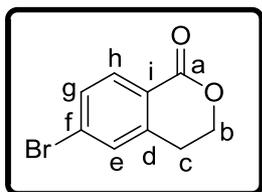
---

---

**6-Bromo-1-isocromanona, 7c**

---

---



Sólido amarillo pálido

**Rendimiento:** 65%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>BrO<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 227.0 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.29

**P<sub>f</sub>**: 63.0-64.6 °C

**IR** (KBr): ν 3052, 2980, 1736, 1624, 1470 cm<sup>-1</sup>

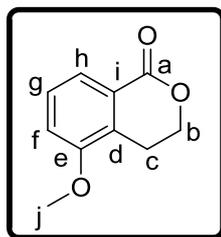
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 3.12 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.8 Hz, 2H<sub>c</sub>), 4.60 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.8 Hz, 2H<sub>b</sub>), 7.13 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 1H<sub>g</sub>), 7.42 (s, 1H<sub>e</sub>), 7.91 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 1H<sub>h</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 24.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 65.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 127.3 (C<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 128.8 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 132.0 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 132.4 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 132.6 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 144.1 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 165.2 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 226 (M<sup>+</sup>, 100%), 188 (70), 182 (10), 154 (60), 77 (80)

**EMAR** (EI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>BrO<sub>2</sub> (M<sup>+</sup>): 225.96294; encontrada: 225.95931

**5-Metoxi-1-isocromanona, 8c**



Sólido amarillo pálido

**Rendimiento:** 28%

**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>

**Peso Molecular:** 178.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.32

**P<sub>f</sub>**: 44.0-45.5 °C

**IR** (KBr):  $\nu$  3040, 2975, 1747, 1626, 1482 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  3.13 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 2H<sub>c</sub>), 3.80 (s, 3H<sub>j</sub>), 4.61 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 2H<sub>b</sub>), 7.03-7.09 (m, 2H<sub>f,g</sub>), 7.67 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.8 Hz, 1H<sub>h</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  28.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>e</sub>), 55.7 (CH<sub>3</sub>, C<sub>j</sub>), 65.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 106.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 109.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 123.2 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 128.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 140.8 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 152.6 (C<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 168.3 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 178 (M<sup>+</sup>, 100%), 150 (90), 134 (45), 106 (12), 77 (40)

**EMAR** (EI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub> (M<sup>+</sup>): 178.06299; encontrada: 178.06547



## **SECCIÓN 2: REACCIÓN ENZIMÁTICA DE BAEYER-VILLIGER SOBRE CETONAS BENZOFUSIONADAS RACÉMICAS**

La preparación de compuestos quirales es un área muy importante dentro de la química orgánica sintética, ya que estas sustancias poseen un gran interés debido a su amplio espectro de aplicación.<sup>145</sup> Existen tres estrategias principales para la síntesis de estos compuestos:

- El empleo de compuestos de partida quirales enantiopuros.
- La resolución cinética de racematos, en la que nos centraremos en esta sección.
- La síntesis asimétrica: Preparación de compuestos enantioméricamente puros a partir de sustratos proquirales empleando un catalizador quiral.

### **1.15. RESOLUCIÓN CINÉTICA (KR) Y RESOLUCIÓN CINÉTICA DINÁMICA (DKR)**

Una resolución cinética (“Kinetic resolution”, KR) es la separación total o parcial de dos enantiómeros de una mezcla racémica. La primera resolución cinética enzimática fue descubierta por Pasteur en el año 1858 y consistió en la resolución del ácido tartárico mediante su fermentación empleando una levadura.<sup>146</sup> La resolución cinética de un racemato se basa en la diferente velocidad de reacción de cada uno de los dos enantiómeros con un agente quiral (un reactivo, catalizador...).

<sup>145</sup> Farina, V.; Reeves, J. T.; Senanayake, C. H.; Song, J. J. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2734-2793.

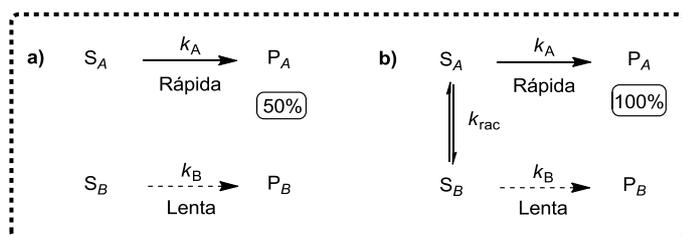
<sup>146</sup> Pasteur, M. L.; Hebd, C. R. *Seanca Acad. Sci. Paris.* **1858**, *46*, 615-618.

## Capítulo 1

En el caso ideal, la diferencia de velocidad de reacción es tan elevada que uno de los enantiómeros reacciona muy rápidamente para dar el producto correspondiente mientras que el otro enantiómero no reacciona y puede ser recuperado al fin de la reacción. El rendimiento máximo de una resolución cinética es del 50% (Figura 1.25.a).

La resolución cinética dinámica (DKR) surge como una metodología alternativa, capaz de vencer esta limitación de rendimiento. Se trata de un proceso en el que, teóricamente, se puede obtener el producto enantiopuro de forma cuantitativa (rendimiento del 100%). Para ello, se combina un proceso de resolución cinética con la racemización *in situ* del sustrato (Figura 1.25.b).<sup>147</sup> Los requisitos que tienen que darse para que se produzca una DKR son los siguientes:

- La resolución cinética debe de ser eficiente.
- La racemización debe ser rápida, al menos 10 veces más rápida que la reacción del enzima con el enantiómero menos reactivo,  $k_{rac} \geq 10 k_B$ .
- No debe dar lugar a subproductos.
- La resolución cinética debe ser irreversible.
- El producto de reacción no debe racemizarse.
- La resolución cinética y la racemización deben de ser compatibles y eficaces en el medio de reacción.



**Figura 1.25.** Resolución cinética clásica (a); Resolución cinética dinámica (DKR) (b). Siendo el enantiómero  $S_A$  el favorecido frente al  $S_B$ . S: sustrato; P: producto.

<sup>147</sup> (a) Ward, R. S. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1475-1490; (b) Caddick, S.; Jenkins, K. *Chem. Soc. Rev.* **1996**, *25*, 447-456; (c) El Gihani, M. T.; Williams, J. M. J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 11-15; (d) Huerta, F. F.; Minidis, A. B. E.; Bäckvall, J.-E. *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 321-331; (e) Kim, M.-J.; Anh, Y.; Park, P. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 578-587; (f) Pellissier, H. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 8291-8327; (g) Turner, N. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 114-119; (h) Pellissier, H. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 1563-1601; (i) Steinreiber, J.; Faber, K.; Griengl, H. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 8060-8072.

La racemización del sustrato puede producirse mediante un catalizador químico, como por ejemplo, auxiliares quirales,<sup>148</sup> complejos organometálicos,<sup>149</sup> o aldehídos<sup>150</sup> (en el caso de la DKR de aminas). Además existen otros ejemplos en los que el grupo que se racemiza es susceptible de sufrir una reacción S<sub>N</sub>2, por lo que añadiéndole una fuente de aniones de la misma naturaleza, se consigue una rápida racemización.<sup>151</sup> Otra posibilidad es la utilización de resinas de intercambio iónico.<sup>152</sup> Existen métodos de racemización que emplean condiciones más suaves y son más respetuosos con el medio ambiente como la racemización catalizada por enzimas,<sup>153</sup> la racemización debida al medio de reacción (pH básico),<sup>154</sup> o bien, a la propia naturaleza del sustrato (por ejemplo 5-hidroxi-2-(5H)-furanonas, hemiaminales o 8-amino-5,6,7,8-tetrahidroquinolinas)<sup>155</sup>.

<sup>148</sup> (a) Ben, R. N.; Durst, T. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 7700-7706; (b) Ammazalorso, A.; Amoroso, R.; Bettoni, G.; De Filippis, B.; Fantacuzzi, M.; Giampietro, L.; Maccallini, C.; Tricca, M. L. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 4088-4091.

<sup>149</sup> (a) Amat, M.; Escolano, C.; Lozano, O.; Llor, N.; Bosch, J. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3139-3142; (b) Nakamura, S.; Nakayama, J.-I.; Toru, T. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 5766-5768; (c) Balcells, D.; Ujaque, G.; Fernandez, I.; Khair, N.; Maseras, F. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 6388-6396.

<sup>150</sup> (a) Chen, S.-T.; Huang, W.-H.; Wang, D.-T. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 7580-7581; (b) Parmar, V. S.; Singh, A.; Bisht, K. S.; Kumar, N.; Belokon, Y. N.; Kochetkov, K. A.; Iknookov, N. S.; Orlova, S. A.; Tararov, V. I.; Saveleva, T. F. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1223-1227; (c) Liljebblad, A.; Kiviniemi, A.; Kanerva, L. T. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 671-677.

<sup>151</sup> Strauss, U. T.; Faber, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 4079-4081.

<sup>152</sup> (a) Paizs, C.; Tosa, M.; Majdik, C.; Tähtinen, P.; Irimie, F. D.; Kanerva, L. T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 619-627; (b) Wuyts, S.; de Temmerman, K.; de Vos, D. E.; Jacobs, P. A. *Chem. Commun.* **2003**, 1928-1929; (c) Wuyts, S.; de Temmerman, K.; de Vos, D. E.; Jacobs, P. A. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 386-397; (d) Ödman, P.; Wessjohann, L. A.; Bornscheuer, U. T. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 9551-9555.

<sup>153</sup> (a) May, O.; Verseck, S.; Bommarius, A.; Drauz, K. *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6*, 452-457; (b) Schnell, B.; Faber, K. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 653-666; (c) Asano, Y.; Yamaguchi, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 7696-7697; (d) Servi, S.; Tessaro, D.; Pedrocchi-Fantoni, G. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 715-726.

<sup>154</sup> (a) Taniguchi, T.; Ogasawara, K. *Chem. Commun.* **1997**, 1399-1400; (b) Suzuki, M.; Yamazaki, T.; Ohta, H.; Shima, K.; Ohi, K.; Nishiyama, S.; Sugai, T. *Synlett* **2000**, 189-192; (c) Lo, H.-H.; Kao, C.-H.; Lee, D.-S.; Yang, T.-K.; Hsu, W.-H. *Chirality* **2003**, *15*, 699-702.

<sup>155</sup> (a) Thuring, J. W. J. F.; Klunder, A. J. H.; Nefkens, G. H. L.; Wegman, M. A.; Zwanenburg, B. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 4759-4760; (b) Sharfuddin, M.; Narumi, A.; Iwai, Y.; Miyazawa, K.; Yamada, S.; Kakuchi, T.; Kaga, H. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 1581-1885; (c) Crawford, J. B.; Skerlj, R. T.; Bidger, G. J. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 669-671.

## 1.16. RESOLUCIÓN CINÉTICA DINÁMICA CATALIZADA POR ENZIMAS

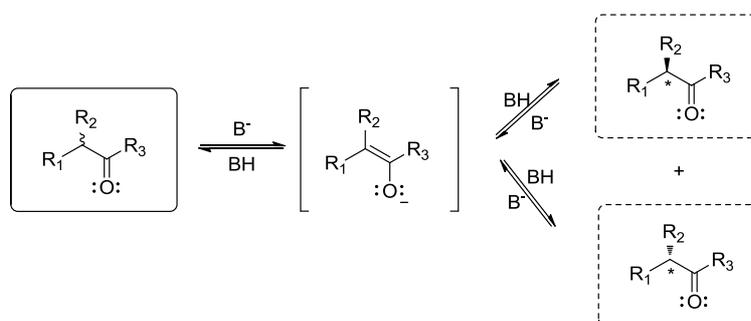
En los últimos años el uso de biocatalizadores en DKRs ha cobrado gran interés. Así por ejemplo, el empleo de enzimas en presencia de complejos metálicos ha sido ampliamente estudiado en el campo de las resoluciones cinéticas dinámicas, donde el enzima cataliza el proceso de resolución cinética y el complejo, la racemización del sustrato.<sup>156</sup> En la presente sección, nos vamos a centrar en resoluciones cinéticas dinámicas catalizadas por enzimas, utilizando como agentes de racemización el pH y/o resinas de intercambio iónico.

### 1.16.1. RESOLUCIÓN CINÉTICA DINÁMICA EN MEDIO BÁSICO

Un método para lograr DKRs consiste en llevar a cabo la resolución cinética enzimática de un sustrato junto a su racemización en medio básico. Generalmente, la racemización implica la eliminación de un hidrógeno del centro estereogénico para formar un carbanión, que es estabilizado bien por grupos adyacentes como carbonilos, nitrilos, nitros u otros, o bien por una eliminación reversible de un sustituyente en posición  $\beta$ . Las limitaciones que posee esta metodología son que por un lado el sustrato tiene que tener un hidrógeno de carácter ácido y por el otro, que los enzimas que catalicen la reacción deben ser activos al pH de racemización (pH neutro, ligeramente básico o muy básico). En la Figura 1.26 se muestra un esquema de racemización en medio básico donde el carbanión es estabilizado por un grupo carbonílico. La base favorece la extracción del hidrógeno en  $\alpha$  de la forma ceto formando un anión, que por deslocalización de la carga lleva a la forma enolato. Puesto que la probabilidad de que el protón se adicione por una u otra cara es la misma, se producirá tanto el isómero *R* como el *S*.

---

<sup>156</sup> (a) Stürmer, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1173-1174; (b) Larsson, A. L. E.; Persson, B. A.; Bäckvall, J.-E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, *36*, 1211-1212; (c) Pàmies, O.; Bäckvall, J.-E. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3247-3261; (d) Pàmies, O.; Bäckvall, J.-E. *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 130-135; (e) Martín-Matute, B.; Bäckvall, J.-E. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 226-232; (f) Martín-Matute, B.; Bäckvall, J.-E. en *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*. Eds. Gotor, V.; Alfonso, I.; García-Urdiales, E. Wiley-VCH, Weinheim **2008**, 89-114.



**Figura 1.26.** Racemización de compuestos carbonílicos mediante tautomería cetoenólica.

Se conocen un gran número de resoluciones cinéticas dinámicas de sustratos de diferente naturaleza (hidantoínas,<sup>154b,c,157</sup> aciloínas,<sup>154a</sup> tioésteres,<sup>158</sup> oxazonas,<sup>159</sup> isoaxozolinas,<sup>160</sup> ésteres activados con halógenos en posición  $\alpha$ ,<sup>161</sup> ésteres bencílicos,<sup>162</sup> dicetonas y  $\alpha$ -cetoésteres<sup>163</sup>) catalizadas por enzimas en medios básicos.

<sup>157</sup> (a) García, M. J.; Azerad, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 85-92; (b) Wen, W.-Y.; Ng, I.-S.; Tsai, S.-W. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2006**, *81*, 1715-1721.

<sup>158</sup> (a) Lin, C. N.; Tsai, S.-W. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *69*, 31-38; (b) Chen, C. Y.; Cheng, Y. C.; Tsai, S.-W. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2002**, *77*, 699-705.

<sup>159</sup> (a) Crich, J.; Brieva, R.; Marquart, P.; Gu, R.-L.; Flemming, S.; Sih, C. J. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3252-3258; (b) Brown, S. A.; Parker, M.-C.; Turner, N. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 1687-1690.

<sup>160</sup> Pesti, J. A.; Yin, J.; Zhang, L.-H.; Anzalone, L.; Waltermire, R. E.; Ma, P.; Gorko, E.; Confalone, P. N.; Fortunak, J.; Silverman, C.; Blackwell, O. J.; Chung, J. C.; Hrytsak, M. D.; Cooke, M.; Powell, L.; Ray, C. *Org. Process Res. Dev.* **2004**, *8*, 22-27.

<sup>161</sup> (a) Tan, D. S.; Günter, M. M.; Drueckhammer, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9093-9094; (b) Um, P.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5605-5610.

<sup>162</sup> Fazlena, H.; Kamaruddin, A. H.; Zulkali, M. M. D. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2006**, *28*, 227-233.

<sup>163</sup> (a) Kalaitzakis, D.; Rozzell, J. D.; Kambourakis, S.; Smonou, I. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4799-4801; (b) Matsuda, T.; Yamanaka, R.; Nakamura, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 513-557.

### 1.16.2. RESOLUCIÓN CINÉTICA DINÁMICA EN PRESENCIA DE RESINAS DE INTERCAMBIO IÓNICO

Las resinas de intercambio iónico también han sido utilizadas como agentes de racemización en resoluciones cinéticas dinámicas. Estas resinas son sólidas e insolubles en agua y están compuestas por grupos polares, ácidos o básicos, incorporados a una matriz de un polímero sintético o por derivados inorgánicos.<sup>164</sup>

Las resinas de intercambio iónico con origen orgánico se pueden clasificar según su naturaleza en resinas ácidas o básicas:

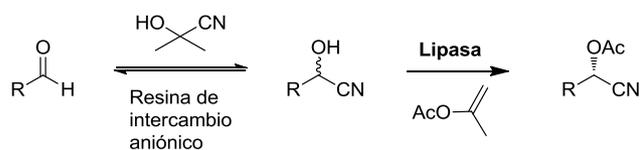
- Las resinas ácidas o de intercambio catiónico se clasifican en (i) resinas ácidas fuertes en las que el grupo funcional es un ácido sulfónico ( $\text{SO}_3\text{H}$ ), y resinas ácidas débiles donde el grupo funcional es un ácido carboxílico ( $\text{COOH}$ ).
- Las resinas básicas o de intercambio aniónico se clasifican en (i) resinas básicas fuertes en las que el grupo funcional es una sal de amonio cuaternario ( $\text{R}_4\text{N}^+$ ) y (ii) resinas básicas débiles que están funcionalizadas con aminas primarias ( $\text{RNH}_2$ ), secundarias ( $\text{R}_2\text{NH}$ ) o terciarias ( $\text{R}_3\text{N}$ ).

Según su estructura de red las resinas de intercambio pueden clasificarse en (a) resinas microporosas; (b) resinas macroporosas, con mayor capacidad de intercambio que las anteriores gracias a una mayor relación área/volumen, y (c) resinas isoporosas, que se caracterizan por tener tamaño de poro uniforme, con lo que aumenta la permeabilidad de los iones en el interior de la red. La capacidad de intercambio de las diferentes resinas va a depender del tipo de grupo funcional y del grado de entrecruzamiento de la matriz.

En 1992 se publicó la síntesis de ésteres de cianhidrina ópticamente activas a partir de aldehídos, a través de la resolución cinética de la cianhidrina racémica catalizada por la lipasa de *Pseudomonas cepacia*, con acetato de isoprenilo como agente acilante y la resina de intercambio aniónico fuerte Amberlita IRA-904 como agente de racemización (Figura 1.27).<sup>152b</sup>

---

<sup>164</sup> Información obtenida del portal de Tecnociencia de la Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT): [www.fecyt.es/especiales/intercambio\\_ionico/clasificacion.htm](http://www.fecyt.es/especiales/intercambio_ionico/clasificacion.htm).

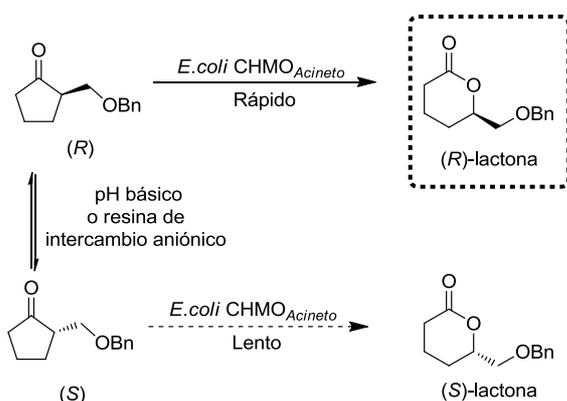


**Figura 1.27.** DKR catalizada por una lipasa en presencia de resinas de intercambio aniónico para la obtención de ésteres de cianhidrinas.

### 1.17. RESOLUCIÓN CINÉTICA DINÁMICA CATALIZADA POR BVMOS

Hasta la fecha se conocen pocos ejemplos de resoluciones cinéticas dinámicas catalizadas por Baeyer-Villiger monooxigenasas. La primera fue descrita por Furstoss y colaboradores, realizando la oxidación selectiva de la ( $\pm$ )-2-benciloximetilciclopentanona con células de *E. coli* recombinantes que contienen el gen de la CHMO<sub>Acineto</sub>.<sup>165</sup> Este sustrato posee un hidrógeno ácido, en posición  $\alpha$  al grupo carbonilo, que permite su racemización a través de una tautomería ceto-enólica a pH básico. Así, se obtuvo la (*R*)-6-benciloximetiltetrahidropiran-2-ona con un 75% de rendimiento y un exceso enantiomérico del 98%. Sin embargo, esta metodología posee una serie de inconvenientes: 1) la necesidad de trabajar a pHs altos produce una pérdida en la actividad enzimática (35%-40%); y 2) la concentración de sustrato debe ser baja (0.3 g/L) para evitar procesos de inhibición enzimática y toxicidad (Figura 1.28).

<sup>165</sup> Berezina, N.; Alphand, V.; Furstoss, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 1953-1955.



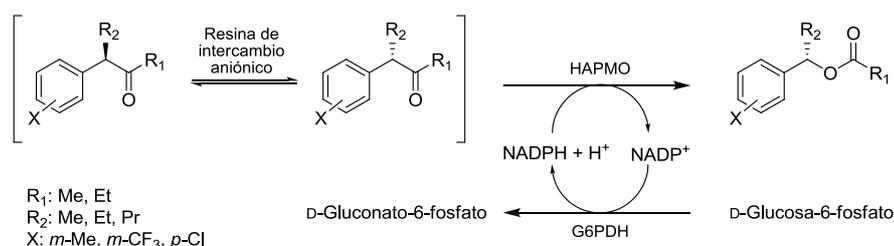
**Figura 1.28.** DKR catalizada por la CHMO de *Acinetobacter calcoaceticus* en disolución tampón Tris/HCl pH 9.0 o empleando resinas de intercambio aniónico como agentes de racemización.

Estos problemas fueron solventados posteriormente con la adición al medio de reacción de una resina aniónica débil (Lewatit MP62), para aumentar la velocidad de racemización.<sup>166</sup> De esta forma la oxidación se pudo llevar a cabo a pH neutro (el óptimo para la actividad del enzima) y además se consiguió aumentar la concentración de sustrato hasta 1.0 g/L, obteniéndose muy buenos rendimientos. De este modo se obtuvo de forma enantiopura la (R)-6-benciloximetiltetrahidropiran-2-ona con un 84% de rendimiento aislado (Figura 1.28).

Otro ejemplo más reciente consistió en la resolución cinética dinámica de cetonas bencílicas sustituidas en posición  $\alpha$  catalizada por la HAPMO aislada (Figura 1.29).<sup>167</sup> En este caso la oxidación biocatalítica se combinó con diferentes resinas de intercambio aniónico como agentes de racemización en medio básico. La adición de resinas fuertes permite una rápida racemización del sustrato, pero provoca una notable inactivación de la HAPMO. Los mejores resultados en la oxidación de la ( $\pm$ )-3-fenilbutan-2-ona se consiguieron empleando resinas débiles, en concreto la Dowex MWA-1. Así, es posible obtener el (S)-acetato de 1-feniletilo con elevadas conversiones y buenos excesos enantioméricos. El estudio se extendió a otras DKRs de cetonas aromáticas con resultados que van de moderados a buenos en función del compuesto oxidado.

<sup>166</sup> Gutiérrez, M.-C.; Furstoss, R.; Alphand, V. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1051-1059.

<sup>167</sup> Rodríguez, C.; de Gonzalo, G.; Ríoz-Martínez, A.; Torres Pazmiño, D. E.; Fraaije, M. W.; Gotor, V. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 1121-1125.



**Figura 1.29.** Procedimiento general para la DKR de bencilcetonas catalizada por la HAPMO.

Asimismo, se llevó a cabo la DKR de este tipo de compuestos catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub> mediante el uso de una resina de intercambio aniónico débil (Lewatit MP62) en presencia de un medio de reacción con 5% de metanol. En general, es posible obtener los correspondientes ésteres quirales con buenas conversiones y excesos enantioméricos.<sup>130</sup>

### 1.18. SÍNTESIS Y FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LAS 3,4-DIHIIDROISOCUMARINAS

Las 3,4 dihidroisocumarinas son compuestos de gran importancia ya que son intermedios clave en la síntesis de moléculas biológicamente activas, con propiedades antifúngicas, antialérgicas y antitumorales, como se muestra en la Figura 1.30.<sup>168</sup> Este hecho hace que sean moléculas muy atractivas en síntesis orgánica.

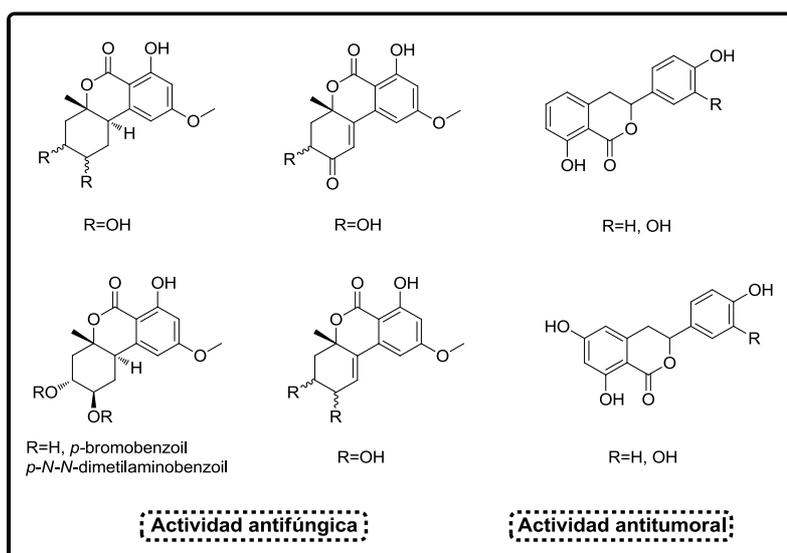
Hasta la fecha se han descrito varias síntesis de estos derivados. Un ejemplo consiste en la *orto*-litiación estabilizada por un agente quelante de la 2-(*o*-tolil)oxazolina, que posteriormente, tras una adición electrófila a un aldehído y una hidrólisis en medio ácido, genera las 3,4-dihidroisocumarinas.<sup>169</sup> También se ha descrito una metodología basada en la reacción radicalaria de 2-bromoetilbenzoato de etilo con diferentes aldehídos, empleando como agente de iniciación cloruro de diciclopentadienil titanoceno. De nuevo se requiere una hidrólisis en medio

<sup>168</sup> (a) Umehara, K.; Matsumoto, M.; Nakamura, M.; Miyase, T.; Kuroyanagi, M.; Noguchi, H. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 566-567; (b) Zidorn, C.; Lohwasser, U.; Pschorr, S.; Salvenmoser, D.; Ongania, K.-H.; Ellmerer, E. P.; Börner, A.; Stuppner, H. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 1691-1697; (c) Jiao, P.; Gloer, J. B.; Campbell, J.; Shearer, C. A. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 612-615.

<sup>169</sup> (a) Fukuda, T.; Iwao, M. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 3289-3303; (b) Uchida, K.; Fukuda, T.; Iwao, M. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 7178-7186.

## Capítulo 1

ácido para obtener las 3-alkuil-3,4-dihidroisocumarinas esperadas.<sup>170</sup> Una nueva ruta sintética consiste en la alquilación con reactivos de Grignard insaturados de 1,2-oxiranos, seguida de una degradación oxidativa con tetraóxido de osmio y peroxomonosulfato de potasio, y posterior hidrólisis ácida.<sup>171</sup> Otros procesos de síntesis se basan en la reacción de arilación de Meerwein, donde bromuros de *O*-metoxicarbonilbencenodiazonio reaccionan con alquenos desactivados utilizando como catalizador CuBr.<sup>172</sup> Han sido también empleadas otras metodologías como la ciclación de cetoaldehídos mediante complejos de Ir y un cooxidante,<sup>173</sup> y ciclaciones [3+3] dominó acopladas con lactonizaciones.<sup>174</sup>



**Figura 1.30.** Compuestos biológicamente activos que presentan la estructura 3,4-dihidroisocumarina en su esqueleto.

Todas estas estrategias, en general, conllevan ciertos inconvenientes, como condiciones de reacción duras, numerosos pasos de reacción y bajos rendimientos debido a la intolerancia de grupos funcionales.

<sup>170</sup> Mandal, S. M.; Roy, S. C. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 4131-4134.

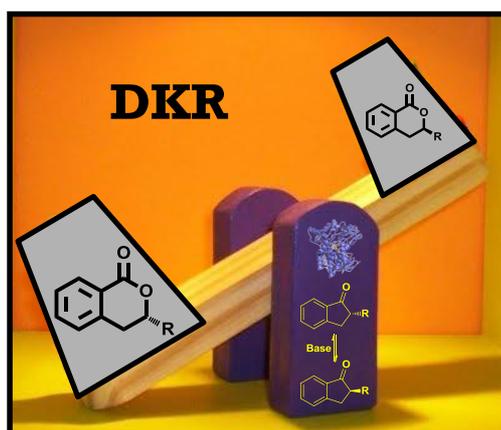
<sup>171</sup> Habel, A.; Boland, W. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1601-1604.

<sup>172</sup> Obushak, M. D.; Matiychuk, V. S.; Turytsya, V. V. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 6112-6115.

<sup>173</sup> Suzuki, T.; Yamada, T.; Watanabe, K.; Katoh, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2583-2585.

<sup>174</sup> Sher, M.; Ali, A.; Reinke, H.; Langer, P. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 5400-5402.

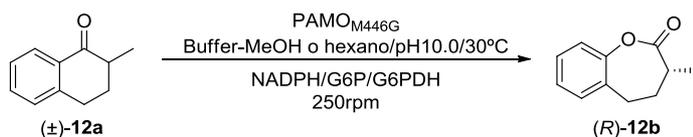
En esta sección nos planteamos como objetivo la oxidación selectiva de 2- y 3-alkuil-1-indanonas racémicas catalizada por las BVMOs HAPMO, wtPAMO y PAMO<sub>M446G</sub>. Para ello, se optimizarán diferentes parámetros de reacción como el pH, la temperatura y la presencia de cosolventes, investigando además la influencia de diferentes resinas de intercambio aniónico en los procesos oxidativos. De este modo se realizará la preparación de 3- y 4-alkuil-3,4-dihidroisocumarinas o 3- y 4-alkuil-3,4-dihidrocumarinas, dependiendo de la regioselectividad mostrada por los enzimas. Ambos tipos de productos finales presentan un elevado valor sintético, ya que son intermedios clave en la síntesis de numerosas moléculas biológicamente activas.





### 1.19. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE LA (±)-2-METIL-1-TETRALONA

Los estudios iniciales se centraron en la oxidación enzimática de una tetralona racémica accesible comercialmente, la (±)-2-metil-1-tetralona [(±)-**12a**], empleando tres BVMOs (la *wt*PAMO, su mutante M446G y la HAPMO). El medio de reacción elegido fue una disolución Tris/HCl a pH 10.0, utilizando como ya se ha descrito en la sección anterior, el sistema G6P/G6PDH para regenerar el NADPH. Las reacciones fueron llevadas a cabo a 30°C para los dos tipos de PAMO y a 20°C para la HAPMO. Después de 72 horas de oxidación de (±)-**12a**, no se observó reacción con la HAPMO y la *wt*PAMO, mientras que con la PAMO<sub>M446G</sub> se obtuvo un 15% de la (*R*)-3-metil-4,5-dihidrobenc[*b*]oxepin-2(3*H*)-ona [(*R*)-**12b**] con bajo exceso enantiomérico (*ee*=36%, Figura 1.31). Debido a que en la oxidación de cetonas benzofusionadas con la HAPMO y la PAMO<sub>M446G</sub> la conversión se incrementaba en presencia de hexano y MeOH, respectivamente, se llevó a cabo la oxidación de (±)-**12a** catalizada por ambos biocatalizadores con un 5% (v/v) de sendos cosolventes. Sin embargo, no se observó ninguna mejora en términos ni de conversión ni de enantioselectividad, por lo que se puede establecer que (±)-**12a** no es un sustrato adecuado para estas enzimas. Este resultado concuerda con lo obtenido previamente en la oxidación de tetralonas catalizada por BVMOs.



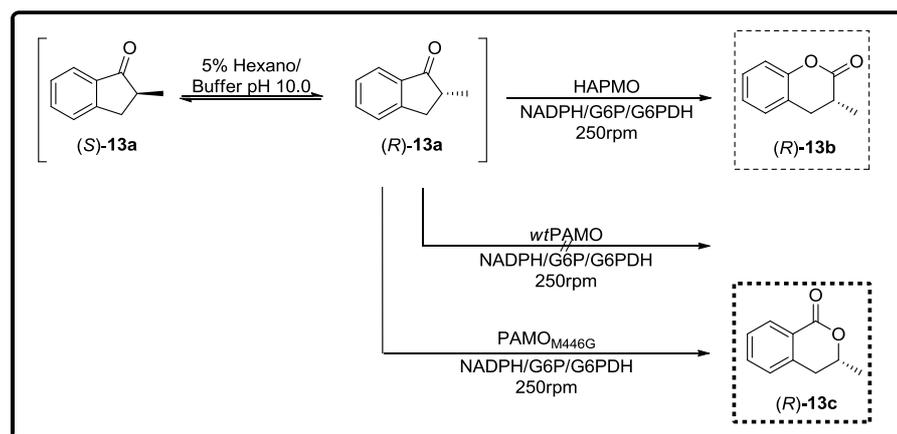
**Figura 1.31.** Oxidación enzimática de la ( $\pm$ )-2-metil-1-tetralona [( $\pm$ )-**12a**] catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub>.

### 1.20. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE LA ( $\pm$ )-2-METIL-1-INDANONA

A la vista de los resultados con la ( $\pm$ )-2-metil-1-tetralona, decidimos estudiar la biooxidación de la cetona benzofusionada análoga de cinco miembros, la ( $\pm$ )-2-metil-1-indanona [( $\pm$ )-**13a**]. Las pruebas iniciales se llevaron a cabo con una concentración de **13a** de 4.0 g L<sup>-1</sup> en un medio bifásico 5% hexano/disolución tampón Tris/HCl pH 10.0. Como se puede observar en la Tabla 1.7, la HAPMO mostró de nuevo una baja conversión y selectividad (entrada 1), generándose un 13% de la lactona esperada, la 3-metil-3,4-dihidrocumarina [(*R*)-**13b**] con baja pureza óptica. La *w*tPAMO tampoco mostró actividad frente a esta cetona (entrada 2). Por el contrario, los resultados obtenidos con la PAMO<sub>M446G</sub> fueron prometedores. Después de 72 horas se obtuvo la lactona no esperada (*R*)-3-metil-3,4-dihidroisocumarina [(*R*)-**13c**] con alta pureza óptica (*ee*=92%) y un 33% de conversión. Se observó que la cetona de partida presentaba un exceso enantiomérico bajo (*ee*=10%), confirmando que se había racemizado en el medio de reacción (entrada 3).

A la vista de este resultado, intentamos aumentar la conversión del proceso, disminuyendo para ello la concentración de sustrato y aumentando el tiempo de reacción, el pH y la temperatura. Así, la reacción a 40°C, pH 10.0 y con una concentración de sustrato 2.0 g/L (entrada 4) permite obtener (*R*)-**13c** con un 84% de conversión y 82% de exceso enantiomérico tras 168 horas. El aumento de pH hasta 10.5 incrementa la conversión (*c*=89%), aunque provoca un descenso en el exceso enantiomérico de (*R*)-**13c** hasta el 74% (entrada 5). Así, con un pH lo suficientemente alto en la biooxidación de ( $\pm$ )-**13a** catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub>, hemos generado la lactona (*R*)-**13c** con elevadas conversiones y excesos enantioméricos. De esta forma, se ha llevado a cabo la síntesis de esta dihidroisocumarina quiral mediante una simple oxidación enzimática regioselectiva. Esta metodología resulta una alternativa muy atractiva para la preparación de estos compuestos, si consideramos los métodos descritos previamente en los Antecedentes y los utilizados para la síntesis de los compuestos racémicos en la parte experimental.

**Tabla 1.7.** Oxidación enzimática de la ( $\pm$ )-2-metil-1-indanona [( $\pm$ )-**13a**] catalizada por BVMOs en presencia de 5% hexano.



Entrada	BVMO	t(h)	T(°C)	$ee_{13a}$ (%) <sup>a</sup>	$ee_{13b \text{ ó } 13c}$ (%) <sup>a</sup>	$c$ (%) <sup>a</sup>
1	HAPMO	72	20	5	6	13
2	wtPAMO	72	30	-	-	≤3
3	M446G	72	30	10	92	33
4 <sup>b</sup>	M446G	168	40	7	82	84
5 <sup>b,c</sup>	M446G	168	40	5	74	89

<sup>a</sup> Determinado por CG.

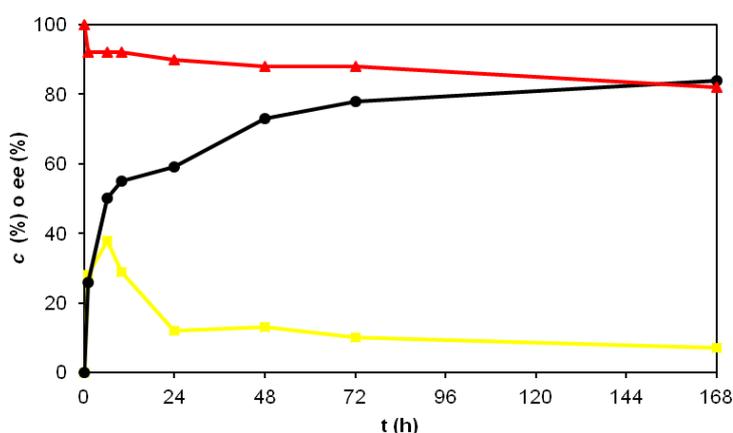
<sup>b</sup> [( $\pm$ )-**13a**]=2.0 g L<sup>-1</sup>

<sup>c</sup> pH=10.5

### 1.20.1. ESTUDIO EN EL TIEMPO DE LA RESOLUCIÓN CINÉTICA DINÁMICA DE LA ( $\pm$ )-2-METIL-1-INDANONA CON LA PAMO<sub>M446G</sub>

La reacción catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub> en Tris/HCl pH 10.0 en presencia de 5% de hexano a 40°C fue monitorizada en el tiempo. Como muestra la Figura 1.32, la biooxidación de ( $\pm$ )-**13a** presenta en la fase inicial el comportamiento típico de una resolución cinética, donde la pureza óptica de la cetona (*S*)-**13a** aumenta a medida que la PAMO<sub>M446G</sub> oxida el enantiómero favorecido a (*R*)-**13c**. Tras 6 horas, se obtiene un 50% de (*R*)-**13c** con un 92% de exceso enantiomérico, mientras que el  $ee$  de (*S*)-**13a** alcanza un valor máximo del 38%. A partir de este momento, predomina la racemización de la cetona, produciéndose una importante pérdida en la pureza óptica de (*S*)-**13a**, mientras que el exceso enantiomérico de la (*R*)-lactona apenas se modifica. De esta manera, a las 72 horas la oxidación alcanza un 78% de conversión y un  $ee$  del 88%.

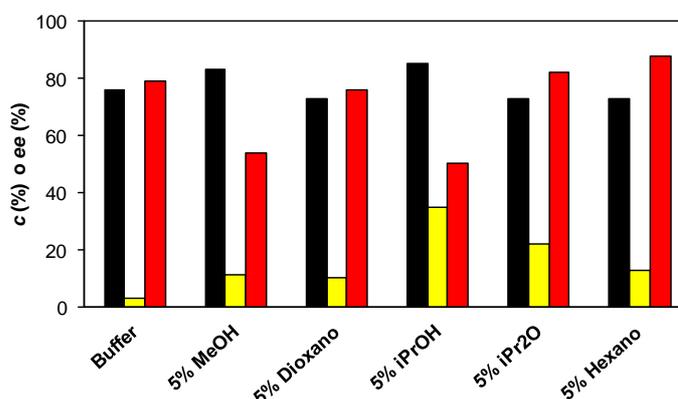
A tiempos más largos la conversión del proceso aumenta, mientras que decrece ligeramente el exceso enantiomérico de la lactona final, debido probablemente a una ligera racemización. Así, tras 168 horas obtenemos (*R*)-**13c** con una conversión del 84% y *ee*=82%.



**Figura 1.32.** Seguimiento de la DKR en el tiempo empleando la  $\text{PAMO}_{\text{M446G}}$  como biocatalizador en presencia de 5% hexano. Se representa la conversión (●) y excesos enantioméricos de (*S*)-**13a** (■) y (*R*)-**13c** (▲).

### 1.20.2. RESOLUCIÓN CINÉTICA DINÁMICA DE LA (±)-2-METIL-1-INDANONA EN PRESENCIA DE DISOLVENTES ORGÁNICOS

Una vez establecido que 48 horas es un tiempo adecuado para obtener (*R*)-**13c** con una alta conversión y pureza óptica, decidimos estudiar ciertos parámetros que pueden afectar a la DKR. En primer lugar analizamos el efecto de diferentes cosolventes en el medio de reacción. Como muestra la Figura 1.33, la oxidación catalizada por la  $\text{PAMO}_{\text{M446G}}$  en disolución tampón pH 10.0 y a 40°C genera un 76% de la (*R*)-lactona con un 79% de exceso enantiomérico. Al añadir un 5% (v/v) de alcoholes de cadena corta como MeOH o <sup>i</sup>PrOH, se consigue un aumento en la conversión del proceso, algo en concordancia con los resultados de la sección anterior para cetonas benzofusionadas aquirales. Sin embargo, estos dos disolventes provocan una disminución de la selectividad enzimática, ya que (*R*)-**13c** fue obtenido con un 54% y un 50% de exceso enantiomérico, respectivamente. Los resultados en presencia de un 5% (v/v) de <sup>i</sup>Pr<sub>2</sub>O y 1,4-dioxano fueron muy similares a los observados en disolución reguladora, mientras que el empleo de un 5% de hexano provoca un aumento en la pureza óptica de (*R*)-**13c** acompañado de un ligero descenso en la conversión del proceso.



**Figura 1.33.** Efecto del medio de reacción en la biooxidación de la 2-metil-1-indanona, [(±)-13a] catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub>. Se representa la conversión (■) y excesos enantioméricos de (S)-13a (■) y (R)-13c (■).

### 1.20.3. OTROS PARÁMETROS DE REACCIÓN QUE AFECTAN A LA RESOLUCIÓN CINÉTICA DINÁMICA DE LA (±)-2-METIL-1-INDANONA

El efecto de la temperatura y el pH fue estudiado en la oxidación de (±)-13a cuando utilizamos como cosolventes 5% de metanol o hexano. La elección de estos disolventes se debió a que habían ofrecido la mayor conversión y exceso enantiomérico en el proceso oxidativo, respectivamente. Como se muestra en la Tabla 1.8, al reducir la temperatura se produce una caída en la conversión (entradas 1-4). Hay que destacar que en las biooxidaciones con metanol (entradas 1 y 2), el descenso en la temperatura conlleva un gran aumento en la selectividad enzimática. También se observó que una disminución en el pH (entradas 5-8) provoca un descenso en la conversión de las reacciones. De nuevo en el caso de las oxidaciones con MeOH, se produce un aumento en la selectividad ( $ee=87\%$  y  $88\%$  a pHs 8.0 y 9.0, respectivamente, frente a  $ee=54\%$  a pH 10.0). En el caso del hexano, la variación tanto de la temperatura como del pH no tiene un efecto tan drástico en la selectividad de la PAMO<sub>M446G</sub>.

**Tabla 1.8.** Estudio del pH y la temperatura en la oxidación enzimática de ( $\pm$ )-**13a** catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub> en presencia de 5% hexano y 5% de MeOH.

Entrada	Disolvente	pH	T(°C)	<i>ee</i> <sub>13a</sub> (%) <sup>a</sup>	<i>ee</i> <sub>13c</sub> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>a</sup>
1	5% MeOH	10	30	26	74	61
2	5% MeOH	10	20	5	82	13
3	5% Hexano	10	30	28	81	60
4	5% Hexano	10	20	6	77	20
5	5% MeOH	9	40	≤3	87	50
6	5% MeOH	8	40	16	88	38
7	5% Hexano	9	40	19	83	64
8	5% Hexano	8	40	34	83	60

<sup>a</sup> Determinado por CG.

Hasta el momento, todas las reacciones catalizadas por la PAMO<sub>M446G</sub> se han llevado a cabo en disoluciones reguladoras de Tris/HCl. Un estudio reciente demostró que la actividad y selectividad de la *wt*PAMO puede variar en función de la naturaleza y fuerza iónica del medio.<sup>175</sup> Por ello, se analizó el efecto de diferentes disoluciones reguladoras sobre las propiedades biocatalíticas de la PAMO<sub>M446G</sub> en la oxidación de ( $\pm$ )-**13a** cuando trabajamos con un 5% de hexano a 40°C (Tabla 1.9). Así, se han preparado una serie de disoluciones reguladoras de glicina, tetraborato de sodio (también denominada bórax) y bicarbonato sódico de concentración 50 mM, en las que se ha ajustado el pH con NaOH a 10.0. Tras 48 horas, se observó que empleando la disolución de bórax no se produce reacción (entrada 1), mientras que con las disoluciones de glicina y bicarbonato (entradas 2 y 3), la oxidación es más lenta que con Tris/HCl, pasando de un 73% de conversión a valores del 24% y 63%, respectivamente. En ambos casos la selectividad es alta, similar a la alcanzada con la resolución reguladora Tris/HCl. Debido a que los resultados obtenidos no mejoraban los previamente descritos, continuamos nuestro estudio con Tris/HCl.

<sup>175</sup> Rodríguez, C.; de Gonzalo, G.; Gotor, V. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2012**, *74*, 138-143.

**Tabla 1.9.** Efecto del medio de reacción en la oxidación enzimática de la ( $\pm$ )-2-metil-1-indanona catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub> en presencia de 5% hexano.

Entrada	Reguladora	<i>ee</i> <sub>13a</sub> (%) <sup>a</sup>	<i>ee</i> <sub>13c</sub> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>a</sup>
1	Borax/NaOH	≤3	-	≤3
2	Glicina/NaOH	5	92	24
3	NaHCO <sub>3</sub> /NaOH	14	90	63

<sup>a</sup> Determinado por CG.

Como se ha descrito en los Antecedentes, las resinas de intercambio iónico se han empleado en numerosos procesos de DKR, por lo que nos planteamos su uso para facilitar la racemización de ( $\pm$ )-**13a**. Por ello, se analizó el efecto de la adición de una serie de resinas iónicas, tanto débiles como fuertes, en la oxidación de ( $\pm$ )-**13a** a 40°C, pH 10.0 y en presencia de un 5% de hexano. Como se muestra en la Tabla 1.10, a las 48 horas se produjo la racemización completa de la cetona para todas las resinas analizadas. Además, la selectividad permaneció muy similar en todos los casos. El empleo de resinas débiles (entradas 2-4) ralentiza las oxidaciones, obteniéndose conversiones menores que cuando llevamos a cabo la reacción en ausencia de resina. El mejor resultado se obtuvo con la resina de intercambio débil Lewatit MP62 (entrada 2), generándose un 56% de (*R*)-**13c** con un 84% de exceso enantiomérico, mientras que con el resto de resinas de carácter débil se consiguen conversiones menores con la misma enantioselectividad. Peores resultados fueron obtenidos con las resinas de intercambio fuertes (entradas 5-8), ya que éstas causan una desactivación acusada de la PAMO<sub>M446G</sub>. Este hecho hace que en general se obtengan conversiones muy bajas e incluso que con la Amberlita IRA 440C no se observe reacción. Por lo tanto, podemos establecer que la adición de resinas de intercambio iónico a la reacción no aporta beneficio alguno al proceso, ya que las resinas son capaces de racemizar la cetona de partida, pero las conversiones alcanzadas son menores que en ausencia de las mismas.

**Tabla 1.10.** Oxidación enzimática de la ( $\pm$ )-2-metil-1-indanona [( $\pm$ )-**13a**] catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub> en presencia de resinas de intercambio iónico.

Entrada	Resina	Carácter	<i>ee</i> <sub>13a</sub> (%) <sup>a</sup>	<i>ee</i> <sub>13c</sub> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>a</sup>
1	Ninguna	-	13	88	73
2	Lewatit MP62	Débil	≤3	84	56
3	Dowex MWA-1	Débil	≤3	85	49
4	Amberlita IRA 67	Débil	≤3	85	53
5	Amberlite IRA 440C	Fuerte	≤3	-	≤3
6	Amberlita A26	Fuerte	≤3	86	40
7	Dowex 1	Fuerte	≤3	76	17
8	Amberlita IRA 910	Fuerte	≤3	85	38

<sup>a</sup> Determinado por CG.

Una vez establecidos los mejores parámetros de reacción (5% de hexano, pH 10.0 y 40°C) se realizó un escalado de la DKR de la ( $\pm$ )-2-metil-1-indanona (250 mg), empleando un extracto libre de células que contiene PAMO<sub>M446G</sub> (PAMO<sub>M446G</sub>-CFE). En este proceso se aislaron 221 mg de la lactona (*R*)-**13c**, que corresponden a un 80% de rendimiento.

### 1.21. RESOLUCIÓN CINÉTICA DINÁMICA DE ( $\pm$ )-2-ALQUIL-1-INDANONAS CATALIZADAS POR LA PAMO<sub>M446G</sub>

Los buenos resultados en la oxidación de la ( $\pm$ )-2-metil-1-indanona con PAMO<sub>M446G</sub>, nos animaron a extender esta metodología a otras 2-alquil-1-indanonas racémicas (Tabla 1.11). También se analizó la HAPMO como biocatalizador, pero de nuevo no hubo reacción para ninguna de las cetonas estudiadas.

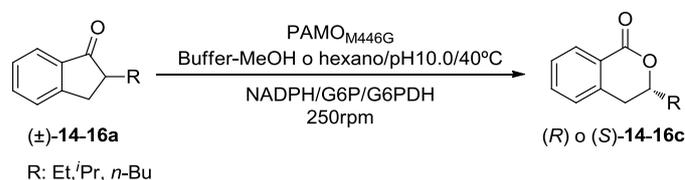
Para todas las 2-alquil-1-indanonas probadas se observa racemización, siendo recuperadas las correspondientes (*R*)- o (*S*)-cetonas con bajos excesos enantioméricos (entre 6% y 20%). La ( $\pm$ )-2-etil-1-indanona [( $\pm$ )-**14a**] es selectivamente oxidada en medio acuoso por la PAMO<sub>M446G</sub> a (*R*)-**14c** con un exceso enantiomérico del 91% y una conversión del 72% tras 96 horas (entrada 1). La adición de un 5% de hexano produjo un importante decrecimiento en la actividad enzimática (entrada 2), manteniéndose la selectividad inalterada. El efecto de un 5% de metanol fue el opuesto, ya que aumentó la actividad (*c*=89%) de la oxidación y disminuyó su selectividad (*ee*=60%), como se muestra en la entrada 3. Este resultado concuerda con el comportamiento descrito para la ( $\pm$ )-2-metil-1-indanona. Debido a que para la *w*tPAMO había sido descrito que un pH menor mejora la selectividad enzimática en reacciones de Baeyer-Villiger, se realizó la biooxidación a pH 8.0. En estas condiciones se produjo un aumento en la

## Resultados y discusión

selectividad enzimática, pero a costa de un descenso de la velocidad de reacción (entrada 4). Otro método para intentar mejorar la enantioselectividad del proceso con el 5% de metanol consistió en trabajar a 20°C. Sin embargo, no se mejoró la selectividad del proceso y se observó un empeoramiento de la actividad (entrada 5).

Idénticas condiciones de reacción se emplearon para resolver la ( $\pm$ )-2-isopropil-1-indanona [( $\pm$ )-**15a**]. Se obtuvo en todo los casos de forma totalmente enantiopura la lactona (*S*)-**15c** con conversiones cercanas al 50% (entradas 6-8). Hay que destacar que en esta oxidación la lactona obtenida presentó la configuración *S*, debido a un cambio en la prioridad de grupos según las reglas de Cahn-Ingold-Prelog (CIP). La adición de hexano aceleró ligeramente la velocidad de reacción, ya que en 104 horas se alcanzó una conversión superior al 50% (entrada 7). La presencia de un 5% de MeOH, no aportó una mejoría, ya que la conversión alcanzada ( $c=42\%$ ) era similar a la conseguida en disolución tampón ( $c=46\%$ ). Estos resultados no pudieron ser mejorados aumentando el tiempo de reacción.

**Tabla 1.11.** Resolución cinética dinámica de ( $\pm$ )-2-alkil-1-indanonas catalizadas por la PAMO<sub>M446G</sub>.



Entrada	R	Cosolvente	t(h)	$ee_{14-16a}(\%)^a$	$ee_{14-16c}(\%)^a$	$c(\%)^a$
1	Et	Ninguno	96	6	91	72
2	Et	5% hexano	96	11	91	36
3	Et	5% MeOH	96	10	60	89
4 <sup>b</sup>	Et	5% MeOH	120	16	85	45
5 <sup>c</sup>	Et	5% MeOH	120	17	60	50
6	<i>i</i> Pr	Ninguno	104	17	$\geq 99$	46
7	<i>i</i> Pr	5% hexano	104	17	$\geq 99$	53
8	<i>i</i> Pr	5% MeOH	104	16	$\geq 99$	42
9	<i>n</i> -Bu	Ninguno	144	17	92	80
10	<i>n</i> -Bu	5% hexano	96	11	92	26
11	<i>n</i> -Bu	5% MeOH	144	20	88	78

<sup>a</sup> Determinado por CG.

<sup>b</sup> pH=8.0.

<sup>c</sup> T=20°C.

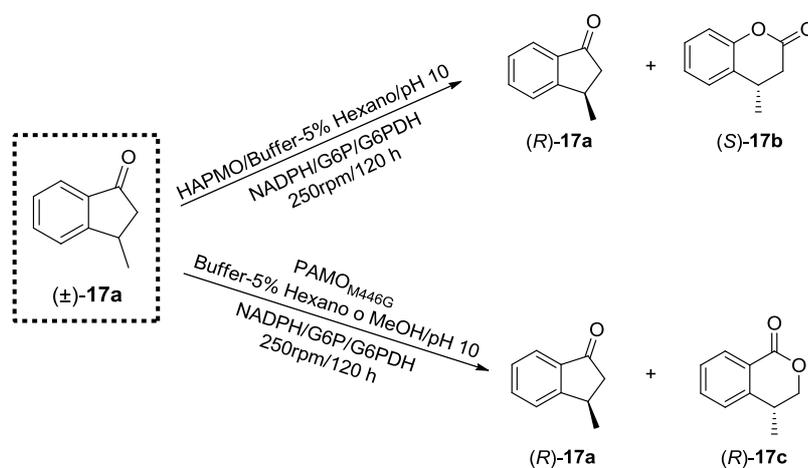
Por último, se desarrolló la resolución cinética dinámica de la ( $\pm$ )-2-butyl-1-indanona [( $\pm$ )-**16a**] (entradas 9-11). En los tres medios de reacción analizados se obtuvo la (*R*)-3-butyl-3,4-dihidroisocumarina [(*R*)-**16c**] con

altos excesos enantioméricos (en torno al 90%). Las reacciones llevadas a cabo en disolución tampón o en presencia de un 5% de MeOH dieron lugar a conversiones mucho mayores (en torno al 80% a las 144 horas), mientras que con un 5% de hexano sólo se alcanza un 26% de (*R*)-**16c** a las 96 horas. En general, podemos concluir que al aumentar la cadena alquílica, a un tamaño mayor de un grupo etilo en las 2-alkil-indanonas, se obtienen peores resultados. Las reacciones son, en general, más lentas y las conversiones alcanzadas menores, aunque la selectividad enzimática se mantiene e incluso aumenta con grupos voluminosos como el isopropilo.

### **1.22. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE LA (±)-3-METIL-1-INDANONA CATALIZADA POR BVMOs**

Finalmente, desarrollamos la oxidación enzimática de la (±)-3-metil-1-indanona, [(±)-**17a**]. Al igual que ocurre con el resto de 1-indanonas, dependiendo del biocatalizador elegido (HAPMO o PAMO<sub>M446G</sub>), se puede obtener la lactona normal (*S*)-**17b** o la lactona anormal (*R*)-**17c**, respectivamente. De nuevo, no se observó oxidación con la *wt*PAMO. Como se muestra en la Tabla 1.12, se realizó la resolución cinética de (±)-**17a** catalizada por la HAPMO en disolución tampón y en la mezcla con un 5% de hexano (entradas 1 y 2). Sorprendentemente, no se observó reacción en presencia de hexano, mientras que en disolución tampón se obtuvo de forma enantiopura un 15% de (*S*)-4-metil-3,4-dihidrocumarina [(*S*)-**17b**]. Este resultado fue mejorado adicionando una doble concentración de biocatalizador, llegando a una conversión del 23% (entrada 3). Tiempos más largos de reacción no aumentaron la conversión de (*S*)-**17b**. Los resultados con la PAMO<sub>M446G</sub> fueron similares. Ni la reacción en disolución tampón, ni la reacción con un 5% de hexano generaron producto alguno (entradas 4 y 5). Sin embargo, este enzima fue capaz de catalizar la oxidación de (±)-**17a** en presencia de un 5% de metanol (entrada 6), generando de forma enantiopura un 12% de (*R*)-4-metil-3,4-dihidroisocumarina [(*R*)-**17c**]. Este resultado no pudo ser mejorado ni mediante el aumento de la concentración del enzima, ni aumentando el tiempo de reacción.

**Tabla 1.12.** Resolución cinética de la ( $\pm$ )-3-metil-1-indanona [( $\pm$ )-**17a**] catalizada por la HAPMO y la PAMO<sub>M446G</sub>.



Entrada	BVMO	Cosolvente	T(°C)	$ee_{17a}$ (%) <sup>a</sup>	$ee_{17b-17c}$ (%) <sup>a</sup>	$c$ (%) <sup>a</sup>	$E$ <sup>b</sup>
1	HAPMO	Ninguno	20	17	$\geq 99$	15	$\geq 200$
2	HAPMO	5% hexano	20	$\leq 3$	-	$\leq 3$	-
3 <sup>c</sup>	HAPMO	Ninguno	20	30	$\geq 99$	23	$\geq 200$
4	M446G	Ninguno	40	7	$\geq 99$	5	$\geq 200$
5 <sup>c</sup>	M446G	5% hexano	40	$\leq 3$	-	$\leq 3$	-
6	M446G	5% MeOH	40	10	88	12	$\geq 200$

<sup>a</sup> Determinado por CG.

<sup>b</sup>  $E = \ln\{(1-ee_s)/[1+(ee_s/ee_p)]\} / \ln\{(1+ee_s)/[1+(ee_s/ee_p)]\}$ .

<sup>c</sup> Doble cantidad de biocatalizador.



*En esta sección se ha llevado a cabo la resolución cinética dinámica de una serie de ( $\pm$ )-2-alkuil-1-indanonas catalizadas por la PAMO<sub>M446G</sub> en medio básico. Se generaron con altos rendimientos y excesos enantioméricos 3-alkuil-3,4-dihidroisocumarinas, intermedios clave en la síntesis de numerosas moléculas biológicamente activas. Al igual que en la sección anterior, la metodología usada para la obtención de estas lactonas se basa en un solo paso de reacción, una oxidación enzimática regioselectiva, lo que resulta una alternativa sencilla para la síntesis de estos compuestos, si tenemos en cuenta otros métodos de preparación descritos previamente.*

*Se optimizó la DKR de la ( $\pm$ )-2-metil-1-indanona analizando el efecto del pH, la temperatura y el medio de reacción (naturaleza de la disolución tampón y cosolventes), así como la presencia de diferentes resinas de intercambio iónico. La temperatura óptima fue 40°C y el pH 10.0 el más adecuado para obtener la (R)-3-metil-3,4-dihidroisocumarina con elevada conversión y exceso enantiomérico. Se observó que la adición de un 5% de hexano mejora la selectividad enzimática sin alterar la actividad, mientras que la adición de un 5% de MeOH incrementa la actividad enzimática a costa de una disminución de la selectividad. La adición de resinas de intercambio no mejoró los resultados obtenidos.*

*Estas condiciones fueron empleadas para llevar a cabo la DKR de otras ( $\pm$ )-2-alkuil-1-indanonas con altas conversiones y excesos enantioméricos en función de las condiciones de reacción. Al aumentar el tamaño del resto alquílico, se consiguen peores conversiones.*

*Finalmente, se ha estudiado la resolución cinética de la ( $\pm$ )-3-metil-1-indanona. Aunque con conversiones bajas, se ha podido obtener de forma enantiopura ambas lactonas regioisómeras en función del biocatalizador empleado.*



### 1.23. TÉCNICAS INSTRUMENTALES

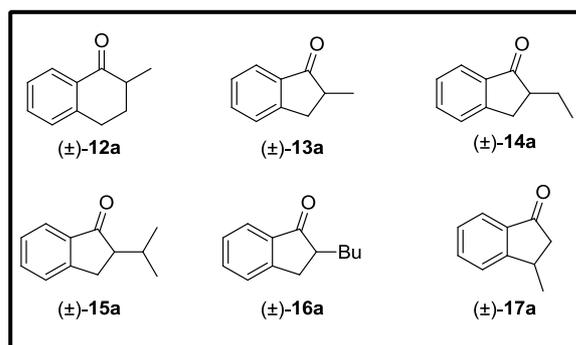
Las técnicas instrumentales empleadas para la síntesis y caracterización de los compuestos mencionados en esta sección, ya se han descrito en su gran mayoría en la Parte Experimental del Capítulo 1 (Sección 1). Únicamente cabe incluir:

- La medida de rotación específica, que se realizó empleando un polarímetro Perkin-Elmer 241. Las unidades están referidas a  $10^{-1}$  deg cm<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>.
- Los análisis de cromatografía líquida de alta eficiencia (del inglés *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), que se llevaron a cabo en un cromatógrafo Hewlett Packard 1100 LC equipado con una columna: Chiralcel OB-H (Daicel, 0.46 cm x 25 cm) o Chiralcel OJ-H (Daicel, 0.45 cm x 25 cm).

## Capítulo 1

---

Las cetonas benzofusionadas racémicas empleadas pueden consultarse en la Figura 1.34.



**Figura 1.34.** Compuestos empleados en el Capítulo 1 (Sección 2).

### 1.24. REACTIVOS GENERALES

Las proteínas recombinantes *wr*PAMO,<sup>50</sup> PAMO<sub>M446G</sub><sup>99</sup> y HAPMO<sup>47</sup> han sido sobreexpresadas y purificadas de acuerdo con los métodos descritos. Las reacciones de oxidación se han llevado a cabo con el enzima aislado en disolución. Se ha definido una unidad enzimática de BVMO como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1.0  $\mu\text{mol}$  de fenilacetona a acetato de bencilo por minuto, a pH 9.0 y 25°C, en presencia de NADPH. El enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (640 U/mg) de *Leuconostoc mesenteroides* y la D-Glucosa-6-fosfato son productos de Sigma-Aldrich-Fluka. Los coenzimas NADP<sup>+</sup>/NADPH (de pureza  $\geq 99\%$ ) obtenidos como sales de sodio son comercializados por Codexis. Las resinas de intercambio aniónico son comercializadas por Sigma-Aldrich-Fluka. Antes de su uso, las resinas se lavaron con agua destilada. Las cetonas racémicas (±)-**12-14a** y (±)-**16-17a**, así como el resto de reactivos y disolventes fueron suministrados por Sigma-Aldrich-Fluka y presentan el mayor grado de pureza posible.

## 1.25. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS

### Síntesis química de la cetona racémica ( $\pm$ )-2-isopropil-1-indanona [( $\pm$ )-**15a**].<sup>176</sup>

#### Preparación de cloruro de isopropil zinc (<sup>i</sup>PrZnCl):

Una disolución 1.0 M de ZnCl<sub>2</sub> en Et<sub>2</sub>O (4.5 mL, 4.50 mmol) se diluye bajo atmósfera de N<sub>2</sub> junto a otra disolución 1.0 M de cloruro de isopropilmagnesio en Et<sub>2</sub>O (2.3 mL, 1.0 eq.), en 15.8 mL de Et<sub>2</sub>O a 0°C. La suspensión resultante se agita vigorosamente durante 3 horas a 0°C.

#### Preparación de la cetona racémica ( $\pm$ )-**15a**:

A una suspensión de ( $\pm$ )-2-cloro-1-indanona (500 mg, 3.01 mmol) y Cu(acac)<sub>2</sub> (39.0 mg, 0.05 eq.) en Et<sub>2</sub>O (6.1 mL) se le añade a temperatura ambiente y bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, el complejo anteriormente formado <sup>i</sup>PrZnCl•MgCl<sub>2</sub> (22.6 mL, 1.5 eq.) y se agita vigorosamente durante 72 horas. A continuación la mezcla se diluye con Et<sub>2</sub>O (30 mL) y se lava con una disolución acuosa de NH<sub>4</sub>Cl (1x20 mL). La fase orgánica se separa, se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Posteriormente se purifica el crudo mediante cromatografía de columna con una mezcla de eluyentes (90% hexano/AcOEt). El producto final ( $\pm$ )-**15a** fue obtenido con un rendimiento global del 29% (143.3 mg).

#### **Método general para la preparación de las lactonas racémicas ( $\pm$ )-**12-17b** y ( $\pm$ )-**16c**.**

Se disuelve la correspondiente cetona ( $\pm$ )-**12-17a** (200 mg, 0.99-1.37 mmol) en 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se añade *m*-CPBA (1.5 eq.) a 0°C. La reacción se sigue mediante TLC. Una vez concluida, se lava varias veces con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (5x10 mL). La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Posteriormente se purifica el crudo mediante cromatografía de columna con una mezcla 80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/hexano. Los rendimientos obtenidos fueron desde el 5% al 60%. Se aislaron 132.0 mg de ( $\pm$ )-**12b** (60%), 122.0 mg de ( $\pm$ )-**13b** (55%), 94.6 mg de ( $\pm$ )-**14b** (43%), 21.8 mg de ( $\pm$ )-**15b** (10%) y 88.7 mg de ( $\pm$ )-**17b** (40%). La oxidación de la ( $\pm$ )-2-butil-1-indanona ( $\pm$ )-**16a** mediante esta metodología generó una mezcla de dos lactonas regioisoméricas, 41.2 mg de ( $\pm$ )-**16b** (19%) y 10.8 mg de ( $\pm$ )-**16c** (5%).

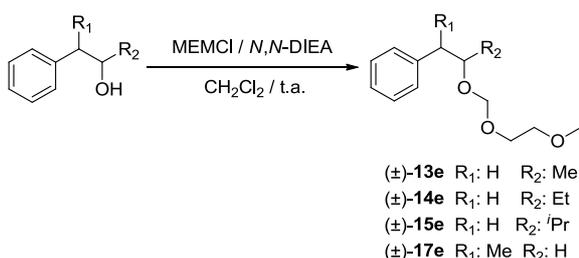
<sup>176</sup> Malosh, C. F.; Ready, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10240-10241.

### Método general para la síntesis de las lactonas racémicas (±)-13-15c y (±)-17c.

Para la preparación de las lactonas racémicas (±)-13-15c y (±)-17c se llevó a cabo una metodología de tres pasos a partir de los sustratos comerciales: 3-fenilpropan-2-ol, 1-fenilbutan-2-ol y 2-fenilpropan-1-ol, respectivamente.

Para la síntesis de (±)-15c fue necesario una etapa adicional, ya que el (±)-3-metil-1-fenilbutan-2-ol (±)-15d no es comercialmente accesible. Por lo tanto, este compuesto fue preparado mediante la reducción de 3-metil-1-fenilbutan-2-ona (1.0 g, 6.16 mmol) con borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>) (352 mg, 1.5 eq.) en MeOH seco (20.0 mL). Se aislaron 630.0 mg (62%) del producto final (±)-15d sin necesidad de una etapa de purificación.

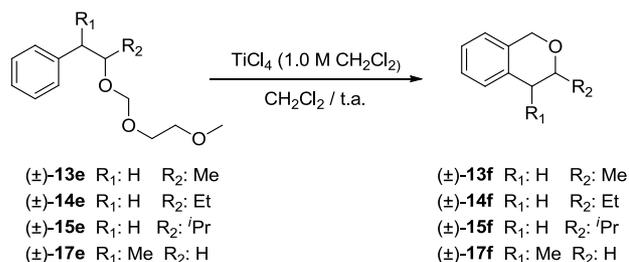
#### Paso 1:



**Figura 1.35.** Síntesis química de los alcoholes *O*-protegidos racémicos (±)-13-15e y (±)-17e.

A una mezcla del correspondiente alcohol (500 mg, 3.04-3.67 mmol) y *N,N*-diisopropiletilamina (*N,N*-DIEA) (1.5 eq.) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (6.0 mL), se le añade gota a gota, bajo atmósfera de N<sub>2</sub> y a temperatura ambiente, cloruro de metoxietoximetilo (MEMCl) (1.5 eq.). La reacción se deja agitando y se sigue por TLC. Una vez se observa la desaparición del sustrato, la mezcla de reacción se lava sucesivamente con agua (2x10 mL), una disolución 1.0 N de NaOH (2x10 mL) y agua (2x10 mL). La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Los crudos obtenidos se purificaron por cromatografía de columna empleando una mezcla de 90% hexano/AcOEt como eluyente para obtener (±)-13e (730.1 mg, 88%), (±)-14e (587.1 mg, 74%), (±)-15e (360.3 mg, 47%) y (±)-17e (696.9 mg, 84%).

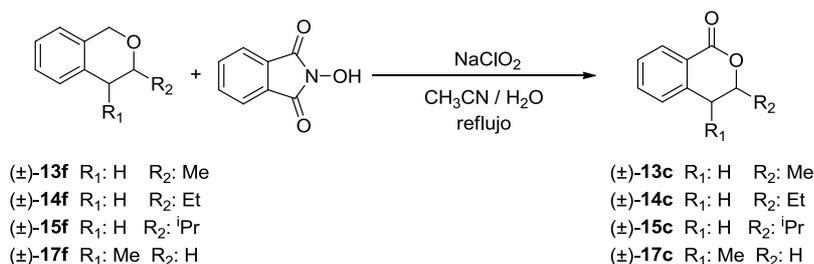
**Paso 2:**



**Figura 1.36.** Preparación de los isocromanos racémicos (±)-**13-15f** y (±)-**17f**.

A una disolución del correspondiente alcohol *O*-protegido (±)-**13-15e** o (±)-**17e** (500 mg, 1.98-2.23 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (6.0 mL) se le añade gota a gota, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, una disolución 1.0 M de tetracloruro de titanio (TiCl<sub>4</sub>) (1.05 eq.) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La reacción se agita a temperatura ambiente y se sigue por TLC. Una vez concluida, se filtra y el disolvente se evapora bajo presión reducida. Los crudos obtenidos se purificaron por cromatografía de columna empleando una mezcla de 90% hexano/AcOEt como eluyente para obtener (±)-**13f** (237.8 mg, 72%), (±)-**14f** (303.6 mg, 92%), (±)-**15f** (174.3 mg, 50%) y (±)-**17f** (175.0 mg, 53%).

**Paso 3:**



**Figura 1.37.** Preparación de las 3, 4-dihidroisocumarinas racémicas (±)-**13-15c** y (±)-**17c**.

Finalmente, a una mezcla del correspondiente isocromano racémico (±)-**13-15f** o (±)-**17f** (125 mg, 0.71-0.84 mmol) y *n*-hidroxiftalimida (0.1 eq.) en 8.0 mL of CH<sub>3</sub>CN/agua 3:1, se le añade cuidadosamente (1.5 eq.) NaClO<sub>2</sub>. La reacción se pone a reflujo y se mantiene agitando durante 18 horas. Posteriormente se deja enfriar y se vierte sobre una disolución al 10% de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (10 mL). La mezcla obtenida se extrae con Et<sub>2</sub>O (5x10 mL) y la fase orgánica se lava con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (2x15 mL). A continuación se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y el disolvente es evaporado bajo presión reducida. En la mayoría de los casos las 3,4-

dihidroisocumarinas racémicas fueron obtenidas puras, sin necesidad de una etapa de purificación posterior. Se aislaron 93.0 mg de ( $\pm$ )-**13c** (68%), 101.8 mg de ( $\pm$ )-**14c** (75%) y 41.2 mg de ( $\pm$ )-**17c** (19%). Sólo en el caso del compuesto ( $\pm$ )-**15c** se requirió una purificación por cromatografía de columna empleando una mezcla de 80% hexano/AcOEt como eluyente. Se aislaron 31.9 mg de ( $\pm$ )-**15c** (20%).

Los compuestos previamente descritos, **15a**, **17b**, **13c**, **15d**, **13e** y **13f** exhiben propiedades físicas y espectrales de acuerdo con los datos publicados. Los compuestos **12-16b**, **14-17c**, **15e**, **17e**, **14-15f** y **17f** fueron debidamente caracterizados.<sup>177</sup>

### 1.26. ASIGNACIÓN DE CONFIGURACIONES ABSOLUTAS

Las configuraciones absolutas de las cetonas benzofusionadas **12-14a**<sup>178</sup> y **17a**,<sup>179</sup> se han obtenido mediante comparación de los cromatogramas obtenidos mediante CG y HPLC con patrones ya descritos previamente en la bibliografía.<sup>180</sup> La configuración absoluta de los compuestos **15-16a** se asignó por analogía con los compuestos **13a** y **14a**, respectivamente.

### 1.27. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

#### Oxidación de las cetonas benzofusionadas racémicas ( $\pm$ )-**12-17a** catalizada por BVMOs.

Las cetonas de partida ( $\pm$ )-**12-17a** (14-28 mM) se disuelven en 0.5 mL del medio de reacción disolución tampón Tris/HCl (50 mM, pH 8.0 a 10.0) conteniendo el correspondiente cosolvente orgánico, junto con D-glucosa-6-fosfato (2.0 eq.), G6PDH (5.0 U), NADPH (0.2 mM) y 1.0 unidad de la correspondiente BVMO. La mezcla se agita a 250 rpm en un agitador orbital a diferentes tiempos y temperaturas. Se detiene la reacción extrayendo con AcOEt (2x0.5 mL), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se analiza por CG, con el fin de determinar la conversión y la selectividad de los procesos de oxidación.

---

<sup>177</sup> Las referencias de los compuestos ya descritos, así como la caracterización completa de los no descritos pueden consultarse en el Apartado 1.29.

<sup>178</sup> Poisson, T.; Dalla, V.; Marsais, F.; Dupas, G.; Oudeyer, S.; Levacher, V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7090-7093.

<sup>179</sup> Yun, J.; Buchwald, S. L. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 767-774.

<sup>180</sup> Los datos cromatográficos se encuentran recogidos en el Apartado 1.28.

**Oxidación de la cetona racémica 2-metil-1-indanona [(±)-13a] catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub> usando como medio de reacción diferentes tipos de disoluciones tampón.**

La 2-metil-1-indanona [(±)-13a] (14 mM) se disuelve en 0.5 mL del correspondiente medio de reacción disolución tampón (50 mM, pH 10.0) conteniendo un 5% de hexano, junto con D-glucosa-6-fosfato (2.0 eq.), G6PDH (5.0 U), NADPH (0.2 mM) y 1.0 unidad de PAMO<sub>M446G</sub>. La mezcla se agita a 250 rpm en un agitador orbital a 40°C durante 48 horas. Se detiene la reacción extrayendo con AcOEt (2x0.5 mL), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se analiza por CG, con el fin de determinar la conversión y el exceso enantiomérico de la lactona (*R*)-13c y la cetona remanente (*S*)-13a.

**Oxidación de la cetona racémica 2-metil-1-indanona [(±)-13a] catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub> en presencia de resinas de intercambio aniónico.**

La 2-metil-1-indanona [(±)-13a] (14 mM) se disuelve en 0.5 mL del medio de reacción disolución tampón Tris/HCl (50 mM, pH 10.0) conteniendo un 5% de hexano, junto con D-glucosa-6-fosfato (2.0 eq.), G6PDH (5.0 U), NADPH (0.2 mM), 1.0 unidad de PAMO<sub>M446G</sub> y la correspondiente resina de intercambio aniónico (5.0 eq. en masa de resina previamente lavada con agua destilada). La mezcla se agita a 250 rpm en un agitador orbital a 40°C durante 48 horas. Se detiene la reacción extrayendo con AcOEt (2x0.5 mL), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se analiza por CG, con el fin de determinar la conversión y el exceso enantiomérico de la lactona (*R*)-13c y la cetona remanente (*S*)-13a.

**Preparación enzimática de 3-alkil-3,4-dihidroisocumarinas quirales (13-16c) a escala multimiligramo catalizada por la PAMO<sub>M446G</sub>.**

Las cetonas racémicas (±)-13-16a (60 mg, 0.41-0.32 mmol) fueron disueltas en una disolución tampón Tris/HCl (50 mM, pH 10.0, 30 mL) en presencia de un 5% de hexano para la oxidación de los compuestos (±)-13a y (±)-15a. Posteriormente, se añade D-glucosa-6-fosfato (2.0 eq.), G6PDH (150.0 U), NADPH (0.2 mM) y 30.0 unidades de la PAMO<sub>M446G</sub>. La mezcla se agita a 40 °C y 250 rpm, en agitador orbital, durante 120 horas para (±)-13a, 96 horas para (±)-14a, 104 horas para (±)-15a y 144 horas para (±)-16a. La fase acuosa se extrae con AcOEt (4x15 mL). La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente a presión reducida. Los crudos fueron purificados por cromatografía de columna (90% hexano/AcOEt), obteniéndose 49.9 mg de (*R*)-13c (75%), 42.9 mg de (*R*)-14c (65%), 32.8 mg de (*S*)-15c (50%) y 47.5 mg de (*R*)-16c (73%).

**Protocolo para la obtención del extracto libre de células que contiene PAMO<sub>M446G</sub> (PAMO<sub>M446G</sub>-CFE).**

El extracto libre de células se preparó, a partir de un cultivo de *E.coli* TOP 10 que contiene el gen de la PAMO<sub>M446G</sub> (PAMO<sub>M446G</sub><sup>+</sup>), siguiendo una metodología similar a la descrita por Torres Pazmiño *et al.*<sup>181</sup> Se inicia el precultivo inoculando *E. coli* TOP 10 PAMO<sub>M446G</sub><sup>+</sup> en 5 mL de medio LB (Lysogeny Broth) que contiene 50 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina. Se incuba a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente el precultivo se diluye en 500 mL de TB (Terrific Broth) con 50 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina y 0.02 % (p/v) de L-arabinosa. Se incuba a 200 rpm y 28°C durante 24 horas hasta que haya una OD<sub>600</sub> aproximada de 7. Las células se separan por centrifugación (6000 rpm durante 10 minutos, 4°C, en una centrífuga Centrikon T-124, con rotor A614), se lavan y se resuspenden en 10 mL de Tris/HCl (50 mM) de pH 9. A la suspensión de células se le añade FAD, de modo que tengamos una concentración final de 100 µM, y se somete a ultrasonidos (en un sonicador Digital Branson, 70% amplitud, 5 min, 2 seg on/off, 4°C). Los agregados proteicos y restos celulares se eliminan por centrifugación (10.000 rpm durante 30 min, 4°C, en una centrífuga Beckman coulter/Allegra 64R con rotor Co650), obteniendo un sobrenadante sin células, lo que denominamos PAMO<sub>M446G</sub>-CFE. Éste se almacena a -20°C hasta su uso.

**Preparación enzimática de la lactona quiral 3-metil-3,4-dihidroisocumarina [(R)-13c] a escala de 250 mg mediante el extracto libre de células que contiene PAMO<sub>M446G</sub>.**

La 2-metil-1-indanona [(±)-13a] (250 mg, 1.71 mmol) se disuelve en una disolución tampón Tris/HCl (50 mM, pH 10.0, 40 mL), junto con D-glucosa-6-fosfato (2.0 eq.), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (1250 unidades), NADPH (0.2 mM) y el extracto libre de células que contiene PAMO<sub>M446G</sub> (46 mL). La mezcla se agita a 250 rpm en un agitador orbital a 40°C y la reacción se sigue mediante CG. Después de 48 horas, se detiene la reacción extrayendo con AcOEt (5x30 mL), la fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo fue purificado por cromatografía de columna (90% hexano/AcOEt), obteniéndose 221.1 mg de (R)-13c (80%).

---

<sup>181</sup> Torres-Pazmiño, D. E.; Snajdrova, R.; Baas, B.-J.; Ghobrial, M.; Mihovilovic, M. D.; Fraaije, M. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2275-2278.

### 1.28. DETERMINACIÓN DE LAS CONVERSIONES Y EXCESOS ENANTIOMÉRICOS

La determinación de los valores de conversión y excesos enantioméricos de la mayoría de los compuestos se ha llevado a cabo mediante cromatografía de gases (Tabla 1.13). Para ello se ha empleado un cromatógrafo Hewlett Packard 6890 Series II equipado con la columna Restek Rt $\beta$ -DEXse (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m, 1 bar N<sub>2</sub>).

**Tabla 1.13.** Determinación de conversiones y/o excesos enantioméricos mediante CG.

Compuesto	Programa <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> (min)	R <sub>s</sub> <sup>182</sup>
(±)- <b>12a</b>	70/5/3/190/0	37.5 (R); 37.8 (S)	2.2
(±)- <b>12b</b>	70/5/3/200/0	40.9 (R); 41.8 (S)	8.0
(±)- <b>13a</b>	70/5/1/130/0	62.2 (S); 64.4 (R)	5.8
(±)- <b>13b</b>	70/5/1/150/0	79.8 (R); 80.8 (S)	2.5
(±)- <b>13c</b>	70/5/1/160/0	91.4 (S); 91.8 (R)	1.2
(±)- <b>14a</b>	70/5/1/150/0	71.4 (S); 71.9 (R)	1.5
(±)- <b>14c</b>	70/5/1/170/0	100.2	--
(±)- <b>15a</b>	70/5/3/200/5	34.3	--
(±)- <b>15c</b>	70/5/3/200/5	44.6	--
(±)- <b>16a</b>	70/5/3/200/10	43.1	--
(±)- <b>16c</b>	70/5/3/200/10	55.0	--
(±)- <b>17a</b>	70/5/1/170/0	68.0 (S); 70.9 (R)	8.1
(±)- <b>17b</b>	70/5/1/170/0	86.4 (S); 87.2 (R)	2.4
(±)- <b>17c</b>	70/5/1/170/0	86.4 (S); 87.2 (R)	2.3

<sup>a</sup> Programa: T<sub>inicial</sub> (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/ min)/ T<sub>final</sub> (°C)/ tiempo (min).  
t<sub>R</sub>: tiempo de retención.

La determinación de los valores de los excesos enantioméricos de los compuestos **14c**, **15a**, **15c**, **16a** y **16c** se ha llevado a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia empleando un cromatógrafo Hewlett Packard 1100 LC equipado con una columna **A**: Chiralcel OB-H (Daicel, 0.46 cm x 25 cm) o **B**: Chiralcel OJ-H (Daicel, 0.45 cm x 25 cm).

<sup>182</sup> El factor de resolución se calcula mediante la fórmula:  $R_s = 2(t_2 - t_1)/(w_1 + w_2)$ , siendo  $t$  el tiempo de retención de cada enantiómero y  $w$  la anchura del pico.

**Tabla 1.14.** Determinación de excesos enantioméricos mediante HPLC.

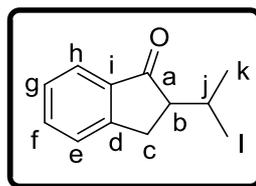
Compuesto	Condiciones <sup>a</sup>	Columna	t <sub>R</sub> (min)	R <sub>s</sub> <sup>182</sup>
(±)- <b>14c</b>	H/IPA 90:10, 0.7, 30°C	<b>A</b>	24.3 ( <i>S</i> ); 30.2 ( <i>R</i> )	6.9
(±)- <b>15a</b>	H/IPA 98:2, 0.8, 30°C	<b>B</b>	6.8 ( <i>R</i> ); 7.5 ( <i>S</i> )	3.8
(±)- <b>15c</b>	H/IPA 98:2, 0.8, 30°C	<b>B</b>	13.9 ( <i>S</i> ); 14.9 ( <i>R</i> )	3.9
(±)- <b>16a</b>	H/IPA 99:1, 1.0, 30°C	<b>B</b>	5.7 ( <i>S</i> ); 6.4 ( <i>R</i> )	4.8
(±)- <b>16c</b>	H/IPA 99:1, 1.0, 30°C	<b>B</b>	14.2 ( <i>R</i> ); 16.6 ( <i>S</i> )	8.2

<sup>a</sup> Condiciones: H/IPA= Hexano/2-propanol, proporción de eluyente, flujo (mL min<sup>-1</sup>), T(°C).  
t<sub>R</sub>: tiempo de retención.

### 1.29. DATOS EXPERIMENTALES

En este apartado se encuentra la caracterización de todos aquellos compuestos utilizados en el Capítulo 1 (Sección 2) de la Memoria que no han sido adquiridos comercialmente. Los criterios de caracterización son los mismos que los utilizados en el Capítulo 1 (Sección 1). En cuanto a las rotaciones específicas [ $\alpha$ ] se han incluido las de aquellos compuestos que no estaban descritas.

(±)-2-Isopropil-1-indanona, (±)-15a<sup>176</sup>



Aceite amarillo

**Rendimiento:** 29%

**Fórmula empírica:** C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O

**Peso Molecular:** 174.3 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.39

**IR** (KBr): 3015, 2960, 1712, 1608, 1465, 1385, 1370 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 0.78 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.8 Hz, 3H<sub>k</sub>), 1.05 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.8 Hz, 3H<sub>l</sub>), 2.36-2.47(m, 1H<sub>j</sub>), 2.64-2.70 (m, 1H<sub>b</sub>), 2.94 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 17.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 3.9 Hz, 1H<sub>c</sub>), 3.14 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 17.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.1 Hz, 1H<sub>c</sub>), 7.35 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.7 Hz, 1H<sub>g</sub>), 7.46 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.7 Hz, 1H<sub>e</sub>), 7.56 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.7 Hz, 1H<sub>f</sub>), 7.74 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.7 Hz, 1H<sub>h</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): 17.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>k</sub>), 20.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>l</sub>), 28.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 28.9 (CH, C<sub>j</sub>), 53.0 (CH, C<sub>b</sub>), 123.6 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 126.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 127.1 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 134.5 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 137.5 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 154.2 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 208.9 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 197 [(M+Na)<sup>+</sup>, 56%]

Capítulo 1

---

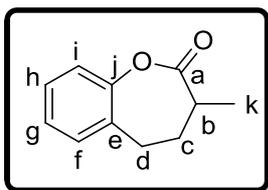
---

---

(±)-3-Metil-4,5-dihidrobenczo[b]oxepin-2(3H)-ona, (±)-12b

---

---



Aceite amarillo

**Rendimiento:** 60%

**Fórmula empírica:** C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 176.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.59

**IR** (KBr): 3040, 2976, 1765, 1608, 1487, 1389 cm<sup>-1</sup>

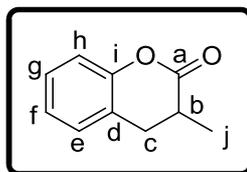
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.16 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.3 Hz, 3H<sub>k</sub>), 1.92-1.98 (m, 1H<sub>c</sub>), 2.12-2.17 (m, 1H<sub>e</sub>), 2.58-2.60 (m, 2H<sub>d</sub>), 2.92-3.04 (m, 1H<sub>b</sub>), 7.06-7.35 (m, 4H<sub>f,g,h,i</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 16.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>k</sub>), 28.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 35.1 (CH, C<sub>b</sub>), 36.0 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 119.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 125.7 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 128.1 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 129.3 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 130.5 (C<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 151.3 (C<sub>ar</sub>, C<sub>j</sub>), 174.3 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 176 (M<sup>+</sup>, 100%), 161 (31), 133 (39), 107 (76), 91 (26)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>NaO<sub>2</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 199.0730; encontrada: 199.0722

**(±)-3-Metil-3,4-dihidrocumarina, (±)-13b**



Aceite amarillo claro

**Rendimiento:** 55%

**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 162.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.49

**IR** (KBr): 3056, 2978, 1765, 1489, 1389 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.37 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.5 Hz, 3H<sub>j</sub>), 2.61-2.83 (m, 2H<sub>b,c</sub>), 2.85-3.06 (m, 1H<sub>c</sub>), 6.98-7.10 (m, 2H<sub>f,h</sub>), 7.12-7.28 (m, 2H<sub>e,g</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 15.3 (CH<sub>3</sub>, C<sub>j</sub>), 31.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 34.2 (CH, C<sub>b</sub>), 116.5 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 122.8 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 124.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 127.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 128.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 151.8 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 171.5 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 162 (M<sup>+</sup>, 100%), 134 (64), 119 (69), 91 (51)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>NaO<sub>2</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 185.0573; encontrada: 185.0569

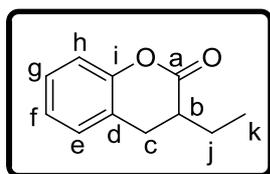
---

---

(±)-3-Etil-3,4-dihidrocumarina, (±)-14b

---

---



Aceite amarillo claro

**Rendimiento:** 43%

**Fórmula empírica:** C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 176.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.54

**IR** (KBr): 3044, 2968, 1767, 1489, 1383 cm<sup>-1</sup>

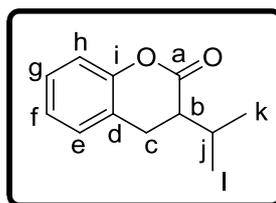
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.06 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.5 Hz, 3H<sub>k</sub>), 1.58-1.68 (m, 1H<sub>j</sub>), 1.92-2.01 (m, 1H<sub>j</sub>), 2.60-2.66 (m, 1H<sub>b</sub>), 2.79-2.87 (m, 1H<sub>c</sub>), 3.05 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 15.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.7 Hz, 1H<sub>c</sub>), 7.03-7.13 (m, 2H<sub>f,h</sub>), 7.18-7.32 (m, 2H<sub>e,g</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 11.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>k</sub>), 22.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>j</sub>), 28.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 40.4 (CH, C<sub>b</sub>), 116.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 122.5 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 124.1 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 128.1 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>e,g</sub>), 151.5 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 170.8 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 176 (M<sup>+</sup>, 83%), 148 (28), 133 (100), 119 (49), 91 (38)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 177.0914; encontrada: 177.0910

**(±)-3-Isopropil-3,4-dihidrocumarina, (±)-15b**



Aceite amarillo

**Rendimiento:** 15%

**Fórmula empírica:** C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 190.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.71

**IR** (KBr): 3043, 2965, 1768, 1489, 1459 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.01 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.8 Hz, 3H<sub>k</sub>), 1.06 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.9 Hz, 3H<sub>l</sub>), 2.16-2.26 (m, 1H<sub>j</sub>), 2.50-2.57 (m, 1H<sub>b</sub>), 2.85-3.01 (m, 2H<sub>c</sub>), 7.01-7.10 (m, 2H<sub>h,f</sub>), 7.18-7.29 (m, 2H<sub>g,e</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 18.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>k</sub>), 20.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>l</sub>), 25.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 26.9 (CH, C<sub>j</sub>), 45.4 (CH, C<sub>b</sub>), 116.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 122.7 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 124.1 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 128.1 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>g,e</sub>), 151.5 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 170.2 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, m/z): 190 (M<sup>+</sup>, 75%), 175 (18), 147 (86), 107 (100) 91 (40), 77 (28)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>NaO<sub>2</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 213.0882; encontrada: 213.0886

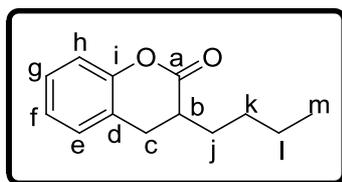
---

---

(±)-3-Butil-3,4-dihidrocumarina, (±)-16b

---

---



Sólido amarillo claro

**Rendimiento:** 19%

**Fórmula empírica:** C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 204.3 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.57

**P<sub>f</sub>**: 30.1-31.7°C

**IR** (KBr): 3045, 2957, 1769, 1489, 1380 cm<sup>-1</sup>

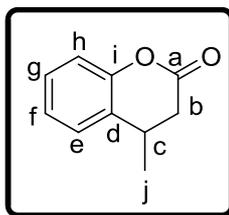
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 0.92 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.1 Hz, 3H<sub>m</sub>), 1.25-1.63 (m, 5H<sub>j,k,l</sub>), 1.87-1.99 (m, 1H<sub>i</sub>), 2.64-2.84 (m, 2H<sub>b,c</sub>), 3.03 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 15.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.7 Hz, 1H<sub>c</sub>), 7.01-7.15 (m, 2H<sub>f,g</sub>), 7.20-7.30 (m, 2H<sub>e,h</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 13.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>m</sub>), 22.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>l</sub>), 28.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>k</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>j</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 39.0 (CH, C<sub>b</sub>), 116.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 122.5 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 124.1 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 128.0 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>e,g</sub>), 151.5 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 170.9 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 204 (M<sup>+</sup>, 60%), 148 (69), 133 (97), 107 (100), 77 (28)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>NaO<sub>2</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 227.1031; encontrada: 227.1043

(±)-4-Metil-3,4-dihidrocumarina, (±)-17b<sup>183</sup>



Aceite amarillo

**Rendimiento:** 40%

**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 162.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.50

**IR** (KBr): 3043, 2968, 1771, 1489, 1380 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.36 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 3H<sub>j</sub>), 2.60 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 15.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.6 Hz, 1H<sub>b</sub>), 2.89 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 15.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.5 Hz, 1H<sub>b</sub>), 3.17-3.24 (m, 1H<sub>c</sub>), 7.06-7.46 (m, 4H<sub>e,f,g,h</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 19.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>j</sub>), 29.4 (CH, C<sub>c</sub>), 36.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 116.8 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 125.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 126.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 127.8 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 128.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 151.2 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 168.2 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, m/z): 162 (M<sup>+</sup>, 100%), 147 (75), 120 (44), 91 (63)

<sup>183</sup> Matsuda, T.; Shigeno, S.; Murakami, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 12086-12087.

## Capítulo 1

---

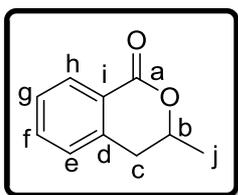
---

---

### (±)-3-Metil-3,4-dihidroisocumarina, (±)-13c<sup>184</sup>

---

---



Aceite blanco

**Rendimiento:** 68%

**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 162.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.18

**IR** (KBr): 3055, 2986, 1724, 1462, 1266

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz): δ 1.67 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.3 Hz, 3H<sub>j</sub>), 3.08-3.26 (m, 2H<sub>c</sub>), 4.83-4.94 (m, 1H<sub>b</sub>), 7.53 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.8 Hz, 1H<sub>h</sub>), 7.60 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.6 Hz, 1H<sub>f</sub>), 7.76 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.6 Hz, 1H<sub>g</sub>), 8.18 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.7 Hz, 1H<sub>e</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz): δ 21.3 (CH<sub>3</sub>, C<sub>j</sub>), 35.8 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 77.3 (CH, C<sub>b</sub>), 126.2 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 128.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 129.1 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 131.1 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 135.5 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 141.1 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 168.1 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 162 (M<sup>+</sup>, 26%), 118 (100), 90 (75)

---

---

### (R)-3-Metil-3,4-dihidroisocumarina, (R)-13c

---

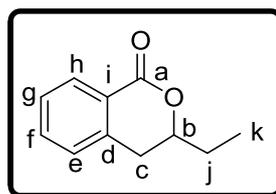
---

**Rendimiento:** 75%

**(R)-13c:** [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -87.5 (c 1.41, CHCl<sub>3</sub>), *ee* 85%. Descrito [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +90.2 (c 0.55, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para (S)-13c en la bibliografía.<sup>185</sup>

<sup>184</sup> Shinkaruk, S.; Bennetau, B.; Babin, P.; Schmitter, J.-M.; Lamothe, V.; Bennetau-Pelissero, C.; Urdaci, M. C. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9383-9391.

(±)-3-Etil-3,4-dihidroisocumarina, (±)-14c



Aceite blanco

**Rendimiento:** 75%

**Fórmula empírica:** C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 176.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.57

**IR** (KBr): 3065, 2963, 1767, 1463, 1371 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.09 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.3 Hz, 3H<sub>k</sub>), 1.26-1.95 (m, 2H<sub>j</sub>), 2.88-3.02 (m, 2H<sub>c</sub>), 4.41-4.50 (m, 1H<sub>b</sub>), 7.25 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.6 Hz, 1H<sub>e</sub>), 7.38 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.6 Hz, 1H<sub>g</sub>), 7.51 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.6 Hz, 1H<sub>f</sub>), 8.07 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.8 Hz, 1H<sub>h</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 9.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>k</sub>), 27.8 (CH<sub>2</sub>, C<sub>j</sub>), 32.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 79.8 (CH, C<sub>b</sub>), 125.0 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 127.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 127.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 129.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 133.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 139.9 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 165.5 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 176 (M<sup>+</sup>, 26%), 118 (100), 133 (100), 90 (61)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>NaO<sub>2</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 199.0730; encontrada: 199.0735

(R)-3-Etil-3,4-dihidroisocumarina, (R)-14c

**Rendimiento:** 65% (R)-14c: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -67.2 (c 0.90, CHCl<sub>3</sub>), *ee* 91%.

<sup>185</sup> Kerti, G.; Kurtán, T.; Illyés, T.-Z.; Kövér, K. E.; Sólyom, S.; Pescitelli, G.; Fujioka, N.; Berova, N.; Antus, S. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 296-305.

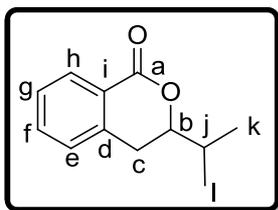
---

---

(±)-3-Isopropil-3,4-dihidroisocumarina, (±)-15c

---

---



Aceite amarillo

**Rendimiento:** 20%

**Fórmula empírica:** C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 190.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.42

**IR** (KBr): 3033, 2965, 1760, 1580, 1465, 1385 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.09 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.9 Hz, 3H<sub>k</sub>), 1.11 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.9 Hz, 3H<sub>l</sub>), 2.00-2.11 (m, 1H<sub>j</sub>), 2.85 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 16.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 3.0 Hz, 1H<sub>c</sub>), 3.01 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 16.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 11.8 Hz, 1H<sub>c</sub>), 4.24-4.31 (m, 1H<sub>b</sub>), 7.36 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.6 Hz, 1H<sub>e</sub>), 7.50 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.4 Hz, 1H<sub>g</sub>), 7.55 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.4 Hz, 1H<sub>f</sub>), 8.09 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.7 Hz, 1H<sub>h</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 18.2 (2CH<sub>3</sub>, C<sub>k,l</sub>), 30.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 32.7 (CH, C<sub>j</sub>), 83.5 (CH, C<sub>b</sub>), 125.0 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 127.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 127.3 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 129.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 133.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 139.9 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 165.5 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 213 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>NaO<sub>2</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 213.0866; encontrada: 213.0882

---

---

(S)-3-Isopropil-3,4-dihidroisocumarina, (S)-15c

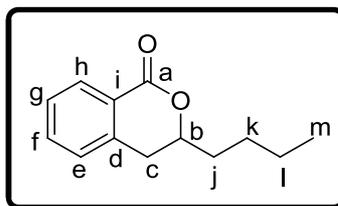
---

---

**Rendimiento:** 50%

(S)-15c: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -58.2 (*c* 1.15, CHCl<sub>3</sub>), *ee* ≥99%.

**(±)-3-Butil-3,4-dihidroisocumarina, (±)-16c**



Aceite amarillo claro

**Rendimiento:** 5%

**Fórmula empírica:** C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 204.3 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.31

**IR** (KBr): 3071, 2970, 1725, 1466, 1383 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 0.93 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.1 Hz, 3H<sub>m</sub>), 1.35-1.61 (m, 4H<sub>k,l</sub>), 1.67-1.77 (m, 1H<sub>j</sub>), 1.83-1.89 (m, 1H<sub>j</sub>), 2.89-3.03 (m, 2H<sub>c</sub>), 4.48-4.56 (m, 1H<sub>b</sub>), 7.23 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.6 Hz, 1H<sub>e</sub>), 7.38 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.6 Hz, 1H<sub>g</sub>), 7.52 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.6 Hz, 1H<sub>f</sub>), 8.09 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.6 Hz, 1H<sub>h</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 13.9 (CH<sub>3</sub>, C<sub>m</sub>), 22.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>i</sub>), 26.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>k</sub>), 33.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>j</sub>), 34.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 78.7 (CH, C<sub>b</sub>), 126.2 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 127.3 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 127.6 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 130.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 133.6 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 139.1 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 165.2 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 204 (M<sup>+</sup>, 60%), 148 (69), 133 (97), 107 (100), 77 (28)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>NaO<sub>2</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 227.1043; encontrada: 227.1036

**(R)-3-Butil-3,4-dihidroisocumarina, (R)-16c**

**Rendimiento:** 73%

**(R)-16c:** [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -37.8 (c 0.74, CHCl<sub>3</sub>), *ee* 92%.

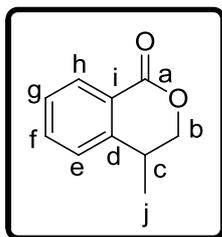
---

---

(±)-4-Metil-3,4-dihidroisocumarina, (±)-17c

---

---



Aceite amarillo

**Rendimiento:** 19%

**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 162.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.31

**IR** (KBr): 3072, 2968, 1730, 1606, 1465, 1379 cm<sup>-1</sup>

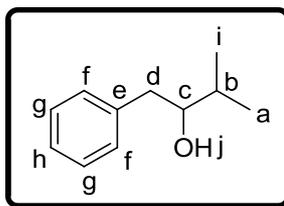
**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz): δ 1.53 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.0 Hz, 3H<sub>j</sub>), 3.32-3.40 (m, 1H<sub>c</sub>), 4.44 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 9.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.1 Hz, 1H<sub>b</sub>), 4.73 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 9.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.2 Hz, 1H<sub>b</sub>), 7.56-7.64 (m, 2H<sub>g,h</sub>), 7.67-7.79 (m, 1H<sub>f</sub>), 8.12-8.24 (m, 1H<sub>e</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz): δ 17.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>j</sub>), 33.2 (CH, C<sub>c</sub>), 74.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 125.5 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 127.6 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 128.8 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 131.3 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 135.7 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 149.6 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 167.7 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 162 (M<sup>+</sup>, 56%), 132 (100), 104 (72), 91 (11)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>NaO<sub>2</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 185.0573; encontrada: 185.0578

(±)-3-Metil-1-fenilbutan-2-ol, (±)-15d<sup>186</sup>



Aceite amarillo

**Rendimiento:** 62%

**Fórmula empírica:** C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>O

**Peso Molecular:** 164.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.39

**IR** (KBr): 3427, 3028, 2960, 1495, 1385, 1176 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.02 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.8 Hz, 6H<sub>a,i</sub>), 1.73-1.80 (m, 2H<sub>j,b</sub>), 2.61 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 13.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 9.4 Hz, 1H<sub>d</sub>), 2.74 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 13.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.3 Hz, 1H<sub>d</sub>), 3.57-3.63 (m, 1H<sub>c</sub>), 7.23-7.36 (m, 5H<sub>f,g,h</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 17.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 18.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>i</sub>) 33.0 (CH, C<sub>b</sub>), 40.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 77.4 (CH, C<sub>c</sub>), 126.3 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 128.5 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 129.3 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 139.1 (C<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, m/z): 164 (M<sup>+</sup>, 4%), 121 (16), 103 (22), 92 (100), 77 (14)

<sup>186</sup> Guijarro, D.; Mancheno, B.; Yus, M. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 4593-4600.

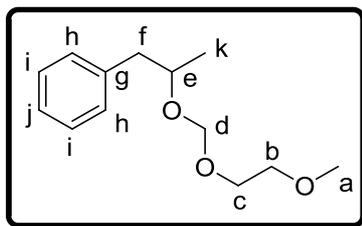
---

---

(±)-[2-[(2-Metoxietoxi)metoxi]propil]benceno, (±)-13e<sup>187</sup>

---

---



Aceite incoloro

**Rendimiento:** 88%

**Fórmula empírica:** C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>

**Peso Molecular:** 224.3 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.32

**IR** (KBr): 3028, 2969, 1496, 1377 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz): δ 1.28 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.3 Hz, 3H<sub>k</sub>), 2.81 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 13.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.7 Hz, 1H<sub>f</sub>), 2.94 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 13.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.7 Hz, 1H<sub>f</sub>), 3.45 (s, 3H<sub>a</sub>), 3.51-3.64 (m, 4H<sub>b,c</sub>), 4.02-4.13 (m, 1H<sub>e</sub>), 4.68 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 7.1 Hz, 1H<sub>d</sub>), 4.81 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 7.1 Hz, 1H<sub>d</sub>), 7.29-7.41 (m, 5H<sub>h,i,j</sub>)

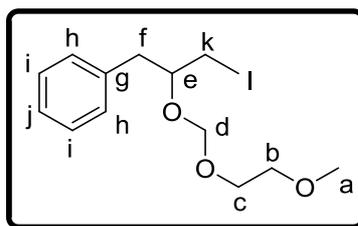
**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz): δ 20.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>k</sub>), 45.0 (CH<sub>2</sub>, C<sub>f</sub>), 59.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 68.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 73.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 75.9 (CH, C<sub>e</sub>), 95.0 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 127.7 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>j</sub>), 129.7 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 131.1 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 140.9 (C<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 225 [(M+H)<sup>+</sup>, 100%]

---

<sup>187</sup> Mohler, D. L.; Thompson, D. W. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 2567-2570.

(±)-[2-[(2-Metoxietoxi)metoxi]butil]benceno, (±)-14e



Aceite incoloro

**Rendimiento:** 74%

**Fórmula empírica:** C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>

**Peso Molecular:** 238.3 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.32

**IR** (KBr): 3028, 2963, 1495, 1372 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz): 1.01 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, 3H<sub>l</sub>), 1.56-1.63 (m, 2H<sub>k</sub>), 2.83-2.86 (m, 2H<sub>f</sub>), 3.43 (s, 3H<sub>a</sub>), 3.47-3.52 (m, 2H<sub>c</sub>), 3.55-3.63 (m, 2H<sub>b</sub>), 3.77-3.84 (m, 1H<sub>e</sub>), 4.62 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 1H<sub>d</sub>), 4.72 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 7.1 Hz, 1H<sub>d</sub>), 7.33-7.46 (m, 5H<sub>h,i,j</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz): δ 10.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>l</sub>), 28.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>k</sub>), 41.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>i</sub>), 59.3 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 68.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 73.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 81.1 (CH, C<sub>e</sub>), 95.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 127.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>j</sub>), 129.5 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>) 130.9 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 140.8 (C<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, m/z): 261 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>NaO<sub>3</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 261.1461; encontrada: 261.1456

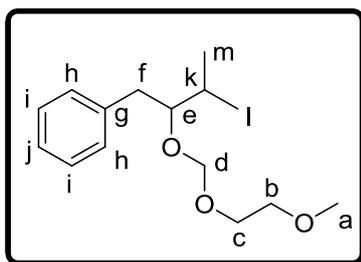
---

---

(±)-1-[2-[(2-Metoxietoxi)metoxi]-3-metilbutil]benceno, (±)-15e

---

---



Aceite incoloro

**Rendimiento:** 47%

**Fórmula empírica:** C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>

**Peso Molecular:** 252.3 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.37

**IR** (KBr): 3028, 2963, 1495, 1386, 1366 cm<sup>-1</sup>

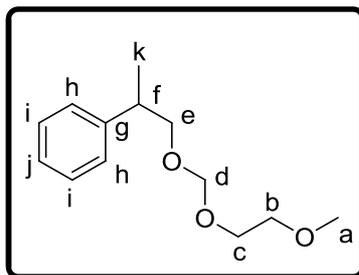
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 0.93 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.3 Hz, 3H<sub>m</sub>), 0.99 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.3 Hz, 3H<sub>l</sub>), 1.80-1.91 (m, 1H<sub>k</sub>), 2.67-2.88 (m, 2H<sub>f</sub>), 3.23-3.32 (m, 6H<sub>c,a,e</sub>), 3.49-3.55 (m, 1H<sub>b</sub>), 3.65-3.70 (m, 1H<sub>b</sub>), 4.49 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 1H<sub>d</sub>), 4.65 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 1H<sub>d</sub>), 7.16-7.30 (m, 5H<sub>h,i,j</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 17.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>l</sub>), 18.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>m</sub>), 30.5 (CH, C<sub>k</sub>), 37.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>f</sub>), 58.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 66.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 71.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 83.0 (CH, C<sub>e</sub>), 95.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 125.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>j</sub>), 128.1 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 129.4 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 139.6 (C<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, m/z): 253 [(M+H)<sup>+</sup>, 42%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>NaO<sub>3</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 275.1618; encontrada: 275.1613

(±)-[1-(2-Metoxietoxi)metoxi]propan-2-il]benceno, (±)-17e



Aceite incoloro

**Rendimiento:** 84%

**Fórmula empírica:** C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>

**Peso Molecular:** 224.3 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.29

**IR** (KBr): 3029, 2961, 1495, 1386 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz): δ 1.43 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.7 Hz, 3H<sub>k</sub>), 3.12-3.24 (m, 1H<sub>i</sub>), 3.51 (m, 3H<sub>a</sub>), 3.61-3.86 (m, 6H<sub>b,c,e</sub>), 4.79 (s, 2H<sub>d</sub>), 7.33-7.46 (m, 5H<sub>h,i,j</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz): δ 19.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>k</sub>), 41.6 (CH, C<sub>i</sub>), 59.3 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 68.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 73.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>e</sub>), 74.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 96.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 127.6 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>j</sub>), 128.7 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 129.6 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 146.1 (C<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, m/z): 247 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>NaO<sub>3</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 247.1305; encontrada: 247.1295

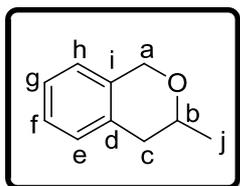
---

---

(±)-3-Metilisocromano, (±)-13f<sup>187</sup>

---

---



Aceite amarillo claro

**Rendimiento:** 72%

**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O

**Peso Molecular:** 148.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.56

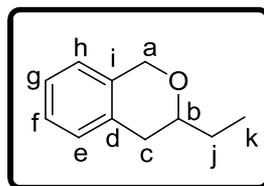
**IR** (KBr): 3065, 2971, 1585, 1499, 1384 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz): δ 1.60 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.1 Hz, 3H<sub>j</sub>), 2.87-3.06 (m, 2H<sub>c</sub>), 4.05-4.15 (m, 1H<sub>b</sub>), 5.07 (s, 2H<sub>a</sub>), 7.26-7.43 (m, 4H<sub>e,f,g,h</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz): δ 22.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>j</sub>), 37.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 69.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>a</sub>), 72.9 (CH, C<sub>b</sub>), 125.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 127.3 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 127.8 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 130.0 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 134.8 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 135.9 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, m/z): 148 (M<sup>+</sup>, 17%), 104 (100), 91 (7)

(±)-3-Etilisocromano, (±)-14f



Aceite incoloro

**Rendimiento:** 92%

**Fórmula empírica:** C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O

**Peso Molecular:** 162.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.57

**IR** (KBr): 3065, 2963, 1496, 1456, 1371 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.14 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, 3H<sub>k</sub>), 1.66-1.86 (m, 2H<sub>j</sub>), 2.79 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 2H<sub>c</sub>), 3.60-3.69 (m, 1H<sub>b</sub>), 4.86 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 15.2 Hz, 1H<sub>a</sub>), 4.95 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 15.2 Hz, 1H<sub>a</sub>), 7.05-7.10 (m, 1H<sub>f</sub>), 7.19-7.31 (m, 3H<sub>e,g,h</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 9.7 (CH<sub>3</sub>, C<sub>k</sub>), 28.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>j</sub>), 33.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 68.0 (CH<sub>2</sub>, C<sub>a</sub>), 76.0 (CH, C<sub>b</sub>), 123.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 125.6 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 126.1 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 128.6 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 133.3 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 134.8 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 162 (M<sup>+</sup>, 17%), 104 (100), 91 (10)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O (M)<sup>+</sup>: 162.1045; encontrada: 162.1039

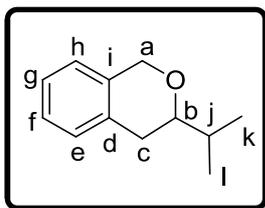
---

---

(±)-3-Isopropilisocromano, (±)-15f

---

---



Aceite amarillo claro

**Rendimiento:** 50%

**Fórmula empírica:** C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O

**Peso Molecular:** 176.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.43

**IR** (KBr): 3024, 2961, 1465, 1386, 1368 cm<sup>-1</sup>

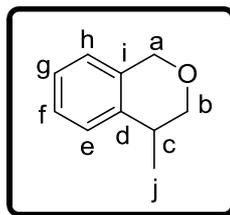
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.05 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.8 Hz, 6H<sub>k,l</sub>), 1.81-1.87 (m, 1H<sub>j</sub>), 2.77 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 14.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 9.9 Hz, 1H<sub>c</sub>), 2.96 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 14.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 2.8 Hz, 1H<sub>c</sub>), 3.61-3.67 (m, 1H<sub>b</sub>), 4.62 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 11.4 Hz, 1H<sub>a</sub>), 4.77 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 11.4 Hz, 1H<sub>a</sub>), 7.24-7.39 (m, 4H<sub>e,f,g,h</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 17.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>k</sub>), 18.7 (CH<sub>3</sub>, C<sub>l</sub>) 33.8 (CH, C<sub>j</sub>), 36.8 (CH<sub>2</sub> C<sub>c</sub>), 44.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>a</sub>), 77.2 (CH, C<sub>b</sub>), 126.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 128.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>) 130.5 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 130.7 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 136.1 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 138.4 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 176 (M<sup>+</sup>, 25%), 91 (85)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O (M)<sup>+</sup>: 176.1201; encontrada: 176.1198

(±)-4-Metilisocromano, (±)-17f



Aceite amarillo claro

**Rendimiento:** 53%

**Fórmula empírica:** C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O

**Peso Molecular:** 148.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Hexano): 0.52

**IR** (KBr): 3021, 2960, 1584, 1492, 1386 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz): δ 1.37 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 3H<sub>i</sub>), 2.93-3.06 (m, 1H<sub>c</sub>), 3.74 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 12.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.0 Hz, 1H<sub>b</sub>), 4.08 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 12.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.4 Hz, 1H<sub>b</sub>), 5.54 (s, 2H<sub>a</sub>), 7.11 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.8 Hz, 1H<sub>e</sub>), 7.13-7.38 (m, 3H<sub>f,g,h</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz): δ 20.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>j</sub>), 33.4 (CH, C<sub>c</sub>), 69.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 72.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>a</sub>), 125.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 127.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 127.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 129.0 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 135.5 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 140.0 (C<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 148 (M<sup>+</sup>, 30%), 118 (100), 105 (21), 91 (20), 77 (11)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O (M)<sup>+</sup>: 148.0888; encontrada: 148.0874



## **CAPÍTULO 2**

***Síntesis biocatalítica  
simultánea de  
compuestos ópticamente  
activos a través de  
transformaciones  
cinéticas asimétricas  
interconectadas.  
Metodología PIKAT***



## 2.1. CATÁLISIS CONCURRENTES

En las últimas décadas, se ha producido un gran avance dentro del campo de la química y de la biología. Gran parte de este desarrollo se ha generado gracias al esfuerzo de los investigadores por entender los principios básicos que rigen los procesos bioquímicos naturales e intentar mimetizarlos. De esta forma, la Naturaleza, el sistema conocido hasta la fecha más evolucionado y eficiente, ha sido la fuente de inspiración para numerosos científicos. En los procesos naturales, la optimización de la energía y de los recursos es una de las mayores premisas.<sup>188</sup> Así, los organismos vivos han optimizado sus maquinarias metabólicas utilizando varios catalizadores de forma selectiva y simultánea, formando redes complejas y efectivas. En estas rutas, los catalizadores están regulados de tal forma que el producto de una reacción es el sustrato de la siguiente.<sup>189</sup>

---

<sup>188</sup> *Biology*. Eds. Curtis, H.; Barnes, N. S. W. H. Freeman & Co., New York **1989**.

<sup>189</sup> *Lehninger Principles of Biochemistry*. Eds. Nelson, D. L.; Cox, M. M. W. H. Freeman & Co., Nueva York **2004**.

## Capítulo 2

---

Numerosos químicos orgánicos han volcado sus esfuerzos en el desarrollo de nuevas estrategias sintéticas de compuestos quirales mimetizando estas rutas biocatalíticas. De esta forma, si se logra que varios catalizadores trabajen de manera simultánea, se disminuyen las pérdidas de rendimiento y tiempo comúnmente asociadas al aislamiento de los productos intermediarios, hechos que se traducen en una disminución de los costes globales. Así, nace el interés por la catálisis concurrente de tipo *tándem* (CTC, del inglés “*concurrent tandem catalysis*”), la cual se define como aquella en la que existe una acción cooperativa de dos o más ciclos catalíticos en un único reactor. En estos casos, cada uno de los catalizadores debe ser compatible con los sustratos, intermedios y demás catalizadores presentes, y además debe comportarse de manera selectiva en la secuencia de reacciones.<sup>190</sup> Dentro de este tipo de procesos, podemos diferenciar dos estrategias diferentes (Figura 2.1):<sup>191</sup>

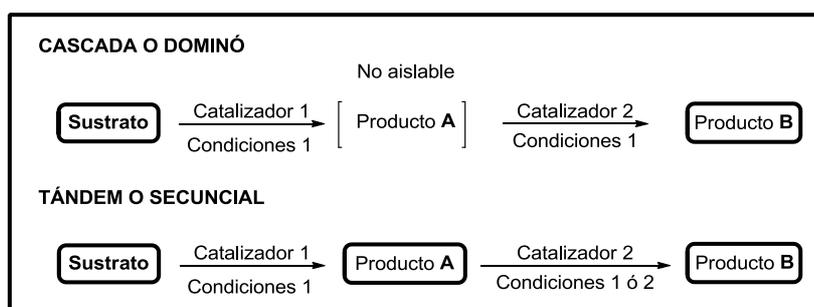
- Procesos *en cascada* o *dominó*: El material de partida sufre una transformación en la que dos o más reacciones ocurren una a continuación de la otra de una manera inseparable. Como consecuencia, las reacciones individuales son muy difícilmente llevadas a cabo de manera independiente. Por esta razón, el producto de la primera reacción es generalmente inestable y a menudo elude su aislamiento y caracterización. Dicho intermediario evoluciona rápidamente hacia el producto final o hacia el siguiente intermedio sin acumularse, y de esta forma se evitan en gran medida reacciones secundarias, dando lugar generalmente a un proceso global con buenos rendimientos.<sup>190</sup>
- Procesos *secuenciales* o *tándem*: Tienen lugar de manera consecutiva y por lo tanto en ocasiones son consideradas como transformaciones *en dos pasos*, donde cada una de las reacciones puede llevarse a cabo por separado y el intermediario es relativamente estable.<sup>192</sup>

---

<sup>190</sup> *Domino Reactions in Organic Synthesis*. Eds. Tietze, L. F.; Brasche, G.; Gericke, K. Wiley-VCH, Weinheim **2006**.

<sup>191</sup> Bisogno, F. R.; Lavandera, I.; Gotor, V. en *Biocatalytic concurrent processes*. Ed. Seidel, A. John Wiley & Sons, Hoboken **2011**, 1-20.

<sup>192</sup> (a) Denmark, S. E.; Thorarensen, A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 137-165; (b) Mayer, S. F.; Kroutil, W.; Faber, K. *Chem. Soc. Rev.* **2001**, *30*, 332-339.



**Figura 2.1.** Representación general de una transformación en cascada y una transformación tándem.

## 2.2. REGENERACIÓN DE COFACTOR EN OXIDORREDUCTASAS

Como ya se ha comentado, en las reacciones catalizadas por oxidorreductasas, la transferencia de electrones entre especies químicas se produce generalmente a través de un cofactor. Puesto que se necesita una molécula de éste por cada molécula de sustrato que se quiere oxidar o reducir, el uso de cantidades estequiométricas de cofactor genera un elevado coste, sobre todo con enzimas que son NADPH-específicos. Por ello, la regeneración y reutilización eficiente de NADPH es esencial para la aplicación de oxidorreductasas aisladas en biocatálisis.

En sentido estricto, cualquier estrategia de reciclaje representa un proceso concurrente, ya que la reacción auxiliar trabaja en paralelo a la reacción deseada. Un buen sistema de regeneración debe cumplir una serie de condiciones. Por un lado, ha de tener bajo coste y ha de evitar la formación de subproductos que requieran etapas de purificación adicionales. Por otro lado, el método empleado no debe interferir en la actividad o selectividad del biocatalizador principal.<sup>193</sup> Además, el proceso debe tener un elevado valor de TON para el cofactor (del inglés “turnover number”),<sup>194</sup> que se define como el número de recambio o los moles de producto formado por cada mol de cofactor usado en una determinada reacción. También debe poseer un elevado valor de TOF (del inglés “turnover frequency”) que se define como frecuencia de recambio y se expresa como TON en la unidad

<sup>193</sup> Leonida, M. D. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 345-369.

<sup>194</sup> Chenault, H. K.; Simon, E. S.; Whitesides, G. M. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **1988**, *6*, 221-270.

## Capítulo 2

---

de tiempo (sus unidades son  $\text{h}^{-1}$ ). Si el reciclado es efectivo, una pequeña cantidad de cofactor frente a la cantidad inicial de sustrato es suficiente para generar reacciones muy rápidas con altos valores de TON. Se considera que para que un proceso resulte rentable en términos económicos, es necesario un valor del TON de entre 1000 y 100000.<sup>195</sup>

Existe un gran número de metodologías que permiten el reciclaje de los cofactores de tipo nicotinamida: métodos químicos,<sup>196</sup> electroquímicos,<sup>197</sup> fotoquímicos,<sup>198</sup> y enzimáticos.<sup>199</sup> Sin embargo todas ellas tienen varias desventajas como son efectos perjudiciales para el biocatalizador principal, altos costes y pérdida de material, lo cual disminuye la “eficiencia atómica” del proceso.<sup>200</sup> Una manera de evitar estos inconvenientes, y de la que se han desarrollado algunos ejemplos en los últimos años, consiste en trabajar con sistemas biocatalíticos concurrentes formados por varias reacciones interconectadas que generan productos de interés. De este modo ya no existe una reacción principal y otra auxiliar, sino dos reacciones principales actuando de forma paralela y generando productos útiles.

---

<sup>195</sup> Hummel, W. *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 487-492.

<sup>196</sup> (a) Hollmann, F.; Schmid, A.; Steckhan, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 169-171; (b) Hollmann, F.; Lin, P.-C.; Witholt, B.; Schmid, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8209-8217; (c) Lutz, J.; Hollmann, F.; Ho, T. V.; Schynder, A.; Fish, R. H.; Schmid, A. *J. Organomet. Chem.* **2004**, *689*, 4783-4790; (d) de Gonzalo, G.; Ottolina, G.; Carrea, G.; Fraaije, M. W. *Chem. Commun.* **2005**, 3724-3726.

<sup>197</sup> (a) Délécouls-Servat, K.; Bergel, A.; Basséguy, R. *J. Appl. Electrochem.* **2001**, *31*, 1095-1101; (b) van der Donk, W. A.; Zhao, H. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 421-426; (c) Liu, W.; Wang, P. *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 369-384.

<sup>198</sup> (a) Hollmann, F.; Taglieber, A.; Schulz, F.; Reetz, M. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1-5; (b) Taglieber, A.; Schulz, F.; Hollmann, F.; Rusek, M.; Reetz, M. T. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 565-572; (c) Park, C. B.; Lee, S. H.; Subramanian, E.; Kale, B. B.; Lee, S. M.; Baeg, J.-O. *Chem. Commun.* **2008**, 5423-5425.

<sup>199</sup> (a) Vrtis, J. M.; White, A.; Metcalf, W. W.; van der Donk, W. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3257-3259; (b) Tishkov, V. I.; Popov, V. O. *Biomol. Eng.* **2006**, *23*, 89-110; (c) Johannes, T. W.; Woodyer, R. D.; Zhao, H. *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *96*, 18-26.

<sup>200</sup> (a) Trost, B. M. *Science* **1991**, *254*, 1471-1477; (b) Sheldon, R. A. *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 1233-1246.

### 2.3. PROCESOS CONCURRENTES CON OXIDORREDUCTASAS

Existen numerosos ejemplos descritos en la bibliografía en los que algunas oxidorreductasas forman parte en procesos concurrentes. En este apartado se señalarán algunos.<sup>201</sup>

Un sistema concurrente de tipo tándem fue el desarrollado por Kroutil y colaboradores empleando alcohol deshidrogenasas (ADHs).<sup>202</sup> En éste se realizó una desracemización de alcoholes secundarios combinando en “one pot” células enteras provenientes de la bacteria *Alcaligenes faecalis*, las cuales oxidan selectivamente un alcohol a cetona, con una ADH aislada, la cual reduce estereoselectivamente la cetona generada (Figura 2.2a). De este modo se genera el alcohol secundario de configuración contraria al oxidado por la bacteria, consiguiéndose la estereoinversión del enantiómero reactivo mediante un proceso concurrente de oxidación-reducción. En este proceso se utilizan dos catalizadores con una estereopreferencia contraria y una fuente de electrones diferente (NADPH y NADH). En las células enteras, el cofactor se recicla gracias al metabolismo celular con un consumo de oxígeno, mientras que para el enzima aislado es necesario un sistema de reciclaje de cofactor auxiliar (bien 2-propanol o el sistema glucosa deshidrogenasa/glucosa). Así se consiguió superar la limitación intrínseca de toda resolución cinética, para la cual el rendimiento máximo teórico del producto enantiopuro es del 50%, pudiéndose obtener los alcoholes secundarios con rendimientos cuantitativos y excelentes excesos enantioméricos. De este modo se ha desarrollado una alternativa efectiva a la resolución cinética dinámica de alcoholes secundarios.

Este método se extendió a la desracemización de alcoholes secundarios empleando enzimas aislados.<sup>203</sup> Se utilizaron dos ADHs con estereoselectividad opuesta usando dos sistemas de regeneración del cofactor diferentes, uno ligado al reciclado del NADH y otro al del NADPH. Para que este proceso tenga lugar, cada una de las ADHs debe ser muy selectiva hacia cada uno de los cofactores. Además, los sistemas de

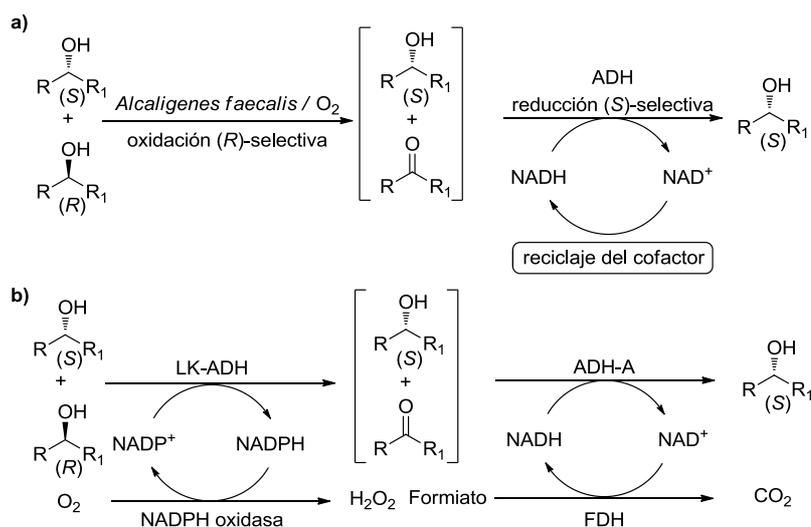
<sup>201</sup> Para ver más ejemplos: Schrittwieser, J. H.; Sattler, J.; Resch, V.; Mutti, F. G.; Kroutil, W. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *14*, 249-256.

<sup>202</sup> Voss, C. V.; Gruber, C. C.; Kroutil, W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 741-745.

<sup>203</sup> (a) Voss, C. V.; Gruber, C. C.; Faber, K.; Knaus, T.; Macheroux, P.; Kroutil, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13969-13972; (b) Voss, C. V.; Gruber, C. C.; Kroutil, W. *Synlett* **2010**, 991-998.

## Capítulo 2

regeneración no deben interferir en las reacciones de oxidación/reducción llevadas a cabo por las ADHs. Los autores emplearon la YcnD NADPH-oxidasa de *Bacillus subtilis* para reciclar el cofactor de la ADH de *Lactobacillus kefir*, enzima con una preferencia anti-Prelog<sup>204</sup> (oxidación del alcohol de configuración *R*), mientras que para la ADH-A, enzima Prelog y NADH-selectiva, utilizaron una formiato deshidrogenasa. De esta forma se aislaron los correspondientes (*S*)-alcoholes con conversión total y de forma enantiopura (Figura 2.2b). Además se desarrolló otro sistema enzimático, con el objeto de formar los alcoholes de configuración opuesta. Para ello se utilizaron los mismos enzimas de regeneración de cofactor y las ADH de *Thermoanaerobium brockii*, enzima con una preferencia Prelog, y ADH-PR2, enzima anti-Prelog.

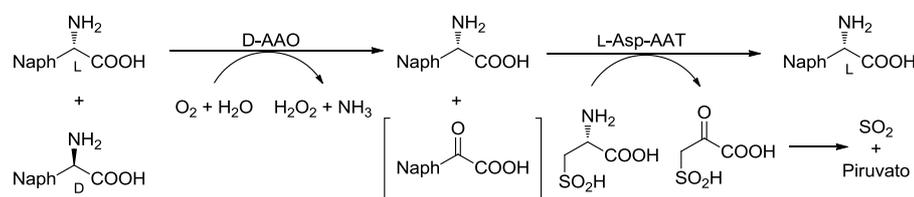


**Figura 2.2.** Desracemización biocatalítica mediante un proceso concurrente de oxidación-reducción.

Otro ejemplo de desracemización mediante un proceso concurrente de oxidación-reducción se empleó en la resolución de aminoácidos. La D-aminoácido oxidasa de *Rhodotorula gracilis* catalizó la deaminación de un

<sup>204</sup> Las ADHs suelen seguir la llamada “regla de Prelog”, es decir transfieren el hidruro por la cara re de la cetona proquiral dando lugar al alcohol de configuración *S*. Esto sucede siempre y cuando el grupo grande unido a la cetona presente también la prioridad sobre el pequeño siguiendo las reglas de Cahn-Ingold-Prelog (CIP). Se encuentra descrito en: Prelog, V. *Pure Appl. Chem.* **1964**, 9, 119-130.

D-aminoácido y una L-aspartato aminotransferasa expresada en *E. coli* se utilizó para la transformación del intermedio  $\alpha$ -cetoácido (Figura 2.3).<sup>205</sup> Aunque la transaminación es un proceso reversible, se consigue una conversión total utilizando como amino-donor el ácido sulfínico derivado de la cisteína. Éste es transformado en el ácido  $\beta$ -cetosulfínico, que descompone en piruvato y dióxido de azufre, desplazando el equilibrio de la reacción.



**Figura 2.3.** Desracemización de la naftilalanina a través de la estereoinversión del D-aminoácido en el L-aminoácido.

Monti y colaboradores llevaron a cabo un proceso concurrente en “one pot” y dos pasos, donde se utilizaron tres alcohol deshidrogenasas aisladas (7 $\beta$ -, 7 $\alpha$ - 12 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasas), con sus respectivos sistemas de reciclaje de cofactor (glucosa deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa, con selectividades de cofactor opuestas), para conseguir la síntesis del ácido 12-cetoursodesoxicólico.<sup>206</sup> En un primer paso 7 $\alpha$ - y 12 $\alpha$ -HSDH, catalizan la oxidación estereo- y regioselectiva del ácido cólico en las posiciones 7 y 12, y posteriormente el enzima 7  $\beta$ -HSDH reduce regio- y estereoselectivamente la cetona en la posición 7. El proceso fue secuencial, ya que primero se adicionaron los enzimas que llevan a cabo oxidaciones y a continuación el biocatalizador encargado de la reducción.

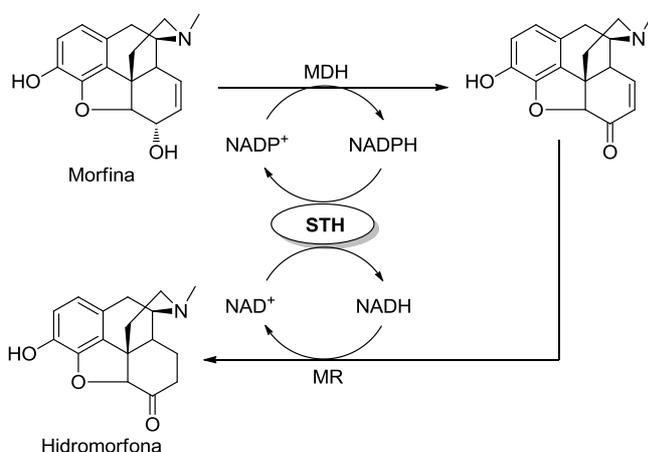
Un ejemplo de catálisis concurrente intrasecuencial (proceso en el que un producto formado en la primera reacción se consume inmediatamente en la segunda, con el fin de regenerar el cofactor) es la oxidación de la morfina en hidromorfona (Figura 2.4).<sup>207</sup> La morfina se transforma en morfina mediante una ADH llamada morfina deshidrogenasa (MDH), NADPH-

<sup>205</sup> Caligiuri, A.; D'Arrigo, P.; Gefflaut, T.; Molla, G.; Pollegioni, L.; Rosini, E.; Rossi, C.; Servi, S. *Biocatal. Biotrans.* **2006**, *24*, 409-413.

<sup>206</sup> Monti, D.; Ferrandi, E. E.; Zanellato, I.; Hua, L.; Polentini, F.; Carrea, G.; Riva, S. *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 1303-1311.

<sup>207</sup> Boonstra, B.; Rathbone, D. A.; French, C. E.; Walker, E. H.; Bruce, N. C. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 5161-5166.

dependiente. La morfina es reducida a hidromorfona mediante una flavoenzima NADH-dependiente proveniente de la “old yellow enzyme” (MR). La transferencia de los equivalentes redox desde la nicotinamida fosforilada al cofactor no fosforilado se produjo a través de la piridina nucleótido transhidrogenasa (STH).



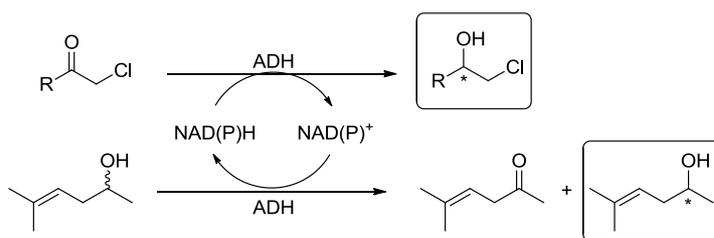
**Figura 2.4.** Síntesis intrasecuenencial de la hidromorfona catalizada por una transhidrogenasa.

### 2.3.1. SISTEMAS DE REGENERACIÓN DE COFACTOR CON APLICABILIDAD SINTÉTICA

En los últimos años, algunos ejemplos han desarrollado la regeneración de cofactor utilizando como cosustrato un compuesto de interés. Un ejemplo de esta metodología es la reducción estereoselectiva de  $\alpha$ -cloro,  $\alpha$ -ciano o  $\alpha$ -azido cetonas mediante una ADH aislada que a su vez regenera el cofactor catalizando la formación de alcoholes quirales como el 2-undecanol o el sulcatol (Figura 2.5).<sup>208</sup> Dependiendo si la ADH es (*R*)- o (*S*)- selectiva se pueden obtener ambas configuraciones de los productos finales. Asimismo, no es necesaria la adición de exceso de cosustrato, ya que la reducción de cetonas con sustituyentes electrón-atractores en posición  $\alpha$  es quasi-

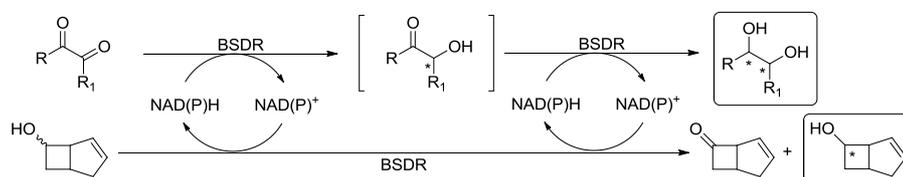
<sup>208</sup> Bisogno, F. R.; Lavandera, I.; Kroutil, W.; Gotor, V. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1730-1732.

irreversible.<sup>209</sup> Así, el equilibrio de la resolución cinética oxidativa está gobernado por la reducción estereoselectiva.



**Figura 2.5.** Síntesis concurrente de dos alcoholes enantioenriquecidos usando una única ADH, partiendo de una mezcla racémica de un alcohol y de una cetona quiral activada en posición  $\alpha$ .

Unos años antes, Medici y colaboradores describieron la resolución cinética de un alcohol bicíclico acoplada a una doble reducción estereoselectiva consecutiva de una dicetona. Ambos procesos estaban catalizados por la ADH *Bacillus stearothermophilus* diacetil reductasa (BSDR) (Figura 2.6).<sup>210</sup>



**Figura 2.6.** Síntesis concurrente de dioles enantioenriquecidos y alcoholes secundarios catalizada por la BSDR.

También se ha descrito el acoplamiento de la desimetrización de un *meso*-diol catalizada por una ADH de hígado de caballo (HLADH) para generar una lactona enantioenriquecida y la aminación reductiva estereoselectiva de un  $\alpha$ -ceto adipato al correspondiente L- $\alpha$ -amino adipato, catalizada por una glutamato deshidrogenasa (GluDH).<sup>211</sup> Este sistema se realiza en un medio

<sup>209</sup> (a) Lavandera, I.; Kern, A.; Resch, V.; Ferreira-Silva, B.; Glieder, A.; Fabian, W. M. F.; de Wildeman, S.; Kroutil, W. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2155-2158; (b) Bisogno, F. R.; García-Urdiales, E.; Valdés, H.; Lavandera, I.; Kroutil, W.; Suirez, D.; Gotor, V. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 11012-11019.

<sup>210</sup> Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Giovannini, P. P.; Guerrini, A.; Medici, A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 1854-1856.

<sup>211</sup> (a) Wong, C.-H.; Matos, J. R. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1994-1996; (b) Matos, J. R.; Wong, C.-H. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 2388-2389.

bifásico en el que la fase acuosa es el medio idóneo para la transformación enzimática y la fase orgánica actúa como reservorio para la lactona hidrofóbica, desplazándose el equilibrio de la reacción.

### 2.3.2. SISTEMAS DE REGENERACIÓN DE COFACTOR CON APLICABILIDAD SINTÉTICA. COMBINACIÓN DE ADH Y BVMO

Se pueden encontrar en la bibliografía algunos procesos concurrentes en los que se emplean una ADH y una BVMO de forma conjunta. Así, un enzima utilizará el cofactor en su forma oxidada y el otro en su forma reducida, regenerándose éste, mientras que a su vez ambas enzimas pueden catalizar reacciones útiles desde un punto de vista sintético.

En 1991 se describió el primer ejemplo de este tipo de procesos donde la ADH de *Thermoanaerobium brockii* oxida a una serie de alcoholes secundarios bicíclicos para dar lugar a las cetonas correspondientes, las cuales son oxidadas por una BVMO de *Acinetobacter calcoaceticus* (Figura 2.7).<sup>212</sup> El reciclaje del cofactor de la primera reacción es llevado a cabo por la segunda y viceversa, constituyendo un ciclo cerrado que finaliza cuando el alcohol de partida se consume completamente.

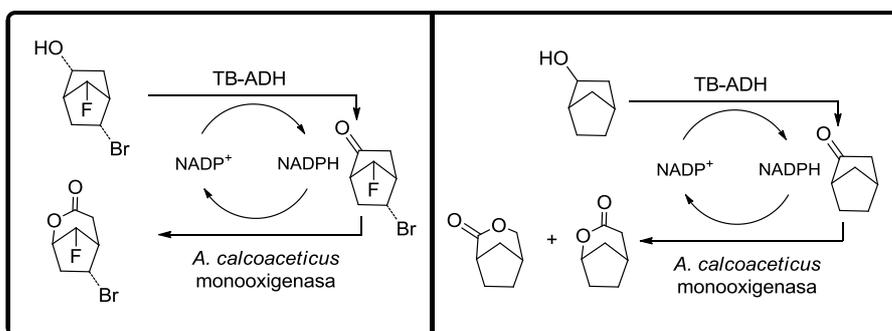
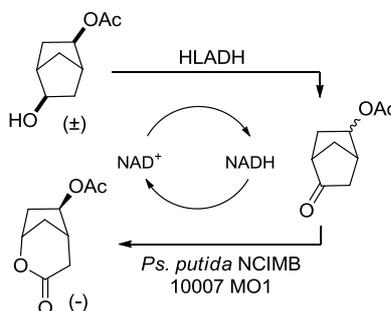


Figura 2.7. Proceso concurrente empleando una ADH y una BVMO.

Unos años más tarde, los mismos autores desarrollaron un sistema similar, empleando una HLADH y una BVMO proveniente de la *Pseudomonas putida* NCIMB 10007 MO1 (Figura 2.8). De nuevo la ADH oxida al alcohol bicíclico a la correspondiente cetona, la cual será oxidada

<sup>212</sup> Willets, A. J.; Knowles, C. J.; Levit, M. S.; Roberts, S. M.; Sandey, H.; Shipston, N. F. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1991**, 1608-1610.

regioselectivamente por la BVMO para generar la lactona bicíclica.<sup>213</sup> El exceso enantiomérico obtenido para el producto final fue excelente, sin embargo la conversión de la reacción fue sólo de un 15%.



**Figura 2.8.** Proceso concurrente empleando una ADH y una BVMO.

Debido a que el reciclaje del cofactor es esencial para el uso de las BVMOs aisladas y al gran interés suscitado en los últimos años por los sistemas de regeneración con aplicabilidad sintética, en este capítulo nos planteamos como objetivo el desarrollo de un sistema que permita la síntesis simultánea de compuestos enantioenriquecidos de una manera paralela. De esta forma se minimizaría la cantidad de reactivos empleados con respecto a las reacciones de síntesis individuales, maximizando la “economía redox”<sup>214</sup> del proceso global.

En particular, se pretende acoplar dos resoluciones cinéticas: la de una cetona y la de un alcohol racémico,<sup>215</sup> catalizadas respectivamente por una BVMO y una ADH. De esta forma se llevará a cabo la preparación simultánea de tres compuestos enantioenriquecidos (una cetona, un éster y un alcohol) empleando una mínima cantidad de cofactor, que cumple el papel de conector entre ambas reacciones. Se optimizarán los parámetros de reacción con el fin de obtener una excelente doble resolución. Las

<sup>213</sup> Gagnon, R.; Grogan, G.; Roberts, S. M.; Villa, R.; Willetts, A. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1995**, 1505-1511.

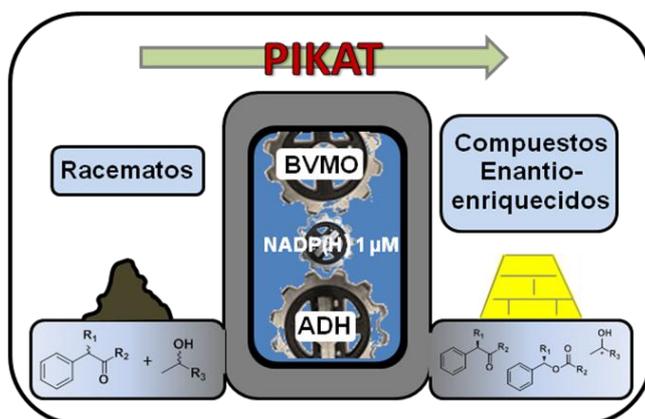
<sup>214</sup> Burns, N. Z.; Baran, P. S.; Hoffmann, R.W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 2854-2867.

<sup>215</sup> Un sistema similar ha sido desarrollado posteriormente en nuestro grupo de investigación mediante el acoplamiento de dos transformaciones asimétricas (la resolución cinética oxidativa de un alcohol secundario y la desimetrización de un sulfuro proquiral) interconectadas por el cofactor empleando una ADH y una BVMO. Estos resultados forman parte de la Tesis Doctoral de Fabricio R. Bisogno y han sido publicados: Bisogno, F. R.; Ríoz-Martínez, A.; Rodríguez, C.; de Gonzalo, G.; Lavandera, I.; Torres Pazmiño, D. E.; Fraaije, M. W.; Gotor, V. *ChemCatChem* **2010**, 2, 946-949.

## Capítulo 2

---

condiciones óptimas se emplearán en la biooxidación de distintas cetonas aromáticas y alcoholes. Finalmente, se pretende evaluar el efecto de la concentración de cofactor para determinar la mínima cantidad del mismo necesaria para mantener este tipo de procesos.

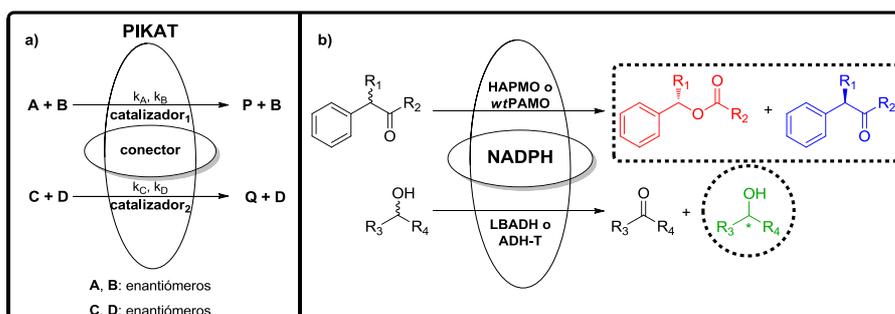


Para la buena ejecución del sistema a desarrollar en el presente capítulo se deben observar previamente varias consideraciones. Debido a la utilización de dos catalizadores simultáneamente, hay que tener en cuenta parámetros tales como el pH, la temperatura y la preferencia por el cofactor, que deben ser optimizados para conseguir unas condiciones de reacción compatibles para ambos biocatalizadores. Otro aspecto importante es la aceptación exclusiva de cada sustrato por cada una de las enzimas, para evitar de este modo reacciones cruzadas o inespecíficas que darían lugar a productos secundarios y disminuirían la eficacia global del proceso. Este hecho llevaría además a transformaciones incompletas por un uso ineficiente del cofactor.

Por todo ello, para nuestro estudio se escogieron como BVMOs la HAPMO y la *wt*PAMO y se seleccionaron las ADHs de *Lactobacillus brevis* (LBADH)<sup>216</sup> y la de *Thermoanaerobacter* sp. (ADH-T),<sup>217</sup> ya que poseen la misma selectividad por el cofactor fosforilado NADPH, y además las ADHs tienen una estereopreferencia complementaria. De esta forma se pueden obtener ambos enantiómeros del alcohol objeto de resolución. Así, se ha desarrollado un sistema en el que se acoplaron dos resoluciones cinéticas, la de un alcohol secundario catalizada por la LBADH o la ADH-T, y la de una cetona aromática catalizada por la HAPMO o la *wt*PAMO, a través de una mínima cantidad de NADPH que actúa como conector. Mediante este proceso se obtienen simultáneamente un éster, una cetona y un alcohol secundario de manera enantioenriquecida (Figura 2.9). Debido a que estas dos reacciones asimétricas tienen lugar de una manera estrictamente paralela y a que si las condiciones de reacción no son las más adecuadas para uno solo de los dos procesos, ambas transformaciones quedarían incompletas dado que se encuentran interconectadas por el cofactor, se denominó a este tipo de procesos, “Parallel Interconnected Kinetic Asymmetric Transformations” (PIKAT).

<sup>216</sup> Wolberg, M.; Hummel, W.; Wandrey, C.; Müller, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4306-4308.

<sup>217</sup> Findrik, Z.; Vasić-Racki, D.; Lütz, S.; Dausmann, T.; Wandrey, C. *Biotechnol. Lett.* **2005**, *27*, 1087-1095.



**Figura 2.9.** a) Representación esquemática del sistema PIKAT aplicado a dos resoluciones cinéticas y b) ejemplo particular del PIKAT objeto a estudio en este capítulo.

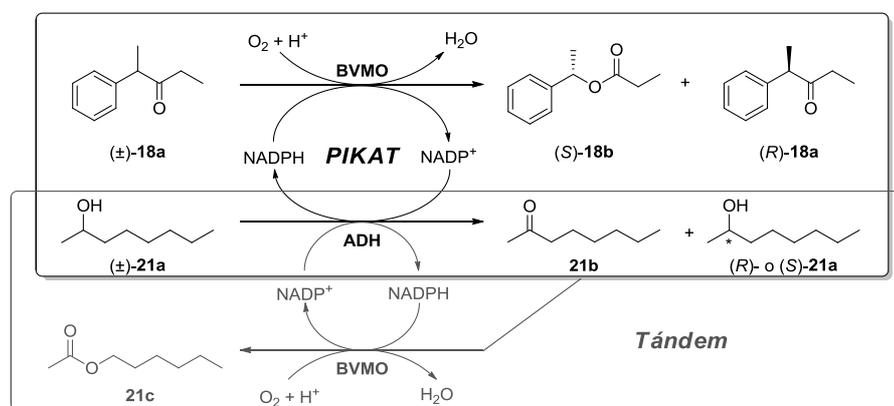
#### 2.4. DOBLE RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA DE LA (±)-2-FENILPENTAN-3-ONA [(±)-18a] Y DEL (±)-2-OCTANOL [(±)-21a] EMPLEANDO BVMOs y ADHs

El estudio se inició con la resolución cinética interconectada de la (±)-2-fenilpentan-3-ona [(±)-18a] y del (±)-2-octanol [(±)-21a] utilizando como biocatalizadores una BVMO y una ADH. Se utilizó una cantidad equimolecular de los sustratos y una cantidad catalítica de cofactor (0.2 mM) (Figura 2.10).

Como se muestra en la Tabla 2.1, los experimentos iniciales se centraron en la biocatálisis empleando la HAPMO y la ADH-T, modificando una serie de parámetros que pueden afectar al sistema, como el pH y la temperatura. Se empleó como medio de reacción una disolución 50 mM Tris/HCl a pH 8.5 y diferentes temperaturas (entradas 1-3). A medida que ésta aumenta se produce un descenso de las conversiones y selectividades de ambas resoluciones cinéticas. De este modo, trabajando a 20°C se alcanzó un 37% de conversión en la oxidación de la cetona, siendo éste un proceso con excelente selectividad ( $E=102$ , entrada 1), mientras que a 25°C los resultados fueron peores y a 30°C se obtuvo tan solo un 20% de conversión y una selectividad baja en la reacción de Baeyer-Villiger ( $E=29$ , entrada 3). La oxidación del alcohol (±)-21a fue selectiva para todas la temperaturas estudiadas, sin embargo el exceso enantiomérico del alcohol remanente se ve limitado por la baja conversión del proceso, alcanzándose un máximo de un 58% cuando se lleva a cabo la oxidación a 20°C (entrada 1). El empeoramiento de la conversión con el aumento de temperatura se puede deber a la conocida desactivación de la HAPMO a temperaturas superiores a los 20°C. A continuación, se llevó a cabo la optimización del pH a esta temperatura. Los mejores resultados fueron obtenidos cuando la reacción transcurrió a pH 7.5 (entrada 4). En estas condiciones se alcanzó una

conversión del proceso cercana al 50% a las 24 horas, se obtuvo el éster (*S*)-**18b** con excelente selectividad ( $E \geq 200$ ) y el alcohol remanente (*R*)-**21a** enantiopuro en la oxidación catalizada por la ADH. A medida que se aumenta el pH (entradas 5-6), decrece tanto la conversión del proceso como la selectividad de la oxidación de Baeyer-Villiger. Cualquier modificación que afecte negativamente a uno de los biocatalizadores, tiene repercusión en todo el sistema PIKAT.

Debido al hecho de que la ADH-T es un enzima Prelog, el alcohol (*S*)-**21a** es el que se oxida selectivamente a la cetona, mientras que el alcohol remanente (*R*)-**21a** se obtiene en general con un alto exceso enantiomérico ( $ee \geq 96\%$ ). Este hecho se produce siempre y cuando la conversión de la reacción se encuentre próxima al 50%, lo cual significa que el sistema se completa. Cuando la HAPMO se combina con la LBADH a 20°C y pH 8.5 (pH óptimo para este enzima), se obtiene de nuevo una doble resolución excelente (entrada 7), generándose un 48% del éster (*S*)-**18b** en una resolución altamente selectiva ( $E \geq 200$ ), y obteniéndose el alcohol (*S*)-**21a** con un alto exceso enantiomérico ( $ee = 92\%$ ). Por lo tanto la selectividad del sistema puede ser cambiada con el simple hecho de modificar el biocatalizador. Además hay que destacar, que en algunos casos se observaron trazas (en porcentajes menores del 5%) de acetato de hexilo (**21c**). Este producto se forma a través de un proceso tándem que comienza con la oxidación por parte de la ADH del alcohol ( $\pm$ )-**21a** a la cetona **21b**, la cual es oxidada por la HAPMO. Este es un hecho sorprendente, ya que era desconocida hasta el momento la capacidad de esta BVMO para oxidar este tipo de cetonas alquílicas lineales.



**Figura 2.10.** Resoluciones cinéticas concurrentes de la ( $\pm$ )-2-fenilpentan-3-ona [( $\pm$ )-**18a**] y del ( $\pm$ )-2-octanol [( $\pm$ )-**21a**] empleando BVMOs y ADHs. El éster **21c** se obtiene como subproducto a través de una reacción tándem.

## Capítulo 2

**Tabla 2.1.** Doble resolución cinética enzimática de la ( $\pm$ )-2-fenilpentan-3-ona [( $\pm$ )-**18a**] y del ( $\pm$ )-2-octanol [( $\pm$ )-**21a**] empleando la HAPMO y ADHs.<sup>a</sup>

Entrada ADH	pH	T (°C)	<i>ee</i> <sub>18a</sub> (%)	<i>ee</i> <sub>18b</sub> (%)	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>	<i>ee</i> <sub>21a</sub> (%)	<b>21a</b> (%)	<b>21b</b> (%)	<b>21c</b> (%)	
1	T	8.5	20	57	97	37	102	58( <i>R</i> )	60	38	2
2	T	8.5	25	39	94	35	51	53( <i>R</i> )	65	35	-
3	T	8.5	30	17	92	20	29	25( <i>R</i> )	79	21	-
4	T	7.5	20	87	97	47	≥200	96( <i>R</i> )	51	46	3
5	T	8.0	20	73	97	44	144	97( <i>R</i> )	50	47	3
6	T	10.0	20	6	81	10	11	10( <i>R</i> )	90	10	-
7	LB	8.5	20	92	98	48	≥200	92( <i>S</i> )	52	44	4

<sup>a</sup> Tiempo de reacción 24 horas. Conversión, porcentajes y excesos enantioméricos determinados por CG.

<sup>b</sup> Conversión,  $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$ .

<sup>c</sup>  $E = \ln\{(1 - ee_s) / [1 + (ee_s / ee_p)]\} / \ln\{(1 + ee_s) / [1 + (ee_s / ee_p)]\}$ .

El estudio sobre esta pareja de sustratos se completó utilizando la *wt*PAMO. Como refleja la Tabla 2.2, cuando este enzima se emplea en combinación con la ADH-T (entrada 1) a pH 7.5 y 20°C, se obtuvieron la cetona (*R*)-**18a**, el éster (*S*)-**18b** y el alcohol (*R*)-**21a** con conversiones cercanas al 50% en un proceso con una excelente selectividad ( $E=147$  y  $ee$  del alcohol del 97%), por lo que no realizamos una posterior optimización. En cambio, hemos analizado el sistema formado por la *wt*PAMO y la LBADH con objeto de determinar las mejores condiciones para esta reacción. Así, se estudió el efecto del pH (de 7.5 a 10.0, entradas 2-5) en la doble resolución trabajando a 20°C, observándose que los valores óptimos eran los comprendidos entre pH 8.5 y pH 9.0 (entradas 3 y 4). En ambos casos las reacciones se completaron ( $c \approx 50\%$ ) con una alta selectividad en el caso de la Baeyer-Villiger ( $E \geq 145$ ), obteniéndose (*R*)-**18a**, (*S*)-**18b** y (*R*)-**21a** con excesos enantioméricos mayores del 90%. A pH 10.0 se produjo una pérdida tanto de selectividad como de conversión del proceso (entrada 5), mientras que a pH 7.5 el sistema presenta una menor actividad que a pHs superiores (entrada 2). Una vez establecido el pH óptimo de 8.5, se investigó el efecto de la temperatura. Debido a que la *wt*PAMO es un enzima termoestable, trabajamos en el intervalo de 20 a 60°C. Las dobles resoluciones a 20°C y 30°C ofrecieron altas conversiones ( $c \geq 48\%$ ) y selectividades ( $E \geq 145$ ) para la oxidación de la cetona racémica), como se muestra en las entradas 3 y 6. Un mayor aumento de la temperatura hasta 40 y 50°C conllevó un decrecimiento en la selectividad de la reacción de Baeyer-Villiger (desde  $E=106$  hasta  $E=29$ , entradas 7 y 8), mientras que a 60°C, se produjo también una pérdida muy importante de la actividad ( $c=21\%$ , entrada 9). De nuevo la oxidación del alcohol ( $\pm$ )-**21a** resultó ser un proceso selectivo, sin embargo las limitaciones en la conversión a altas temperaturas, provocan que el

exceso enantiomérico del alcohol remanente sea bajo. El hecho de que los mejores resultados se consigan a 20-30°C se debe a la desactivación de la LBADH a altas temperaturas, lo que una vez más evidencia que en esta catálisis concurrente deben darse las condiciones apropiadas para los dos enzimas. Si no es así, uno de los procesos no funcionará adecuadamente, por lo que el cofactor no se regenerará de forma eficiente, produciéndose un proceso incompleto.

En todas las resoluciones catalizadas por la *w*tPAMO y las dos ADHs también se forma el subproducto **21c**, sin embargo se observa en menor proporción que en los procesos biocatalizados con la HAPMO.

**Tabla 2.2.** Doble resolución cinética enzimática de la ( $\pm$ )-2-fenilpentan-3-ona [( $\pm$ )-**18a**] y del ( $\pm$ )-2-octanol [( $\pm$ )-**21a**] empleando la *w*tPAMO y ADHs.<sup>a</sup>

Entrada	ADH	pH	T (°C)	<i>ee</i> <sub>18a</sub> (%)	<i>ee</i> <sub>18b</sub> (%)	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>	<i>ee</i> <sub>21a</sub> (%)	<b>21a</b> (%)	<b>21b</b> (%)	<b>21c</b> (%)
1	T	7.5	20	85	96	47	147	97( <i>R</i> )	50	50	-
2	LB	7.5	20	46	98	32	118	45( <i>S</i> )	68	32	-
3	LB	8.5	20	99	93	52	145	98( <i>S</i> )	50	48	2
4	LB	9.0	20	91	96	49	156	98( <i>S</i> )	50	50	-
5	LB	10.0	20	40	97	29	66	41( <i>S</i> )	70	30	-
6	LB	8.5	30	90	97	48	160	98( <i>S</i> )	50	50	-
7	LB	8.5	40	70	96	42	106	61( <i>S</i> )	62	38	-
8	LB	8.5	50	50	89	36	29	64( <i>S</i> )	59	39	2
9	LB	8.5	60	26	92	21	30	27( <i>S</i> )	79	19	2

<sup>a</sup> Tiempo de reacción 24 horas. Conversión, porcentajes y excesos enantioméricos determinados por CG.

<sup>b</sup> Conversión,  $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$ .

<sup>c</sup>  $E = \ln\{(1 - ee_s) / [1 + (ee_s / ee_p)]\} / \ln\{(1 + ee_s) / [1 + (ee_s / ee_p)]\}$ .

## 2.5. DOBLE RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA DE LA ( $\pm$ )-4-FENILHEXAN-3-ONA [( $\pm$ )-**19a**] Y DEL ( $\pm$ )-2-OCTANOL [( $\pm$ )-**21a**] EMPLEANDO BVMOs Y ADHs

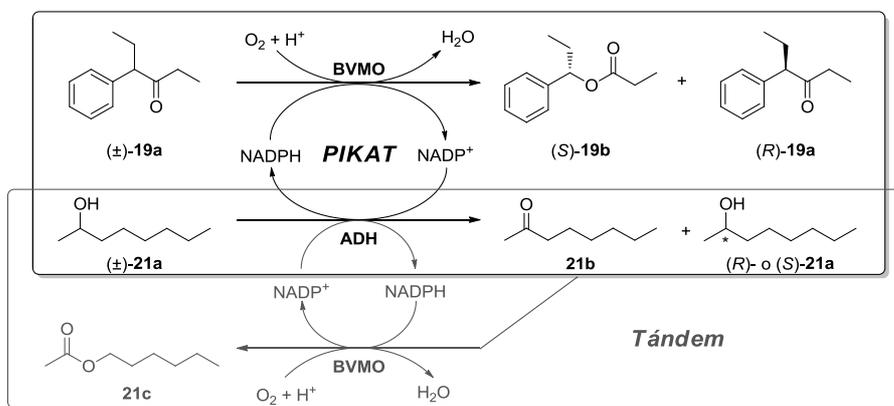
Una vez establecidas las mejores condiciones de reacción, 20°C y pH 8.5 en las reacciones catalizadas por la LBADH y la misma temperatura y pH 7.5 en las catalizadas por el enzima ADH-T, ampliamos el estudio a otros sustratos, inicialmente usando otra cetona racémica. Se estudió así la doble resolución de la ( $\pm$ )-4-fenilhexan-3-ona [( $\pm$ )-**19a**] y del ( $\pm$ )-2-octanol [( $\pm$ )-**21a**]. Como refleja la Tabla 2.3, independientemente de las BVMOs y ADHs utilizadas se obtienen en todos los casos conversiones cercanas al 50%, generándose (*S*)-**19b** con un alto exceso enantiomérico ( $ee \geq 96\%$ ) y

## Capítulo 2

aislándose el alcohol (*S*)- o (*R*)-**21a** con una pureza óptica buena ( $ee \geq 71\%$ , entradas 1-4). Por lo tanto la selectividad de los procesos fue excelente en todos los casos, consiguiéndose valores de  $E > 200$  en todas las oxidaciones de ( $\pm$ )-**19a**. Hay que resaltar que las reacciones catalizadas por la *w*tPAMO (entradas 3 y 4) son más rápidas que las catalizadas por la HAPMO (entradas 1 y 2), ya que se alcanzan conversiones altas en tan solo 6 horas. Únicamente se observó la presencia del éster **21c** en las reacciones catalizadas por las BVMOs combinadas con la ADH-T, pero en ningún caso el porcentaje de este compuesto superó el 2%.

Debido a los buenos resultados obtenidos y con objeto de demostrar la aplicabilidad del sistema, se llevó a cabo la doble resolución de la ( $\pm$ )-4-fenilhexan-3-ona [( $\pm$ )-**19a**] y del ( $\pm$ )-2-octanol [( $\pm$ )-**21a**] catalizada por la *w*tPAMO y la ADH-T a escala multimiligramo (25 mg), obteniéndose enantiopuros (*R*)-**19a**, (*S*)-**19b** y (*R*)-**21a** con un 50% de conversión. Los tres productos de la reacción fueron aislados, obteniéndose un rendimiento del 81% para (*R*)-**19a**, del 86% para (*S*)-**19b** y del 75% en el caso de (*R*)-**21a**.

**Tabla 2.3.** Doble resolución cinética enzimática de la ( $\pm$ )-4-fenilhexan-3-ona [( $\pm$ )-**19a**] y del ( $\pm$ )-2-octanol [( $\pm$ )-**21a**] empleando BVMOs y ADHs.<sup>a</sup>

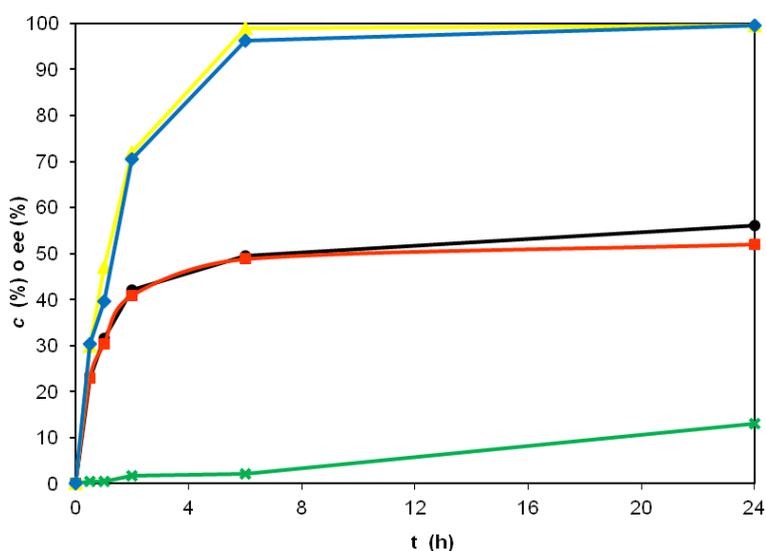


Entrada	BVMO	ADH	t (h)	$ee_{19a}$ (%)	$ee_{19b}$ (%)	$c$ (%) <sup>b</sup>	$ee_{21a}$ (%)	<b>21a</b> (%)	<b>21b</b> (%)
1	HAPMO	T	24	75	$\geq 99$	43	76( <i>R</i> )	57	41
2	HAPMO	LB	24	87	$\geq 99$	47	99( <i>S</i> )	50	50
3	<i>w</i> tPAMO	T	6	99	96	50	93( <i>R</i> )	49	49
4	<i>w</i> tPAMO	LB	4.5	72	98	41	71( <i>S</i> )	58	42

<sup>a</sup> Conversión, porcentajes y excesos enantioméricos determinados por CG.

<sup>b</sup> Conversión,  $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$ .

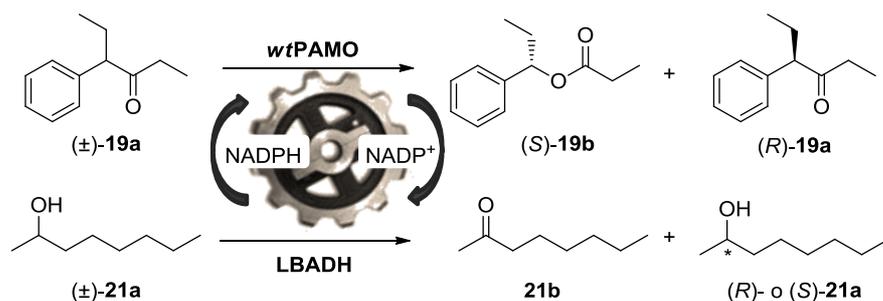
La doble resolución de estos sustratos catalizada por la *w*tPAMO y la ADH-T fue monitorizada en el tiempo con el fin de corroborar algunas hipótesis: 1) Como estamos en un proceso concurrente, la formación de los productos (*S*)-**19b** y **21b** debe ser igual a lo largo del curso de la reacción; y 2) si ambas resoluciones poseen enantioselectividades similares, el exceso enantiomérico de los sustratos remanentes (*R*)-**19a** y (*R*)-**21a** deben ser similares durante todo el proceso. Como muestra la Figura 2.11, los porcentajes del éster (*S*)-**19b** y de la cetona **21b** son muy similares durante todo el experimento. Además, los excesos enantioméricos de los sustratos remanentes (*R*)-**19a** y (*R*)-**21a** fueron casi idénticos durante todo el proceso. Después de 6 horas, la 2-octanona (**21b**) comienza a oxidarse lentamente a su correspondiente éster **21c**, generándose hasta un 13% de éste al cabo de 24 horas. Este hecho hace que el porcentaje de **21b** disminuya a partir de las 6 horas, favoreciendo el aumento del exceso enantiomérico del alcohol remanente (*R*)-**21a**, mediante un desplazamiento del equilibrio de la reacción.

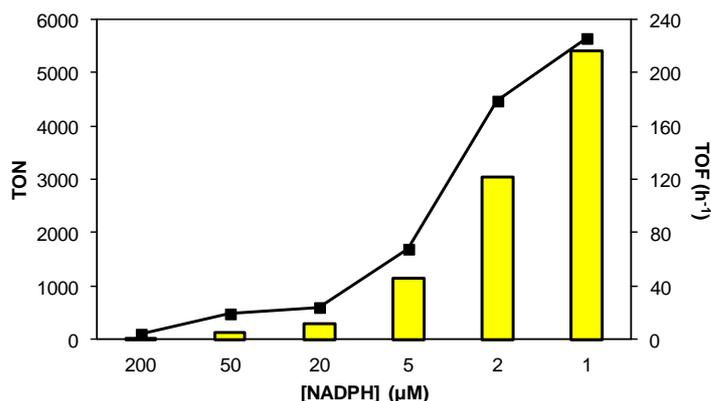


**Figura 2.11.** Estudio en el tiempo de la doble resolución enzimática de la ( $\pm$ )-4-fenilhexan-3-ona [( $\pm$ )-**19a**] y del ( $\pm$ )-2-octanol [( $\pm$ )-**21a**] empleando la *w*tPAMO y la ADH-T. Se representa el porcentaje de: (*S*)-**19b** (●); **21b** (■); **21c** (x); y exceso enantiomérico de: (*R*)-**19a** (▲) y (*R*)-**21a** (◆).

### 2.5.1. EFICACIA DEL COFACTOR

Como se ha comentado en los antecedentes del presente capítulo, la calidad de un sistema de reciclaje se puede medir a través de la eficacia del cofactor, calculando los valores de TON y TOF. Por ello, para la aplicación de los sistemas aquí descritos a gran escala, la optimización de la cantidad de cofactor es vital. Así, hemos optimizado la concentración del NADPH utilizado en la doble resolución de la ( $\pm$ )-4-fenilhexan-3-ona [( $\pm$ )-**19a**] y del ( $\pm$ )-2-octanol [( $\pm$ )-**21a**] empleando como biocatalizadores la *wt*PAMO y la LBADH. Para este proceso el TON se corresponde con el número de moles de éster (*S*)-**19b** formado por cada mol de NADPH empleado, mientras que el TOF será este valor por unidad de tiempo. Como se observa en la Figura 2.12, la adición de menores cantidades de cofactor da lugar a mayores valores de TON y TOF. Así cuando se emplea una concentración de 200  $\mu\text{M}$  (la cantidad empleada en todos los estudios con BVMOs) se obtiene un TON de 25 y un valor de TOF de 4  $\text{h}^{-1}$ . Sin embargo, cuando las concentraciones utilizadas son 20  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ , los valores de TON son de 288 y 115 respectivamente. A pesar de producirse un aumento considerable en ambos valores respecto a los obtenidos con 200  $\mu\text{M}$ , éste no es suficiente como para que el escalado sea, económicamente hablando, rentable. Sin embargo, con concentraciones de cofactor de 2.0  $\mu\text{M}$  y 5.0  $\mu\text{M}$ , se obtienen valores de TON de 3051 y 1152 respectivamente, lo que indica que estos procesos son totalmente efectivos y viables desde un punto de vista económico. Cuando se utiliza una concentración de cofactor de 1.0  $\mu\text{M}$ , el sistema acoplado funciona de forma más efectiva, alcanzándose valores de TON de 5424 y de TOF de 226  $\text{h}^{-1}$ , lo que supone un incremento en un factor de 50 con respecto a lo obtenido con 200  $\mu\text{M}$ . Este hecho se debe principalmente a dos factores: 1) la ( $\pm$ )-4-fenilhexan-3-ona [( $\pm$ )-**19a**] es un sustrato muy bueno para la *wt*PAMO y 2) la afinidad de este enzima por el NADPH es muy alta ( $K_M=3.0 \mu\text{M}$ ). Hay que resaltar que, incluso trabajando a concentraciones por debajo de la  $K_M$ , el proceso es eficiente. Además, se comprobó en todas las dobles resoluciones que la selectividad de ambos procesos no variaba al emplear diferentes concentraciones del cofactor.

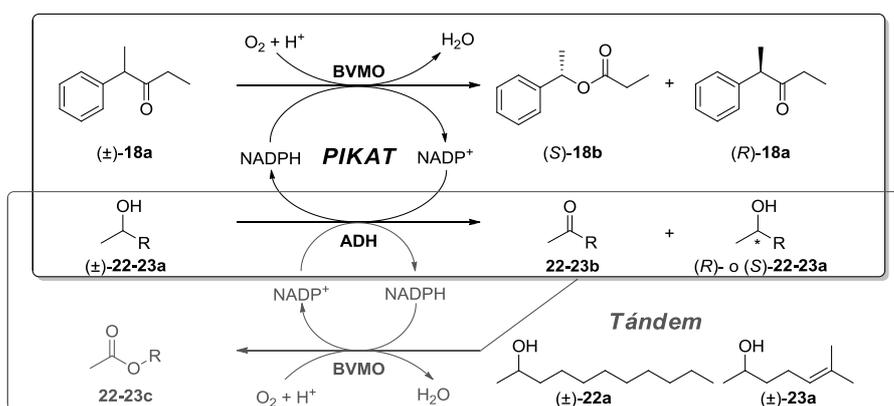




**Figura 2.12.** Efecto de la concentración de NADPH en el TON<sup>194</sup> (■) y el TOF (■) en la transformación PIKAT de la (±)-4-fenilhexan-3-ona [(±)-**19a**] y del (±)-2-octanol [(±)-**21a**], catalizada por la LBADH y la *wt*PAMO.

## 2.6. DOBLE RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA DE LA (±)-2-FENILPENTAN-3-ONA [(±)-**18a**] Y DE DIFERENTES ALCOHOLES SECUNDARIOS EMPLEANDO BVMOs y ADHs

El número de alcoholes empleados en el sistema PIKAT fue ampliado, acoplando la oxidación selectiva del (±)-2-undecanol [(±)-**22a**] y del (±)-sulcatol [(±)-**23a**] a la resolución cinética de la (±)-2-fenilpentan-3-ona [(±)-**18a**] (Figura 2.13). Como refleja la Tabla 2.4, cuando se realiza la oxidación de (±)-**22a** con las ADHs acopladas a la oxidación de (±)-**18a** catalizada por la *wt*PAMO (entradas 3 y 4) se obtienen mejores conversiones y enantioselectividades que cuando se acoplan estos procesos a la oxidación de la cetona (±)-**18a** empleando la HAPMO (entradas 1 y 2). Así, en presencia de la *wt*PAMO se puede aislar el alcohol enantiopuro (*S*)-undecanol utilizando la LBADH como biocatalizador, mientras que usando la ADH-T se obtiene (*R*)-**22b** con una pureza óptica alta (*ee*=87%). Hay que destacar que en las reacciones catalizadas por la *wt*PAMO no se observa la formación del acetato de nonilo (**22c**), mientras que con la HAPMO se forma un 8% de este subproducto.



**Figura 2.13.** Resoluciones cinéticas concurrentes de la (±)-2-fenilpentan-3-ona [(±)-18a] y diferentes alcoholes secundarios, empleando BVMOs y ADHs.

**Tabla 2.4.** Doble resolución cinética enzimática de la (±)-2-fenilpentan-3-ona [(±)-18a] y del (±)-2-undecanol [(±)-22a] empleando BVMOs y ADHs.<sup>a</sup>

Entrada	BVMO	ADH	<i>ee</i> <sub>18a</sub> (%)	<i>ee</i> <sub>18b</sub> (%)	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>	<i>ee</i> <sub>22a</sub> (%)	22a (%)	22b (%)	22c (%)
1	HAPMO	T	66	97	48	144	73( <i>R</i> )	57	35	8
2	HAPMO	LB	52	97	46	114	66( <i>S</i> )	59	33	8
3	<i>w</i> tPAMO	T	64	96	46	145	87( <i>R</i> )	52	48	-
4	<i>w</i> tPAMO	LB	≥99	89	53	132	≥99( <i>S</i> )	50	49	1

<sup>a</sup> Tiempo de reacción 24 horas. Conversión, porcentajes y excesos enantioméricos determinados por CG.

<sup>b</sup> Conversión,  $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$ .

<sup>c</sup>  $E = \ln\{(1 - ee_s) / [1 + (ee_s / ee_p)]\} / \ln\{(1 + ee_s) / [1 + (ee_s / ee_p)]\}$ .

La resolución de la cetona (±)-18a fue excelente cuando se acopló con la biooxidación selectiva del (±)-sulcatol [(±)-23a] (Tabla 2.5). En todos los casos, independientemente de la ADH y la BVMO escogida, la selectividad del proceso de Baeyer-Villiger fue muy alta ( $E \geq 179$ ). Sin embargo, el exceso enantiomérico del alcohol remanente 23a varió mucho dependiendo de la ADH escogida. Así, cuando se utilizó la LBADH se obtuvo (*S*)-23b enantiopuro (entradas 2 y 4), mientras que con la ADH-T se aisló el alcohol (*R*)-23b con muy baja pureza óptica (entradas 1 y 3). Con objeto de explicar los resultados obtenidos con la ADH-T, se analizaron las biooxidaciones de los alcoholes (±)-21a, (±)-22a y (±)-23a utilizando como sistema de regeneración del cofactor un exceso de acetona en el medio, que se reduciría a isopropanol por medio de la ADH, en lo que se conoce como regeneración de cofactor por sustrato acoplado. Se observó que los alcoholes (±)-21a y (±)-22a se oxidaban selectivamente, obteniéndose tras 4 horas los correspondientes alcoholes remanentes enantiopuros (*R*)-21a y (*R*)-22a con

un 50% de conversión. Sin embargo el ( $\pm$ )-sulcatol se oxidó con más de un 95% de conversión, lo que indica que la ADH-T no es capaz de diferenciar entre ambos enantiómeros.

Al igual que ocurre con el ( $\pm$ )-2-undecanol, en las dobles resoluciones cinéticas catalizadas con la *wf*PAMO, se obtuvo menor cantidad del acetato de 4-metilpent-3-en-1-ilo (**23c**) (entradas 3 y 4), que en aquellas catalizadas por la HAPMO (entradas 1 y 2).

**Tabla 2.5.** Doble resolución cinética enzimática de la ( $\pm$ )-2-fenilpentan-3-ona [( $\pm$ )-**18a**] y del ( $\pm$ )-sulcatol [( $\pm$ )-**23a**] empleando BVMOs y ADHs.<sup>a</sup>

Entrada	BVMO	ADH	<i>ee</i> <sub>18a</sub> (%)	<i>ee</i> <sub>18b</sub> (%)	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	<i>E</i> <sup>c</sup>	<i>ee</i> <sub>23a</sub> (%)	<b>23a</b> (%)	<b>23b</b> (%)	<b>23c</b> (%)
1	HAPMO	T	99	99	50	200	≤3	50	38	12
2	HAPMO	LB	99	95	51	200	99( <i>S</i> )	46	46	8
3	<i>wf</i> PAMO	T	93	96	48	179	21( <i>R</i> )	50	48	2
4	<i>wf</i> PAMO	LB	98	96	50	200	99( <i>S</i> )	50	48	2

<sup>a</sup> Tiempo de reacción 24 horas. Conversión, porcentajes y excesos enantioméricos determinados por CG.

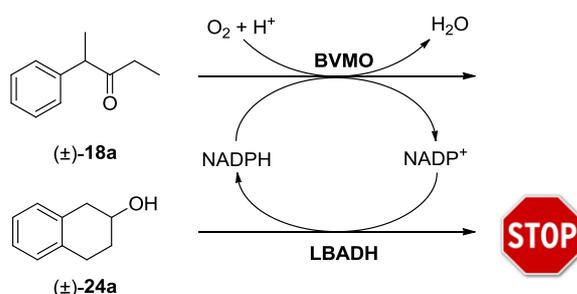
<sup>b</sup> Conversión,  $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$ .

<sup>c</sup>  $E = \ln\{(1 - ee_s) / [1 + (ee_s / ee_p)]\} / \ln\{(1 + ee_s) / [1 + (ee_s / ee_p)]\}$ .

## 2.7. EXPERIMENTOS ADICIONALES QUE CORROBORAN QUE EL PIKAT ES UN SISTEMA CONCURRENTE

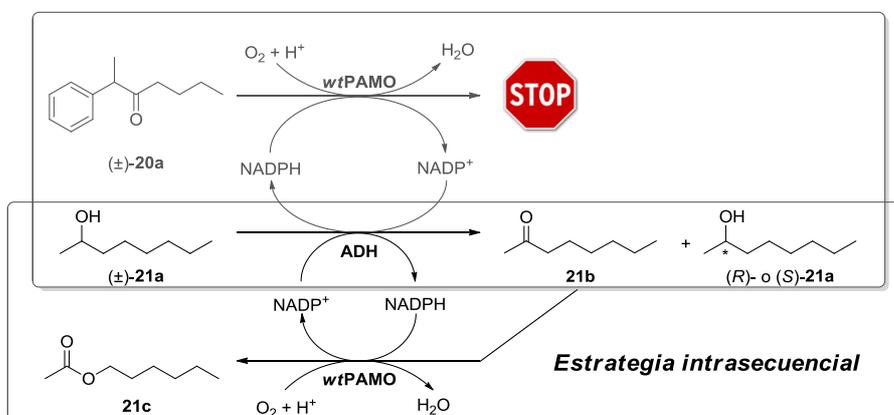
Con el objetivo de demostrar que ambas reacciones del sistema PIKAT deben proceder de una manera eficiente para conseguir una adecuada regeneración de cofactor y un proceso concurrente adecuado, se realizaron una serie de experimentos adicionales. Las primeras pruebas que se habían realizado representaban un modelo quasi-ideal, donde tanto la cetona ( $\pm$ )-**18a** como el alcohol ( $\pm$ )-**21a** son, respectivamente, buenos sustratos para las BVMOs y las ADHs escogidas. Para los estudios a realizar, hemos intercambiado uno de los compuestos por un mal sustrato, como es el caso del ( $\pm$ )-2-tetralol [( $\pm$ )-**24a**] para las ADHs y la ( $\pm$ )-2-fenilheptan-3-ona [( $\pm$ )-**20a**] para las BVMOs.

De este modo, cuando se combinó la cetona ( $\pm$ )-**18a** con el alcohol ( $\pm$ )-**24a** usando como biocatalizadores la ADH-T y ambas BVMOs, se observó la formación tras 24 horas de sólo un 3% del correspondiente éster **18b** (Figura 2.14) mientras que el alcohol no fue oxidado.



**Figura 2.14.** Resoluciones cinéticas concurrentes de la (±)-2-fenilpentan-3-ona [(±)-**18a**] y del (±)-2-tetralol [(±)-**24a**] empleando BVMOs y la LBADH.

Cuando (±)-**18a** fue sustituida en el sistema ideal por la cetona (±)-**20a** en la doble resolución acoplada con el (±)-2-octanol catalizada por la wtPAMO y ambas ADHs, se obtuvo únicamente un 5% del éster **20c** (Figura 2.15). Sin embargo se produjo la oxidación del alcohol (±)-**21a** debido a la regeneración de cofactor producida por la oxidación de Baeyer-Villiger de la cetona **21b** al éster **21c**. Por lo tanto se está produciendo un proceso de catálisis concurrente intrasecuencial, donde nada más formarse la 2-octanona (**21b**), se consume con el fin de regenerar el cofactor. Cuando el PIKAT se realizó con la wtPAMO y la LBADH, se obtuvo un 46% del alcohol (*S*)-**21a** enantiopuro, además de un 6% de cetona **21b**. En la oxidación catalizada con la ADH-T el alcohol se consumió totalmente para generar un 8% de cetona **21b** y además un 92% de **21c**. Esta alta conversión se debe a que la ADH-T puede oxidar ambos enantiómeros del alcohol (±)-**21a**, siempre y cuando no exista otra reacción acoplada que lo limite o haya suficiente tiempo de reacción como para que se transforme primero uno y a continuación el otro.



**Figura 2.15.** Resoluciones cinéticas concurrentes de la (±)-2-fenilheptan-3-ona [(±)-**20a**] y del (±)-2-octanol [(±)-**21a**] empleando la wtPAMO y ADHs.

Con objeto de tener un mayor conocimiento de las proporciones de los ésteres (*S*)-**18-19b** frente a **21-23c** en las doble resoluciones, analizamos los parámetros cinéticos de las BVMOs en la oxidación de las cetonas ( $\pm$ )-**18-19a** y **21-23b**. Como era de esperar y se puede observar en la Tabla 2.6 por los valores de eficiencia catalítica ( $k_{\text{cat}}/K_M$ ), estas enzimas prefieren en general como sustratos las cetonas aromáticas ( $\pm$ )-**18-19a** (entradas 1-4) a las lineales **21-23b** (entradas 5-10), con la excepción de la 2-undecanona para la HAPMO, que se comentará más a fondo posteriormente. Además la HAPMO y la *w*tPAMO experimentaron diferentes perfiles cinéticos. La actividad catalítica de la *w*tPAMO es similar ( $k_{\text{cat}}$  de 0.37 a 2.90 s<sup>-1</sup>) para todas las cetonas, mientras que los valores de la  $K_M$  presentan una gran variación. Esto sugiere que en la *w*tPAMO el paso limitante es, probablemente, un evento cinético no relacionado con la reactividad del sustrato, lo cual está de acuerdo con estudios previos realizados sobre esta BVMO.<sup>73a</sup> Por el contrario, la HAPMO presenta más variedad en el valor de  $k_{\text{cat}}$  (de 0.39 a 14.15 s<sup>-1</sup>) y en el valor de  $K_M$  (de 0.02 a 4.0 mM), lo que indica que en este caso, la reacción podría estar limitada por las propiedades químicas y/o estructurales del sustrato o del producto. Estos enzimas (en particular la HAPMO) mostraron una eficiencia catalítica aceptable con las cetonas alifáticas **21-23b**, lo que explica la cantidad de éster **21-23c** obtenido en estas reacciones. Sin embargo, a pesar de que la HAPMO mostró una alta eficiencia catalítica con la 2-undecanona (**22b**) (entrada 8), este enzima se inhibe a concentraciones del sustrato mayores de 5mM. Por ello en las dobles resoluciones apenas se obtiene el éster **22c**. En la oxidación del ( $\pm$ )-2-octanol en disolución tampón 50mM Tris/HCl a pH 8.5 y 20°C catalizada por la LBADH, se observó una actividad catalítica de 41s<sup>-1</sup> y una  $K_M$  de 290  $\mu$ M. Ese hecho indica que la oxidación de Baeyer-Villiger en la doble resolución es el paso limitante de la velocidad.

**Tabla 2.6.** Parámetros cinéticos para la oxidación de Baeyer-Villiger de cetonas catalizada por BVMOs.

Entrada	Sustrato	BVMO	$K_M$ (mM)	$k_{\text{cat}}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{\text{cat}}/K_M$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
1	( $\pm$ )- <b>18a</b>	<i>w</i> tPAMO	0.03±0.01	2.90±0.09	96700
2	( $\pm$ )- <b>18a</b>	HAPMO	4.0±1.2	14.15±1.82	3.500
3	( $\pm$ )- <b>19a</b>	<i>w</i> tPAMO	0.02±0.01	2.54±0.14	127000
4	( $\pm$ )- <b>19a</b>	HAPMO	0.10±0.01	4.06±0.11	40600
5	<b>21b</b>	<i>w</i> tPAMO	0.23±0.03	0.39±0.02	1700
6	<b>21b</b>	HAPMO	1.0±0.04	1.48±0.18	1480
7	<b>22b</b>	<i>w</i> tPAMO	0.07±0.03	0.37±0.04	5300
8	<b>22b</b>	HAPMO	0.02±0.01	3.54±0.13	177000
9	<b>23b</b>	<i>w</i> tPAMO	2.5±0.75	1.70±0.23	680
10	<b>23b</b>	HAPMO	1.3±0.05	0.39±0.05	300



*Se ha descrito el funcionamiento de un sistema enzimático donde la regeneración del cofactor de forma cíclica conduce a lo denominado como “Parallel Interconnected Kinetic Asymmetric Transformation”.*

*Este sistema se basa en dos reacciones en “one pot” empleando dos biocatalizadores que se encuentran interconectados por una mínima cantidad del cofactor que es reciclado internamente. Mediante el acoplamiento de dos resoluciones cinéticas, ha sido posible obtener simultáneamente tres compuestos enantiopuros (una cetona, un éster y un alcohol), minimizando la cantidad de reactivos empleados.*

*Estas reacciones tienen lugar de una manera estrictamente paralela y para asegurar buenos resultados, al menos una de las reacciones debe ser cuasi-irreversible (en este caso la reacción catalizada por la BVMO).*

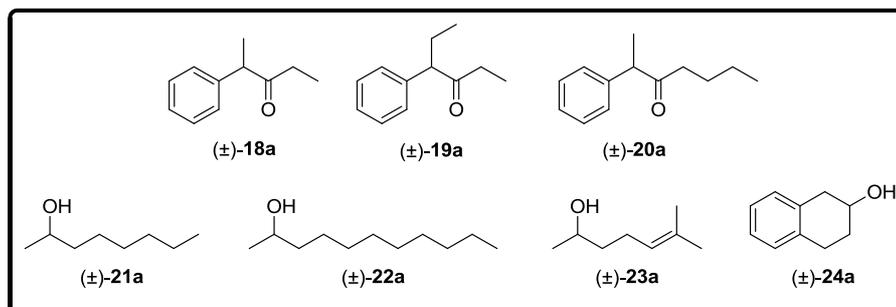
*Además, la selectividad del sistema puede ser manipulada por la simple elección de los biocatalizadores adecuados. La correcta elección de éstos y de los sustratos cumple un papel fundamental para el éxito global del proceso. De esta forma cuando se escogen sustratos adecuadas como la ( $\pm$ )-2-fenilpentan-3-ona y la ( $\pm$ )-4-fenilhexan-3-ona para las BVMOs y el ( $\pm$ )-2-octanol y el ( $\pm$ )-2-undecanol para las ADHs, se obtienen procesos muy selectivos con altas conversiones.*

*Se ha estudiado la eficiencia de esta doble resolución observándose que incluso a concentraciones tan bajas del cofactor como 1.0  $\mu$ M, ambos biocatalizadores pueden funcionar sin ningún tipo de problema y sin pérdida de selectividad, lo que hace muy factible el escalado de este tipo de procesos.*

*Se ha observado que las propiedades cinéticas de los biocatalizadores están en concordancia con los resultados experimentales obtenidos. Ambas BVMOs prefieren cetonas aromáticas que alifáticas.*



Las técnicas instrumentales empleadas para la síntesis y caracterización de los compuestos mencionados en este capítulo, ya se han descrito en la Parte Experimental del Capítulo 1. Únicamente se incluirán en esta sección los apartados referentes a reactivos utilizados, así como los procedimientos sintéticos, experimentales y analíticos que se han desarrollado a lo largo del presente capítulo, incluyendo la caracterización de todos los compuestos relacionados con éste. Las cetonas y los alcoholes empleados pueden consultarse en la Figura 2.16.



**Figura 2.16.** Bencilcetonas y alcoholes empleados en el presente capítulo.

## 2.8. REACTIVOS GENERALES

Las proteínas recombinantes wtPAMO<sup>50</sup> y HAPMO<sup>47</sup> han sido sobreexpresadas y purificadas de acuerdo con los métodos descritos. Las reacciones de oxidación se han llevado a cabo con el enzima aislado en disolución. Se ha definido una unidad enzimática de BVMO como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1.0  $\mu\text{mol}$  de 2-fenilpentan-3-ona a propionato de 1-feniletilo por minuto, a pH 8.0 y 20°C, en presencia de NADPH. Las alcohol deshidrogenasas de *Lactobacillus brevis* ADH (LBADH) y *Thermoanaerobacter* sp. ADH (ADH-T) fueron adquiridas de la casa comercial Codexis. La cantidad usada de ADH en los diferentes ensayos fue calculada respecto a la actividad proporcionada por la casa suministradora (ADH-T 780 U/mL, LBADH 2320 U/mL). El enzima G6PDH (640 U/mg) de *Leuconostoc mesenteroides* y la G6P son productos de Sigma-Aldrich-Fluka. Los coenzimas NADP<sup>+</sup>/NADPH (de pureza  $\geq 99\%$ ), obtenidos como sales de sodio son comercializados por Codexis.

Las alcoholes racémicos ( $\pm$ )-**21-24a** y las cetonas ( $\pm$ )-**21-23b**, así como el resto de reactivos y disolventes fueron suministrados por Sigma-Aldrich-Fluka y presentan el mayor grado de pureza posible.

## 2.9. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS

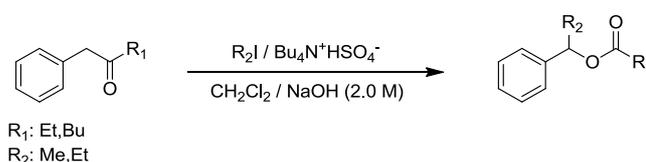
### Síntesis química de las cetonas racémicas ( $\pm$ )-**18-20a** mediante alquilación en medio bifásico.<sup>218</sup>

A una disolución de hidrogenosulfato de tetra-*n*-butilamonio (0.92 eq.) en 7 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se le añade la cetona correspondiente (1-fenilbutan-2-ona o 1-fenilhexan-2-ona) (500 mg, 2.84-3.73 mmol), el agente alquilante (halogenuro de metilo o etilo, 2.2 eq.) y una disolución 2.0 M de NaOH (8.4 mL). El sistema se agita vigorosamente a 40°C, siguiendo la reacción por TLC. Una vez concluida, la fase acuosa se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x10 mL). La fase orgánica resultante se lava sucesivamente con H<sub>2</sub>O (10 mL), una disolución de HCl 5% (10 mL) y H<sub>2</sub>O (10 mL), se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente a presión reducida. A continuación se precipita el hidrogenosulfato de tetra-*n*-butilamonio por adición de Et<sub>2</sub>O y se filtra sobre placa filtrante. Por último se evapora el Et<sub>2</sub>O a presión reducida.

---

<sup>218</sup> Fry, A. J.; Bujanauskas, J. P. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3157-3163.

El crudo obtenido se purifica por cromatografía de columna empleando una mezcla (90% hexano/Et<sub>2</sub>O) como eluyente para (±)-**18-19a** y 80% (hexano/AcOEt) para (±)-**20a**. Se aislaron 327.0 mg de (±)-**18a** (60%), 375.0 mg de (±)-**19a** (63%) y 322.0 mg de (±)-**20a** (60%).



**Figura 2.17.** Alquilación de bencilcetonas en medio bifásico.

### Procedimiento general para la obtención de los ésteres (±)-**18-20b** mediante reacción de acilación.

A una suspensión del correspondiente alcohol (1-feniletanol o 1-fenilpropanol) (100 mg, 0.73-0.82 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (5 mL) y piridina (1.2 eq.) se le adiciona, bajo atmósfera de N<sub>2</sub> y a 0 °C, anhídrido propiónico o anhídrido butírico (1.2 eq.) como agente acilante. La reacción se agita a temperatura ambiente y se sigue por TLC (90% hexano/AcOEt). Una vez concluida se lava con una disolución de HCl 1.5 N (4x5 mL). La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se evaporan los disolventes a presión reducida. No es necesaria una posterior etapa de purificación. Se aislaron 90.5 mg de (±)-**18b** (62%), 88.9 mg de (±)-**19b** (63%) y 72.7 mg de (±)-**20b** (43%).

### Procedimiento general para la obtención de los ésteres (±)-**21-23c** mediante reacción de acilación.

A una suspensión del correspondiente alcohol (hexan-1-ol, nonan-1-ol y 4-metil-3-penten-1-ol) (100 mg, 0.69-0.97 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (5 mL) y 4-*N,N*-dimetilaminopiridina (4-DMAP) (catalítico) se le adiciona, bajo atmósfera de N<sub>2</sub> y a 0 °C, anhídrido acético como agente acilante (1.2 eq.). La reacción se agita a temperatura ambiente y se sigue por TLC (90% hexano/AcOEt). Una vez concluida se lava con una disolución de HCl 1.5 N (4x5 mL). La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se evaporan los disolventes a presión reducida. No es necesaria una posterior etapa de purificación. Se aislaron 112.8 mg de **21c** (80%), 112.9 mg de **22c** (88%) y 133.6 mg de **23c** (90%).

La lactona **2b** (como se indica en el Capítulo 1, Sección 1) fue sintetizada por oxidación química de Baeyer-Villiger empleando *m*-CPBA en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Su caracterización se encuentra recogida en la parte experimental del Capítulo 1, Sección 1.

## Capítulo 2

---

Los compuestos previamente descritos, **18-20a**, **18-20b** y **21-23c** exhiben propiedades físicas y espectrales de acuerdo con los datos publicados.<sup>219</sup>

### 2.10. ASIGNACIÓN DE CONFIGURACIONES ABSOLUTAS

Las configuraciones absolutas de las cetonas **18-20a**, los ésteres **18-20b** y los alcoholes **21-24a**,<sup>88,220</sup> se han obtenido mediante comparación de los cromatogramas obtenidos mediante CG con patrones ya descritos previamente en la bibliografía.<sup>221</sup>

### 2.11. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

#### 2.11.1. CINÉTICA ENZIMÁTICA

Para la determinación de los parámetros cinéticos de la *wt*PAMO y la HAPMO con las distintas cetonas aromáticas se determinó la actividad enzimática monitorizando el consumo de NADPH a 340 nm ( $\epsilon_{\text{NAD(P)H},340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Para determinar la actividad enzimática de la LBADH en la oxidación del alcohol racémico ( $\pm$ )-**21a** se midió la formación de este compuesto. Los estudios cinéticos se realizaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda Bio10 UV/Vis. Todas las medidas se han realizado a temperatura ambiente.

Las disoluciones *stock* de las cetonas (1.0 M) se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO). La presencia del DMSO apenas modifica la actividad enzimática, mientras que permite incrementar la solubilidad de los sustratos. En un experimento modelo (1 mL), la mezcla de reacción contiene una disolución reguladora de Tris/HCl (50 mM) pH 7.5, NADPH (100  $\mu\text{M}$ ), 1% (v/v) DMSO y BVMO (0.05-0.07  $\mu\text{M}$ ).

En la oxidación del alcohol racémico ( $\pm$ )-**23a** con LBADH, la mezcla de reacción se encuentra a pH 8.5 y la concentración del enzima es 0.02  $\mu\text{M}$ .

Los datos obtenidos fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten mediante regresión no lineal empleando el programa SigmaPlot versión 10.0

---

<sup>219</sup> Las referencias de los compuestos ya descritos y su caracterización pueden consultarse en el Apartado 2.13.

<sup>220</sup> (a) Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Giovannini, P. P.; Medici, A.; Pedrini, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 3047-3053; (b) Raminelli, C.; Comasseto, J. V.; Andrade, L. H.; Porto, L. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3117-3122; (c) de Gonzalo, G.; Lavandera, I.; Faber, K.; Kroutil, W. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2163-2166.

<sup>221</sup> Los datos cromatográficos se encuentran recogidos en el Apartado 2.12.

para Windows. El cálculo de la constante catalítica ( $k_{cat}$ ) y la constante de Michaelis ( $K_M$ ) permiten conocer la eficiencia catalítica del enzima con un determinado sustrato ( $k_{cat}/K_M$ ).

### 2.11.2. PROCEDIMIENTOS PARA LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS CATALIZADAS POR BVMOs

#### Procedimiento general para la resolución cinética simultánea de cetonas y alcoholes racémicos catalizada por una BVMO y una ADH de manera acoplada.

Las cetonas racémicas ( $\pm$ )-**18a** y ( $\pm$ )-**19a** (10-15 mM) se disuelven en Tris/HCl (50 mM, pH 7.5-10.0, 0.5 mL). A continuación se añade NADPH (0.2 mM), la correspondiente ADH (2.0 U), la HAPMO o la *w*tPAMO (1.0 U), y finalmente el correspondiente alcohol racémico ( $\pm$ )-**21-23a** (1.0 eq.). Cuando se utiliza la LBADH, se adiciona como aditivo  $MgCl_2$  (concentración final 1 mM). Las reacciones se agitan a 250 rpm durante los tiempos y a las temperaturas establecidas. Se detiene la reacción extrayendo con AcOEt (2x0.5 mL). La fase orgánica se seca con  $Na_2SO_4$  y se analiza directamente por CG y HPLC para determinar la conversión y/o el exceso enantiomérico de los compuestos **18-19a**, **21-23a**, **18-19b**, **21-23b** y **21-23c**.

#### Optimización de la concentración de NADPH en el sistema bienzimático acoplado.

La cetona racémica ( $\pm$ )-**19a** (11.3 mM) se disuelve en Tris/HCl (50 mM, pH 8.5, 0.5 mL). A continuación se añaden diferentes concentraciones de NADPH (1-200  $\mu$ M),  $MgCl_2$  (1 mM), la LBADH (2.0 U), la *w*tPAMO (1.0 U), y finalmente el correspondiente alcohol racémico ( $\pm$ )-**21a** (1.0 eq.). Las reacciones se agitan a 250 rpm de 6 a 24 horas (dependiendo la concentración de cofactor) y a 20°C. Se detiene la reacción extrayendo con AcOEt (2x0.5 mL). La fase orgánica se seca con  $Na_2SO_4$  y se analiza directamente por CG y HPLC para determinar la conversión y/o el exceso enantiomérico de los compuestos **19a**, **19b**, **21a**, **21b** y **21c**.

#### Reducción de las cetonas racémicas ( $\pm$ )-**18-20a** catalizada por ADHs.

Las cetonas racémicas ( $\pm$ )-**18-20a** (10 mM) se disuelven en 0.5 mL de Tris/HCl (50 mM) de pH 7.5 o pH 8.0 que contiene un 5% (v/v) de 2-propanol. Posteriormente se le añade NADPH (0.2 mM) y 2 unidades de la ADH. Cuando se utiliza LBADH, se adiciona como aditivo  $MgCl_2$  (concentración final 1 mM). Las reacciones se agitan a 250 rpm durante 24 horas a 20°C. Se detiene la reacción extrayendo con AcOEt (2x0.5 mL). La fase orgánica se seca con  $Na_2SO_4$  y se analiza directamente por CG y HPLC

para determinar la conversión y el exceso enantiomérico de los productos de reducción finales.

### **Oxidación de las cetonas 21-23b catalizada por BVMOs.**

Las cetonas **21-23b** (10 mM) se disuelven en 0.5 mL del medio de reacción disolución tampón Tris/HCl (50 mM, pH 8.5) junto con D-glucosa-6-fosfato (2.0 eq.), G6PDH (5.0 U), NADPH (0.2 mM) y 1.0 unidad de la correspondiente BVMO. La mezcla se agita a 250 rpm en un agitador orbital a 20°C durante 24 horas. Se detiene la reacción extrayendo con AcOEt (2x0.5 mL), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se analiza por CG con el fin de determinar la conversión de los procesos de oxidación.

### **Oxidación de los alcoholes (±)-21-23a empleando la ADH-T.**

Los alcoholes (±)-**21-23a** (12 mM) se disuelven en 0.5 mL del medio de reacción disolución tampón Tris/HCl (50 mM, pH 7.5) junto con NADP<sup>+</sup> (0.2 mM). A continuación se añade la ADH-T (2.0 U) y 5% (v/v) acetona. La mezcla se agita a 250 rpm en un agitador orbital a 20°C durante 4 horas. Se detiene la reacción extrayendo con AcOEt (2x0.5 mL), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se analiza por CG con el fin de determinar la conversión y el exceso enantiomérico de los procesos de oxidación.

### **Resolución cinética simultánea de la cetona (±)-19a y el alcohol (±)-21a a escala multimiligramo catalizada por la wtPAMO y la ADH-T.**

Las cetona racémica (±)-**19a** (25 mg, 0.14 mmol) se disuelve en una disolución tampón Tris/HCl (50 mM, pH 7.5, 12.5 mL). Posteriormente se le añade NADPH (0.2 mM), ADH-T (20.0 U), wtPAMO (10.0 U) y el alcohol racémico (±)-**21a** (1.0 eq.). La mezcla se agita a 20°C y 250 rpm, en agitador orbital, durante 6 horas. La fase acuosa se extrae con AcOEt (5x5 mL). La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente a presión reducida. Los crudos fueron purificados por cromatografía de columna (50% hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), obteniéndose de forma enantiopura, 10.1 mg de (*R*)-**19a** (81%), 11.7 mg de (*S*)-**19b** (86%), y 7.0 mg de (*R*)-**21a** (75%).

## 2.12. DETERMINACIÓN DE LAS CONVERSIONES Y EXCESOS ENANTIOMÉRICOS

La determinación de los valores de exceso enantiomérico de los compuestos se ha llevado a cabo mediante cromatografía de gases (Tabla 2.7). Para ello se ha empleado un cromatógrafo Hewlett Packard 6890 Series II equipado con la columna **A**: Restek Rt $\beta$ -DEXse (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m, 1 bar N<sub>2</sub>) y **B**: Varian CP-Chiralsil-DEX CB (25 m x 0.32 mm x 0.25  $\mu$ m, 1 bar, N<sub>2</sub>).

**Tabla 2.7.** Determinación de excesos enantioméricos mediante cromatografía de gases quiral.

Compuesto	Programa <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> (min)	Columna	R <sub>s</sub> <sup>182</sup>
(±)-18a	70/5/1/110/0/3/150/0	48.3 (R); 49.2 (S)	A	2.8
(±)-19a	90/30/3/200/0	47.4 (R); 48.4 (S)	A	3.3
(±)-20a	90/45/2/140/0	61.3 (R); 63.2 (S)	B	4.2
(±)-18b	70/5/1/110/0/3/150/0	50.2 (S); 51.5 (R)	A	4.0
(±)-19b	90/30/3/200/0	45.5 (S); 48.0 (R)	A	10.0
(±)-20b	90/45/2/140/0	65.8 (S); 68.3 (R)	B	6.2
(±)-21a <sup>b</sup>	90/5/2.5/105/0/5/130/2	14.6 (S); 16.4 (R)	A	16.0
(±)-22a <sup>b</sup>	90/5/2.5/105/0/20/140/0/2.5/160/0	17.2 (S); 17.9 (R)	B	11.0
(±)-23a	70/5/1/110/0/3/150/0	28.0 (S); 28.9(R)	A	2.4
(±)-24a <sup>b</sup>	90/5/2.5/105/0/5/180/5	24.8 (S); 25.8 (R)	A	11.3

<sup>a</sup> Programa: T<sub>inicial</sub> (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/ min)/ T<sub>final</sub> (°C)/ tiempo (min).

<sup>b</sup> Los alcoholes fueron derivatizados a sus correspondientes acetatos con 4-DMAP y anhídrido acético en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

t<sub>R</sub>: tiempo de retención.

## Capítulo 2

La determinación de los valores de los porcentajes de alcohol, cetona y éster, también se ha llevado a cabo mediante cromatografía gaseosa empleando como columna: Restek Rt $\beta$ -DEXse (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m, 1 bar N<sub>2</sub>).

**Tabla 2.8.** Determinación de los porcentajes de alcohol, cetona y éster mediante CG.

Compuesto	Programa <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> (min)
(±)- <b>21a</b>	70/5/1/110/0/3/150/0	28.9
(±)- <b>22a</b>	70/5/1/110/0/3/150/0	55.5
(±)- <b>24a</b>	70/5/1/110/0/3/150/0/10/200/0	61.4
(±)- <b>21b</b>	70/5/1/110/0/3/150/0	22.9
(±)- <b>22b</b>	70/5/1/110/0/3/150/0	53.0
(±)- <b>23b</b>	70/5/1/110/0/3/150/0	22.5
(±)- <b>24b</b>	70/5/1/110/0/3/150/0/10/200/0	62.5
(±)- <b>21c</b>	70/5/1/110/0/3/150/0	25.1
(±)- <b>22c</b>	70/5/1/110/0/3/150/0	53.5
(±)- <b>23c</b>	70/5/1/110/0/3/150/0	23.9

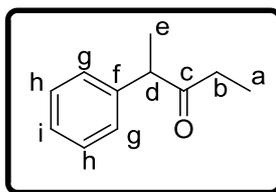
<sup>a</sup> Programa: T<sub>inicial</sub> (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/ min)/ T<sub>final</sub> (°C)/ tiempo (min).

t<sub>R</sub>: tiempo de retención.

### 2.13. DATOS EXPERIMENTALES

En este apartado se encuentra la caracterización de todos aquellos compuestos utilizados en el presente capítulo que no han sido adquiridos comercialmente, excepto los ésteres **21-23c**, los cuales se prepararon y se analizaron sólo por CG-MS. Nuestro único interés en estos compuestos estaba focalizado en corroborar su formación en el sistema bienzimático, por ello no nos detuvimos más en su análisis. Los criterios de caracterización para el resto de compuestos son los mismos que los utilizados en el Capítulo 1.

(±)-2-Fenilpentan-3-ona, (±)-18a<sup>218</sup>



Aceite incoloro

**Rendimiento:** 60%

**Fórmula empírica:** C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O

**Peso Molecular:** 162.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (90% Hexano/AcOEt): 0.40

**IR** (KBr): 3028, 2978, 1715, 1600, 1494, 1453, 1267 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.01 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, 3H<sub>a</sub>), 1.55 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.9 Hz, 3H<sub>e</sub>), 2.38-2.45 (m, 2H<sub>b</sub>), 3.81 (c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.9 Hz, 1H<sub>d</sub>), 7.25-7.37 (m, 5H<sub>g,h,i</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 7.9 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 17.4 (CH<sub>3</sub>, C<sub>e</sub>), 34.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 52.6 (CH, C<sub>d</sub>), 127.0 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 127.7 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 128.8 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 140.8 (C<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 211.5 (C=O, C<sub>c</sub>)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, m/z): 163 [(M+H)<sup>+</sup>, 100%]

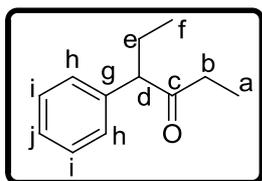
---

---

(±)-4-Fenilhexan-3-ona, (±)-19a<sup>222</sup>

---

---



Aceite incoloro

**Rendimiento:** 63%

**Fórmula empírica:** C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O

**Peso Molecular:** 176.3 g/mol

**R<sub>f</sub>** (90% Hexano/AcOEt): 0.52

**IR** (KBr): 3056, 2968, 1712, 1600, 1493, 1454, 1266 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 0.80 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.3 Hz, 3H<sub>f</sub>), 0.98 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.3 Hz, 3H<sub>a</sub>), 1.68-1.78 (m, 1H<sub>e</sub>), 2.04-2.13 (m, 1H<sub>e</sub>), 2.32-2.49 (m, 2H<sub>b</sub>), 3.55 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.5 Hz, 1H<sub>d</sub>), 7.22-7.36 (m, 5H<sub>h,i,j</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 7.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 12.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>f</sub>), 25.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>e</sub>), 35.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 60.4 (CH, C<sub>d</sub>), 127.0 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>j</sub>), 128.2 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 128.7 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 139.1 (C<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 211.2 (C=O, C<sub>c</sub>)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 177 [(M+H)<sup>+</sup>, 100%]

---

---

(S)-4-Fenilhexan-3-ona, (S)-19a

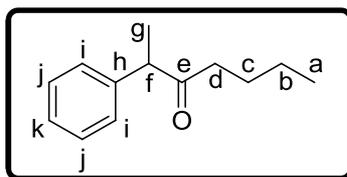
---

---

**Rendimiento:** 81%

<sup>222</sup> Compuesto accesible comercialmente.

**(±)-2-Fenilheptan-3-ona, (±)-20a<sup>90</sup>**



Aceite incoloro

**Rendimento:** 60%

**Fórmula empírica:** C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O

**Peso Molecular:** 190.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (90% Hexano/AcOEt): 0.37

**IR** (KBr): 3055, 2986, 1712, 1596, 1423, 1266 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 0.77 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.3 Hz, 3H<sub>a</sub>), 1.08-1.20 (m, 2H<sub>b</sub>), 1.34 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 3H<sub>g</sub>), 1.39-1.46 (m, 2H<sub>c</sub>), 2.31 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.3 Hz, 2H<sub>d</sub>), 3.71 (c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.9 Hz, 1H<sub>f</sub>), 7.16-7.31 (m, 5H<sub>i,j,k</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 13.7 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 17.4 (CH<sub>3</sub>, C<sub>g</sub>), 22.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 25.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 40.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 52.9 (CH, C<sub>f</sub>), 127.0 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 127.8 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>k</sub>), 128.8 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>j</sub>), 140.7 (C<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 211.0 (C=O, C<sub>e</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 190 (M<sup>+</sup>, 11%), 105 (81), 85 (100)

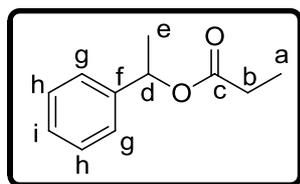
---

---

(±)-Propionato de 1-feniletilo, (±)-18b<sup>223</sup>

---

---



Aceite incoloro

**Rendimiento:** 62%

**Fórmula empírica:** C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 178.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (90% Hexano/AcOEt): 0.40

**IR** (KBr): 3061, 2983, 1732, 1605, 1495, 1266 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.06 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, 3H<sub>a</sub>), 1.45 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.6 Hz, 3H<sub>e</sub>), 2.22-2.31 (m, 2H<sub>b</sub>), 5.81 (c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.6 Hz, 1H<sub>d</sub>), 7.17-7.27 (m, 5H<sub>g,h,i</sub>)

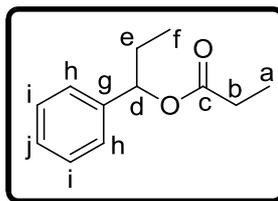
**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 9.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 22.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>e</sub>), 27.8 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 72.0 (CH, C<sub>d</sub>), 126.0 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 127.7 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 128.4 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 141.8 (C<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 173.6 (C=O, C<sub>c</sub>)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, m/z): 179 [(M+H)<sup>+</sup>, 100%]

---

<sup>223</sup> Barbero, M.; Cadamuro, S.; Dughera, S.; Venturello, P. *Synthesis* **2008**, 3625-3632.

**(±)-Propionato de 1-fenilpropilo, (±)-19b<sup>224</sup>**



Aceite incoloro

**Rendimiento:** 63%

**Fórmula empírica:** C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 192.3 g/mol

**R<sub>f</sub>** (90% Hexano/AcOEt): 0.50

**IR** (KBr): 3059, 2975, 1732, 1604, 1494, 1266 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 0.89 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.3 Hz, 3H<sub>f</sub>), 1.14 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.6 Hz, 3H<sub>a</sub>), 1.77-1.97 (m, 2H<sub>e</sub>), 2.32-2.41 (m, 2H<sub>b</sub>), 5.68 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.5 Hz, 1H<sub>d</sub>), 7.27-7.35 (m, 5H<sub>h,i,j</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 9.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>f</sub>), 9.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 27.8 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>e</sub>), 77.0 (CH, C<sub>d</sub>), 126.4 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 127.7 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>j</sub>), 128.3 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 140.6 (C<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 173.8 (C=O, C<sub>c</sub>)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 193 [(M+H)<sup>+</sup>, 100%]

**(S)-Propionato de 1-fenilpropilo, (S)-19b**

**Rendimiento:** 86%

<sup>224</sup> Birman, V.; Jiang, H. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 3445-3447.

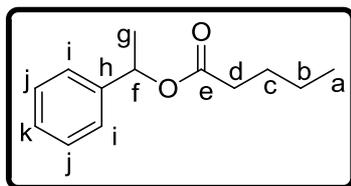
---

---

(±)-Pentanoato de 1-feniletilo, (±)-20b<sup>90</sup>

---

---



Aceite incoloro

**Rendimiento:** 43%

**Fórmula empírica:** C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 206.3 g/mol

**R<sub>f</sub>** (90% Hexano/AcOEt): 0.40

**IR** (KBr): 3055, 2986, 1729, 1423, 1265 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 0.82 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 3H<sub>a</sub>), 1.18-1.32 (m, 2H<sub>b</sub>), 1.45 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.6 Hz, 3H<sub>g</sub>), 1.50-1.60 (m, 2H<sub>c</sub>), 2.22-2.27 (m, 2H<sub>d</sub>), 5.81 (c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.6 Hz, 1H<sub>f</sub>), 7.18-7.27 (m, 5H<sub>i,j,k</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 13.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 22.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>g</sub>), 22.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 27.0 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 34.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 71.9 (CH, C<sub>f</sub>), 126.0 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 127.7 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>k</sub>), 128.4 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>j</sub>), 141.8 (C<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 173.0 (C=O, C<sub>e</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, m/z): 206 (M<sup>+</sup>, 9%), 122 (83), 105 (100), 85 (25)

## **CAPÍTULO 3**

***Resolución cinética  
dinámica de  $\beta$ -  
cetoésteres  $\alpha$ -sustituidos  
catalizada por BVMOs:  
Síntesis de  
 $\alpha$ -hidroxiésteres quirales***



Las BVMOs han sido ampliamente utilizadas en la desimetrización o resolución cinética, tanto clásica como dinámica, de cetonas cíclicas y bicíclicas,<sup>104,107,108</sup> así como cetonas alifáticas lineales<sup>52,225</sup> y alquil bencil cetonas.<sup>88,90</sup> Recientemente, se ha ampliado el espectro de sustrato de estos biocatalizadores, ya que se ha visto que son capaces de oxidar cetonas que presentan grupos electrón-dadores en posición  $\beta$ , como  $\beta$ -hidroxicetonas y  $\beta$ -aminocetonas, precursores de 1,2-dioles,  $\beta$ -aminoácidos y  $\beta$ -aminoalcoholes. De esta manera se ha extendido la aplicación de las BVMOs en la síntesis de compuestos biológicamente activos de elevado interés.

### 3.1. BVMOs COMO BIOCATALIZADORES EN LA SÍNTESIS DE 1,2-DIOLES

Los 1,2-dioles enantiopuros son intermedios de gran valor en la síntesis de compuestos con actividad biológica y en productos naturales, como por ejemplo, la ingramicina y la tienamicina.<sup>226</sup> Son compuestos muy versátiles fácilmente transformables en epóxidos quirales,<sup>227</sup> aziridinas y aminoalcoholes.<sup>228</sup> Además, poseen un gran interés en la industria química para la preparación de poliésteres ópticamente activos,<sup>229</sup> y disolventes quirales,<sup>230</sup> y en la industria farmacéutica, ya que se usan como agentes antimicrobianos.<sup>231</sup> Asimismo, son muy útiles como auxiliares quirales y ligandos en hidrogenaciones asimétricas.<sup>232</sup>

<sup>225</sup> (a) Rehdorf, J.; Kirschner, A.; Bornscheuer, U. T. *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29*, 1393-1398; (b) Völker, A.; Kirschner, A.; Bornscheuer, U. T.; Altenbuchner, J. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *77*, 1251-1260.

<sup>226</sup> (a) Rao, A. V. R.; Bose, D. S.; Gurjar, M. K.; Ravindranathan, T. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 7031-7040; (b) Wright, A. E.; Schäfer, M.; Midland, S.; Munnecke, D. E.; Sims, J. J. *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 5699-5702.

<sup>227</sup> Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 10515-10530.

<sup>228</sup> (a) Lohray, B. B.; Ahuja, J. R. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 95-97; (b) Nicolaou, K. C.; Huang, X.; Snyder, S. A.; Rao, P. B.; Bella, M.; Reddy, M. V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 834-838.

<sup>229</sup> (a) Spassky, N.; Sigwalt, P. *Eur. Polym. J.* **1971**, *7*, 7-16; (b) Rao, A. V. R.; Bose, D. S.; Gurjar, M. K.; Ravindranathan, T. *Tetrahedron* **1989**, *22*, 7031-7040.

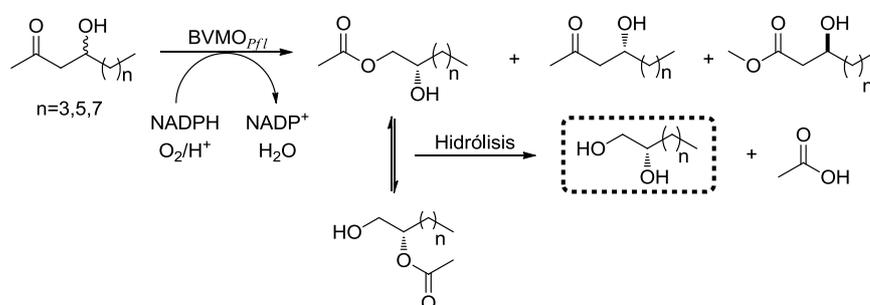
<sup>230</sup> Smith, A. A.; Haines, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 6280-6284.

<sup>231</sup> Parida, S.; Dordick, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2253-2259.

<sup>232</sup> Hayashi, T.; Tanaka, M.; Ogata, I. *Tetrahedron Lett.* **1977**, *3*, 295-296.

### Capítulo 3

Entre los numerosos métodos para la preparación de estos compuestos, recientemente se ha descrito una estrategia biocatalítica a través de la resolución cinética de una serie de ( $\pm$ )-4-hidroxi-2-cetonas alifáticas empleando células de *E. coli* recombinantes que expresan el gen de una BVMO procedente de *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106 (BVMO<sub>Pfl</sub>) (Figura 3.1).<sup>233</sup> En general, los procesos oxidativos permitieron la obtención de los correspondientes acetatos de (*S*)-hidroxialquilo con buenas conversiones ( $c \geq 40\%$ ) y enantioselectividades ( $E \approx 50$ ). Aquellos derivados con una cadena alquílica más larga experimentaron biotransformaciones más rápidas. Así, en la oxidación de la ( $\pm$ )-4-hidroxi-2-dodecanona se alcanzó una conversión cercana al 50% en dos horas, mientras que para la de la ( $\pm$ )-4-hidroxi-2-octanona se necesitaron ocho horas. Aunque no es relevante para la pureza óptica del producto final, se observa una migración del grupo acetilo del alcohol primario al secundario, formándose una mezcla 4:1 de los correspondientes dioles monoacetilados. Sólo se obtuvieron pequeñas cantidades (<5%) del producto no esperado o anormal de la oxidación de Baeyer-Villiger, el correspondiente éster de metilo, por lo que la reacción fue altamente regioselectiva.



**Figura 3.1.** Resolución cinética de ( $\pm$ )-4-hidroxi-2-cetonas catalizada por una BVMO procedente de *Pseudomonas fluorescens* DSM 50106 expresada en *E. coli*.

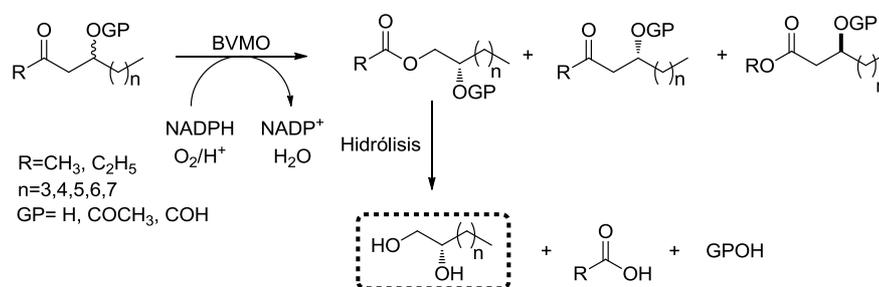
Este proceso se extendió a la oxidación de otras  $\beta$ -hidroxicetonas, tanto ( $\pm$ )-4-hidroxi-2-cetonas como ( $\pm$ )-5-hidroxi-3-cetonas, catalizada por once BVMOs procedentes de diferentes microorganismos (Figura 3.2).<sup>234</sup> Los enzimas que mostraron mejores actividades para este tipo de sustratos fueron la CHMO<sub>Acineto</sub>, la CHMO<sub>Brevi2</sub>, la CHMO<sub>Rhodo2</sub>, la CHMO<sub>Xantho</sub>, la CPMO<sub>Coma</sub> y la BVMO<sub>Pfl</sub>. Todos estos biocatalizadores oxidaron el enantiómero *S* de la cetona de partida, quedando remanente el enantiómero *R*.

<sup>233</sup> Kirschner, A.; Bornscheuer, U. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7004-7006.

<sup>234</sup> Rehdorf, J.; Kengar, A.; Bornscheuer, U. T.; Mihovilovic, M. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3739-3743.

En general la mayor actividad enzimática se observó con las  $\beta$ -hidroxicetonas de menor cadena alquílica, obteniéndose muy buenas enantioselectividades ( $E > 150$ ) para el grupo “CHMO” en las oxidaciones de las ( $\pm$ )-4-hidroxi-2-cetonas.

La protección del grupo hidroxilo antes de la biotransformación provoca una disminución de la actividad enzimática para el grupo “CHMO”. De nuevo en los ésteres de (*S*)-hidroxialquilo se produjo la migración del grupo acilo del alcohol primario al secundario, sin verse afectada la enantioselectividad. Los productos finales sufrieron una hidrólisis en el medio tras 24 horas de reacción, dando lugar a los correspondientes (*S*)-1,2-dioles con conversiones moderadas ( $c \leq 40\%$ ). Finalmente se observó que la posición del grupo carbonilo afectaba a la regioselectividad de la oxidación. Así, en la resolución cinética de las ( $\pm$ )-5-hidroxi-3-cetonas se generó también el éster anormal, variando su proporción en función del biocatalizador escogido. Por ejemplo, la  $\text{CPMO}_{\text{Coma}}$  catalizó de manera enantioselectiva la oxidación de la ( $\pm$ )-5-hidroxi-3-nonanona generando un 50% del (*S*)-éster normal, mientras que la  $\text{BVMO}_{\text{Pfl}}$  catalizó este proceso sin enantioselectividad, formándose mayoritariamente el (*S*)-éster no esperado.



**Figura 3.2.** Resolución cinética de cetonas lineales  $\beta$ -sustituidas usando BVMOs recombinantes.

### 3.2. BVMOs COMO BIOCATALIZADORES EN LA SÍNTESIS DE $\beta$ -AMINOÁCIDOS Y $\beta$ -AMINOALCOHOLES

Los  $\beta$ -aminoácidos son precursores de  $\beta$ -péptidos, alcaloides, terpenoides y antibióticos  $\beta$ -lactámicos, lo que les confiere un gran interés desde un punto de vista farmacológico.<sup>235</sup> En particular, los  $\beta$ -péptidos son compuestos con gran potencial debido a su alta estabilidad frente a enzimas proteolíticas.

<sup>235</sup> *Enantioselective Synthesis of  $\beta$ -Amino Acids*. Eds. Juaristi, E; Soloshonok, V. A. Wiley-VCH, Nueva York 2005.

Asimismo, los  $\beta$ -aminoalcoholes son moléculas clave en la síntesis de numerosos fármacos, como la efredina, el cloranfenicol, el pronetalol, la adrenalina y la noradrenalina.<sup>236</sup> También se encuentran presentes en pinturas y materiales de revestimientos. Además poseen aplicación como agentes quirales en síntesis asimétrica.<sup>237</sup>

Recientemente se ha descrito la síntesis de estos compuestos mediante la oxidación de  $\beta$ -aminocetonas catalizada por células de *E. coli* recombinantes que expresan el gen de la CDMO y de CHMOs provenientes de varios microorganismos.<sup>238</sup> Estos enzimas muestran regiodivergencia frente a un gran número de sustratos, por ello son *a priori* adecuados para estos procesos, ya que la síntesis de los  $\beta$ -aminoalcoholes se produce a través de la formación del éster esperado de la cetona y su posterior hidrólisis, mientras que la síntesis de los  $\beta$ -aminoácidos *N*-protegidos transcurre a través de la hidrólisis del éster anormal.

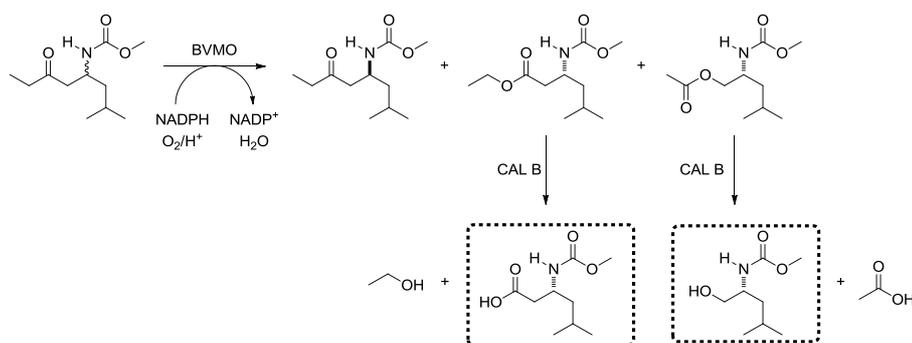
En dicho estudio se analizó la oxidación del ( $\pm$ )-(2-dimetil-6-oxooctan-4-il)carbamato de metilo catalizada por una serie de BVMOs (Figura 3.3), observando que sólo cuatro biocatalizadores mostraron actividad con este sustrato, las células que expresan la CDMO de *Rhodococcus ruber* SC1, la CHMO<sub>Arthro</sub>, la CHMO<sub>Brachy</sub> y la CHMO<sub>Xantho</sub>. En todos los casos se obtuvieron mezclas de ambos ésteres regioisoméricos con muy buenas enantioselectividades, excepto para la oxidación catalizada por la CDMO, donde el éster normal se obtuvo con baja enantioselectividad. Además, este enzima posee una enantiopreferencia opuesta al resto de las CHMOs estudiadas, oxidando la (+)-cetona, lo que posibilita la obtención de ambos enantiómeros del éster anormal con alta pureza óptica mediante la elección del biocatalizador (CDMO o grupo “CHMO”). A pesar de que las enantioselectividades obtenidas fueron en general muy buenas, las actividades de estos enzimas frente a este sustrato fueron de bajas a moderadas. El estudio se extendió al derivado con el grupo amino sin proteger, la ( $\pm$ )-5-amino-7-dimetiloctan-3-ona, sin embargo no se obtuvo producto final en ninguna de las biooxidaciones. Finalmente se escaló la oxidación catalizada por la CDMO, aislándose ambos ésteres regioisoméricos. Éstos fueron posteriormente hidrolizados mediante la lipasa de *Candida antarctica* B, generándose la  $\beta$ -leucina y el  $\beta$ -amino-4-metil-1-pentanol *N*-protegidos, con rendimientos del 33% y 90%, respectivamente.

---

<sup>236</sup> Bergmeier, S. C. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 2561-2576.

<sup>237</sup> Ager, D. J.; Prakash, I.; Schaad, D. R. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 835-875.

<sup>238</sup> Rehdorf, J.; Mihovilovic, M. D.; Bornscheuer, U. T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 4506-4508.



**Figura 3.3.** Síntesis enzimática de β-amino-4-metil-1-pentanol y β-leucina N-protectados, combinando una oxidación de Baeyer-Villiger enzimática con una hidrólisis catalizada por la lipasa de *Candida antarctica* B.

Este estudio fue completado con nuevos sustratos (Figura 3.4), llevando a cabo la oxidación de (±)-4-amino-2-cetonas y (±)-5-amino-3-cetonas protegidas en el grupo amino como carbamato de metilo mediante el uso de las BVMOs empleadas en la oxidación de las hidroxicetonas.<sup>239</sup> Se observó que diez de los enzimas biocatalizaron estos procesos (además de los cuatro previamente mencionados, la HAPMO, wtPAMO, CHMO<sub>Acineto</sub>, CHMO<sub>Rhodo1</sub>, CHMO<sub>Rhodo2</sub> y CHMO<sub>Brevil</sub>) mientras que seis no mostraron actividad alguna. Las (±)-4-amino-2-cetonas con cadenas lineales cortas y con un grupo fenilo eran los mejores sustratos en cuanto a conversión y enantioselectividad, generándose en todos los casos los ésteres normales, mientras que si presentaban una cadena alquílica ramificada se obtenían estos ésteres con peores resultados. De nuevo varios enzimas mostraron un comportamiento enantiocomplementario en este tipo de oxidaciones, pudiendo obtener el enantiómero *R* o *S* del sustrato remanente o del éster normal dependiendo del enzima escogido.

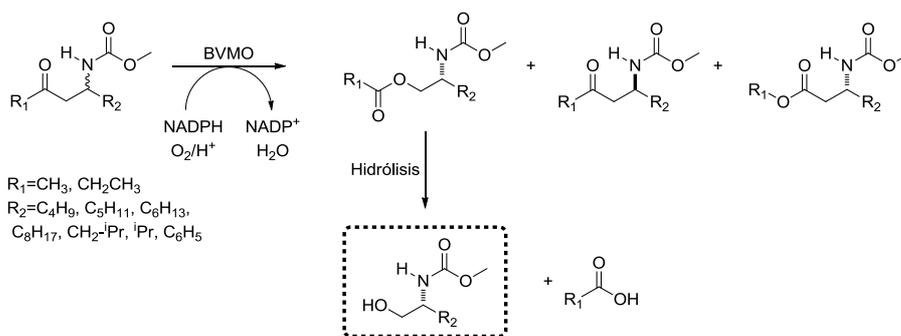
En la oxidación de las (±)-5-amino-3-cetonas con cadena alifática ramificada catalizada por las BVMOs se observó regiodivergencia, formándose el éster normal y anormal con una alta pureza óptica pero con baja conversión. La CHMO<sub>Arthro</sub> fue el enzima que mostró una mayor actividad con este tipo de sustratos, obteniéndose una conversión moderada. Sorprendentemente todas las BVMOs estudiadas mostraron una alta actividad con el (±)-(3-oxo-1-fenilbutil)carbamato de metilo, excepto la HAPMO, que oxida preferentemente cetonas aromáticas.

<sup>239</sup> Rehdorf, J.; Mihovilovic, M. D.; Fraaije, M. W.; Bornscheuer, U. T. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 9525-9535.

### Capítulo 3

La wtPAMO catalizó esta oxidación con la mayor selectividad, generándose un 50% de (+)-éster normal de forma enantiopura. De nuevo es posible alcanzar ambos enantiómeros del producto, ya que la wtPAMO muestra una enantioselectividad opuesta al resto de las CHMOs.

Finalmente los acetatos y etanoatos de  $\beta$ -aminoalquilo generados experimentaron al cabo de 30 y 42 horas hidrólisis en el medio de reacción para dar los correspondientes  $\beta$ -aminoalcoholes *N*-protegidos. En general los rendimientos obtenidos dependieron de la estructura del sustrato y variaron desde un 8% hasta un 56%.



**Figura 3.4.** Resolución cinética de  $\beta$ -aminocetonas *N*-protegidas catalizada por BVMOs.

### 3.3. $\alpha$ -HIDROXIÉSTERES Y $\alpha$ -HIDROXIÁCIDOS

Los  $\alpha$ -hidroxiésteres son compuestos muy versátiles con aplicación en la industria química y alimentaria (principalmente como conservantes y aromatizantes). Además la industria farmacéutica ha mostrado un gran interés en la síntesis de estos compuestos, ya que forman parte de antibióticos, fármacos con propiedades anticancerígenas (camptotecina) y otros compuestos biológicamente activos.<sup>240</sup>

También son empleados como intermedios para la preparación de compuestos de alto valor añadido.<sup>241</sup> Así, los  $\alpha$ -hidroxiésteres pueden ser

<sup>240</sup> (a) Skaddan, M. B.; Kilbourn, M. R.; Snyder, S. E.; Sherman, P. S.; Desmond, T. J.; Frey, K. A. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4552-4562; (b) Zha, C.; Brown, G. B.; Brouillette, W. J. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6519-6528; (c) Tokuda, O.; Kano, T.; Gao, W.-G.; Ikemoto, T. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5103-5105; (d) Tangirala, R. S.; Antony, S.; Agama, K.; Pommier, Y.; Anderson, B. D.; Bevins, R.; Curran, D. P. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6202-6212.

<sup>241</sup> Hasegawa, J.; Nagashima, N. en *Stereoselective Biocatalysis*. Ed. Patel, R. N. Marcel Dekker, Nueva York **2000**, 343-363.

hidrolizados a  $\alpha$ -hidroxiácidos, derivados muy interesantes con gran aplicación en la industria química, farmacéutica y cosmética.<sup>242</sup> La mayor parte de los  $\alpha$ -hidroxiácidos se encuentran en la naturaleza. Algunos ejemplos son el ácido glicólico (caña de azúcar), ácido láctico (leche agria y jugo de tomate), ácido cítrico (naranja, limón y pomelo), ácido málico (manzanas), ácido tartárico (uvas y vinos), y la gluconolactona que es un importante metabolito que interviene en el proceso de renovación de las células de la piel.

El ácido láctico es muy usado en cosmética, ya que posee un bajo peso molecular, por lo que presenta una alta absorción cutánea. Este  $\alpha$ -hidroxiácido posee otras aplicaciones,<sup>243</sup> como por ejemplo su uso como monómero en la síntesis de polímeros biodegradables.<sup>243,244</sup> El ácido poliláctico es una alternativa más respetuosa con el medio ambiente que el plástico que proviene de materiales petroquímicos.<sup>245</sup> La Figura 3.5 muestra los derivados más importantes del ácido láctico. Entre estos podemos destacar:

- Lacturo: Monómero para producir ácido poliláctico y otros copolímeros que son alternativas biodegradables a los plásticos y pueden ser usados en membranas artificiales y en dispositivos que liberan fármacos en el cuerpo humano (*drug delivery devices*).
- 1,2-propanodiol: Compuesto usado como disolvente en la producción de resinas de poliéster, fármacos y cosméticos, así como anticongelante.
- Ácido acrílico: Intermedio para la síntesis de acrilato. Empleado en el tratamiento de papel, cuero, fibras y detergentes, además de ser material de revestimiento.
- Ácido pirúvico y derivados: Compuestos cuya demanda comercial ha aumentado debido a su uso como precursores en la síntesis de fármacos y agroquímicos.

<sup>242</sup> (a) *Chiral  $\alpha$ -Hydroxy Acids in Enantioselective Synthesis*. Eds. Coppola, G. M.; Schuster, H. F. Wiley-VCH, Weinheim **1997**; (b) Corma, A.; Iborra, S.; Velty, A. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2411-2502.

<sup>243</sup> (a) Lipinsky, E. S.; Sinclair, R. G. *Chem. Eng. Prog.* **1986**, *82*, 26-32; (b) Datta, R.; Tsai, S. P.; Bonsignore, P.; Moon, S. H.; Frank, J. R. *FEMS Microbiol. Rev.* **1995**, *16*, 221-231.

<sup>244</sup> Buchta, K. *Biotechnology* **1983**, *3*, 409-417.

<sup>245</sup> Lunt, J. *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, *59*, 145-152.

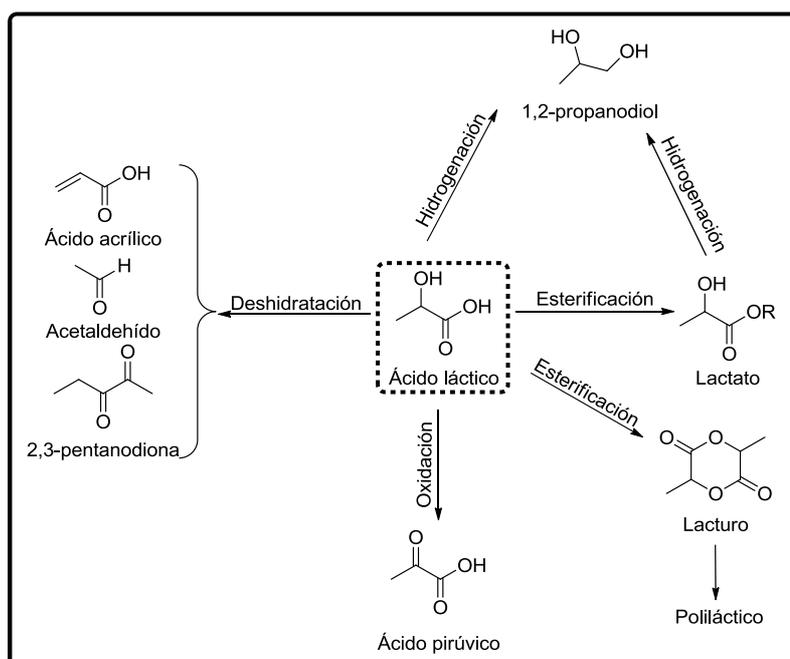


Figura 3.5. Derivados del ácido láctico más importantes.

Los  $\alpha$ -hidroxiésteres acilados son compuestos de elevado interés, muestra de ello son, por ejemplo, los precursores de derivados del ácido tetrónico (Figura 3.6), los cuales se encuentran presentes en numerosos productos naturales con actividad biológica, como el ácido ascórbico y el pulvínico.<sup>246</sup>

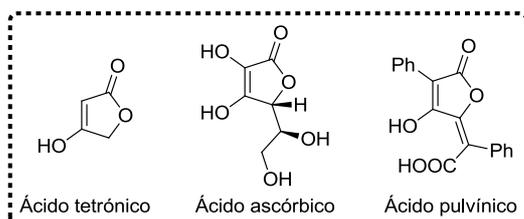
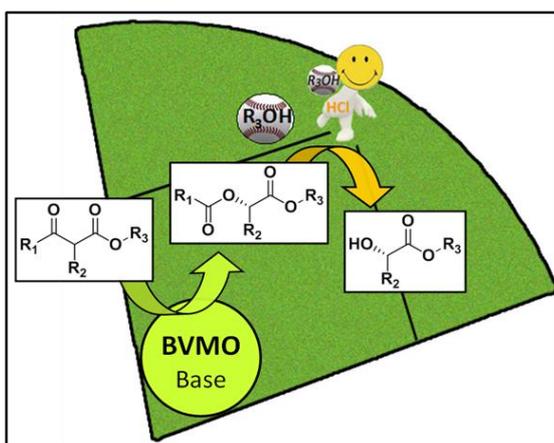


Figura 3.6. Estructuras del ácido tetrónico y alguno de sus derivados.

<sup>246</sup> (a) Desage-El Murr, M.; Nowaczyk, S.; Le Gall, T.; Mioskowski, C.; Amekraz, B.; Moulin, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1289-1293; (b) Tejedor, D.; Garcia-Tellado, F. *Org. Prep. Proced. Int.* **2004**, *36*, 33-59; (c) Zografos, A. L.; Georgiadis, D. *Synthesis* **2006**, 3157-3188.

Debido al elevado interés que poseen los  $\alpha$ -hidroxiésteres y sus derivados acilados, en este capítulo nos hemos planteado su síntesis de manera biocatalítica. Para ello se llevará a cabo la resolución cinética de  $\beta$ -cetoésteres  $\alpha$ -sustituidos catalizada por BVMOs. Diferentes parámetros de reacción como la temperatura, el pH, la concentración de sustrato o el medio de reacción serán optimizados para obtener las mayores actividades y selectividades. Finalmente, se escalarán las reacciones con objeto de aislar los  $\alpha$ -hidroxiésteres acilados para, posteriormente, llevar a cabo su hidrólisis y generar los correspondientes  $\alpha$ -hidroxiésteres.





### **3.4. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE ( $\pm$ )- $\beta$ -CETOÉSTERES $\alpha$ -SUSTITUIDOS**

#### **3.4.1. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE ( $\pm$ )-2-METIL-3-OXOBUTAN- Y -PENTAN-OATOS DE ALQUILO**

Inicialmente, nos hemos planteado la oxidación de una serie de ( $\pm$ )-2-metil-3-oxobutanoatos de alquilo catalizada por la HAPMO, la *w*tPAMO y la PAMO<sub>M446G</sub>. Las reacciones se realizaron en disolución tampón 50 mM Tris/HCl pH 8.0 y pH 9.0, con G6P/G6PDH como sistema de regeneración de NADPH. Al igual que en el resto de capítulos, la temperatura inicial para los dos biocatalizadores PAMO fue de 30°C y para la HAPMO de 20°C. Como refleja la Tabla 3.1, todas las oxidaciones de estos compuestos son altamente enantioselectivas, generándose los correspondientes (*S*)-ésteres con una pureza óptica excelente. Sin embargo, las biotransformaciones a pH 8.0 (entradas impares) tienen menores conversiones que las realizadas a pH 9.0 (entradas pares). Es más, a este pH algunas reacciones superan el 50% de conversión formándose el (*S*)-éster enantiopuro. Este hecho no es de extrañar, debido a que la estructura del ( $\pm$ )- $\alpha$ -alquil- $\beta$ -cetoéster posee un hidrógeno ácido, por lo que es posible su racemización espontánea, produciéndose una resolución cinética dinámica que nos permitiría obtener el enantiómero *S* del éster con elevados excesos enantioméricos y

### Capítulo 3

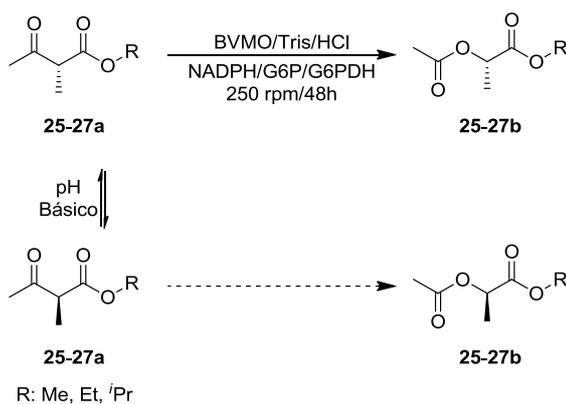
---

conversiones mayores del 50%. Además, en todas las reacciones realizadas en el presente capítulo, el sustrato de partida ha sido recuperado en su forma racémica.

El ( $\pm$ )-2-metil-3-oxobutanoato de metilo [( $\pm$ )-**25a**] no es un buen sustrato para la HAPMO en estas condiciones, ya que tras 48 horas tan sólo se obtuvo un 5% de producto (*S*)-**25b** (entradas 1 y 2) tanto a pH 8.0 como 9.0. En cambio, la *w*tPAMO fue capaz de catalizar la oxidación enzimática de este sustrato con conversiones moderadas o buenas. Se formó un 28% y un 62% de (*S*)-**25b**, a pH 8.0 y 9.0, respectivamente (entradas 3 y 4). La PAMO<sub>M446G</sub> presentó una menor actividad con este  $\beta$ -cetoéster que su cepa natural, alcanzándose tan solo un 15% de conversión a pH 9.0 (entrada 6).

En la oxidación de ( $\pm$ )-2-metil-3-oxobutanoato de etilo [( $\pm$ )-**26a**], tanto la HAPMO como la PAMO<sub>M446G</sub> generaron el diéster (*S*)-**26b** con conversiones de bajas a moderadas (desde 9% a 28%, como se observa en las entradas 7-8 y 11-12). Sin embargo, la oxidación catalizada por la *w*tPAMO permitió obtener un 90% de (*S*)-2-acetoxipropanoato de etilo [(*S*)-**26b**] cuando trabajamos a pH 9.0 (entrada 10), mientras que un pH menor conllevó un descenso en la conversión de la biotransformación (entrada 9). De la misma manera que ocurre con el sustrato ( $\pm$ )-**25a**, en la oxidación de ( $\pm$ )-2-metil-3-oxobutanoato de isopropilo [( $\pm$ )-**27a**] catalizada por la HAPMO, tan solo se obtuvo un 5% de producto (*S*)-**27b** tanto a pH 8.0 como 9.0 (entradas 13 y 14). La PAMO<sub>M446G</sub> mostró una actividad baja a pH 8.0 (*c*=13%, entrada 17) y moderada a pH 9.0 (*c*=36%, entrada 18). De nuevo la *w*tPAMO fue capaz de catalizar a pH 9.0 la oxidación completa de este sustrato a (*S*)-**27b** (entrada 16). Incluso a pH 8.0 se puede obtener un 72% del diéster (*S*)-**27b** (entrada 15). Por lo tanto, se observa que al aumentar el tamaño de la cadena alquílica del éster, se obtienen procesos oxidativos más rápidos catalizados por la *w*tPAMO, sin verse influenciada la selectividad del proceso.

**Tabla 3.1.** Resolución cinética dinámica de ( $\pm$ )-2-metil-3-oxobutanoatos de alquilo ( $\pm$ )-**25-27a** catalizada por BVMOs.



Entrada	Sustrato	Enzima	pH	ee(%) <sup>a</sup>	c(%) <sup>a</sup>
1	( $\pm$ )- <b>25a</b>	HAPMO	8.0	$\geq 99(S)$	5
2	( $\pm$ )- <b>25a</b>	HAPMO	9.0	$\geq 99(S)$	5
3	( $\pm$ )- <b>25a</b>	wtPAMO	8.0	$\geq 99(S)$	28
4	( $\pm$ )- <b>25a</b>	wtPAMO	9.0	$\geq 99(S)$	62
5	( $\pm$ )- <b>25a</b>	M446G	8.0	-	$\leq 3$
6	( $\pm$ )- <b>25a</b>	M446G	9.0	$\geq 99(S)$	15
7	( $\pm$ )- <b>26a</b>	HAPMO	8.0	$\geq 99(S)$	25
8	( $\pm$ )- <b>26a</b>	HAPMO	9.0	$\geq 99(S)$	28
9	( $\pm$ )- <b>26a</b>	wtPAMO	8.0	$\geq 99(S)$	28
10	( $\pm$ )- <b>26a</b>	wtPAMO	9.0	$\geq 99(S)$	90
11	( $\pm$ )- <b>26a</b>	M446G	8.0	$\geq 99(S)$	9
12	( $\pm$ )- <b>26a</b>	M446G	9.0	$\geq 99(S)$	25
13	( $\pm$ )- <b>27a</b>	HAPMO	8.0	$\geq 99(S)$	5
14	( $\pm$ )- <b>27a</b>	HAPMO	9.0	$\geq 99(S)$	5
15	( $\pm$ )- <b>27a</b>	wtPAMO	8.0	$\geq 99(S)$	72
16	( $\pm$ )- <b>27a</b>	wtPAMO	9.0	$\geq 99(S)$	$\geq 99$
17	( $\pm$ )- <b>27a</b>	M446G	8.0	$\geq 99(S)$	13
18	( $\pm$ )- <b>27a</b>	M446G	9.0	$\geq 99(S)$	36

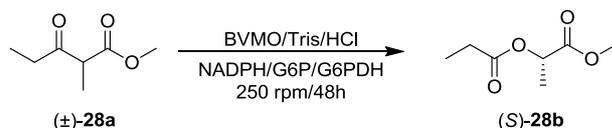
<sup>a</sup> Determinado por CG.

Las mismas condiciones de reacción se emplearon para la oxidación de ( $\pm$ )-2-metil-3-oxopentanoato de metilo [( $\pm$ )-**28a**]. Como muestra la Tabla 3.2, los resultados obtenidos con este sustrato no mejoran los obtenidos en la oxidación de los derivados ( $\pm$ )-2-metil-3-oxobutanoato. De nuevo se observan mayores conversiones a pH 9.0.

### Capítulo 3

Tras 48 horas, se obtuvo una conversión de baja a moderada en función del pH para la oxidación de este sustrato catalizada por la HAPMO (entradas 1 y 2). Hay que destacar que esta biotransformación a pH 9.0 no fue completamente enantioselectiva, generándose el diéster (*S*)-**28b** con un 82% de exceso enantiomérico (entrada 2). La PAMO<sub>M446G</sub> no mostró apenas actividad sobre este sustrato (entradas 5 y 6). De nuevo la *w*tPAMO fue el mejor biocatalizador para este tipo de sustratos, alcanzándose un 56% de (*S*)-2-propioniloxipropanoato de metilo [(*S*)-**28b**] con un 92% de exceso enantiomérico a pH 9.0 (entrada 4). Un descenso del pH conlleva de nuevo un decrecimiento en la conversión (*c*=36%) y, en este caso en concreto, también un descenso en la pureza óptica del diéster (*ee*=88%, entrada 3).

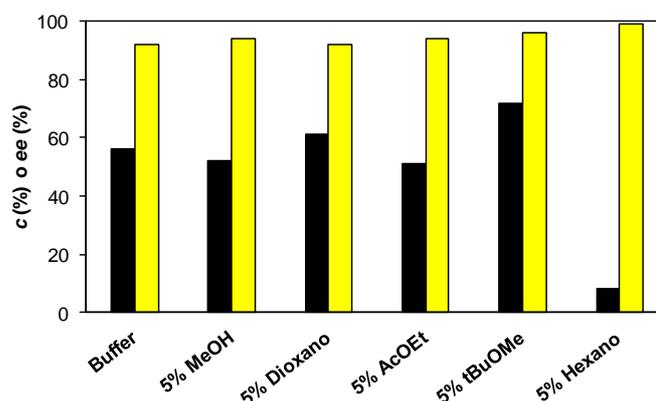
**Tabla 3.2.** Resolución cinética dinámica de ( $\pm$ )-2-metil-3-oxopentanoato de metilo [( $\pm$ )-**28a**] catalizada por BVMOs.



Entrada	Enzima	pH	<i>ee</i> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>a</sup>
1	HAPMO	8.0	≥99( <i>S</i> )	16
2	HAPMO	9.0	82( <i>S</i> )	30
3	<i>w</i> tPAMO	8.0	88( <i>S</i> )	36
4	<i>w</i> tPAMO	9.0	92( <i>S</i> )	56
5	M446G	8.0	-	≤3
6	M446G	9.0	≥99( <i>S</i> )	7

<sup>a</sup> Determinado por CG.

Con objeto de mejorar la conversión en la oxidación de ( $\pm$ )-**28a** catalizada por la *w*tPAMO a pH 9.0, procedimos a estudiar este proceso en presencia de distintos cosolventes, ya que habíamos visto el efecto positivo de utilizar medios no convencionales en el Capítulo 1 tanto para la HAPMO como para la PAMO<sub>M446G</sub>. Como se observa en la Figura 3.7, al añadir un 5% (v/v) de un disolvente hidrofílico como el 1,4-dioxano, se consiguió un ligero aumento en la conversión del proceso (*c*=61%), mientras que la pureza óptica se mantiene constante. Las reacciones con un 5% de metanol o acetato de etilo no mejoran la actividad del proceso, mientras que el mejor resultado se obtiene empleando un 5% de <sup>t</sup>BuOMe. De este modo, es posible generar un 72% del diéster (*S*)-**28b** con una pureza óptica del 96%. El uso de un 5% de hexano permite recuperar (*S*)-**28b** prácticamente enantiopuro, pero en una reacción con una conversión muy baja (*c*=8%).

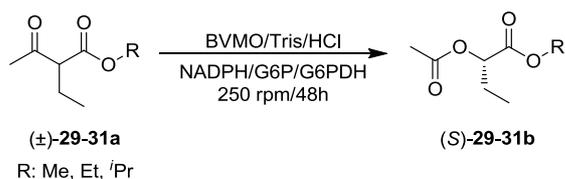


**Figura 3.7.** Efecto del medio de reacción en la biooxidación de  $(\pm)$ -2-metil-3-oxopentanoato de metilo  $[(\pm)$ -28a] catalizada por la *wt*PAMO. Se representa la conversión (■) y el exceso enantiomérico de  $(S)$ -28b (■).

### 3.4.2. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE $(\pm)$ -2-ETIL-3-OXOBUTANOATOS DE ALQUILO

Se ha llevado a cabo la biooxidación de una serie de  $(\pm)$ -2-etil-3-oxobutanoatos de alquilo empleando las BVMOs disponibles en las condiciones descritas al inicio del apartado 3.4.1. Como muestra la Tabla 3.3, de nuevo las biotransformaciones a pH 9.0 fueron más efectivas que a pH 8.0 (entradas pares e impares, respectivamente). Todos los sustratos fueron oxidados de forma totalmente enantioselectiva por los tres enzimas, mientras que se observaron variaciones en la conversión dependiendo de la estructura del sustrato. Así, las reacciones de Baeyer-Villiger de  $(\pm)$ -2-etil-3-oxobutanoato de metilo  $[(\pm)$ -29a] catalizadas por la HAPMO y la PAMO<sub>M446G</sub> son más lentas que las biooxidaciones de los derivados de etilo  $(\pm)$ -30b e isopropilo  $(\pm)$ -31b. La mayor conversión obtenida para la HAPMO fue de un 59% en la oxidación de  $(\pm)$ -2-etil-3-oxobutanoato de etilo a pH 9.0 (entrada 8), mientras la PAMO<sub>M446G</sub> generó un 85% de  $(S)$ -2-acetoxibutanoato de isopropilo  $[(S)$ -31b] enantiopuro (entrada 18). La *wt*PAMO mostró una alta actividad con los tres derivados, siendo capaz de transformar  $(\pm)$ -2-etil-3-oxobutanoato de metilo  $[(\pm)$ -29a] con una elevada conversión ( $c=89\%$ ) (entrada 4). Este enzima fue capaz de generar cuantitativamente los diésteres  $(S)$ -30b y  $(S)$ -31b (entradas 10 y 16) cuando trabajamos a pH 9.0. Incluso la oxidación de los sustratos  $(\pm)$ -29-31a catalizada por la *wt*PAMO a pH 8.0 dio lugar a conversiones mayores del 50% en todos los casos, llegándose a producir un 85% en el caso  $(S)$ -30b (entrada 9) cuando empleamos estas condiciones.

**Tabla 3.3.** Resolución cinética dinámica de ( $\pm$ )-2-etil-3-oxobutanoatos de alquilo ( $\pm$ )-**29-31a** catalizada por BVMOs.



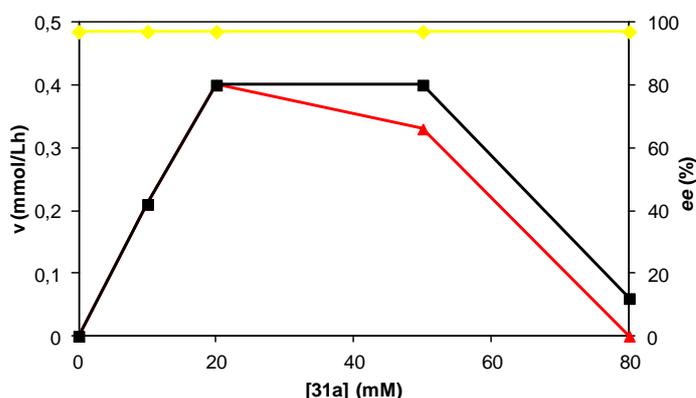
Entrada	Sustrato	Enzima	pH	<i>ee</i> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>
1	( $\pm$ )- <b>29a</b>	HAPMO	8.0	-	≤3
2	( $\pm$ )- <b>29a</b>	HAPMO	9.0	≥99( <i>S</i> )	37
3	( $\pm$ )- <b>29a</b>	<i>wt</i> PAMO	8.0	≥99( <i>S</i> )	65
4	( $\pm$ )- <b>29a</b>	<i>wt</i> PAMO	9.0	≥99( <i>S</i> )	89
5	( $\pm$ )- <b>29a</b>	M446G	8.0	≥99( <i>S</i> )	18
6	( $\pm$ )- <b>29a</b>	M446G	9.0	≥99( <i>S</i> )	39
7	( $\pm$ )- <b>30a</b>	HAPMO	8.0	-	≤3
8	( $\pm$ )- <b>30a</b>	HAPMO	9.0	≥99( <i>S</i> )	59
9	( $\pm$ )- <b>30a</b>	<i>wt</i> PAMO	8.0	≥99( <i>S</i> )	85
10	( $\pm$ )- <b>30a</b>	<i>wt</i> PAMO	9.0	≥99( <i>S</i> )	≥99
11	( $\pm$ )- <b>30a</b>	M446G	8.0	≥99( <i>S</i> )	25
12	( $\pm$ )- <b>30a</b>	M446G	9.0	≥99( <i>S</i> )	56
13	( $\pm$ )- <b>31a</b>	HAPMO	8.0	-	≤3
14	( $\pm$ )- <b>31a</b>	HAPMO	9.0	≥99( <i>S</i> )	46
15	( $\pm$ )- <b>31a</b>	<i>wt</i> PAMO	8.0	≥99( <i>S</i> )	68
16	( $\pm$ )- <b>31a</b>	<i>wt</i> PAMO	9.0	≥99( <i>S</i> )	≥99
17	( $\pm$ )- <b>31a</b>	M446G	8.0	≥99( <i>S</i> )	62
18	( $\pm$ )- <b>31a</b>	M446G	9.0	≥99( <i>S</i> )	85

<sup>a</sup> Determinado por HPLC.

<sup>b</sup> Determinada por CG.

A la vista de los buenos resultados obtenidos en las oxidaciones catalizadas por la *wt*PAMO, decidimos estudiar el efecto de la concentración de sustrato en la oxidación del β-cetoéster ( $\pm$ )-**31a**. La influencia de este parámetro en las propiedades del biocatalizador se analizó en dos medios de reacción: 1) Tris/HCl a pH 9.0 y 30°C; y 2) Tris/HCl con un 5% (v/v) de <sup>t</sup>BuOMe a pH 9.0 y 30°C. La elección de este disolvente se debió al aumento observado, tanto de la conversión como de la enantioselectividad, en la oxidación del sustrato ( $\pm$ )-**28a** catalizada por la *wt*PAMO. Como refleja la Figura 3.8, el exceso enantiomérico del diéster (*S*)-**31b** no se vio afectado por la concentración del sustrato ( $\pm$ )-**31a**, ya que se mantuvo constante (*ee*≥99) para ambos procesos.

La velocidad de reacción (expresada como mmol de ( $\pm$ )-**31a** consumidos por litro de disolución por hora) alcanzó un valor de  $0.4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  a una concentración de 20 mM en disolución tampón, mientras que la presencia de un 5% de *t*BuOMe permitió alcanzar una mayor velocidad a una concentración de 50 mM. A concentraciones mayores, la velocidad del proceso disminuyó pronunciadamente, de modo que con 80 mM no se observó reacción en medio acuoso, mientras que se convirtieron únicamente  $0.06 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  de ( $\pm$ )-**31a** cuando se llevó a cabo la reacción con 5% de *t*BuOMe.

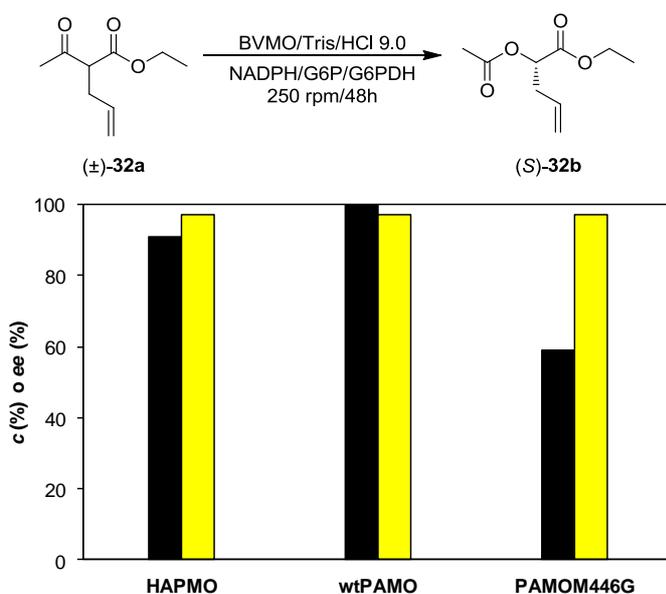


**Figura 3.8.** Efecto de la concentración de sustrato en la resolución cinética dinámica de ( $\pm$ )-2-etil-3-oxobutanoato de isopropilo [( $\pm$ )-**31a**] catalizada por la *w*PAMO. Se representa la velocidad de reacción en: disolución tampón Tris/HCl 50mM a pH 9.0 (▲) y disolución tampón Tris/HCl 50mM a pH 9.0 con 5% de *t*BuOMe (■), además del exceso enantiomérico de (*S*)-**31b** para ambos procesos (◆).

### 3.4.3. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE OTROS ( $\pm$ )- $\beta$ -CETOÉSTERES $\alpha$ -SUTITUIDOS QUE POSEEN GRUPOS MÁS VOLUMINOSOS

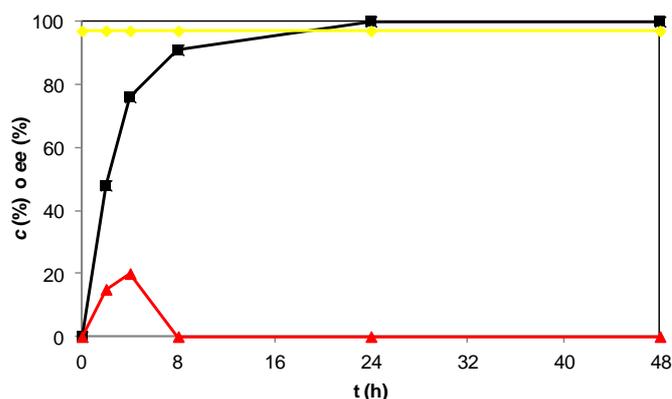
Continuamos nuestro estudio con la resolución cinética dinámica de ( $\pm$ )-2-acetilpenten-4-oato de etilo [( $\pm$ )-**32a**] catalizada por las tres BVMOs en disolución tampón 50 mM Tris/HCl pH 9.0 (Figura 3.9). Tanto la HAPMO como la *w*PAMO, demostraron ser biocatalizadores apropiados para este proceso. En ambos casos se generó de manera enantiopura el diéster (*S*)-**32b** con un 91% de conversión para la HAPMO y conversión cuantitativa para la *w*PAMO. En cambio la PAMO<sub>M446G</sub> mostró una menor actividad para este sustrato ( $c=57\%$ ), pero mantuvo la misma selectividad ( $ee \geq 99\%$ ). Así, se puede sintetizar de forma efectiva el diéster (*S*)-**32b**, un compuesto muy

interesante como intermedio para posteriores transformaciones, debido a que posee tres centros reactivos en su estructura.



**Figura 3.9.** Resolución cinética dinámica de (±)-**32a** catalizada por las tres BVMOs. Se representa la conversión (■) y el exceso enantiomérico del diéster (S)-**32b** (■).

La oxidación del β-cetoéster (±)-**32a** catalizada por la wtPAMO fue monitorizada en el tiempo. Como se observa en la Figura 3.10, la DKR fue muy rápida, superándose el 50% de conversión después de sólo 2 horas. El exceso enantiomérico del diéster (S)-**32b** fue excelente desde el inicio del proceso y permaneció inalterado a lo largo del mismo. En su fase inicial, la biooxidación de (±)-**32a** presenta el comportamiento típico de una resolución cinética clásica, donde la pureza óptica del β-cetoéster (S)-**32a** aumenta a medida que la wtPAMO oxida el enantiómero favorecido (R)-**32a**. El mayor exceso enantiomérico registrado para el sustrato fue de un 20% a conversiones cercanas a 50%. Tras 4 horas, esta pureza óptica disminuye recuperándose **32a** racémico a partir de las 8 horas. Se obtuvo una conversión cuantitativa del diéster enantiopuro (S)-**32b** tras 24 horas.

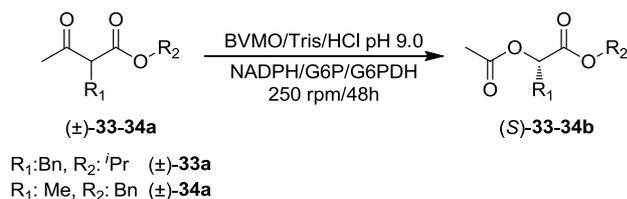


**Figura 3.10.** Seguimiento de la DKR de (±)-**32a** en el tiempo empleando la *wtPAMO*. Se representa la conversión (■) y los excesos enantioméricos de (S)-**32a** (▲) y (S)-**32b** (◆).

Finalmente se analizaron β-cetoésteres con un anillo aromático en su estructura. Como muestra la Tabla 3.4, la HAPMO no fue capaz de catalizar la oxidación de (±)-2-bencil-3-oxobutanoato de isopropilo [(±)-**33a**] (entrada 1), un resultado sorprendente para una BVMO principalmente activa en sustratos aromáticos. Por el contrario la *wtPAMO* generó el diéster (S)-**33b** con una conversión total y un moderado exceso enantiomérico (*ee*=51%) (entrada 2). Puesto que en ciertas ocasiones se ha observado que un descenso del pH conlleva un aumento en la enantioselectividad de esta BVMO en reacciones de Baeyer-Villiger, también se realizó la oxidación a pH 8.0. Sin embargo, sólo se produjo un ligero aumento en el exceso enantiomérico del producto final (*ee*=55%), pero acompañado de un severo descenso en la actividad enzimática (*c*=24%, entrada 3). Por su parte, la  $PAMO_{M446G}$  fue capaz de resolver este sustrato con una alta conversión (*c*=75%) y un moderado exceso enantiomérico (*ee*=60%, entrada 4), el mayor obtenido para este β-cetoéster.

Mejores resultados se alcanzaron en la oxidación de (±)-2-metil-3-oxobutanoato de bencilo [(±)-**34a**]. Para los tres enzimas el diéster (S)-**34b** fue obtenido de forma enantiopura. Tanto la HAPMO como la *wtPAMO* catalizaron la oxidación de modo cuantitativa (entradas 5 y 6), mientras que la  $PAMO_{M446G}$  mostró una actividad bastante baja (*c*=22%, entrada 7).

**Tabla 3.4.** Resolución cinética dinámica de (±)-2-bencil-3-oxobutanoato de isopropilo y (±)-2-metil-3-oxobutanoato de bencilo [(±)-**33-34a**] catalizada por BVMOs.



Entrada	Sustrato	Enzima	ee(%) <sup>a</sup>	c(%) <sup>b</sup>
1	(±)- <b>33a</b>	HAPMO	-	≤3
2	(±)- <b>33a</b>	<i>wt</i> PAMO	51( <i>S</i> )	≥99
3 <sup>c</sup>	(±)- <b>33a</b>	<i>wt</i> PAMO	55( <i>S</i> )	24
4	(±)- <b>33a</b>	M446G	60( <i>S</i> )	75
5	(±)- <b>34a</b>	HAPMO	≥99( <i>S</i> )	≥99
6	(±)- <b>34a</b>	<i>wt</i> PAMO	≥99( <i>S</i> )	≥99
7	(±)- <b>34a</b>	M446G	≥99( <i>S</i> )	22

<sup>a</sup> Determinado por HPLC.

<sup>b</sup> Determinada por CG.

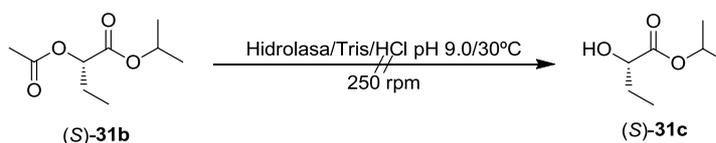
<sup>c</sup> pH 8.0.

### 3.5. SÍNTESIS DE $\alpha$ -HIDROXIÉSTERES

Realizada la síntesis de los  $\alpha$ -hidroxiésteres acilados con elevadas conversiones y excesos enantioméricos para la mayoría de los compuestos, se procedió a su escalado. Así, se llevó a cabo la oxidación con 50 mg de producto de partida empleando la *wt*PAMO como biocatalizador, lo que permitió aislar los productos finales con rendimientos de moderados a buenos (55-76%) y sin modificaciones en la enantioselectividad respecto a las reacciones en pequeña escala. Una vez aislados los  $\alpha$ -hidroxiésteres acilados, el siguiente paso fue su conversión en los correspondientes  $\alpha$ -hidroxiésteres ópticamente puros. Inicialmente se emplearon una serie de hidrolasas comercialmente disponibles, con el fin de catalizar la hidrólisis selectiva de los grupos acetilo o propionilo de los diésteres. Se utilizó como sustrato modelo el diéster (*S*)-**31b**, escogiendo como medio de reacción una disolución tampón 50 mM Tris/HCl pH 9.0 a 30°C, para, una vez optimizada la hidrólisis, intentar llevar a cabo una reacción secuencial desde el  $\beta$ -cetoéster con la BVMO y la lipasa, sin necesidad de aislar el diéster. Sin embargo, como se muestra en las entradas 1-6 de la Tabla 3.5, no se observó hidrólisis con la mayoría de las hidrolasas probadas (la lipasa de *Candida rugosa* (CRL), la esterasa de hígado de cerdo (PLE), la proteasa subtilisina Calsberg, la CAL-B y las lipasas de *Pseudomonas fluorescens* AK y de

*Pseudomonas amano* IM). Para la lipasa tipo A de *Candida antartica* (CAL-A), la lipasa de *Pseudomonas amano* SD y la lipasa de páncreas porcino (PPL) se observan conversiones desde bajas para la PPL ( $c=10\%$  a las 3.5 horas, entrada 9) hasta moderadas para la CAL-A y la lipasa SD ( $c=43\%$  en el mismo tiempo, entradas 7 y 8), aunque estas reacciones no son regioselectivas, sino que se observan mezclas de productos de hidrólisis de las dos posiciones reactivas de los diésteres.

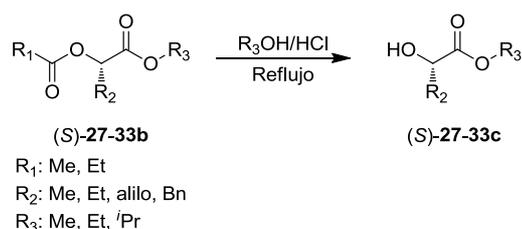
**Tabla 3.5.** Hidrólisis de (*S*)-2-acetoxibutanoato de isopropilo [(*S*)-**31b**] catalizada por hidrolasas.



Entrada	Enzima	t(h)	c(%) <sup>a</sup>
1	CRL	7	≤3
2	PLE	7	≤3
3	Subtilisina	7	≤3
4	CAL-B	7	≤3
5	AK	7	≤3
6	IM	7	≤3
7	CAL-A	3.5	43
8	SD	3.5	43
9	PPL	3.5	10

<sup>a</sup> Determinada por CG.

A la vista de estos resultados, se decidió llevar a cabo una hidrólisis química selectiva de los grupos acetilo y propionilo ( $R_1$  en Figura 3.11) tratando los diésteres de partida (*S*)-**27-33b** con el correspondiente alcohol (metanol, etanol o isopropanol), en presencia de una cantidad catalítica de ácido clorhídrico. Utilizando esta metodología se pudieron aislar los  $\beta$ -hidroxiésteres (*S*)-**27-33c** con buenos rendimientos (60-85%).



**Figura 3.11.** Hidrólisis de los diésteres (*S*)-**27-33b** a los correspondientes  $\alpha$ -hidroxiésteres (*S*)-**27-33c**.



*En el presente capítulo se ha realizado la resolución cinética dinámica en medio básico de una serie de  $\beta$ -cetoésteres  $\alpha$ -sustituídos catalizada por tres BVMOs, obteniendo los mejores resultados en cuanto a conversión a pH 9.0. Este hecho amplía el tipo de sustratos de estas enzimas, ya que habían sido empleados principalmente en la oxidación de compuestos aromáticos.*

*Los resultados revelan que tanto la HAPMO como la wtPAMO y su mutante M446G, catalizan la oxidación de ( $\pm$ )-2-etil- y 2-metil-3-oxobutanoatos de alquilo con excelente enantioselectividad, siendo la wtPAMO el enzima que mostró una mayor actividad con estos derivados. En general la HAPMO y la wtPAMO catalizan la oxidación de  $\beta$ -cetoésteres  $\alpha$ -sustituídos que poseen restos más voluminosos en la cadena del éster con mayores rendimientos.*

*Empleando ( $\pm$ )-2-metil-3-oxopentanoato de metilo como sustrato, los tres enzimas mostraron una menor actividad y selectividad. En la reacción catalizada por la wtPAMO la presencia de 5% (v/v) de <sup>t</sup>BuOMe permite mejorar los resultados, así como optimizar la concentración de sustrato hasta 50 mM en la oxidación de ( $\pm$ )-2-etil-3-oxobutanoato de isopropilo catalizada por dicha BVMO.*

*Sólo la wtPAMO catalizó la resolución cinética dinámica de ( $\pm$ )-2-bencil-3-oxobutanoato de isopropilo con una alta conversión. Sin embargo, la selectividad del proceso fue moderada. Tanto la HAPMO como la wtPAMO fueron biocatalizadores excelentes para la resolución de ( $\pm$ )-2-metil-3-oxobutanoato de bencilo, formándose de forma enantiopura y con total conversión el diéster final.*

*Finalmente, se llevó a cabo un escalado de estas oxidaciones catalizadas por la wtPAMO, el cual permitió aislar los productos con rendimientos de moderados a buenos y en general altos excesos enantioméricos. Los correspondientes diésteres fueron hidrolizados, obteniéndose los (S)- $\alpha$ -hidroxiésteres con altos rendimientos.*



Las técnicas instrumentales empleadas para la síntesis y caracterización de los compuestos mencionados en este capítulo, ya se han descrito en la Parte Experimental del Capítulo 1. Únicamente se incluirán en esta sección los apartados referentes a reactivos utilizados, así como los procedimientos sintéticos, experimentales y analíticos que se han desarrollado a lo largo del presente capítulo, incluyendo la caracterización de todos los compuestos relacionados con éste. Los  $\beta$ -cetoésteres  $\alpha$ -sustituidos empleados pueden consultarse en la Figura 3.12.

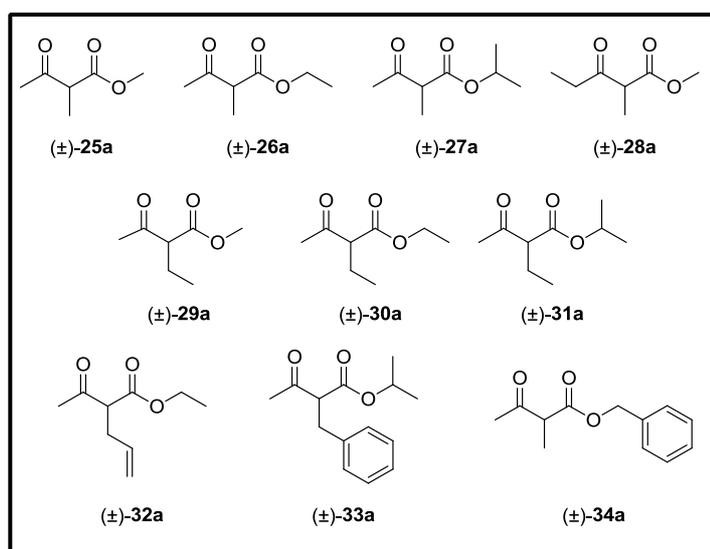


Figura 3.12.  $\beta$ -Cetoésteres  $\alpha$ -sustituídos utilizados en el presente capítulo.

### 3.6. REACTIVOS GENERALES

Las proteínas recombinantes wtPAMO,<sup>50</sup> PAMO<sub>M446G</sub><sup>99</sup> y HAPMO<sup>47</sup> han sido sobreexpresadas y purificadas de acuerdo con los métodos descritos. Las reacciones de oxidación se han llevado a cabo con el enzima aislado en disolución. Se ha definido una unidad enzimática de BVMO como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1.0  $\mu$ mol de fenilacetona a acetato de bencilo por minuto, a pH 9.0 y 25°C, en presencia de NADPH. La G6PDH de *Leuconostoc mesenteroides* es comercializada por Fluka-Biochemica, mientras que la G6P y el NADPH fueron adquiridos a Sigma-Aldrich.

La lipasa tipo B de *Candida antarctica* (Novozyme SP-435L, CAL-B, 7300 PLU/g) inmovilizada por adsorción sobre Lewatit E fue donada por Novo Nordisk. La lipasa tipo A de *Candida antartica* (CAL-A IMB-104, 2.6 U/mg) fue suministrada por Biocatalytics. La lipasa de *Candida rugosa* es comercializada por Sigma (CRL, 965 U/mg). La lipasa de páncreas porcino fue sumistrada por Sigma (PPL; 308 U/mg). La lipasa de *Pseudomonas fluorescens* AK (22100 U/g) fue adquirida a Sigma-Aldrich. Las lipasas de *Pseudomonas amano* IM (943 u/g) y SD (24,700 u/g) fueron suministradas por Amano Enzyme Europe Ltd. Finalmente, la esterasa de hígado de cerdo (PLE, 132U/mg) y la proteasa subtilisina Calsberg (91,4 U/mg) fueron adquiridas de Fluka-Biochemica.

Las  $\beta$ -cetoésteres  $\alpha$ -sustituidos ( $\pm$ )-**26a** y ( $\pm$ )-**30a**, así como los  $\alpha$ -hidroxiésteres (*S*)-**25c-27c** y (*S*)-**34c** fueron adquiridos de la casa comercial Sigma-Aldrich-Fluka, mientras que ( $\pm$ )-**29a** proviene de Alfa Aesar. El resto de reactivos y disolventes fueron suministrados por Sigma-Aldrich-Fluka y presentan el mayor grado de pureza posible.

### 3.7. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS

#### Síntesis de $\beta$ -cetoésteres $\alpha$ -sustituidos racémicos ( $\pm$ )-**25a**, ( $\pm$ )-**27-28a** y ( $\pm$ )-**31-34a**.<sup>247</sup>

Una mezcla del correspondiente acetoacetato de alquilo o 3-oxo-pentanoato de metilo (2.0 g, 10.41-15.38 mmol) y  $K_2CO_3$  anhidro (1.3 eq., guardado en estufa durante al menos 5 horas) en 20.0 mL de acetona seca, se agita bajo atmósfera de  $N_2$  cinco minutos. A continuación, se le añaden cuidadosamente 1.3 eq. del correspondiente haluro de alquilo (ioduro de metilo o etilo, bromuro de alilo o bencilo). La reacción se deja a reflujo durante 16 horas. Posteriormente se filtra y el disolvente se elimina bajo presión reducida. Los crudos fueron purificados por cromatografía de columna (90% hexano/AcOEt), obteniéndose 1.54 g de ( $\pm$ )-**25a** (67%), 1.80 g de ( $\pm$ )-**27a** (81%), 0.64 g de ( $\pm$ )-**28a** (29%), 0.91 g de ( $\pm$ )-**31a** (42%), 1.84 g de ( $\pm$ )-**32a** (84%), 1.13 g de ( $\pm$ )-**33a** (53%) y 1.01 g de ( $\pm$ )-**34a** (47%).

#### Síntesis de los diésteres racémicos ( $\pm$ )-**25-31b** y ( $\pm$ )-**33-34b**.

Para la preparación de los diésteres ( $\pm$ )-**26-27b**, ( $\pm$ )-**29-31b** y ( $\pm$ )-**33b**, se lleva a cabo un procedimiento de dos pasos a partir de los correspondientes ácidos racémicos: ácido láctico, ácido 2-hidroxi-butanoico y ácido fenil-láctico.

#### Síntesis de $\alpha$ -hidroxiésteres racémicos ( $\pm$ )-**26-27c**, ( $\pm$ )-**29-31c** y ( $\pm$ )-**33c**.

A una suspensión del correspondiente ácido (1.0 g, 6.10-11.11 mmol) en 40.0 mL de MeOH, EtOH o *i*PrOH, se le añaden trazas de HCl. La reacción se pone a reflujo y se sigue por TLC (95%  $CH_2Cl_2$ /MeOH). Después de 24 horas, la reacción se para y el disolvente se evapora a presión reducida. El crudo de reacción se disuelve en 20 mL de  $CH_2Cl_2$ , se lava con una disolución saturada de  $NaHCO_3$  (2x15 mL) y se extrae con  $CH_2Cl_2$  (3x15 mL). La fase orgánica se seca con  $Na_2SO_4$ , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Los  $\alpha$ -hidroxiésteres racémicos se obtienen puros, sin necesidad de una etapa de purificación posterior.

<sup>247</sup> Lee, M.; Kim, D.H. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 913-922.

### Capítulo 3

---

Se aislaron 328.4 mg de (±)-**26c** (29%), 395.6 mg de (±)-**27c** (27%), 589.0 mg de (±)-**29c** (52%), 836.3 mg de (±)-**30c** (66%), 1.06 g de (±)-**31c** (76%) y 893.0 mg de (±)-**33c** (72%).

Este paso no fue necesario para la preparación de los compuestos (±)-**25b**, (±)-**28b** y (±)-**34b** ya que el lactato de metilo y el 2-hidroxiopropanoato de bencilo racémicos son comerciales.

#### Síntesis de los diésteres racémicos (±)-**25-31b** y (±)-**33-34b**.

Los  $\alpha$ -hidroxiésteres racémicos (±)-**25-27c**, (±)-**29-31c** y (±)-**33-34c** (300 mg, 1.44-2.88 mmol) fueron acilados, bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, con anhídrido acético (2.0 eq.) o anhídrido propiónico (en el caso de (±)-**28b**) y una cantidad catalítica de 4-DMAP en 6.0 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco. La reacción se agita a temperatura ambiente y se sigue por TLC. Una vez concluida se lava con una disolución de HCl 1.5 N (4x5 mL). La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se evaporan los disolventes a presión reducida. No es necesaria una posterior etapa de purificación. Se aislaron 315.9 mg de (±)-**25b** (75%), 85.4 mg de (±)-**26b** (21%), 181.9 mg de (±)-**27b** (46%), 101.5 mg de (±)-**28b** (22%), 301.0 mg de (±)-**29b** (74%), 241.2 mg de (±)-**30b** (61%), 266.5 mg de (±)-**31b** (69%), 126.2 mg de (±)-**33b** (35%) y 166.5 mg de (±)-**34b** (45%).

#### **Síntesis del diéster racémico 2-acetoxipenten-4-oato de etilo [(±)-**32b**].**

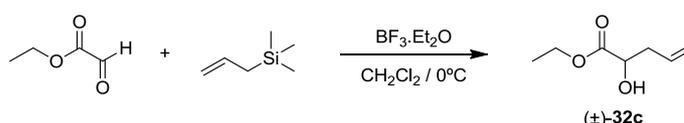
Para la preparación del diéster (±)-**32b** fue llevado a cabo un procedimiento de dos pasos a partir del glioxilato de etilo.

#### Síntesis de 2-hidroxiipenten-4-oato de etilo [(±)-**32c**].<sup>248</sup>

A una disolución de glioxilato de etilo (500 mg, 4.90 mmol) y aliltrimetilsilano (2.0 eq.) en 25 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco, se le añade bajo atmósfera de N<sub>2</sub> y gota a gota, BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O (2.0 eq.) a 0°C. La disolución se deja llevar a temperatura ambiente y se agita durante 1.5 horas. A continuación la reacción se lava con una disolución saturada de NH<sub>4</sub>Cl y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x20 mL). La fase orgánica se lava con una disolución saturada de NaCl (50 mL), se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se concentra el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por cromatografía de columna empleando una mezcla de 70% hexano/AcOEt como eluyente para obtener (±)-**32c** (300.0 mg, 59%).

---

<sup>248</sup> Zhu, H.; Wickenden, J. G.; Campbell, N. E.; Leung, J. C. T. L.; Johnson, K. M. S.; Glenn, M. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2019-2022.



**Figura 3.13.** Síntesis de 2-hidroxipenten-4-oato de etilo  $(\pm)\text{-32c}$ .

#### Acetilación de 2-hidroxipenten-4-oato de etilo $(\pm)\text{-32c}$ .

El 2-hidroxipenten-4-oato de etilo  $(\pm)\text{-32c}$  (300 mg, 2.08 mmol) fue acetilado, bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ , con anhídrido acético (2.0 eq.) y una cantidad catalítica de 4-DMAP en 6.0 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco. La reacción se agita a temperatura ambiente y se sigue por TLC. Una vez concluida se lava con una disolución de HCl 1.5 N (4x5 mL). La fase orgánica se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtra y se evaporan los disolventes a presión reducida. No es necesaria una posterior etapa de purificación. Se aislaron con un rendimiento cuantitativo 373.1 mg de  $(\pm)\text{-32b}$ .

Los compuestos previamente descritos,  $(\pm)\text{-25a}$ ,  $(\pm)\text{-27-28a}$ ,  $(\pm)\text{-31a}$ ,  $(\pm)\text{-34a}$ ,  $(\pm)\text{-25-26b}$ ,  $(\pm)\text{-26c}$ ,  $(\pm)\text{-29-30c}$  y  $(\pm)\text{-32c}$  exhiben propiedades físicas y espectrales de acuerdo con los datos publicados. Los compuestos  $(\pm)\text{-32-33a}$ ,  $(\pm)\text{-27-34b}$ ,  $(\pm)\text{-27c}$ ,  $(\pm)\text{-31c}$  y  $(\pm)\text{-33c}$  fueron debidamente caracterizados.<sup>249</sup>

### **3.8. ASIGNACIÓN DE CONFIGURACIONES ABSOLUTAS**

Las configuraciones absolutas de los diésteres **25-31b** y **33-34b** se han establecido mediante comparación de los cromatogramas obtenidos mediante CG y HPLC con patrones obtenidos mediante la esterificación y/o acetilación de los correspondientes  $\alpha$ -hidroxiésteres/ácidos quirales comerciales.<sup>250</sup>

La configuración absoluta de 2-acetoxipenten-4-oato de etilo **32b** se ha obtenido mediante comparación de los cromatogramas obtenidos mediante HPLC con patrones obtenidos mediante la hidrólisis de **32b** catalizada por la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens*.<sup>251</sup>

Las configuraciones absolutas de los  $\alpha$ -hidroxiésteres fueron establecidas gracias a su previa derivatización en los correspondientes acetatos y propionatos.

<sup>249</sup> Las referencias de los compuestos ya descritos, así como la caracterización completa de los no descritos pueden consultarse en el Apartado 3.11.

<sup>250</sup> Los datos cromatográficos se encuentran recogidos en el Apartado 3.10.

<sup>251</sup> Beard, F.; Lecouve, J.-P. EP 1400531A1, **2004**.

### 3.9. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

#### Oxidación de los $\beta$ -cetoésteres $\alpha$ -sustituidos racémicos ( $\pm$ )-25-34a catalizada por BVMOs.

Los  $\beta$ -cetoésteres  $\alpha$ -sustituidos racémicos ( $\pm$ )-25-34a (10 mM) se disuelven en 0.5 mL del medio de reacción disolución tampón Tris/HCl (50 mM, pH 8.0 o pH 9.0), conteniendo un 1% (v/v) DMSO. A continuación se añade D-glucosa-6-fosfato (2.0 eq.), G6PDH (5.0 U), NADPH (0.2 mM) y 1.0 unidad de la correspondiente BVMO. La mezcla se agita a 250 rpm en un agitador orbital a la temperatura establecida durante 48 horas. Se detiene la reacción extrayendo con AcOEt (2x0.5 mL), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se analiza por CG y HPLC con el fin de determinar la conversión y selectividad de los procesos de oxidación.

#### Estudio de la concentración de sustrato en la oxidación de ( $\pm$ )-31a catalizada por la wtPAMO en dos medios de reacción diferentes.

El 2-etil-3-oxobutanoato de isopropilo ( $\pm$ )-31a (10-80 mM) se disuelve en dos medios de reacción diferentes: a) Una disolución tampón Tris/HCl (50 mM, pH 9.0, 0.5 mL) que contiene 1% (v/v) DMSO o b) Una disolución tampón Tris/HCl (50 mM, pH 9.0, 0.5 mL) que contiene un 5% (v/v) <sup>t</sup>BuOMe (25  $\mu$ L) y 1% (v/v) DMSO. Posteriormente se añaden a la reacción NADPH (0.2 mM), D-glucosa-6-fosfato (2.0 eq.), G6PDH (5.0 U) y la wtPAMO (1.0 U). La mezcla se agita a 250 rpm en un agitador orbital a 30°C durante 48 horas. Se detiene la reacción extrayendo con AcOEt (2x0.5 mL), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se analiza por CG y HPLC con el fin de determinar la conversión y exceso enantiomérico de (*S*)-31b.

#### Oxidación de los $\beta$ -cetoésteres $\alpha$ -sustituidos racémicos ( $\pm$ )-25-34a a escala multimiligramo catalizada por la wtPAMO.

Los  $\beta$ -cetoésteres  $\alpha$ -sustituidos racémicos ( $\pm$ )-25-34a (50 mg, 0.21-0.38 mmol) se disuelven en 13 mL del medio de reacción disolución tampón Tris/HCl (50 mM, pH 9.0), conteniendo un 1% (v/v) DMSO y 5% (v/v) <sup>t</sup>BuOMe para el sustrato ( $\pm$ )-28a. A continuación se añade D-glucosa-6-fosfato (2.0 eq.), G6PDH (150 U), NADPH (0.2 mM) y 30 unidades de la wtPAMO. La mezcla se agita a 250 rpm en un agitador orbital a 30°C durante 24 horas. Se detiene la reacción extrayendo con AcOEt (3x10.0 mL), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente a presión reducida. No se requirió ningún tipo de purificación más, excepto para (*S*)-25b y (*S*)-28-29b, cuyos crudos fueron purificados por cromatografía de columna (90% hexano/AcOEt). Todos los productos finales fueron obtenidos enantiopuros excepto (*S*)-28b y (*S*)-33b, que fueron aislados con un 96% y 51% de exceso enantiomérico, respectivamente.

Se obtuvieron 30.8 mg de (*S*)-**25b** (55%), 35.1 mg de (*S*)-**26b** (62%), 32.8 mg de (*S*)-**27b** (59%), 38.3 mg de (*S*)-**28b** (68%), 36.0 mg de (*S*)-**29b** (65%), 33.4 mg (*S*)-**30b** (61%), 34.4 mg de (*S*)-**31b** (63%), 35.6 mg de (*S*)-**32b** (65%), 39.6 mg de (*S*)-**33b** (74%) y 41.0 mg de (*S*)-**34b** (76%).

#### **Hidrólisis enzimática del diéster (*S*)-31b.**

El compuesto (*S*)-**31b** (9.4 mg, 0.05 mmol) se disuelve en 500  $\mu$ L de una disolución tampón Tris/HCl (50 mM, pH 9.0). Posteriormente se añaden 9.4 mg de la correspondiente hidrolasa (CAL-A, CRL, PPL, SD, PLE, subtilisina, CAL-B, AK e IM). La mezcla se agita a 250 rpm en un agitador orbital a 30°C durante 3.5 horas o 7 horas. Se detiene la reacción extrayendo con AcOEt (2x0.4 mL), el cual contiene 1 mg/mL de mesitileno como estándar externo, se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se analiza por CG y HPLC con el fin de determinar la conversión y el exceso enantiomérico de los productos de hidrólisis.

#### **Hidrólisis química de los diésteres (*S*)-27-33b.**

A una disolución del correspondiente diéster (*S*)-**27-33b** (25 mg, 0.20-0.31 mmol) en 5.0 mL de MeOH, EtOH o *i*PrOH, se le añaden unas trazas de HCl. La reacción se pone a reflujo y se sigue por TLC usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente. Después de la desaparición del producto de partida, la reacción se para y el disolvente es evaporado a presión reducida. Los correspondientes (*S*)- $\alpha$ -hidroxiésteres se obtuvieron sin necesidad de una purificación posterior. Todos los productos se obtuvieron enantiopuros, excepto (*S*)-**25c** y (*S*)-**33c**, los cuales se obtuvieron con un 96% y 51% de exceso enantiomérico respectivamente. Se aislaron 11.3 mg de (*S*)-**27c** (60%), 9.8 mg de (*S*)-**25c** (60%), 11.8 mg de (*S*)-**29c** (64%), 13.2 mg de (*S*)-**30c** (70%), 12.6 mg de (*S*)-**31c** (65%), 13.5 mg de (*S*)-**32c** (65%) y 17.6 mg de (*S*)-**33c** (85%).

### **3.10. DETERMINACIÓN DE LAS CONVERSIONES Y EXCESOS ENANTIOMÉRICOS**

La determinación de los valores de conversión y excesos enantioméricos de la mayoría de los compuestos se ha llevado a cabo mediante cromatografía de gases (Tabla 3.6). Para ello se ha empleado un cromatógrafo Hewlett Packard 6890 Series II equipado con la columna **A**: Restek Rt $\beta$ -DEXse (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m, 1 bar N<sub>2</sub>) y **B**: Hewlett-Packard HP1 (metil siloxano entrecruzado, 30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m, 1 bar, N<sub>2</sub>).

### Capítulo 3

**Tabla 3.6.** Determinación de conversiones y/o excesos enantioméricos mediante CG.

Compuesto	Programa <sup>a</sup>	Columna	t <sub>R</sub> (min)	R <sub>s</sub> <sup>182</sup>
(±)-25a	50/20/3/110	A	35.9, 36.1	1.0
(±)-25b	50/20/3/110	A	32.8 (S), 33.5 (R)	2.2
(±)-25c	50/20/3/110	A	27.1 (S), 29.0 (R)	4.3
(±)-26a	50/20/3/110	A	37.9	n.d.
(±)-26b	50/20/3/110	A	35.7 (S), 36.2 (R)	2.4
(±)-26c	50/20/3/110	A	26.6 (S), 28.5 (R)	4.0
(±)-27a	50/20/1/90	A	52.2, 52.6	1.0
(±)-27b	50/20/1/90	A	49.3 (S), 50.2 (R)	2.0
(±)-27c	50/20/1/90	A	34.8 (S), 39.7 (R)	10.5
(±)-28a	50/20/1/110	A	54.2, 57.9	10.0
(±)-28b	50/20/1/110	A	51.0 (R), 52.1(S)	2.3
(±)-25c	50/20/1/110	A	21.4 (S), 27.5 (R)	10.1
(±)-29a	50 Isoterma	B	6.0	n.d.
(±)-29b	50 Isoterma	B	7.5	--
(±)-29c	50 Isoterma	B	2.4	n.d.
(±)-30a	50 Isoterma	B	10.2	n.d.
(±)-30b	50 Isoterma	B	12.8	--
(±)-30c	50 Isoterma	B	3.5	n.d.
(±)-31a	50 Isoterma	B	13.3	n.d.
(±)-31b	50 Isoterma	B	16.3	--
(±)-31c	50 Isoterma	B	5.7	n.d.
(±)-32a	50/25/20/200	B	22.7	n.d.
(±)-32b	50/25/20/200	B	26.6	--
(±)-32c	50/25/20/200	B	6.6	n.d.
(±)-33a	70/5/1/120	B	44.3	--
(±)-33b	70/5/1/120	B	46.0	n.d.
(±)-33c	70/5/1/120	B	25.5	n.d.
(±)-34a	70/5/1/120	B	35.7	n.d.
(±)-34b	70/5/1/120	B	37.7	--
(±)-34c	70/5/1/120	B	33.1	n.d.

n.d. no determinado.

<sup>a</sup> Programa: T<sub>inicial</sub> (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/ min)/ T<sub>final</sub> (°C)

t<sub>R</sub>: tiempo de retención.

La determinación de los valores de los excesos enantioméricos de los compuestos **29-34b** se ha llevado a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia empleando un cromatógrafo Hewlett Packard 1100 LC equipado con una columna **A**: Chiralcel OB-H (Daicel, 0.46 x 25 cm) o **B**: Chiralcel OD (Daicel, 0.45 cm x 25 cm) (Tabla 3.7).

**Tabla 3.7.** Determinación de excesos enantioméricos mediante HPLC.

Compuesto	Condiciones <sup>a</sup>	Columna	t <sub>R</sub> (min)	R <sub>s</sub> <sup>182</sup>
(±)- <b>29b</b>	H/IPA 99:1, 0.7, 25°C	<b>A</b>	12.9 ( <i>R</i> ); 17.7 ( <i>S</i> )	6.7
(±)- <b>30b</b>	H/IPA 99:1, 0.5, 25°C	<b>A</b>	17.8 ( <i>R</i> ); 21.1 ( <i>S</i> )	5.4
(±)- <b>31b</b>	H/IPA 99:1, 0.5, 20°C	<b>A</b>	12.7 ( <i>R</i> ); 14.3 ( <i>S</i> )	1.3
(±)- <b>32b</b>	H/IPA 99:1, 0.5, 20°C	<b>A</b>	22.6 ( <i>R</i> ); 26.3 ( <i>S</i> )	4.4
(±)- <b>33b</b>	H/IPA 99:1, 1.0, 25°C	<b>B</b>	25.8 ( <i>R</i> ); 34.8 ( <i>S</i> )	4.5
(±)- <b>34b</b>	H/IPA 95:5, 0.8, 20°C	<b>B</b>	23.8 ( <i>R</i> ); 26.3 ( <i>S</i> )	2.0

<sup>a</sup> Condiciones: H/IPA= Hexano/2-propanol, proporción de eluyente, flujo (mL min<sup>-1</sup>), T(°C).  
t<sub>R</sub>: tiempo de retención.

### 3.11. DATOS EXPERIMENTALES

En este apartado se encuentra la caracterización de todos aquellos compuestos utilizados en el presente capítulo que no han sido adquiridos comercialmente. Los criterios de caracterización son los mismos que los utilizados en el Capítulo 1.

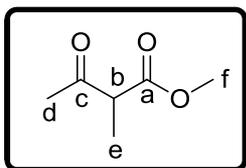
---

---

(±)-2-Metil-3-oxobutanoato de metilo, (±)-25a<sup>252</sup>

---

---



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 67%

**Fórmula empírica:** C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>

**Peso Molecular:** 130.1 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.27

**IR** (KBr): 2999, 1750, 1720, 1380, 1359 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.35 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 3H<sub>e</sub>), 2.23 (s, 3H<sub>d</sub>), 3.51 (c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 1H<sub>b</sub>), 3.79 (s, 3H<sub>f</sub>)

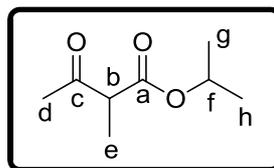
**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 12.7 (CH<sub>3</sub>, C<sub>e</sub>), 28.3 (CH<sub>3</sub>, C<sub>d</sub>), 52.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>f</sub>), 53.3 (CH, C<sub>b</sub>), 170.8 (C=O, C<sub>a</sub>), 203.5 (C=O, C<sub>c</sub>)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, m/z): 153 [(M+Na)<sup>+</sup>, 56%]

---

<sup>252</sup> Christoffers, T.; Kauf, T.; Werner, T.; Rössle, M. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2601-2608.

(±)-2-Metil-3-oxobutanoato de isopropilo, (±)-27a<sup>253</sup>



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 81%

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>

**Peso Molecular:** 158.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.41

**IR** (KBr): 2942, 1738, 1715, 1455, 1376, 1359 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): 1.24 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.1 Hz, 6H<sub>g,h</sub>), 1.28 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 3H<sub>e</sub>), 2.20 (s, 3H<sub>d</sub>), 3.44 (c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 1H<sub>b</sub>), 4.27-5.29 (m, 1H<sub>f</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 12.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>e</sub>), 21.4 (2CH<sub>3</sub>, C<sub>g,h</sub>), 28.3 (CH<sub>3</sub>, C<sub>d</sub>), 53.8 (CH, C<sub>b</sub>), 68.8 (CH, C<sub>f</sub>), 170.0 (C=O, C<sub>a</sub>), 203.6 (C=O, C<sub>c</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 181 [(M+Na)<sup>+</sup>, 53%]

<sup>253</sup> Palomo, C.; Oiarbide, M.; García, J. M.; Banuelos, P.; Odriozola, J. M.; Razkin, J.; Linden, A. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2637-2640.

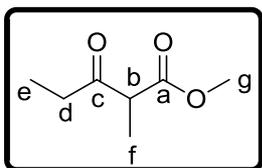
---

---

(±)-2-Metil-3-oxopentanoato de metilo, (±)-28a

---

---



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 29%

**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>

**Peso Molecular:** 144.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.37

**IR** (KBr): 2984, 1747, 1715, 1455, 1435 cm<sup>-1</sup>

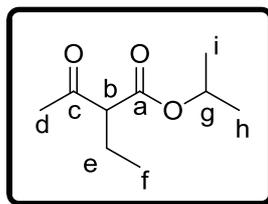
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.06 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 3H<sub>e</sub>), 1.34 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 3H<sub>f</sub>), 2.52-2.59 (m, 2H<sub>d</sub>), 3.52 (c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 1H<sub>b</sub>), 3.71 (s, 3H<sub>g</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 7.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>e</sub>), 12.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>f</sub>), 34.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 52.3 (CH, C<sub>b</sub>), 52.4 (CH<sub>3</sub>, C<sub>g</sub>) 171.1 (C=O, C<sub>a</sub>), 206.3 (C=O, C<sub>c</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 167 [(M+Na)<sup>+</sup>, 76%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>NaO<sub>3</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 167.0679; encontrada: 167.0671

(±)-2-Etil-3-oxobutanoato de isopropilo, (±)-31a



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 42%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>

**Peso Molecular:** 172.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.46

**IR** (KBr): 2980, 1736, 1714, 1463, 1375, 1359 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 0.82 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.5 Hz, 3H<sub>f</sub>), 1.14 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.3 Hz, 6H<sub>h,i</sub>), 1.71-1.82 (m, 2H<sub>e</sub>), 2.10 (s, 3H<sub>d</sub>), 3.18-3.22 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 1H<sub>b</sub>), 4.94-5.22 (m, 1H<sub>g</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 11.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>f</sub>), 21.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>e</sub>), 21.3 (CH<sub>3</sub>, C<sub>h</sub>), 21.4 (CH<sub>3</sub>, C<sub>i</sub>), 28.4 (CH<sub>3</sub>, C<sub>d</sub>), 61.3 (CH, C<sub>b</sub>), 68.4 (CH, C<sub>g</sub>), 169.0 (C=O, C<sub>a</sub>), 203.6 (C=O, C<sub>c</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, m/z): 195 [(M+Na)<sup>+</sup>, 28%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>NaO<sub>3</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 195.0992; encontrada: 195.0993

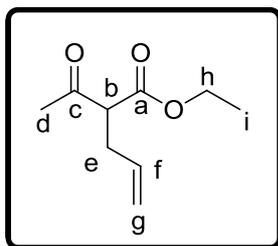
---

---

(±)-2-Acetilpenten-4-oato de etilo, (±)-32a<sup>254</sup>

---

---



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 84%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>

**Peso Molecular:** 170.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.28

**IR** (KBr): 3081, 2983, 1743, 1715, 1643, 1441, 1367 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.25 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 3H<sub>i</sub>), 2.21 (s, 3H<sub>d</sub>), 2.54-2.59 (m, 2H<sub>e</sub>), 3.50 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.5 Hz, 1H<sub>b</sub>), 4.18 (c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 2H<sub>h</sub>), 5.01-5.28 (m, 2H<sub>g</sub>), 5.65-5.79 (m, 1H<sub>f</sub>)

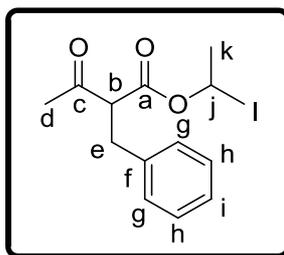
**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 14.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>i</sub>), 28.9 (CH<sub>3</sub>, C<sub>d</sub>), 32.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>e</sub>), 59.1 (CH, C<sub>b</sub>), 61.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>h</sub>), 117.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>g</sub>), 132.1 (CH, C<sub>f</sub>), 169.1 (C=O, C<sub>a</sub>), 202.4 (C=O, C<sub>c</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 193 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

---

<sup>254</sup> Zhang, Y.; Raines, A. J.; Flowers, R. A. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2363-2365.

**(±)-2-Bencil-3-oxobutanoato de isopropilo, (±)-33a**



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 53%

**Fórmula empírica:** C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>

**Peso Molecular:** 234.3 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.43

**IR** (KBr): 3056, 2982, 1738, 1715, 1496, 1455 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.14-1.29 (m, 6H<sub>k,l</sub>), 2.20 (s, 3H<sub>d</sub>), 3.14 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 2H<sub>e</sub>), 3.76 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 1H<sub>b</sub>), 4.98-5.12 (m, 1H<sub>j</sub>), 7.18-7.31 (m, 5H<sub>g,h,i</sub>)<sup>255</sup>

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 21.4 (CH<sub>3</sub>, C<sub>k</sub>), 21.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>l</sub>), 29.3 (CH<sub>3</sub>, C<sub>d</sub>), 33.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>e</sub>), 61.4 (CH, C<sub>b</sub>), 69.0 (CH, C<sub>j</sub>), 126.8 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 128.0 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 128.5 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 138.1 (C<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 168.6 (C=O, C<sub>a</sub>), 202.3 (C=O, C<sub>c</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 257 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>NaO<sub>3</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 257.1148; encontrada: 257.1169

<sup>255</sup> En el espectro de resonancia se puede ver alguna señal del correspondiente compuesto enólico, pero debido al insuficiente tiempo de adquisición no se pueden observar todas.

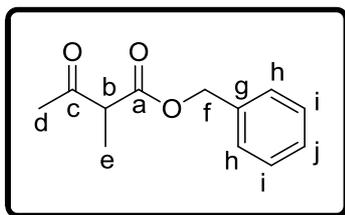
---

---

(±)-2-Metil-3-oxobutanoato de bencilo, (±)-34a<sup>256</sup>

---

---



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 47%

**Fórmula empírica:** C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>

**Peso Molecular:** 206.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.35

**IR** (KBr): 3050, 2990, 1744, 1715, 1498, 1455, 1359 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.36 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.1 Hz, 3H<sub>e</sub>), 2.19 (s, 3H<sub>d</sub>), 3.55 (c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.1 Hz, 1H<sub>b</sub>), 5.17 (s, 2H<sub>f</sub>), 7.32-7.37 (m, 5H<sub>h,i,j</sub>)

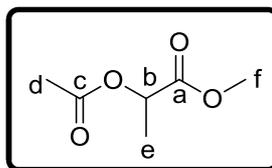
**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 12.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>e</sub>), 28.3 (CH<sub>3</sub>, C<sub>d</sub>), 53.5 (CH, C<sub>b</sub>), 70.0 (CH<sub>2</sub>, C<sub>f</sub>), 128.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>j</sub>), 128.4 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 128.5 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 134.0 (C<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 170.3 (C=O, C<sub>a</sub>), 203.3 (C=O, C<sub>c</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, m/z): 229 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

---

<sup>256</sup> Alexander, M. R. S.; Rzepa, H. S.; White, A. J. P.; Billen, D.; Hii, K. K. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3085-3096.

**(±)-2-Acetoxipropanoato de metilo, (±)-25b<sup>257</sup>**



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 75%

**Fórmula empírica:** C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>

**Peso Molecular:** 146.1 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.28

**IR** (KBr): 2998, 1741, 1454, 1237 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.46 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 3H<sub>e</sub>), 2.11 (s, 3H<sub>d</sub>), 3.73 (s, 3H<sub>f</sub>), 5.07 (c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 1H<sub>b</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 16.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>e</sub>), 20.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>d</sub>), 52.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>f</sub>), 68.4 (CH, C<sub>b</sub>), 170.3 (C=O, C<sub>c</sub>), 171.2 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 169 [(M+Na)<sup>+</sup>, 24%]

**(S)-2-Acetoxipropanoato de metilo, (S)-25b**

**Rendimiento:** 55%

<sup>257</sup> Knochel, P.; Lotz, M.; Monsees, A.; Riermeier, T.; Kadyrov, R.; Almena, J. DE 10219490 A1 2003.

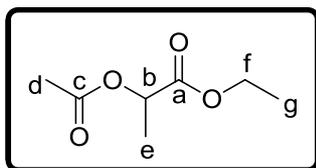
---

---

(±)-2-Acetoxipropanoato de etilo, (±)-26b<sup>258</sup>

---

---



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 21%

**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>

**Peso Molecular:** 160.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.32

**IR** (KBr): 2997, 1743, 1441, 1370 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.26 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 3H<sub>g</sub>), 1.47 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 3H<sub>e</sub>), 2.12 (s, 3H<sub>d</sub>), 4.19 (c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 2H<sub>f</sub>), 5.10 (c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 1H<sub>b</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 14.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>g</sub>), 16.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>e</sub>), 20.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>d</sub>), 61.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>f</sub>), 68.6 (CH, C<sub>b</sub>), 170.3 (C=O, C<sub>a</sub>), 171.2 (C=O, C<sub>c</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 183 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

---

---

(S)-2-Acetoxipropanoato de etilo, (S)-26b

---

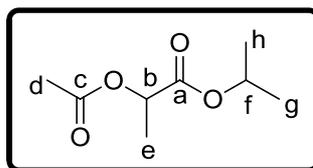
---

**Rendimiento:** 62%

---

<sup>258</sup> Wynberg, H.; Lorand, J. P. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 2538-2542.

**(±)-2-Acetoxipropanoato de isopropilo, (±)-27b**



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 46%

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>

**Peso Molecular:** 174.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.34

**IR** (KBr): 2986, 1745, 1455, 1386, 1200 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.23 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.4 Hz, 3H<sub>g</sub>), 1.24 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.4 Hz, 3H<sub>h</sub>), 1.45 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 3H<sub>e</sub>), 2.11 (s, 3H<sub>d</sub>), 4.97-5.08 (m, 2H<sub>b,f</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 16.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>e</sub>), 20.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>d</sub>), 21.5 (2CH<sub>3</sub>, C<sub>g,h</sub>), 68.7 (CH, C<sub>f</sub>), 68.9 (CH, C<sub>b</sub>), 170.3 (2C=O, C<sub>c,a</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 183 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>NaO<sub>4</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 197.0784; encontrada: 197.0776

**(S)-2-Acetoxipropanoato de isopropilo, (S)-27b**

**Rendimiento:** 59%

**(S)-27b:** [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -37.9 (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>), *ee* 99%.

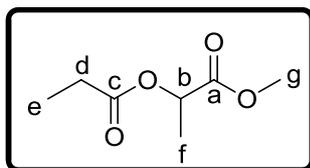
---

---

(±)-2-Propioniloxipropanoato de metilo, (±)-28b

---

---



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 22%

**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>

**Peso Molecular:** 160.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.34

**IR** (KBr): 2991, 1746, 1461, 1305, 1277 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.15 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.5 Hz, 3H<sub>e</sub>), 1.47 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 3H<sub>f</sub>), 2.36-2.47 (m, 2H<sub>d</sub>), 3.73 (s, 3H<sub>g</sub>), 5.08 (c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 1H<sub>b</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 8.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>e</sub>), 16.9 (CH<sub>3</sub>, C<sub>f</sub>), 27.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 52.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>g</sub>), 68.3 (CH, C<sub>b</sub>), 171.3 (C=O, C<sub>a</sub>), 178.3 (C=O, C<sub>c</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 183 [(M+Na)<sup>+</sup>, 50%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>NaO<sub>4</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 183.0628; encontrada: 183.0619

---

---

(S)-2-Propioniloxipropanoato de metilo, (S)-28b

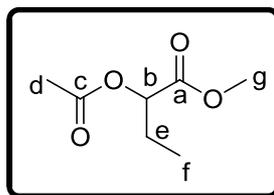
---

---

**Rendimiento:** 68%

**(S)-28b:** [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -34.6 (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>), *ee* 96%.

(±)-2-Acetoxybutanoato de metilo, (±)-29b



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 74%

**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>

**Peso Molecular:** 160.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.34

**IR** (KBr): 2957, 1746, 1440, 1376, 1235 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 0.96 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, 3H<sub>f</sub>), 1.79-1.90 (m, 2H<sub>e</sub>), 2.11 (s, 3H<sub>d</sub>), 3.72 (s, 3H<sub>g</sub>), 4.91-4.95 (m, 1H<sub>b</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 9.4 (CH<sub>3</sub>, C<sub>f</sub>), 20.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>d</sub>), 24.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>e</sub>), 52.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>g</sub>), 73.2 (CH, C<sub>b</sub>), 170.5 (2C=O, C<sub>a,c</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, m/z): 183 [(M+Na)<sup>+</sup>, 34%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>NaO<sub>4</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 183.0628; encontrada: 183.0637

(S)-2-Acetoxybutanoato de metilo, (S)-29b

**Rendimiento:** 65%

(S)-29b: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -25.0 (c 0.90, CHCl<sub>3</sub>), ee 99%.

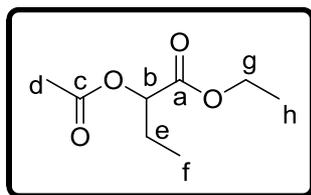
---

---

(±)-2-Acetoxibutanoato de etilo, (±)-30b

---

---



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 61%

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>

**Peso Molecular:** 174.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.36

**IR** (KBr): 2980, 1744, 1464, 1375, 1234 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 0.96 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, 3H<sub>f</sub>), 1.25 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 3H<sub>h</sub>), 1.79-1.90 (m, 2H<sub>e</sub>), 2.10 (s, 3H<sub>d</sub>), 4.17 (c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 2H<sub>g</sub>), 4.88-4.92 (m, 1H<sub>b</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 9.4 (CH<sub>3</sub>, C<sub>f</sub>), 14.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>h</sub>), 20.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>d</sub>), 24.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>e</sub>), 61.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>g</sub>), 73.3 (CH, C<sub>b</sub>), 170.1 (C=O, C<sub>a</sub>), 170.5 (C=O, C<sub>c</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 197 [(M+Na)<sup>+</sup>, 70%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>NaO<sub>4</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 197.0782; encontrada: 197.0784

---

---

(S)-2-Acetoxibutanoato de etilo, (S)-30b

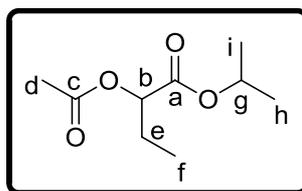
---

---

**Rendimiento:** 61%

(S)-30b: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -28.7 (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>), *ee* 99%.

**(±)-2-Acetoxibutanoato de isopropilo, (±)-31b**



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 69%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>

**Peso Molecular:** 188.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.41

**IR** (KBr): 2989, 1745, 1464, 1426, 1375, 1234 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 0.96 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, 3H<sub>f</sub>), 1.22 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.3 Hz, 3H<sub>i</sub>), 1.23 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.8 Hz, 3H<sub>h</sub>), 1.77-1.88 (m, 2H<sub>e</sub>), 2.10 (s, 3H<sub>d</sub>), 4.84-4.88 (m, 1H<sub>g</sub>), 4.99-5.08 (m, 1H<sub>b</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 9.3 (CH<sub>3</sub>, C<sub>f</sub>), 20.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>i</sub>), 21.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>h</sub>), 21.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>d</sub>), 24.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>e</sub>), 68.8 (CH, C<sub>g</sub>), 73.4 (CH, C<sub>b</sub>), 169.6 (C=O, C<sub>c</sub>), 170.5 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 211 [(M+Na)<sup>+</sup>, 52%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>9</sub>H<sub>16</sub>NaO<sub>4</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 211.0946; encontrada: 211.0948

**(S)-2-Acetoxibutanoato de isopropilo, (S)-31b**

**Rendimiento:** 63%

**(S)-31b:** [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -38.7 (c 0.98, CHCl<sub>3</sub>), *ee* 99%.

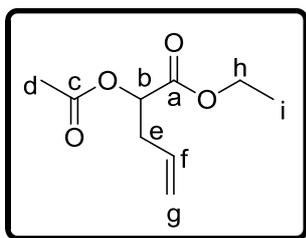
---

---

(±)-2-Acetoxipenten-4-oato de etilo, (±)-32b

---

---



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 99%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>

**Peso Molecular:** 186.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.44

**IR** (KBr): 3080, 2983, 1744, 1643, 1469, 1431 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.25 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 3H<sub>i</sub>), 2.11 (s, 3H<sub>d</sub>), 2.54-2.60 (m, 2H<sub>e</sub>), 4.18 (c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 2H<sub>h</sub>), 5.01-5.06 (m, 1H<sub>b</sub>), 5.08-5.18 (m, 2H<sub>g</sub>), 5.72-5.79 (m, 1H<sub>f</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 14.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>i</sub>), 20.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>d</sub>), 35.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>e</sub>), 61.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>h</sub>), 71.6 (CH, C<sub>b</sub>), 118.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>g</sub>), 131.9 (CH, C<sub>f</sub>), 169.5 (C=O, C<sub>c</sub>), 170.3 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 209 [(M+Na)<sup>+</sup>, 30%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>NaO<sub>4</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 209.0784; encontrada: 209.0767

---

---

(S)-2-Acetoxipenten-4-oato de etilo, (S)-32b

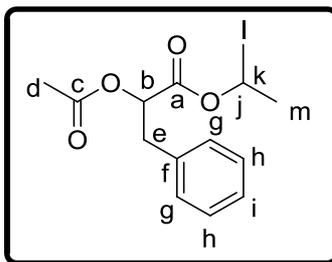
---

---

**Rendimiento:** 65%

(S)-32b: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -17.3 (c 1.12, CHCl<sub>3</sub>), *ee* 99%.

**(±)-2-Acetoxi-3-fenilpropanoato de isopropilo, (±)-33b**



Líquido amarillo claro

**Rendimiento:** 35%

**Fórmula empírica:** C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>

**Peso Molecular:** 250.1 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.29

**IR** (KBr): 3030, 2934, 1731, 1496, 1455, 1375 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.17 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.4 Hz, 3H<sub>l</sub>), 1.23 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.4 Hz, 3H<sub>m</sub>), 2.09 (s, 3H<sub>d</sub>), 3.10 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 11.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.6 Hz, 1H<sub>e</sub>), 3.16 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 11.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.0 Hz, 1H<sub>e</sub>), 4.98-5.07 (m, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.4 Hz, 1H<sub>k</sub>), 5.16 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.0 Hz, 1H<sub>b</sub>), 7.23-7.31 (m, 5H<sub>g,h,i</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 20.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>l</sub>), 21.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>m</sub>), 21.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>d</sub>), 37.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>e</sub>), 69.1 (CH, C<sub>k</sub>), 73.1 (CH, C<sub>b</sub>), 126.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 128.3 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 129.3 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 135.9 (C<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 169.1 (C=O, C<sub>c</sub>), 170.3 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 273 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>NaO<sub>4</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 273.1097; encontrada: 273.1105

**(S)-2-Acetoxi-3-fenilpropanoato de isopropilo, (S)-33b**

**Rendimiento:** 74%

**(S)-33b:** [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -5.7 (c 1.05, CHCl<sub>3</sub>), ee 51%.

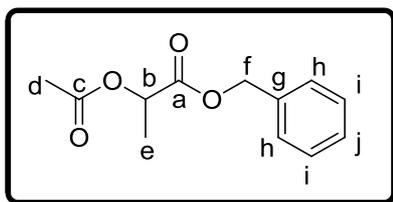
---

---

(±)-2-Acetoxipropanoato de bencilo, (±)-34b

---

---



Líquido amarillo claro

**Rendimiento:** 45%

**Fórmula empírica:** C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>

**Peso Molecular:** 222.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.31

**IR** (KBr): 3035, 2994, 1744, 1495, 1455, 1305 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.49 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.0 Hz, 3H<sub>e</sub>), 2.12 (s, 3H<sub>d</sub>), 5.09-5.16 (m, 1H<sub>b</sub>), 5.17 (s, 2H<sub>f</sub>), 7.33-7.36 (m, 5H<sub>h,i,j</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 16.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>e</sub>), 20.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>d</sub>), 66.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>f</sub>), 68.5 (CH, C<sub>b</sub>), 128.0 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 128.3 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>i</sub>), 135.3 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>j</sub>), 166.3 (C<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 170.3 (C=O, C<sub>c</sub>), 170.6 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 245 [(M+Na)<sup>+</sup>, 55%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>NaO<sub>4</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 245.0784; encontrada: 245.0795

---

---

(S)-2-Acetoxipropanoato de bencilo, (S)-34b

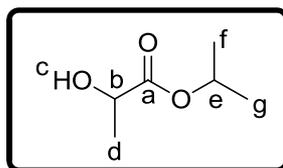
---

---

**Rendimiento:** 76%

(S)-34b: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -91.4 (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>), *ee* 99%.

**(±)-2-Hidroxiopropanoato de isopropilo, (±)-27c**



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 27%

**Fórmula empírica:** C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>

**Peso Molecular:** 132.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.20

**IR** (KBr): 3480, 2984, 1746, 1463, 1376 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.24 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.1 Hz, 3H<sub>d</sub>), 1.25 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.4 Hz, 3H<sub>f</sub>), 1.37 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.4 Hz, 3H<sub>g</sub>), 2.94 (s, 1H<sub>c</sub>), 4.15-4.23 (m, 1H<sub>b</sub>), 5.02-5.10 (m, 1H<sub>e</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 20.3 (CH<sub>3</sub>, C<sub>d</sub>), 21.6 (2CH<sub>3</sub>, C<sub>f,g</sub>), 66.7 (CH, C<sub>b</sub>), 69.3 (CH, C<sub>e</sub>), 175.2 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 155 [(M+Na)<sup>+</sup>, 73%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NaO<sub>3</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 155.0684; encontrada: 155.0687

**(S)- 2-Hidroxiopropanoato de isopropilo, (S)-27c<sup>259</sup>**

**Rendimiento:** 60%

**(S)-27c:** [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -5.2 (c 1.00, CHCl<sub>3</sub>), *ee* 99%.

<sup>259</sup> Brown, H. C.; Pai, G. G. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 1384-1394.

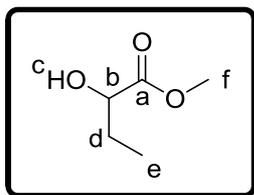
---

---

(±)-2-Hidroxi-butanoato de metilo, (±)-29c<sup>260</sup>

---

---



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 52%

**Fórmula empírica:** C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>3</sub>

**Peso Molecular:** 118.1 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.20

**IR** (KBr): 3433, 2969, 1738, 1420, 1296 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 0.95 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, 3H<sub>e</sub>), 1.60-1.89 (m, 2H<sub>d</sub>), 2.77 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.9 Hz, 1H<sub>c</sub>), 3.78 (s, 3H<sub>f</sub>), 4.15 (c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.9 Hz, 1H<sub>b</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 8.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>e</sub>), 27.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 52.4 (CH<sub>3</sub>, C<sub>f</sub>), 71.4 (CH, C<sub>b</sub>), 175.6 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 141 [(M+Na)<sup>+</sup>, 40%]

---

---

(S)-2-Hidroxi-butanoato de metilo, (S)-29c<sup>261</sup>

---

---

**Rendimiento:** 64%

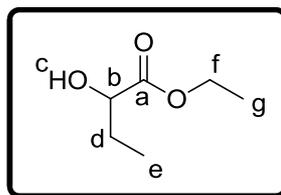
(S)-29c: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -6.4 (c 1.15, CHCl<sub>3</sub>), *ee* 99%.

---

<sup>260</sup> Kolasa, T.; Miller, M. J. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4978-4984.

<sup>261</sup> Akiyama, T.; Shimizu, M.; Mukaiyama, T. *Chem. Lett.* **1984**, 611-614.

**(±)-2-Hidroxi-butanoato de etilo, (±)-30c<sup>262</sup>**



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 66%

**Fórmula empírica:** C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>

**Peso Molecular:** 132.1 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.21

**IR** (KBr): 3429, 2980, 1733, 1464, 1212 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 0.96 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.3 Hz, 3H<sub>e</sub>), 1.29 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.1 Hz, 3H<sub>g</sub>), 1.63-1.88 (m, 2H<sub>d</sub>), 2.77 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.7 Hz, 1H<sub>c</sub>), 4.10-4.16 (m, 1H<sub>b</sub>), 4.24 (c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.1 Hz, 2H<sub>f</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 8.7 (CH<sub>3</sub>, C<sub>e</sub>), 14.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>g</sub>), 27.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 61.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>f</sub>), 71.3 (CH, C<sub>b</sub>), 175.2 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 155 [(M+Na)<sup>+</sup>, 36%]

**(S)-2-Hidroxi-butanoato de etilo, (S)-30c<sup>262</sup>**

**Rendimiento:** 70%

**(S)-30c:** [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -6.0 (c 1.20, EtOH), *ee* 99%.

<sup>262</sup> Nakamura, K.; Inoue, K.; Ushio, K.; Oka, S.; Ohno, A. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2589-2593.

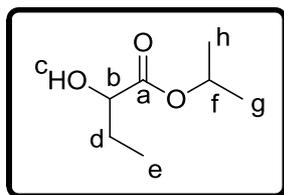
---

---

(±)-2-Hidroxi-butanoato de isopropilo, (±)-31c

---

---



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 76%

**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>

**Peso Molecular:** 146.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.31

**IR** (KBr): 3413, 2982, 1731, 1463, 1376 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 0.94 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, 3H<sub>e</sub>), 1.25 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.3 Hz, 3H<sub>h</sub>), 1.27 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.3 Hz, 3H<sub>g</sub>), 1.64-1.71 (m, 1H<sub>d</sub>), 1.77-1.81 (m, 1H<sub>d</sub>), 2.80 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.7 Hz, 1H<sub>c</sub>), 4.09-4.10 (m, 1H<sub>b</sub>), 5.09 (m, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.3 Hz, 1H<sub>f</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): 8.7 (CH<sub>3</sub>, C<sub>e</sub>), 21.7 (2CH<sub>3</sub>, C<sub>h,g</sub>), 27.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 69.3 (CH, C<sub>f</sub>), 71.3 (CH, C<sub>b</sub>), 174.7 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 169 [(M+Na)<sup>+</sup>, 61%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>NaO<sub>3</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 169.0835; encontrada: 169.0838

---

---

(S)-2-Hidroxi-butanoato de isopropilo, (S)-31c

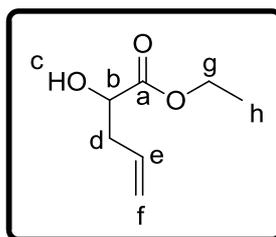
---

---

**Rendimiento:** 65%

(S)-31c: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -6.1 (c 0.85, CHCl<sub>3</sub>), *ee* 99%.

**(±)-2-Hidroxipenten-4-oato de etilo, (±)-32c<sup>263</sup>**



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 59%

**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>

**Peso Molecular:** 144.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.23

**IR** (KBr): 3409, 3081, 2984, 1747, 1644, 1463, 1376 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.29 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 3H<sub>h</sub>), 2.38-2.48 (m, 1H<sub>d</sub>), 2.52-2.61 (m, 1H<sub>d</sub>), 2.81 (d, 1H<sub>c</sub>), 4.20-4.28 (m, 3H<sub>g,b</sub>), 5.11-5.18 (m, 2H<sub>i</sub>), 5.73-5.87 (m, 1H<sub>e</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 14.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>h</sub>), 38.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 61.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>g</sub>), 69.8 (CH, C<sub>b</sub>), 118.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>i</sub>), 132.4 (CH, C<sub>e</sub>), 174.2 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 167 [(M+Na)<sup>+</sup>, 67%]

**(S)-2-Hidroxipenten-4-oato de etilo, (S)-32c**

**Rendimiento:** 65%

**(S)-32c:** [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -4.2 (c 0.95, CHCl<sub>3</sub>), *ee* 99%.

<sup>263</sup> Zhu, H.; Wickenden, J. G.; Campbell, N. E.; Leung, J. C. T.; Johnson, K. M. S.; Glenn, M. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2019-2022.

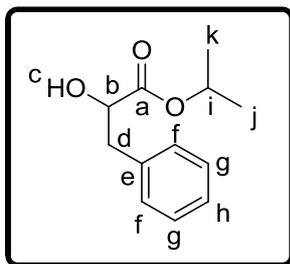
---

---

(±)-2-Hidroxi-3-fenilpropanoato de isopropilo, (±)-33c

---

---



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 72%

**Fórmula empírica:** C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>

**Peso Molecular:** 208.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.23

**IR** (KBr): 3359, 3088, 2982, 1731, 1496, 1375 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.26 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.1 Hz, 3H<sub>k</sub>), 1.28 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.1 Hz, 3H<sub>j</sub>), 2.99 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 13.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.8 Hz, 2H<sub>c,d</sub>), 3.15 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 13.8 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.8 Hz, 1H<sub>d</sub>), 4.43 (sa, 1H<sub>b</sub>), 5.08 (m, 1H<sub>i</sub>), 7.20-7.36 (m, 5H<sub>f,g,h</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 21.6 (2CH<sub>3</sub>, C<sub>k,j</sub>), 40.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 69.4 (CH, C<sub>i</sub>), 71.1 (CH, C<sub>b</sub>), 126.7 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>h</sub>), 128.1 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 129.4 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 136.3 (C<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 173.6 (C=O, C<sub>a</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 231 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>NaO<sub>3</sub> (M+Na)<sup>+</sup>: 231.0992; encontrada: 231.0995

---

---

(S)-2-Hidroxi-3-fenilpropanoato de isopropilo, (S)-33c

---

---

**Rendimiento:** 85%

(S)-33c: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -9.7 (c 0.78, CHCl<sub>3</sub>), *ee* 51%.

# **CAPÍTULO 4**

***Preparación enzimática  
de sulfóxidos quirales  
empleando Baeyer-  
Villiger monooxigenasas***



Las BVMOs no sólo catalizan la reacción que lleva su nombre, sino también la biooxidación de heteroátomos como azufre, boro, nitrógeno o fósforo.<sup>79</sup> Sin embargo, la habilidad de estas enzimas para llevar a cabo este tipo de oxidaciones, y en especial las sulfoxidaciones asimétricas de las que nos ocuparemos en el presente capítulo, es mucho menos conocida.

#### 4.1. IMPORTANCIA DE LOS SULFÓXIDOS

El grupo sulfóxido presenta una estructura piramidal, en la cual el átomo de azufre se encuentra tricoordinado con un átomo de oxígeno y dos carbonos, poseyendo un par de electrones libres. Por lo tanto, si las dos cadenas con carbonos son diferentes, los sulfóxidos presentan quiralidad. La interacción azufre-oxígeno tiene un carácter electrostático, que produce un significativo dipolo, con la carga negativa centrada en el oxígeno. Los sulfóxidos son compuestos con una notable estabilidad óptica ya que su índice de racemización es bajo a temperatura ambiente. En la mayoría de los casos sólo a altas temperaturas (sobre 200°C) se produce racemización en estos compuestos.<sup>264</sup>

---

<sup>264</sup> Raymer, D. R.; Gordon, A. J.; Mislow, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 4854-4860.

## Capítulo 4

---

Los sulfóxidos orgánicos son moléculas interesantes ya que pueden reaccionar de maneras diferentes, bien a través de su par de electrones libres, a través del oxígeno, o bien a través de sus grupos alquílicos o arílicos. Por ello, son compuestos de una gran versatilidad química, lo que junto a su capacidad de inducción asimétrica y a su facilidad de eliminación en condiciones de reacción suaves, les hace moléculas perfectas como ligandos y auxiliares quirales en catálisis asimétrica.<sup>265</sup> Asimismo, estas características pueden ser incluso mejoradas cuando se introducen en la molécula del sulfóxido grupos heteroaromáticos con capacidad quelante, ya que de esta forma se genera un punto reactivo más.

La mayor utilidad sintética de los sulfóxidos se debe a la habilidad de su átomo de azufre para estabilizar la carga negativa de un carbono adyacente.<sup>266</sup> Este poder de estabilización unido al incremento de acidez del protón en su posición  $\alpha$ , facilita los ataques nucleófilos de forma estereoselectiva a aldehídos, cetonas e iminas. Este hecho favorece el desarrollo de la química de formación de enlaces C-C.<sup>267</sup> Si los sulfóxidos presentan un doble enlace conjugado, su comportamiento es similar al de las cetonas  $\alpha$ - $\beta$ -insaturadas, siendo susceptibles de experimentar ataques nucleófilos sobre estos dobles enlaces activados. Estos compuestos pueden ser utilizados como dienófilos en reacciones de Diels-Alder, pudiendo producirse tras la formación del aducto, la eliminación pirolítica del grupo sulfóxido.<sup>267</sup>

Además, el grupo sulfínilo presente en los sulfóxidos quirales forma parte de numerosos compuestos con actividad biológica, de los que se muestran algunos ejemplos en la Figura 4.1.<sup>268</sup>

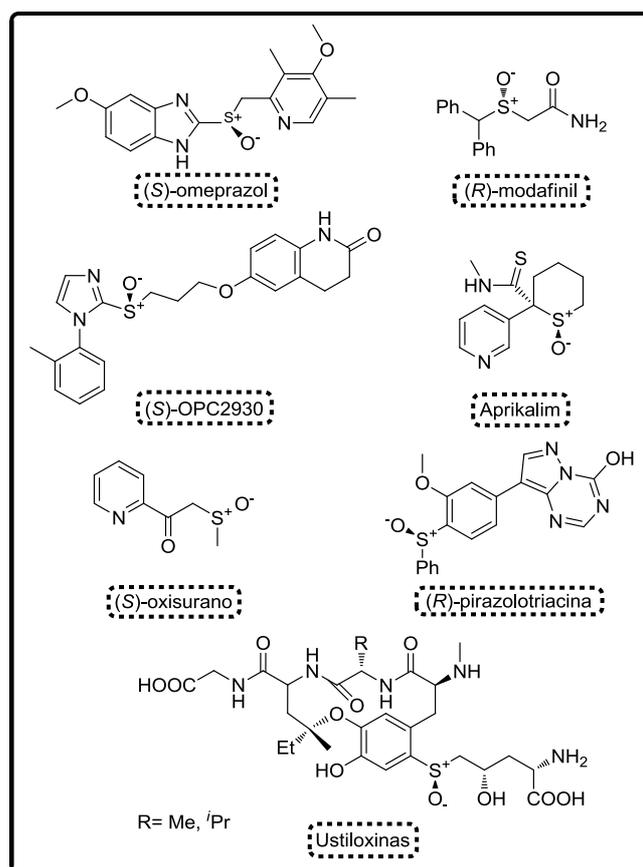
---

<sup>265</sup> (a) Carreño, M. C. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 1717-1760; (b) Fernández, I.; Khiar, N. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 3651-3705; (c) Kobayashi, S.; Ogawa, C.; Konishi, H.; Sugiura, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6610-6611; (d) Dalko, P. I.; Moisan, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5138-5175; (e) Pellissier, H. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5559-5601; (f) Fernández, I.; Valdivia, V.; Leal, M. P.; Khiar, N. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2215-2218; (g) Carreño, M. C.; Hernández-Torres, G.; Ribagorda, M.; Urbano, A. *Chem. Commun.* **2009**, 6129-6144.

<sup>266</sup> Barlett, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 3305-3312.

<sup>267</sup> Solladié, G. *Synthesis* **1981**, 185-195.

<sup>268</sup> (a) Bentley, R. *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 609-624; (b) Wojaczyńska, E.; Wojaczyński, J. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 4303-4353.



**Figura 4.1.** Compuestos con actividad biológica que presentan un grupo sulfinilo en su estructura.

Por ello, en los últimos años la industria farmacéutica ha mostrado un gran interés en la síntesis de estos compuestos.<sup>269</sup> Así, el esomeprazol (el enantiómero *S* del omeprazol), cuya función es curar y aliviar los síntomas de reflujo gastroesofágico, es uno de los medicamentos más vendidos en el mundo.<sup>269c,270</sup> El armodafinil (el enantiómero *R* del modafinil) es un fármaco

<sup>269</sup> (a) Rouhi, A. M. *Chem. Eng. News* **2003**, *81*, 56-61; (b) Legros, L.; Dehli, J. R.; Bolm, C. *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 19-31; (c) Federsel, H.-J. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 671-680.

<sup>270</sup> Cotton, H.; Elebring, T.; Larsson, M.; Li, L.; Sörensen, H.; von Unge, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 3819-3825.

estimulante para el tratamiento de desórdenes en el sueño.<sup>271</sup> El (S)-OPC-2930 es un antiagregante plaquetario.<sup>272</sup> El aprikalim funciona como un activador del canal de potasio<sup>273</sup> y el (S)-oxisurano, es un inmunosupresor.<sup>274</sup> Por otra parte, un derivado de la (R)-pirazolotriacina<sup>275</sup> actúa como fármaco contra la hiperuricemia y las ustiloxinas son moléculas activas contra el cáncer de pecho y pulmón en humanos.<sup>276</sup>

### 4.2. SÍNTESIS DE SULFÓXIDOS QUIRALES

Existen diferentes estrategias para la síntesis de sulfóxidos quirales. Entre éstas podemos destacar: resoluciones cinéticas de sulfóxidos racémicos,<sup>277</sup> oxidación asimétrica de sulfuros proquirales mediante oxidantes químicos en cantidades estequiométricas,<sup>278</sup> o la adición nucleófila de ligandos a sulfinatos quirales con reactivos de Grignard (método de Andersen).<sup>279</sup> Sin embargo, todos estos procesos tienen una serie de desventajas: limitación en el rendimiento, altos costes, necesidad de cantidades estequiométricas de oxidantes o procesos tediosos con muchas limitaciones en la estructura del sustrato.

Por todo ello, el procedimiento más extendido, aceptado y utilizado en la industria desde hace décadas, es la oxidación catalítica enantioselectiva de

---

<sup>271</sup> (a) Osorio-Lozada, A.; Prisinzano, T.; Olivo, H. F. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3811-3815; (b) Rebiere, F.; Duret, G.; Prat, L.; Piacenza, G. U.S. Patent 7368591, **2005**; *Chem. Abstr.* **2005**, *143*, 366999r.

<sup>272</sup> Matsugi, M.; Shimada, R.; Ohata, S.; Nojima, M.; Fukuda, N.; Minamikawa, J.; Kita, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 1511-1513.

<sup>273</sup> Brown, T. J.; Chapman, R. F.; Cook, D. C.; Hart, T. W.; McLay, I. M.; Jordan, R.; Mason, J. S.; Palfreyman, M. N.; Walsh, R. J. A.; Withnall, M. T.; Aloup, J.-C.; Cavero, I.; Farge, D.; James, C.; Mondot, S. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 3613-3624.

<sup>274</sup> Khair, N.; Fernández, I.; Alcuía, F. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1993**, *74*, 405-406.

<sup>275</sup> Naito, S.; Nishimura, M. *Xenobiotica* **2002**, *32*, 491-503.

<sup>276</sup> Hutton, C. A.; White, J. M. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1643-1646.

<sup>277</sup> (a) Bortolini, O.; Fantin, G.; Fogagnolo, M.; Medici, A.; Pedrini, P. *Chem. Commun.* **2000**, 365-366; (b) Noguchi, T.; Miyagawa, T.; Satoh, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 2073-2076.

<sup>278</sup> (a) Davis, F. A.; Sheppard, A. C. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 5703-5742; (b) Legros, J.; Bolm, B. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1086-1092; (c) Caron, S.; Dugger, R. W.; Ruggeri, S. G.; Ragan, J. A.; Brown Ripin, D. H. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2943-2989.

<sup>279</sup> (a) Andersen, K. K. *Tetrahedron Lett.* **1962**, *3*, 93-95; (b) Andersen, K. K.; Gaffield, W.; Papanikolaou, N. N.; Foley, J. W.; Perkins, R. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 5637-5646; (c) Whitesell, J. K.; Wong, M.-S. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4552-4554.

sulfuros proquirales. Estos procesos pueden estar catalizados bien por complejos metálicos,<sup>280</sup> o bien por biocatalizadores.<sup>281</sup>

En cuanto a los métodos para la preparación de sulfóxidos quirales mediante oxidación asimétrica biocatalizada de sulfuros proquirales, hay dos grupos mayoritarios de enzimas empleados, las peroxidasas,<sup>282</sup> y las monooxigenasas.<sup>27</sup> En el presente capítulo nos centraremos en las BVMOs, pertenecientes a este último grupo de enzimas.

### 4.3. SÍNTESIS DE SULFÓXIDOS QUIRALES MEDIANTE REACCIONES CATALIZADAS POR BVMOs

El primer grupo en investigar la acción de las Baeyer-Villiger monooxigenasas en la oxidación de heteroátomos presentes en xenobióticos, fue el de Walsh en 1982.<sup>283</sup> Describieron la oxidación de 4-tolil etil sulfuro a su correspondiente (*S*)-sulfóxido con un 73% de exceso enantiomérico, mediante el enzima aislado CHMO de *Acinetobacter* sp. (Tabla 4.1, entrada 1). En 1992, Carrea y colaboradores estudiaron la biooxidación de numerosos alquil aril sulfuros y dialquil sulfuros con preparaciones de CHMO<sub>Acineto</sub> parcialmente purificadas (algunos ejemplos se muestran en la Tabla 4.1).<sup>284</sup> Se observó que la estereoselectividad enzimática de estas oxidaciones dependía enormemente de la estructura del sulfuro de partida, y por tanto se obtuvieron tanto (*R*)- como (*S*)-sulfóxidos. Un ejemplo de las diferentes enantioselectividades encontradas radica en la oxidación del fenil metil sulfuro y etil 4-fluorofenil sulfuro, compuestos con estructuras muy similares. En el primer caso se aísla de forma enantiopura el (*R*)-fenil metil sulfóxido, mientras que en el segundo se obtiene el (*S*)-sulfóxido con un

<sup>280</sup> (a) Kagan, H. B. en *Catalytic Asymmetric Synthesis*. Ed. Ojima, I. Wiley-VCH, New-York **2000**, 327-356; (b) Kagan, B.; Luukas, T. en *Transition Metals for Organic Synthesis*. Eds. Beller, M.; Bolm, C. Wiley-VCH, Weinheim **2004**, 479-495; (c) Bäckvall, J.-E. en *Modern Oxidation Methods*. Ed. J.-E. Bäckvall, VCH-Wiley, Weinheim **2004**, 193-222.

<sup>281</sup> (a) Faber, K. *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 5004-5010; (b) Holland, H. L. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 171-181.

<sup>282</sup> (a) Colonna, S.; Gaggero, N.; Casella, L.; Carrea, G.; Pasta, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 95-106; (b) Holland, H. L. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 171-181; (c) Dembitsky, V. M. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 4701-4720; (d) Pezzotti, F.; Okrasa, K.; Therisod, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 2681-2683; (e) Ryan, B. J.; Carolan, N.; Ó'Fágáin, C. *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 355-363; (f) Pezzotti, F.; Therisod, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 701-704.

<sup>283</sup> Light, D. R.; Waxman, D. J.; Walsh, C. *Biochemistry* **1982**, *21*, 2490-2498.

<sup>284</sup> Carrea, G.; Redigolo, B.; Riva, S.; Colonna, S.; Gaggero, N.; Battistel, E.; Bianchi, D. *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, *3*, 1063-1068.

## Capítulo 4

93% de exceso enantiomérico (entradas 3 y 6, respectivamente). Además, se obtuvieron resultados muy similares en la oxidación de alquil aril sulfuros sustituidos con grupos funcionales (entradas 7 y 8).<sup>285</sup> En la mayoría de los casos los productos se aislaron con buenas conversiones ( $c \geq 75\%$ ) y altos excesos enantioméricos ( $ee \geq 90\%$ ).

**Tabla 4.1.** Biooxidaciones de sulfuros catalizadas por la CHMO de *Acinetobacter*.<sup>a</sup>



Entrada	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	ee(%)	c(%)
1	<i>p</i> -Me-Ph <sup>b</sup>	Et	73( <i>S</i> )	n.d
2	<i>p</i> -Me-Ph	Et	89( <i>S</i> )	89
3	Ph	Me	99( <i>R</i> )	88
4	<i>p</i> -Me-Ph	Me	37( <i>S</i> )	94
5	Bn	Me	54( <i>R</i> )	97
6	<i>p</i> -F-Ph	Et	93( <i>S</i> )	93
7	Ph	CH <sub>2</sub> CN	92( <i>R</i> )	90
8	Ph	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Cl	93( <i>S</i> )	75
9	Bn	Me	54( <i>R</i> )	97
10	Bn	Et	67( <i>S</i> )	80
11	Bn	<i>n</i> -Pr	96( <i>S</i> )	90
12	Benciletil	Me	40( <i>R</i> )	95
13	Bencilpropil	Me	48( <i>S</i> )	79
14	Ciclopentil	Me	98( <i>R</i> )	80
15	<sup>t</sup> Bu	Me	99( <i>R</i> )	98
16	Oct	Me	50( <i>S</i> )	50

n.d. no determinado.

<sup>a</sup> t=14 horas.

<sup>b</sup> Reacción realizada con el enzima aislado.

Años más tarde se amplió este estudio a distintos bencil alquil y bencilalquil metil sulfuros (entradas 9-13).<sup>286</sup> De nuevo las conversiones obtenidas en las oxidaciones superaban siempre el 75%, lo que indica que la CHMO<sub>Acineto</sub> no es muy sensible a las diferencias estructurales de estos compuestos. Además

<sup>285</sup> Secundo, F.; Carrea, G.; Dallavalle, S.; Franzosi, G. *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 1981-1982.

<sup>286</sup> Pasta, P.; Carrea, G.; Holland, H. L.; Dallavalle, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 933-936.

apenas se generaron cantidades apreciables del producto de sobreoxidación (la sulfona), por lo que el paso de sulfoxidación es el responsable del exceso enantiomérico del sulfóxido. Cuando la cadena alquílica es mayor a un grupo metilo, la configuración predominante cambia de *R* a *S*, obteniéndose como mayor valor un 96% de exceso enantiomérico para el bencil *n*-propil sulfóxido (entrada 11). Esta misma inversión fue observada al aumentar la cadena alquílica entre el grupo fenilo y el átomo de azufre (entradas 12 y 13).

Las biotransformaciones llevadas a cabo sobre dialquil sulfuros generaron los correspondientes dialquil sulfóxidos con conversiones altas (mayores del 80%) y excesos enantioméricos excelentes para la oxidación de los derivados *tert*-butil metil y ciclopentil metil sulfuro (entradas 14 y 15). Sin embargo, al aumentar la longitud de una de las cadenas alquílicas (metil octil sulfuro), se observó una disminución drástica de la conversión y enantioselectividad (entrada 16).<sup>284,287</sup>

Con objeto de explicar la influencia de la estructura del sustrato en la enantioselectividad enzimática, se estudiaron las oxidaciones de bencil metil sulfuros sustituidos en posición *para*. Se observó que todos aquellos sustratos con grupos electrón-dadores generaban el (*R*)-sulfóxido mientras que aquellos con grupos electrón-atractores daban lugar al (*S*)-sulfóxido. Este hecho fue explicado mediante un modelo en el cual el centro activo de la CHMO<sub>Acineto</sub> se encuentra dividido en dos cavidades, una grande rica en electrones y otra pequeña y pobre. Dependiendo de su naturaleza, cada sustituyente estará más cómodo en uno u otro hueco, obteniéndose el enantiómero *R* o *S* en cada caso.<sup>288</sup>

También se ha estudiado la oxidación de algunos sulfuros con células recombinantes de la CHMO<sub>Acineto</sub> sobreexpresada en levadura de panadería.<sup>289</sup> Con este biocatalizador se obtuvo el (*R*)-fenil metil y el (*R*)-*tert*-butil metil sulfóxido enantiopuros con rendimientos del 95% y 54%, respectivamente. En la oxidación del *n*-butil metil sulfuro se obtuvo el correspondiente (*R*)-sulfóxido con un 74% de exceso enantiomérico y un 55% de rendimiento.

<sup>287</sup> Colonna, S.; Gaggero, N.; Carrea, G.; Pasta, P. J. *Chem. Soc., Chem. Commun.* **1997**, 5, 439-440.

<sup>288</sup> Ottolina, G.; Pasta, P.; Varley, D.; Holland, H. L. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 3427-3430.

<sup>289</sup> Chen, G.; Kayser, M. M.; Mihovilovic, M. D.; Mrstik, M. E.; Martínez, C. A.; Stewart, J. D. *New J. Chem.* **1999**, 23, 827-832.

## Capítulo 4

---

Se han utilizado también en forma de células enteras naturales, recombinantes o bien como extractos enzimáticos, otros organismos que contienen genes de BVMOs para llevar a cabo sulfoxidaciones enantioselectivas de alquil aril sulfuros. Algunos ejemplos son: *Pseudomonas putida* NCIMB 10007,<sup>290</sup> *Pseudomonas* sp. NCIMB 9872, *Xanthobacter autotrophicus* DSM 431 (NCIMB 10811) y la levadura negra NV2.<sup>291</sup> En algunos casos se observó un comportamiento enantiocomplementario con los resultados obtenidos en estudios previos con el enzima aislado CHMO<sub>Acineto</sub>. Así, cuando se utiliza como biocatalizador células enteras que expresan una CPMO de *Pseudomonas* sp. NCIMB 9872 en la sulfoxidación del tioanisol, se obtiene el enantiómero *S*, configuración opuesta a la obtenida cuando se utiliza la CHMO<sub>Acineto</sub>. En ambos casos se obtiene el fenil metil sulfóxido con conversión total y enantiopuro, sin embargo con otros sustratos como etil y metil *p*-tolil sulfuro, la CPMO muestra una mayor selectividad. Cuando se utilizan células enteras de la levadura negra NV2 y de *X. autotrophicus* en la oxidación del tioanisol, se obtiene el correspondiente (*R*)-sulfóxido enantiopuro con un conversión cuantitativa y de un 75%, respectivamente.

Recientemente se ha descrito un procedimiento para la síntesis de una serie de  $\beta$ -hidroxisulfóxidos empleando la CHMO<sub>Acineto</sub> aislada (Figura 4.2).<sup>292</sup> Estos compuestos presentan un gran interés debido a su utilidad como auxiliares quirales en síntesis asimétrica. Pueden actuar también como ligandos<sup>293</sup> o como precursores de una gran variedad de compuestos como sulfuros cíclicos, leucotrienos, benzotiazepinas y alcoholes alílicos.<sup>294</sup> La resolución cinética del sulfuro ( $\pm$ )-*trans*-2-(feniltio)ciclohexanol mediante la oxidación selectiva catalizada por esta BVMO ocurrió con una excelente regio- y enantioselectividad ( $ee_{diast}=99:1$ ,  $ee=98\%$  del sulfuro,  $ee\geq 99\%$  de (1*S*, 2*S*, *S*<sub>s</sub>)-sulfóxido para  $c=47\%$ ). Los resultados obtenidos para el ( $\pm$ )-*trans*-2-(feniltio)ciclopentanol y el ( $\pm$ )-*trans*-2-(feniltio)cicloheptanol fueron moderados, con excesos diastereoisoméricos del orden del 80%, mientras que el exceso enantiomérico del producto mayoritario era próximo al 60%.

---

<sup>290</sup> Beecher, J.; Richardson, P.; Willetts, A. *Biotechnol. Lett.* **1994**, *16*, 909-912.

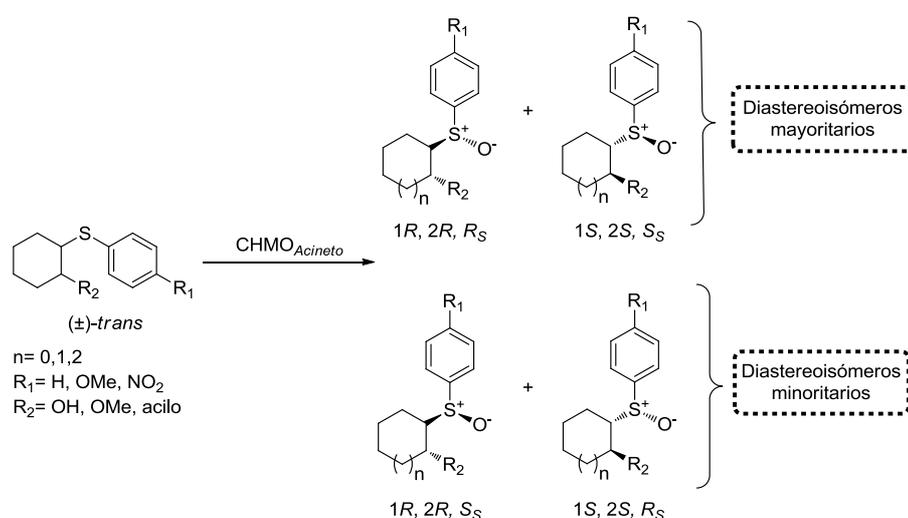
<sup>291</sup> Kelly, D. R.; Knowles, C. J.; Mahdi, J. G.; Taylor, I. N.; Wright, M. A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 365-368.

<sup>292</sup> Colonna, S.; Pironti, V.; Zambianchi, F.; Ottolina, G.; Gaggero, N.; Celentano, G. *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 363-368.

<sup>293</sup> Broutin, P. E; Colobert, F. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3281-3284.

<sup>294</sup> (a) Schwatz, A.; Madan, P. B.; Mohacsi, E.; O'Brien, J. P.; Todaro, L. J.; Coffen, D. L. *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 851-856; (b) Kesavan, V.; Bonnet-Delpon, D.; Bégué, J. P. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2895-2898.

Los sustratos cuyo grupo hidroxilo se encontraba protegido no experimentaron reacción de oxidación, al igual que el ( $\pm$ )-*trans*-2-((4-nitrofenil)tio)ciclohexanol.



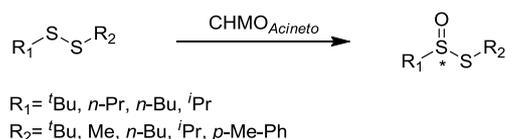
**Figura 4.2.** Oxidación de ( $\pm$ )-*trans*- $\beta$ -hidroxisulfuros catalizada por la  $\text{CHMO}_{Acineto}$ .

Otros ejemplos de sulfoxidaciones enantioselectivas catalizadas por las BVMOs purificadas HAPMO, *wt*PAMO y su mutante M446G, han sido descritos tanto en la Introducción como en los Antecedentes del Capítulo 1.

#### 4.4. OXIDACIONES DE OTRO TIPO DE COMPUESTOS DE AZUFRE CATALIZADAS POR BVMOS

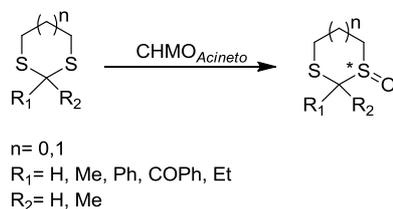
Las BVMOs son capaces de oxidar otro tipo de compuestos con azufre, como por ejemplo disulfuros. En la sulfoxidaciones de una serie de alquil alquil y alquil aril disulfuros catalizada por la  $\text{CHMO}_{Acineto}$  (Figura 4.3) se obtuvieron enantioselectividades bajas o moderadas (22-64%), excepto en la biotransformación del *tert*-butil disulfuro (90% de (*R*)-*tert*-butilbutanotiosulfonato con un 97% de exceso enantiomérico).<sup>284,295</sup>

<sup>295</sup> Colonna, S.; Gaggero, N.; Carrea, G.; Pasta, P.; Alphanh, V.; Furstoss, R. *Chirality* **2001**, *13*, 40-42.



**Figura 4.3.** Sulfoxidaciones de disulfuros catalizadas por la CHMO<sub>Acineto</sub>.

Otros compuestos objeto de interés para las BVMOs fueron los 1,3-ditioacetales, ya que sus correspondientes sulfóxidos resultan muy útiles como grupos quirales sintéticamente equivalentes del anión acilo.<sup>296</sup> Se demostró que la CHMO<sub>Acineto</sub> en forma pura es capaz de oxidar 1,3-ditioacetales, generando de forma enantiopura los (*R*)-monosulfóxidos con buenos rendimientos, formándose pequeñas cantidades de monosulfona.<sup>297</sup> Este estudio fue extendido a la oxidación de ditianos y ditiolanos sustituidos en posición 2 con objeto de probar si existe una preferencia diastereo-enantiotópica por parte de la CHMO<sub>Acineto</sub> (Figura 4.4).<sup>298</sup> En todos los casos se produjo la formación preferencial del *trans*-monosulfóxido.



**Figura 4.4.** Sulfoxidaciones de derivados de ditianos, ditiolanos y ditioacetales catalizadas por la CHMO<sub>Acineto</sub>.

Colonna y colaboradores estudiaron también la oxidación de sulfitos cíclicos a sulfatos mediante la CHMO<sub>Acineto</sub>.<sup>299</sup> Estos compuestos son considerados equivalentes sintéticos de epóxidos, ya que son capaces de reaccionar con una gran variedad de nucleófilos. En muchos casos los sulfatos cíclicos son incluso más reactivos que los oxiranos.<sup>300</sup> Se llevó a

<sup>296</sup> Colonna, S.; Gaggero, N.; Pasta, P.; Ottolina, G. *Chem. Commun.* **1996**, 20, 2303-2307.

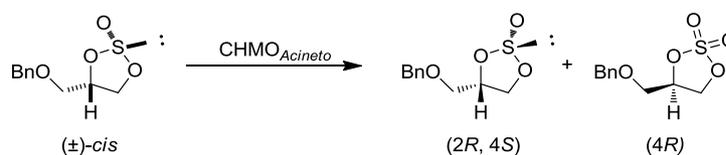
<sup>297</sup> Colonna, S.; Gaggero, N.; Bertinotti, A.; Carrea, G.; Pasta, P.; Bernardi, A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 11, 1123-1124.

<sup>298</sup> Colonna, S.; Gaggero, N.; Carrea, G.; Pasta, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 565-570.

<sup>299</sup> Colonna, S.; Gaggero, N.; Carrea, G.; Pasta, P. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1998**, 3, 415-416.

<sup>300</sup> (a) Oi, R.; Sharpless, K. B. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 999-1002; (b) Lohray, B. B. *Synthesis* **1992**, 1035-1052; (c) Pilkington, M.; Wallis, J. D. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*

cabo la resolución cinética de *cis*- y *trans*-4-benciloximetil-1,2,3,-dioxatiolano-2-óxido así como de *cis*- y *trans*-metil-dioxatiolano-2-óxido. En el caso de los derivados benciloxi, los *cis* presentan una mayor reactividad y selectividad que los *trans*, así por ejemplo para el derivado *cis*-benciloximetil se obtuvo al 62% de conversión, un exceso enantiomérico del 94% para el sulfito remanente y se aisló el sulfato correspondiente con un 58% de pureza óptica (Figura 4.5). En el caso de los sulfitos metilados este orden se invierte, siendo el derivado *trans* más reactivo y selectivo que el *cis*.

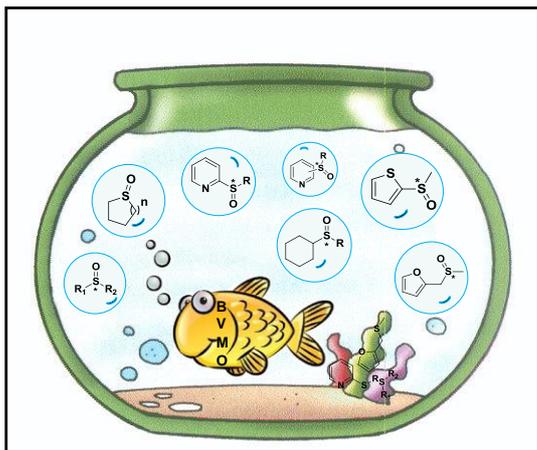


**Figura 4.5.** Oxidación enantioselectiva de sulfitos a sulfatos catalizada por la  $\text{CHMO}_{\text{Acineto}}$ .

## Capítulo 4

---

Debido al alto interés que presentan los sulfóxidos ópticamente activos en química orgánica, en este capítulo nos hemos planteado la preparación de sulfóxidos quirales con estructuras muy diversas (heteroaril alquil, ciclohexil alquil, alquil alquil sulfóxidos y sulfóxidos cíclicos), empleando como biocatalizadores las Baeyer-Villiger monooxigenasas HAPMO, wtPAMO y su mutante M446G en medio acuoso. Se analizarán además algunas de las variables que influyen para la obtención de los sulfóxidos con las mayores conversiones y excesos enantioméricos. Asimismo, se llevará a cabo la oxidación de diferentes sulfóxidos racémicos catalizada por la HAPMO y se analizarán los parámetros cinéticos en las sulfoxidaciones de ciertos sulfuros proquirales catalizadas por este enzima.



## 4.5. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE HETEROARIL ALQUIL SULFUROS

### 4.5.1. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE (ALQUILTIO)PIRIDINAS

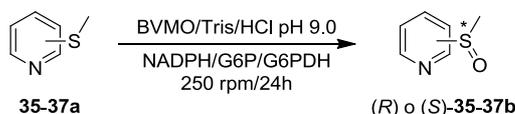
Nuestros primeros estudios se centraron en la preparación de metilsulfinilpiridinas con el grupo metilsulfinilo situado en posiciones 2-, 3- o 4- respecto al nitrógeno de la piridina (sustratos **35a**, **36a** y **37a**, respectivamente), empleando procesos de oxidación catalizados por la HAPMO, la *w*tPAMO y la PAMO<sub>M446G</sub>. Las reacciones fueron llevadas a cabo en disolución tampón 50 mM Tris/HCl pH 9.0 con un sistema de regeneración G6P/G6PDH para NADPH, y de igual modo que en capítulos anteriores, la temperatura inicial fue de 30°C para los dos biocatalizadores PAMO y de 20°C para HAPMO. Como muestra la Tabla 4.2, la HAPMO fue capaz de catalizar la sulfoxidación enzimática de los tres derivados con conversiones de moderadas a altas y excelentes excesos enantioméricos (entradas 1-3) después de 24 horas. El mejor sustrato para este enzima fue la 2-(metiltio)piridina (**35a**), ya que fue posible alcanzar de forma enantiopura el sulfóxido (*S*)-**35b** con conversión completa (entrada 1). Los derivados 3- y 4- fueron oxidados con peores conversiones, observándose que cuanto más alejado el grupo sulfuro del nitrógeno, menor conversión. Así, la (*S*)-3-(metilsulfinil)piridina [(*S*)-**36b**] fue obtenida con un 95% de conversión (entrada 2), mientras que la oxidación de la 4-(metiltio)piridina (**37a**) generó un 63% de (*R*)-**37b** (entrada 3). Hay que resaltar que este enzima muestra una estereoselectividad opuesta a la obtenida en la oxidación de **35-36a**, cuando cataliza la biotransformación del sulfuro **37a**.

En las reacciones catalizadas por la *w*tPAMO y la PAMO<sub>M446G</sub> (entradas 4-9), únicamente se observó producto en la oxidación de la 3-(metiltio)piridina (**36a**) (entradas 5 y 8). Para este sustrato, la PAMO<sub>M446G</sub> mostró una mayor actividad que la cepa nativa, generando un 54% de (*R*)-**36b** después de 24 horas con un exceso enantiomérico del 88% (entrada 5), mientras que con la *w*tPAMO se obtuvo un 26% de (*R*)-**36b** con una moderada pureza óptica (*ee*=39%) (entrada 8).

## Capítulo 4

Es importante tener en cuenta que dependiendo del enzima escogido (la HAPMO o la PAMO<sub>M446G</sub>) se pueden obtener con una alta selectividad ambos enantiómeros del sulfóxido **36b**.

**Tabla 4.2.** Biooxidaciones de (metiltio)piridinas catalizadas por BVMOs.

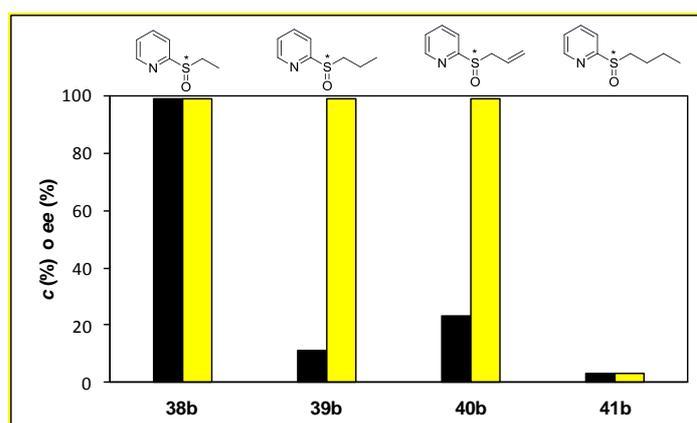


Entrada	Sustrato	Enzima	<i>ee</i> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>
1	<b>35a</b>	HAPMO	≥99( <i>S</i> )	≥99
2	<b>36a</b>	HAPMO	≥99( <i>S</i> ) <sup>b</sup>	95
3	<b>37a</b>	HAPMO	≥99( <i>R</i> )	63
4	<b>35a</b>	M446G	-	≤3
5	<b>36a</b>	M446G	88( <i>R</i> ) <sup>b</sup>	54
6	<b>37a</b>	M446G	-	≤3
7	<b>35a</b>	<i>wt</i> PAMO	-	≤3
8	<b>36a</b>	<i>wt</i> PAMO	39( <i>R</i> ) <sup>b</sup>	26
9	<b>37a</b>	<i>wt</i> PAMO	-	≤3

<sup>a</sup> Determinado por HPLC.

<sup>b</sup> Determinado por CG.

Debido a los excelentes resultados obtenidos en la oxidación de la 2-(metiltio)piridina (**35a**) con la HAPMO, nos propusimos extender este estudio a otras 2-(alquiltio)piridinas (Figura 4.6). En los casos que la HAPMO mostró actividad con estos derivados (**38-39a** y **40a**), lo hizo con total enantioselectividad. Así, tras 24 horas se pudo sintetizar de forma enantiopura la 2-(etilsulfinil)piridina [(*S*)-**38b**] con conversión completa. A medida que aumenta la cadena alquílica de los derivados disminuye progresivamente la conversión de la biooxidación. De esta forma se generó tan solo un 11% del sulfóxido enantiopuro (*S*)-(2-(propilsulfinil)piridina [(*S*)-**39b**]. Esta misma tendencia se encuentra recogida en la bibliografía para la oxidación catalizada por la HAPMO de derivados del tioanisol.<sup>95</sup> En la oxidación de la 2-(aliltio)piridina (**40a**) se alcanza un 23% de conversión, lo cual permite establecer que el doble enlace presenta un efecto positivo sobre la actividad enzimática de la HAPMO. Finalmente, tras 24 horas no se observó sulfoxidación de la 2-(butiltio)piridina (**41a**), indicando que una cadena alquílica de tres carbonos es límite para este biocatalizador.



**Figura 4.6.** Biooxidación de 2-(alquiltio)piridinas (**38-41a**) catalizada por la HAPMO. Se representa la conversión (■) y el exceso enantiomérico de (*S*)-**38-41b** (■).

Estos sustratos fueron también probados con la *w*tPAMO y su mutante M446G. Sorprendentemente, la PAMO<sub>M446G</sub> fue capaz de transformar el sulfuro **38a** en un 13% de (*R*)-2-(etilsulfinil)piridina [(*R*)-**38b**] con un exceso enantiomérico del 76% después de 24 horas. De nuevo, podemos obtener ambos enantiómeros del sulfóxido **38b**, ya que este biocatalizador muestra una enantioselectividad contraria con respecto a la HAPMO.

Para todas estas oxidaciones se observó una mínima cantidad (menor del 8%) de la sulfona. Este hecho indica que la pureza óptica de los sulfóxidos finales se debe casi exclusivamente a la oxidación asimétrica por parte del biocatalizador.

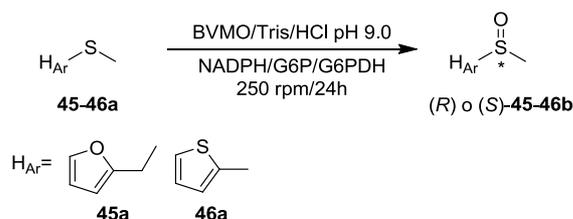
#### 4.5.2. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE OTROS SULFUROS HETEROAROMÁTICOS

Posteriormente analizamos otros sulfuros heteroaromáticos, comenzando el estudio con un sulfuro heterocíclico oxigenado, el 2-furfurilmetil metil sulfuro (**45a**). Como se muestra en la Tabla 4.3, se obtuvo enantiopuro el (*R*)-2-furfurilmetil metil sulfóxido [(*R*)-**45b**] en la oxidación catalizada por la HAPMO (entrada 1). En cambio, la utilización de la *w*tPAMO y su mutante M446G generó (*S*)-**45b** con menores enantioselectividades (entradas 2 y 3), especialmente en el caso del mutante. Las conversiones del proceso van de moderadas a altas, siendo posible conseguir **45b** con la mayor conversión empleando la *w*tPAMO (entrada 2).

## Capítulo 4

Además se estudió la oxidación de un sulfuro heterocíclico con un átomo de azufre en el anillo aromático como es el 2-(metiltio)tiofeno (**46a**). Después de 24 horas, la HAPMO fue capaz de transformar de forma enantiopura este compuesto en su correspondiente (*S*)-sulfóxido con una buena conversión ( $c=71\%$ , entrada 4). La *wt*PAMO mostró una menor actividad y selectividad en la síntesis del enantiómero opuesto (*R*)-**46b** ( $c=22\%$  y  $ee=34\%$ , entrada 5). Por último, la PAMO<sub>M446G</sub> presentó una muy baja actividad con este sustrato, alcanzándose tan solo un 7% de conversión tras 24 horas (entrada 6).

**Tabla 4.3.** Sulfoxidaciones de compuestos heterocíclicos catalizadas por BVMOs.

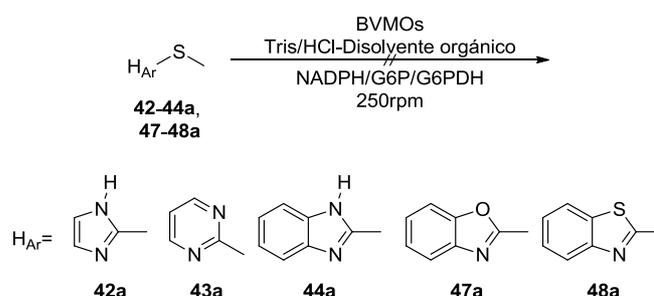


Entrada	Sustrato	Enzima	$ee(\%)^a$	$c(\%)^b$
1	<b>45a</b>	HAPMO	$\geq 99(R)$	69
2	<b>45a</b>	<i>wt</i> PAMO	81( <i>S</i> )	92
3	<b>45a</b>	M446G	25( <i>S</i> )	64
4	<b>46a</b>	HAPMO	$\geq 99(S)$	71
5	<b>46a</b>	<i>wt</i> PAMO	34( <i>R</i> )	22
6	<b>46a</b>	M446G	-	7

<sup>a</sup> Determinado por HPLC.

<sup>b</sup> Determinada por CG.

En la Figura 4.7 se muestra la sulfoxidación biocatalizada de otros sulfuros heteroaromáticos conteniendo nitrógeno como el 2-(metiltio)-1*H*-imidazol (**42a**), 2-(metiltio)pirimidina (**43a**) y 2-(metiltio)-1*H*-benzo[*b*]imidazol (**44a**). Se probaron distintas condiciones de reacción modificando el pH, la temperatura y la presencia de cosolventes, pero no se observó oxidación alguna con ninguno de los biocatalizadores tras largos tiempos. También se analizaron otros sustratos benzofusionados como el 2-(metiltio)benzoxazol (**47a**) o el 2-(metiltio)benzo[*d*]tiazol (**48a**), pero tampoco ninguno de las BVMOs mostró actividad, lo cual corrobora el resultado negativo obtenido también para el sulfuro nitrogenado análogo **44a**.



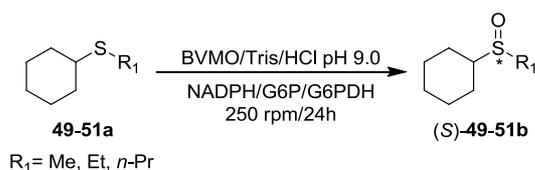
**Figura 4.7.** Sulfoxidaciones de compuestos heterocíclicos que presentan nitrógeno en el anillo aromático catalizadas por BVMOs.

#### 4.6. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE CICLOHEXIL ALQUIL SULFUROS

Como ya se ha comentado a lo largo de la presente Memoria, tanto la HAPMO como la wtPAMO han sido principalmente descritas como BVMOs que oxidan compuestos aromáticos. Para ampliar el rango de sustratos que pueden ser oxidados por estos biocatalizadores, nos planteamos el estudio sobre compuestos no aromáticos, analizando inicialmente una serie de ciclohexil alquil sulfuros. Como se puede observar en la Tabla 4.4, la HAPMO fue capaz de catalizar la sulfoxidación del ciclohexil metil sulfuro (**49a**) y ciclohexil etil sulfuro (**50a**) a sus correspondientes (*S*)-sulfóxidos con conversión total y excelentes excesos enantioméricos (entradas 1 y 2) después de 24 horas. La wtPAMO generó un 96% del (*S*)-ciclohexil metil sulfóxido [(*S*)-**49b**] con una actividad óptica moderada (*ee*=35%, entrada 4). Sin embargo, este enzima se mostró casi inactivo con el sulfuro **50a** (entrada 5). En las reacciones catalizadas por la PAMO<sub>M446G</sub> se obtienen conversiones y excesos enantioméricos moderados (entradas 7 y 8). Así, este enzima catalizó la oxidación del ciclohexil metil sulfuro (**49a**) con un 67% de conversión y una pureza óptica del 49% (entrada 7). Los resultados obtenidos para el derivado etilo fueron peores, ya que la conversión no superó el 19% y el exceso enantiomérico obtenido fue de un 31% (entrada 8). Como se puede observar, la PAMO<sub>M446G</sub> es capaz de oxidar el sulfuro **50a** mientras que su cepa natural no.

Finalmente, se ha estudiado la oxidación enzimática del ciclohexil propil sulfuro (**51a**) catalizada por las tres BVMOs (entradas 3, 6 y 9), no siendo observada reacción alguna después de 24 horas. Esto indica que el grupo propilo es limitante en la actividad enzimática de estos biocatalizadores para la oxidación de ciclohexil alquil sulfuros.

**Tabla 4.4.** Oxidación biocatalizada de ciclohexil alquil sulfuros (**49-51a**) catalizada por BVMOs.



Entrada	Sustrato	Enzima	<i>ee</i> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>
1	<b>49a</b>	HAPMO	≥99( <i>S</i> )	≥99
2	<b>50a</b>	HAPMO	96( <i>S</i> )	≥99
3	<b>51a</b>	HAPMO	-	≤3
4	<b>49a</b>	<i>wt</i> PAMO	35( <i>S</i> )	96
5	<b>50a</b>	<i>wt</i> PAMO	-	5
6	<b>51a</b>	<i>wt</i> PAMO	-	≤3
7	<b>49a</b>	M446G	49( <i>S</i> )	67
8	<b>50a</b>	M446G	31( <i>S</i> )	19
9	<b>51a</b>	M446G	-	≤3

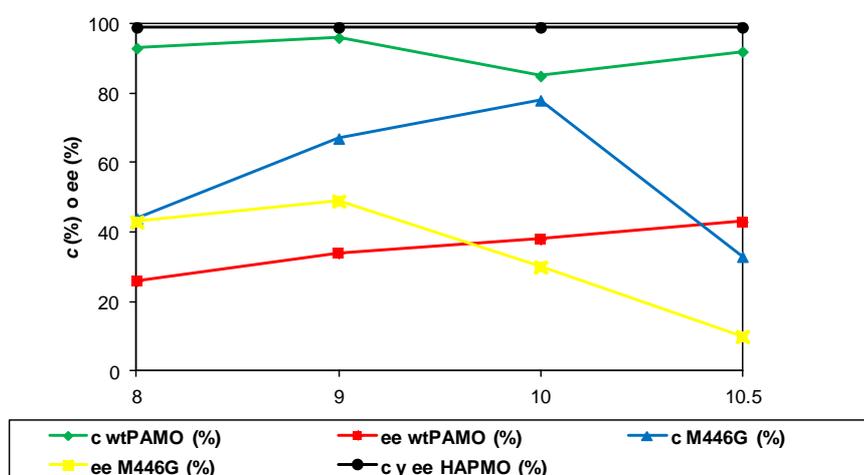
<sup>a</sup> Determinado por HPLC.

<sup>b</sup> Determinada por CG.

#### 4.6.1. EFECTO DEL pH EN LA OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DEL CICLOHEXIL METIL SULFURO CATALIZADA POR BVMOS

Con el objeto de optimizar los resultados en la oxidación enzimática de **49a** en los dos biocatalizadores de tipo PAMO y conocer mejor el comportamiento de las tres BVMOs, analizamos el efecto del pH en este proceso. Como refleja la Figura 4.8, la HAPMO fue capaz de catalizar esta oxidación con conversión completa y alto exceso enantiomérico independientemente del valor del pH estudiado. Este dato no está en concordancia con lo estudiado para las cetonas benzofusionadas, donde a pH 10.5 se observa un decrecimiento acusado en la actividad enzimática (Ver Sección 1, Capítulo 1). Sin embargo hay que tener en cuenta, que tanto la naturaleza del sustrato como el tipo de reacción son totalmente diferentes, por lo que este resultado es factible. Para los enzimas *wt*PAMO y PAMO<sub>M446G</sub>, el intervalo de pH óptimo es de 9.0 a 10.0, alcanzando como valores máximos de conversión, 96% y 78% respectivamente. En cuanto a la selectividad enzimática, pH 10.5 es el óptimo para la *wt*PAMO (*ee*=43%). Para su mutante, el pH más adecuado fue el pH 9.0, alcanzándose una pureza óptica del 49%. Valores de pH más altos llevan a una pérdida gradual de la enantioselectividad, con excesos enantioméricos cercanos al

10% para pH 10.5. Al igual que para la HAPMO, existe una discordancia entre el pH óptimo en la oxidación de la 1-indanona por PAMO<sub>M446G</sub> (Capítulo 1) y lo observado en la oxidación del ciclohexil metil sulfuro, **49a**.



**Figura 4.8.** Efecto del pH en la oxidación del ciclohexil metil sulfuro (**49a**) catalizada por las tres BVMOs.

#### 4.7. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE SULFUROS ALIFÁTICOS CÍCLICOS Y LINEALES

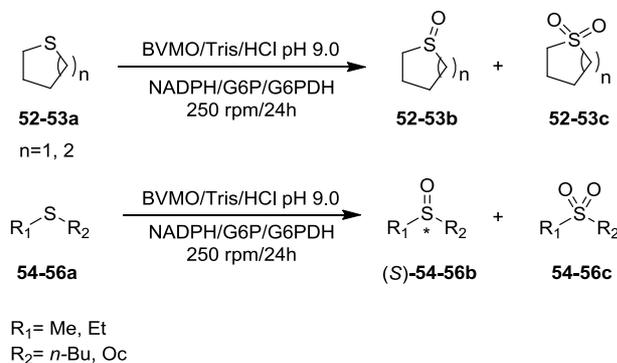
Otros sustratos de origen no aromático analizados fueron los sulfuros cíclicos tetrahidrotiofeno (**52a**) y tetrahydro-2*H*-tiopirano (**53a**). Ninguno de estos sustratos fue aceptado por la wtPAMO o su mutante M446G. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 4.5, la HAPMO oxidó ambos sustratos con conversión total (entradas 1 y 2). Se obtuvo una cantidad de sulfona moderada, cercana al 20%. Por lo tanto, la HAPMO fue capaz de catalizar la primera oxidación (de sulfuro a sulfóxido), así como la segunda de sulfóxido a sulfona, ya que tanto **52b** como **53b** fueron parcialmente oxidados.

También se ha realizado el estudio de sulfuros alifáticos lineales como sustratos de las tres BVMOs. Como se muestra en la Tabla 4.5, de nuevo los mejores resultados se dieron con la HAPMO. Tras 24 horas, se consiguió de forma enantiopura el (*S*)-*n*-butil metil sulfóxido [(*S*)-**54b**] y el (*S*)-*n*-butil etil sulfóxido [(*S*)-**55b**] con conversión completa (entradas 3 y 4). Debido al buen resultado con estos sustratos, decidimos probar un sulfuro con mayor cadena alquílica, eligiendo el metil octil sulfuro (**55a**). En este caso la conversión no fue total, se obtuvo un 75% del (*S*)-**56b** enantiopuro y un 12% de su sulfona **56c** (entrada 5).

## Capítulo 4

Tanto la *wt*PAMO como su mutante M446G no oxidaron este sustrato. Sin embargo ambos enzimas catalizaron la oxidación de los sulfuros **54a** y **55a** con moderadas conversiones (34-45%) y excesos enantioméricos (36-65%) (entradas 6-7 y 9-10). En ninguno de los casos se observó sobreoxidación de los correspondientes sulfóxidos, sino que se recuperó el sulfuro de partida remanente.

**Tabla 4.5.** Biooxidación de sulfuros alifáticos cíclicos y lineales (**52-56a**) catalizada por BVMOs.



Entrada	Sustrato	Enzima	$ee_b(\%)^a$	$a(\%)^a$	$b(\%)^a$	$c(\%)^a$
1	<b>52a</b>	HAPMO	-	-	76	24
2	<b>53a</b>	HAPMO	-	-	80	20
3	<b>54a</b>	HAPMO	$\geq 99(S)$	-	$\geq 99$	-
4	<b>55a</b>	HAPMO	$\geq 99(S)$	-	$\geq 99$	-
5	<b>56a</b>	HAPMO	$\geq 99(S)$	13	75	12
6	<b>54a</b>	<i>wt</i> PAMO	65( <i>S</i> )	60	40	-
7	<b>55a</b>	<i>wt</i> PAMO	50( <i>S</i> )	66	34	-
8	<b>56a</b>	<i>wt</i> PAMO	-	$\geq 99$	-	-
9	<b>54a</b>	M446G	53( <i>S</i> )	55	45	-
10	<b>55a</b>	M446G	36( <i>S</i> )	61	39	-
11	<b>56a</b>	M446G	-	$\geq 99$	-	-

<sup>a</sup> Determinado por CG.

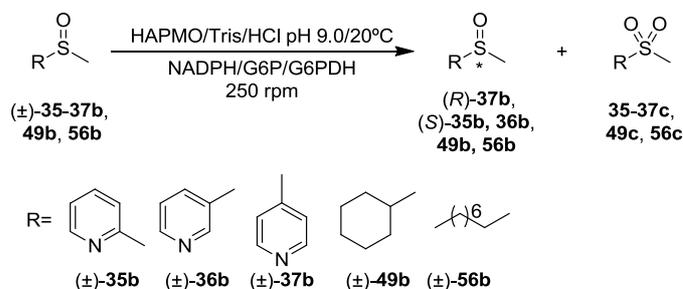
$a$ = porcentaje del sulfuro,  $b$ = porcentaje del sulfóxido,  $c$ = porcentaje de la sulfona.

#### 4.8. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE SULFÓXIDOS RACÉMICOS CATALIZADA POR LA HAPMO

Como hemos visto en los apartados previos del presente capítulo, las sulfoxidaciones catalizadas por la HAPMO fueron las que permitieron conseguir los mejores excesos enantioméricos y conversiones. Además, es conocido que este biocatalizador es capaz de catalizar la oxidación de ciertos sulfóxidos racémicos generándose la correspondiente sulfona con moderadas conversiones.<sup>95</sup> Por ello nos hemos planteado la oxidación de una serie de sulfóxidos racémicos de diferente naturaleza empleando este biocatalizador. Como se refleja en la Tabla 4.6, este proceso es en general muy rápido, ya que se requiere de tiempos muy cortos de reacción para alcanzar altas conversiones. Así, la oxidación de (±)-2-(metilsulfinil)piridina [(±)-**35b**] alcanzó un 60% de conversión en tan sólo 30 minutos. El correspondiente sulfóxido remanente (*S*)-(**35b**) se obtuvo con un buen exceso enantiomérico (*ee*=71%, entrada 1). Cuando el grupo metilsulfinilo está más alejado del nitrógeno, como es el caso de los sulfóxidos (±)-**36b** y (±)-**37b**, las reacciones de oxidación son también rápidas, sin embargo los correspondientes sulfóxidos remanentes, (*S*)-**36b** y (*R*)-**37b**, se alcanzaron con bajos excesos enantioméricos (cercaos al 20%, entradas 2 y 3).

Además, se analizaron sulfóxidos no heteroaromáticos, como el (±)-ciclohexil metil sulfóxido [(±)-**49b**] y el (±)-metil octil sulfóxido [(±)-**56b**] (entradas 4 y 5). La HAPMO mostró ser menos activa con estos sustratos, ya que fueron necesarios tiempos cercanos a 5 horas para conseguir conversiones altas. Sin embargo, estos procesos fueron muy selectivos, pudiéndose alcanzar (*S*)-**49b** con una pureza óptica del 82% (entrada 4) y (*S*)-**56b**, de forma enantiopura (entrada 5).

**Tabla 4.6.** Biooxidación de sulfóxidos racémicos (±)-**36-37b**, (±)-**49b** y (±)-**56b** catalizada por la HAPMO.



## Capítulo 4

Entrada	Sustrato	t (h)	ee <sub>b</sub> (%) <sup>a</sup>	c(%) <sup>b</sup>
1	(±)- <b>35b</b>	0.5	71(S)	60
2	(±)- <b>36b</b>	0.6	21(S) <sup>b</sup>	67
3	(±)- <b>37b</b>	0.5	24(R)	55
4	(±)- <b>49b</b>	5.0	82(S)	60
5	(±)- <b>56b</b>	4.5	≥99(S)	55

<sup>a</sup> Determinado por HPLC.

<sup>b</sup> Determinada por CG.

### 4.9. PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA HAPMO PARA LA OXIDACIÓN DE SULFUROS PROQUIRALES

Con objeto de tener un mayor conocimiento de la HAPMO como biocatalizador oxidativo de sulfuros proquirales, se estudiaron los parámetros cinéticos en la sulfoxidación de diversos sulfuros (Tabla 4.7). Los análisis cinéticos revelaron que los heteroaril alquil y alquil alquil sulfuros **35-36a**, **45a**, **49a** y **54a** poseen valores de  $K_M$  buenos (0.1-1.7 mM). Los valores de  $k_{cat}$  son similares para todos los compuestos, con actividades que van desde 0.3-2.9 s<sup>-1</sup>, obteniéndose el mayor valor para la oxidación del ciclohexil metil sulfuro (**49a**). Estas actividades catalíticas son del orden de 6 a 12 veces menores que las obtenidas en la oxidación de los sustratos favoritos de este enzima (acetofenonas con grupos electrón-dadores en el anillo aromático).<sup>47</sup> Podemos concluir que la mejor eficiencia catalítica encontrada fue para el ciclohexil metil sulfuro (**49a**), del orden de 10 ó 20 veces mayor que los sulfuros heteroaromáticos estudiados.

**Tabla 4.7.** Parámetros cinéticos para la sulfoxidación de sulfuros proquirales catalizada por la HAPMO.

Entrada	Sustrato	$K_M$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
1	<b>35a</b>	1.7±0.02	2.48±0.26	1.5
2	<b>36a</b>	0.29±0.01	0.32±0.03	1.1
3	<b>45a</b>	0.15±0.02	0.35±0.03	2.3
4	<b>49a</b>	0.13±0.01	2.87±0.21	22.1
5	<b>54a</b>	0.40±0.03	2.02±0.16	5.0

*Se ha llevado a cabo la síntesis de una serie de heteroaril alquil, ciclohexil alquil y alquil alquil sulfóxidos quirales mediante sulfoxidaciones enantioselectivas catalizadas por la HAPMO, wtPAMO y PAMO<sub>M446G</sub>.*

*La HAPMO fue capaz de catalizar la oxidación enzimática de (metiltio)piridinas con conversiones de moderadas a altas y excesos enantioméricos excelentes, mientras que la wtPAMO y su mutante sólo catalizaron la síntesis de la 3-(metilsulfinil)piridina. La HAPMO es un biocatalizador apropiado para la oxidación de otras 2-(alquiltio)piridinas, generando los sulfóxidos correspondientes con alta enantioselectividad. Las conversiones de estos procesos van de excelentes a bajas según va aumentando la cadena alquílica.*

*Compuestos heterocíclicos como el 2-furfurilmetil metil sulfuro o el 2-(metiltio)tiofeno demostraron ser buenos sustratos para estos biocatalizadores, consiguiendo de nuevo los mejores resultados con la HAPMO. Otros sulfuros heterocíclicos como pirimidina, imidazol y benzoimidazol, no fueron oxidados por ninguno de los tres enzimas.*

*Tanto la HAPMO como la PAMO<sub>M446G</sub> permitieron la obtención de ciclohexil metil y ciclohexil etil sulfóxidos con conversiones y purezas ópticas de moderadas a altas. Se observó que el pH del medio de reacción no afecta a la actividad de la HAPMO en la oxidación enzimática del ciclohexil metil sulfuro, sin embargo la wtPAMO y la PAMO<sub>M446G</sub> se ven influenciadas por este parámetro.*

*La HAPMO demostró ser un biocatalizador adecuado para la oxidación de sulfuros alifáticos cíclicos y lineales, mientras que la wtPAMO y la PAMO<sub>M446G</sub> mostraron peor actividad y selectividad con este tipo de sustratos.*

*Finalmente, la resolución cinética de sulfóxidos catalizada por la HAPMO es mucho más rápida que los procesos de sulfoxidación. Este biocatalizador mostró una menor actividad y una mayor enantioselectividad con sulfóxidos alifáticos lineales o cíclicos que con compuestos heterocíclicos.*



Las técnicas instrumentales empleadas para la síntesis y caracterización de los compuestos mencionados en este capítulo, ya se han descrito en la Parte Experimental del Capítulo 1. Únicamente se incluirán en esta sección los apartados referentes a reactivos utilizados, así como los procedimientos sintéticos, experimentales y analíticos que se han desarrollado a lo largo del presente capítulo, incluyendo la caracterización de todos los compuestos relacionados con éste. Los sulfuros empleados pueden consultarse en la Figura 4.9.

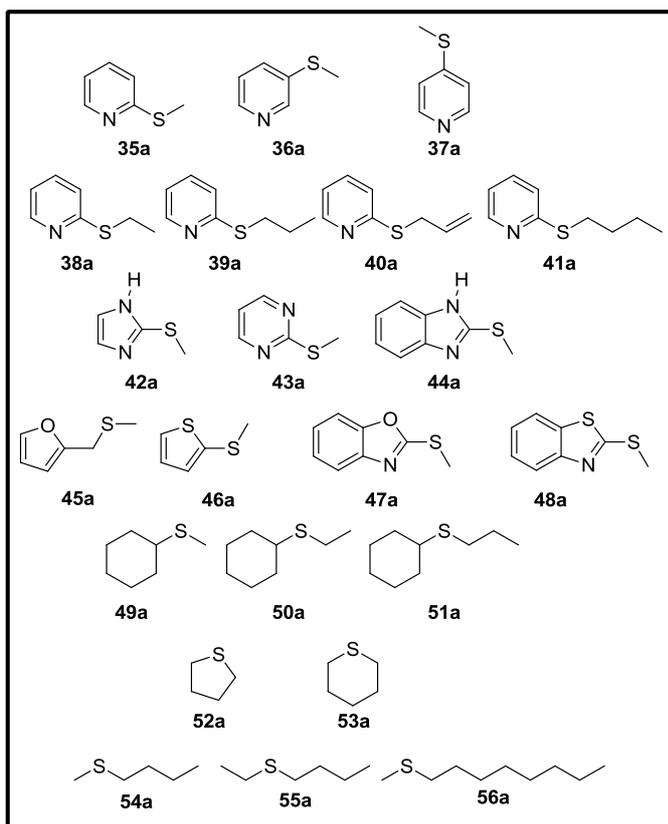


Figura 4.9. Sulfuros utilizados en el presente capítulo.

#### 4.10. REACTIVOS GENERALES

Las proteínas recombinantes *w*PAMO,<sup>50</sup> PAMO<sub>M446G</sub><sup>99</sup> y HAPMO<sup>47</sup> han sido sobreexpresadas y purificadas de acuerdo con los métodos descritos. Las reacciones de oxidación se han llevado a cabo con el enzima aislado en disolución, empleando el sistema G6P/G6PDH para regenerar el cofactor NADPH. Se ha definido una unidad enzimática de BVMO como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1.0  $\mu\text{mol}$  de tioanisol a fenil metil sulfóxido por minuto, a pH 9.0 y 25°C, en presencia de NADPH. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Leuconostoc mesenteroides* es comercializada por Fluka-Biochemica. La D-Glucosa-6-fosfato y el NADPH fueron adquiridos a Sigma-Aldrich. El extracto libre de células que contiene HAPMO se preparó siguiendo el mismo protocolo que para el extracto que contiene PAMO<sub>M446G</sub>, descrito en el Capítulo 1, Sección 2.

Los sulfuros **45-46a** son productos de Alfa Aesar. El compuesto **49a** es comercializado por Sigma-Aldrich-Fluka. Los sustratos **48a**, **52-55a** fueron adquiridos a Acros Organics, mientras que **56a** fue suministrado por TCI Europa. El resto de reactivos y disolventes fueron suministrados por Sigma-Aldrich-Fluka y presentan el mayor grado de pureza posible.

#### 4.11. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS

##### Síntesis química de los sulfuros **35a**, **37a** y **42-44a**.<sup>301</sup>

Se agita una disolución del correspondiente tiol (500 mg, 3.04-4.38 mmol) y  $K_2CO_3$  (3.0 eq.) en  $CH_2Cl_2$  (15 mL) a 0°C durante 5 minutos. Posteriormente se adiciona por orden ioduro de metilo (1.0 eq.) y  $Et_3N$  (1.0 eq.). La reacción se sigue por TLC (50% hexano/AcOEt). Una vez observada la desaparición del producto de partida, se añade a la mezcla 15 mL de agua y se efectúa una extracción con  $CH_2Cl_2$  (3x10 mL). La fase orgánica es lavada con  $H_2O$  (10 mL) y una disolución saturada de NaCl (10 mL). Finalmente se seca con  $Na_2SO_4$ , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Los rendimientos obtenidos fueron desde 15-99%. Se obtuvieron 557.4 mg de **35a** (99%), 133.4 mg de **37a** (24%), 86.9 mg de **42a** (15%), 278.2 mg de **43a** (49%) y 208.0 mg de **44a** (38%).

##### Síntesis química de la 3-(metiltio)piridina (**36a**).<sup>302</sup>

A una disolución de 3-bromopiridina (1.58 g, 10.0 mmol) en THF seco (10 mL) a temperatura ambiente y bajo atmósfera de  $N_2$ , se le añade 5 mL de una disolución 2 M de  $iPrMgCl$  en THF seco (5.0 mL, 1.0 eq.). Tras una hora agitando, se le añade disulfuro de dimetilo (898  $\mu$ L, 1.0 eq.) y se deja reaccionar durante 18 horas. La reacción se sigue por TLC (95%  $CH_2Cl_2/Et_2O$ ). Una vez observada la desaparición del producto de partida, se añade a la mezcla 50 mL de una disolución de NaCl saturada y se extrae con  $CH_2Cl_2$  (3x20 mL). La fase orgánica es lavada con  $H_2O$  (20 mL). Finalmente se seca con  $Na_2SO_4$ , se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por cromatografía de columna empleando una mezcla de 95%  $CH_2Cl_2/Et_2O$  como eluyente para obtener 1.04 g de **36a** (83%).

<sup>301</sup> Porto, A. L. M.; Cassiola, F.; Dias, S. L. P.; Joekes, I.; Gushikem, Y.; Rodrigues, J. A. R.; Moran, P. J. S.; Manfio, G. P.; Marsaioli, A. J. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, 19-20, 327-334.

<sup>302</sup> Doudouh, A.; Woltermann, C.; Gros, P. C. *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 4978-4980.

### Síntesis química de los sulfuros 38-41a y 50-51a.<sup>95</sup>

A una disolución del correspondiente tiol (250 mg, 2.15-2.27 mmol) en MeOH seco (6.0 mL) y a 0°C, se le añade sodio (1.1 eq.) bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Se deja agitar la mezcla durante una hora. Posteriormente, se le añade el correspondiente bromuro o ioduro de alquilo (1.1 eq.) y se deja agitando a temperatura ambiente. Una vez observada la desaparición del producto de partida mediante TLC, se evapora el MeOH y se añade al crudo 6 mL de agua. A continuación se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x10 mL). La fase orgánica es lavada con H<sub>2</sub>O (10 mL). Finalmente se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Los crudos obtenidos no requirieron de una mayor purificación. Se aislaron 149.5 mg de **38a** (48%), 203.3 mg de **39a** (59%), 190.0 mg de **40a** (56%), 304.5 mg de **41a** (82%), 223.4 mg de **50a** (72%) y 136.2 mg de **51a** (40%).

### Síntesis química de 2-(metiltio)benzoxazol (**47a**).<sup>303</sup>

A una disolución de 2-tiobenzoxazol (500 mg, 3.30 mmol) en DMF (10 mL) a temperatura ambiente, se le añade K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6.9 g, 1.0 eq.) y se agita durante 15 minutos. Posteriormente se le añade ioduro de metilo (226 µL, 1.2 eq.) y se deja agitar durante una hora. Se añaden 30 mL de agua y la mezcla se extrae con AcOEt (3x10 mL). Las fases orgánicas se combinan, se lavan con 5 mL de agua, se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtran y se evapora el disolvente a presión reducida. Se aislaron 476.5 mg de **47a** (87%).

### Síntesis química de los sulfóxidos (±)-**35-40b**, (±)-**45-46b**, (±)-**49-50b**, **52b**, **53b**, (±)-**54-56b**.

Se disuelve el correspondiente sulfuro de partida (100 mg, 0.62-1.14 mmol) en una mezcla de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mL) y MeOH (3 mL). La reacción se deja agitando y se sigue por TLC. Una vez se observa la desaparición del sustrato se añade una pequeña cantidad de Pd/C y se deja reaccionar durante 4 horas. Al cabo de ese tiempo, se elimina el paladio filtrando sobre celita y se lava con MeOH. Se evapora el disolvente a presión reducida. Se adiciona H<sub>2</sub>O, se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4x10 mL) y se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La fase orgánica se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Los rendimientos obtenidos fueron de 10-98%, como se muestra en la Tabla 4.8.

---

<sup>303</sup> Bethge, L.; Venkatrao Jarikote, D.; Seitz, O. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 114-125.

**Tabla 4.8.** Rendimientos y cantidad obtenida en la síntesis de sulfóxidos descritos en el presente capítulo.

Sulfóxido	Cantidad(mg)	Rdto(%)
(±)- <b>35b</b>	81.2	72
(±)- <b>36b</b>	39.4	35
(±)- <b>37b</b>	22.6	20
(±)- <b>38b</b>	11.2	10
(±)- <b>39b</b>	69.6	63
(±)- <b>40b</b>	67.2	61
(±)- <b>45b</b>	84.3	75
(±)- <b>46b</b>	89.8	80
(±)- <b>49b</b>	110.1	98
(±)- <b>50b</b>	108.9	98
<b>52b</b>	61.5	52
<b>53b</b>	72.8	63
(±)- <b>54b</b>	87.5	76
(±)- <b>55b</b>	72.6	64
(±)- <b>56b<sup>a</sup></b>	37.5	34

<sup>a</sup> Columna 95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH

### Oxidación asimétrica de los sulfuros **36-38a**, **40a** y **50a** empleando el método de Kagan.<sup>304</sup>

A una mezcla de tetraisopropóxido de titanio Ti(O-*i*-Pr)<sub>4</sub> (2.97 mL, 2.0 eq.) y (+)-L-tartrato de dietilo (1.71 mL, 2.0 eq.) en 50 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco, se le añade gota a gota agua destilada (90 µL, 1.0 eq.) bajo atmósfera de N<sub>2</sub> y a 0°C. Se agita hasta que se forma una disolución amarilla homogénea y entonces se añade el correspondiente sulfuro **36-38a**, **40a** y **50a** (5.0 mmol). La mezcla resultante se enfría hasta -20 °C y en ese momento se añade una disolución 5.5 M de *tert*-butil hidroperóxido (TBHP) en decano (1 mL, 1.1 eq.). Después de cuatro horas de agitación, se añade gota a gota, agua destilada (900 µL, 10.0 eq.). Se deja agitando una hora a esta temperatura y posteriormente otra hora más a temperatura ambiente. El gel obtenido se filtra y se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL). El filtrado se mezcla con una disolución de NaOH 5% (p/v) en una disolución saturada de cloruro de sodio (30 mL) y se mantiene durante una 1 hora. Después se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x20 mL). La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente a presión

<sup>304</sup> Pitchen, P.; Duñach, E.; Deshmukh, M. N.; Kagan, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 8188-8193.

reducida. Se obtuvieron unos crudos que fueron purificados por cromatografía de columna usando como eluyente mezclas CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH en diferentes proporciones (98/2 para **36b** y **37b**; 99/1 para **38b**, **40b** y **50b**). Se aislaron 345.4 mg de (*R*)-**36b** (49%), 211.5 mg de (*R*)-**37b** (30%), 155.0 mg de (*R*)-**38b** (20%), 392.4 mg de (*R*)-**40b** (47%) y 304.0 mg de (*R*)-**50b** (38%).

Los compuestos previamente descritos, **35-38a**, **42-44a**, **47a**, ( $\pm$ )-**45-46b**, ( $\pm$ )-**50b**, **52-53b**, ( $\pm$ )-**54b** y ( $\pm$ )-**56b** exhiben propiedades físicas y espectrales de acuerdo con los datos publicados. Los compuestos **39-41a**, **50-51a**, ( $\pm$ )-**35-40b**, ( $\pm$ )-**49b** y ( $\pm$ )-**55b** fueron debidamente caracterizados.<sup>305</sup>

### 4.12. ASIGNACIÓN DE CONFIGURACIONES ABSOLUTAS

Las configuraciones absolutas de los sulfóxidos **35b**,<sup>306</sup> **45b**,<sup>215</sup> **46b**,<sup>307</sup> **49b**,<sup>308</sup> y **56b**<sup>308</sup> se han obtenido mediante comparación de los cromatogramas obtenidos mediante HPLC con patrones ya descritos previamente en la bibliografía.<sup>309</sup>

Las configuraciones absolutas de los sulfóxidos **36-38b**, **40b** y **50b** fueron establecidas por comparación de los cromatogramas obtenidos mediante HPLC con patrones obtenidos a través de la oxidación asimétrica de los correspondientes sulfuros proquirales empleando el método de Kagan con (+)-L-tartrato de dietilo, tetraisopropóxido de titanio Ti(O-*i*-Pr)<sub>4</sub> y *tert*-butil hidroperóxido (TBHP).<sup>304</sup>

La configuración absoluta de **39b** se asignó por analogía con los compuestos **35b** y **38b**, respectivamente.

La configuración absoluta del *n*-butil metil sulfóxido **54b** fue determinada mediante comparación con el valor de su rotación específica previamente

---

<sup>305</sup> Las referencias de los compuestos ya descritos, así como la caracterización completa de los no descritos pueden consultarse en el Apartado 4.15.

<sup>306</sup> Pironti, V.; Nicolis, S.; Monzani, E.; Colonna, S.; Casella, L. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 8153-8160.

<sup>307</sup> van Deurzen, M. P. J.; Remkes, I. J.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1997**, *117*, 329-337.

<sup>308</sup> Egami, H.; Katsuki, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8940-8941.

<sup>309</sup> Los datos cromatográficos se encuentran recogidos en el Apartado 4.14.

publicado.<sup>310</sup> Finalmente, la configuración del *n*-butil etil sulfóxido **55b** fue establecido por analogía con este último.

### 4.13. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

#### 4.13.1. CINÉTICA ENZIMÁTICA

Para la determinación de los parámetros cinéticos de la HAPMO con los sulfuros **35-36a** se determinó la actividad enzimática monitorizando el consumo de NADPH a 370 nm ( $\epsilon_{\text{NAD(P)H},370} = 2.7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), mientras que para los sulfuros **45a**, **49a** y **54a** se utilizó como longitud de onda 340 nm ( $\epsilon_{\text{NAD(P)H},340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Los estudios cinéticos se realizaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda Bio10 UV/Vis. Todas las medidas se han realizado a temperatura ambiente.

Las disoluciones *stock* de los sulfuros (1.0 M) se prepararon en dimetilsulfóxido (DMSO). La presencia del DMSO apenas modifica la actividad enzimática, mientras que permite incrementar la solubilidad de los sustratos. En un experimento modelo (1.0 mL), la mezcla de reacción contiene una disolución reguladora de Tris/HCl (50 mM) pH 9.0, NADPH (100  $\mu\text{M}$ ), 1% DMSO (v/v) y BVMO (0.2-0.8  $\mu\text{M}$ ).

Los datos obtenidos fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten mediante regresión no lineal empleando el programa SigmaPlot versión 10.0 para Windows. El cálculo de la constante catalítica ( $k_{\text{cat}}$ ) y la constante de Michaelis ( $K_{\text{M}}$ ) permite conocer la eficiencia catalítica del enzima con un determinado sustrato ( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ).

#### 4.13.2. PROCEDIMIENTOS PARA LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS CATALIZADAS POR BVMOS

##### Oxidación de sulfuros **35-56a** y sulfóxidos ( $\pm$ )-**35-37b**, ( $\pm$ )-**49b** y ( $\pm$ )-**56b**, catalizada por BVMOs.

Los correspondientes sulfuros o sulfóxidos (10 mM) se disuelven en 0.5 mL del medio de reacción disolución tampón Tris/HCl (50 mM, pH 8.0 a 10.5) conteniendo 1% (v/v) DMSO, junto con D-glucosa-6-fosfato (2.0 eq.), G6PDH (5.0 U), NADPH (0.2 mM) y 1.0 unidad de la correspondiente BVMO. La mezcla se agita a 250 rpm en un agitador orbital a diferentes temperaturas durante el tiempo establecido. Se detiene la reacción

<sup>310</sup> Drabowicz, J.; Bujnicki, B.; Mikolajczyk, M. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 2788-2790.

## Capítulo 4

---

extrayendo con AcOEt (2x0.5 mL), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se analiza por CG y/o HPLC, con el fin de determinar la conversión y la selectividad de los procesos de oxidación.

### **Preparación enzimática de sulfóxidos quirales (S)-35-36b, (R)-37b, (S)-38-40b, (S)-49b y (S)-54-55b a escala multimiligramo mediante el extracto libre de células que contiene HAPMO.**

Los correspondientes sulfuros **35-40a**, **49a** y **54-55a** (250 mg, 1.63-2.40 mmol) se disuelven en una disolución tampón Tris/HCl (50 mM, pH 9.0, 40mL), conteniendo 1% (v/v) DMSO, junto con D-glucosa-6-fosfato (2.0 eq.), G6PDH (1250 U), NADPH (0.2 mM) y el extracto libre de células que contiene HAPMO (46 mL). La mezcla se agita a 250 rpm en un agitador orbital a 20°C y la reacción se sigue mediante CG. Después de 24 horas, se detiene la reacción extrayendo con AcOEt (5x30 mL), la fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Los crudos fueron purificados por cromatografía de columna usando diferentes concentraciones de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH como eluyente (98/2 para (S)-**35b**, (S)-**39b** y (S)-**40b**, 95/5 para (S)-**36b**, (R)-**37b** y (S)-**38b**, 90/10 para (S)-**49b** y (S)-**54b-55b**. Los rendimientos fueron desde el 6% hasta el 95% (Tabla 4.9).

**Tabla 4.9.** Rendimientos y cantidad obtenida en la síntesis de sulfóxidos quirales anteriormente descrita.

Sulfóxido	Cantidad(mg)	Rdto(%)
(S)- <b>35b</b>	267.9	95
(S)- <b>36b</b>	253.8	90
(R)- <b>37b</b>	141.0	50
(S)- <b>38b</b>	279.0	85
(S)- <b>39b</b>	16.6	6
(S)- <b>40b</b>	52.8	19
(S)- <b>49b</b>	255.5	91
(S)- <b>54b</b>	249.0	88
(S)- <b>55b</b>	252.7	89

#### 4.14. DETERMINACIÓN DE LAS CONVERSIONES Y EXCESOS ENANTIOMÉRICOS

La determinación de los valores de los excesos enantioméricos de los compuestos **35b**, **37b**, **38-40b**, **45-46b**, **49-50b** y **56b** se ha llevado a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia empleando un cromatógrafo Hewlett Packard 1100 LC equipado con una columna Chiralcel OB-H (Daicel, 0.46 cm x 25 cm) excepto para el compuesto **45b**, que fue usada una Chiralcel OD (Daicel, 0.46 cm x 25 cm) (Tabla 4.10).

**Tabla 4.10.** Determinación de excesos enantioméricos mediante HPLC.

Compuesto	Condiciones <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> (min)	R <sub>s</sub> <sup>182</sup>
(±)- <b>35b</b>	H/IPA 90:10, 1.0, 25°C	16.6 (S); 29.8 (R)	18.9
(±)- <b>37b</b>	H/IPA 90:10, 1.0, 25°C	31.7 (S); 36.3 (R)	5.6
(±)- <b>38b</b>	H/IPA 95:5, 1.0, 25°C	8.6 (S); 13.5 (R)	12.9
(±)- <b>39b</b>	H/IPA 90:10, 1.0, 25°C	10.8 (S); 20.2 (R)	14.9
(±)- <b>40b</b>	H/IPA 90:10, 1.0, 25°C	10.6 (S); 15.1 (R)	9.6
(±)- <b>45b</b>	H/IPA 90:10, 0.5, 20°C	18.1 (R); 22.2 (S)	3.6
(±)- <b>46b</b>	H/IPA 92:8, 0.5, 25°C	21.4 (S); 26.5 (R)	4.2
(±)- <b>49b</b>	H/IPA 80:20, 0.7, 25°C	7.8 (S); 9.2 (R)	5.1
(±)- <b>50b</b>	H/IPA 80:20, 0.7, 25°C	7.3(S); 11.1 (R)	7.4
(±)- <b>56b</b>	H/IPA 98:2, 0.7, 30°C	25.0 (S); 27.8 (R)	3.2

<sup>a</sup> Condiciones: H/IPA= Hexano/2-propanol, proporción de eluyente, flujo (mL min<sup>-1</sup>), T(°C).  
t<sub>R</sub>: tiempo de retención.

La determinación de los valores de conversión y/o excesos enantioméricos de algunos sulfóxidos se ha llevado a cabo mediante cromatografía de gases (Tabla 4.11). Para ello se ha empleado un cromatógrafo Hewlett Packard 6890 Series II equipado con la columna **A**: Restek Rtβ-DEXse (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm, 1 bar N<sub>2</sub>) y **B**: Hewlett-Packard HP1 (metil siloxano entrecruzado, 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm, 1 bar, N<sub>2</sub>). En todos los casos la temperatura del inyector fue de 225°C y la del detector, de tipo FID, de 250°C.

**Tabla 4.11.** Determinación de conversiones y/o excesos enantioméricos mediante CG.

Compuesto	Programa <sup>a</sup>	Columna	t <sub>R</sub> (min)	R <sub>s</sub> <sup>182</sup>
<b>35a</b>	70/5/3/130/0	<b>B</b>	6.6	--
(±)- <b>35b</b>	70/5/3/130/0	<b>B</b>	14.4	--
<b>35c</b>	70/5/3/130/0	<b>B</b>	18.0	--
<b>36a</b>	70/15/3/120/0/1/140/0/ 3/180/0	<b>A</b>	32.5	--
(±)- <b>36b</b>	70/15/3/120/0/1/140/0/ 3/180/0	<b>A</b>	58.2 (S), 58.6 (R)	1.9
<b>36c</b>	70/15/3/120/0/1/140/0/ 3/180/0	<b>A</b>	62.0	--
<b>37a</b>	70/5/3/130/0	<b>B</b>	9.2	--
(±)- <b>37b</b>	70/5/3/130/0	<b>B</b>	15.6	--
<b>37c</b>	70/5/3/130/0	<b>B</b>	18.5	--
<b>38a</b>	70/5/3/130/0	<b>B</b>	7.8	--
(±)- <b>38b</b>	70/5/3/130/0	<b>B</b>	16.5	--
<b>39a</b>	70/5/3/130/0	<b>B</b>	12.0	--
(±)- <b>39b</b>	70/5/3/130/0	<b>B</b>	21.4	--
<b>40a</b>	70/5/3/130/0	<b>B</b>	11.3	--
(±)- <b>40b</b>	70/5/3/130/0	<b>B</b>	19.3	--
<b>45a</b>	70/0/10/190/0	<b>B</b>	2.4	--
(±)- <b>45b</b>	70/0/10/190/0	<b>B</b>	5.2	--
<b>46a</b>	70/5/3/130/0	<b>B</b>	8.7	--
(±)- <b>46b</b>	70/5/3/130/0	<b>B</b>	16.6	--
<b>49a</b>	70/5/3/130/0	<b>B</b>	5.0	--
(±)- <b>49b</b>	70/5/3/130/0	<b>B</b>	17.7	--
<b>49c</b>	70/5/3/130/0	<b>B</b>	21.7	--
<b>50a</b>	70/5/3/130/0	<b>B</b>	7.6	--
(±)- <b>50b</b>	70/5/3/130/0	<b>B</b>	21.0	--
<b>52a</b>	70/5/3/130/0	<b>A</b>	8.8	--
<b>52b</b>	70/5/3/130/0	<b>A</b>	30.3	--
<b>52c</b>	70/5/3/130/0	<b>A</b>	35.5	--
<b>53a</b>	70/5/3/130/0	<b>A</b>	12.6	--
<b>53b</b>	70/5/3/130/0	<b>A</b>	34.1	--
<b>53c</b>	70/5/3/130/0	<b>A</b>	38.7	--
<b>54a</b>	50/5/3/200/0	<b>A</b>	12.2	--
(±)- <b>54b</b>	50/5/3/200/0	<b>A</b>	31.4 (S), 31.8 (R)	2.6
<b>55a</b>	50/5/3/200/0	<b>A</b>	14.2	--
(±)- <b>55b</b>	50/5/3/200/0	<b>A</b>	33.1(S), 35.4 (R)	1.8
<b>56a</b>	70/5/3/200/0	<b>A</b>	22.3	--
(±)- <b>56b</b>	70/5/3/200/0	<b>A</b>	40.4	--
<b>56c</b>	70/5/3/200/0	<b>A</b>	44.5	--

<sup>a</sup> Programa: T<sub>inicial</sub> (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/ min)/ T<sub>final</sub> (°C)/ tiempo (min).

t<sub>R</sub>: tiempo de retención.

#### **4.15. DATOS EXPERIMENTALES**

En este apartado se encuentra la caracterización de todos aquellos compuestos utilizados en el presente capítulo que no han sido adquiridos comercialmente. Los criterios de caracterización son los mismos que los utilizados en el Capítulo 1.

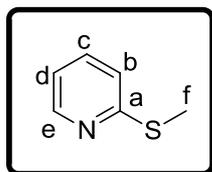
---

---

**2-(Metiltio)piridina, 35a**<sup>302</sup>

---

---



Aceite amarillo

**Rendimiento:** 99%

**Fórmula empírica:** C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NS

**Peso Molecular:** 125.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.71

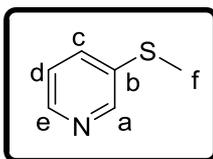
**IR** (KBr): 3052, 2928, 1645, 1570, 1450 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.56 (s, 3H<sub>f</sub>), 6.94-6.98 (m, 1H<sub>d</sub>), 7.18 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.9 Hz, 1H<sub>b</sub>), 7.44-7.49 (m, 1H<sub>c</sub>), 8.41-8.42 (m, 1H<sub>e</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 13.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>f</sub>), 119.0 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 121.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>), 135.7 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>c</sub>), 149.3 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 159.9 (C<sub>ar</sub>, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, m/z): 125 (M<sup>+</sup>, 100%), 112 (39), 78 (69), 51 (25)

**3-(Metiltilio)piridina, 36a**<sup>302</sup>



Aceite amarillo

**Rendimiento:** 83%

**Fórmula empírica:** C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NS

**Peso Molecular:** 125.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.51

**IR** (KBr): 3046, 2940, 1640, 1580, 1432 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.48 (s, 3H<sub>f</sub>), 7.16-7.20 (m, 1H<sub>d</sub>), 7.52-7.56 (m, 1H<sub>c</sub>), 8.35-8.36 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.6 Hz, 1H<sub>e</sub>), 8.49 (s, 1H<sub>a</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 15.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>f</sub>), 123.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 134.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>c</sub>), 135.4 (C<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>), 146.0 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 147.7 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 125 (M<sup>+</sup>, 100%), 110 (26), 83 (26), 39 (21)

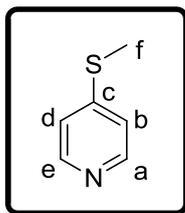
---

---

4-(Metiltio)piridina, 37a<sup>311</sup>

---

---



Sólido amarillo

**Rendimiento:** 24%

**Fórmula empírica:** C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NS

**Peso Molecular:** 125.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.35

**P<sub>f</sub>**: 39.1-40.4°C

**IR** (KBr): 3052, 2931, 1660, 1550, 1433 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz): δ 2.71 (s, 3H<sub>f</sub>), 7.44 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.8 Hz, 2H<sub>b,d</sub>), 8.47 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.8 Hz, 2H<sub>a,e</sub>)

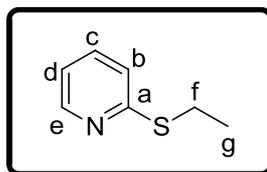
**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz): δ 13.9 (CH<sub>3</sub>, C<sub>f</sub>), 121.7 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>b,d</sub>), 149.6 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>a,e</sub>), 154.1 (C<sub>ar</sub>, C<sub>c</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, m/z): 125 (M<sup>+</sup>, 100%), 92 (38), 79 (21), 51 (28)

---

<sup>311</sup> Kamiyama, T.; Enomoto, S.; Inoue, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, 33, 5184-5189.

**2-(Etiltio)piridina, 38a**<sup>312</sup>



Líquido amarillo

**Rendimiento:** 48%

**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>NS

**Peso Molecular:** 139.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.71

**IR** (KBr): 3057, 2910, 1587, 1445 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz): δ 1.53 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 3H<sub>g</sub>), 3.31 (c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 2H<sub>f</sub>), 7.23-7.28 (m, 1H<sub>d</sub>), 7.43 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.1 Hz, 1H<sub>b</sub>), 7.76-7.82 (m, 1H<sub>c</sub>), 8.53-8.56 (m, 1H<sub>e</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz): δ 15.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>g</sub>), 25.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>f</sub>), 120.0 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 123.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>), 138.7 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>c</sub>), 150.5 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 161.4 (C<sub>ar</sub>, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, m/z): 139 (M<sup>+</sup>, 53%), 124 (41), 114 (28), 106 (100), 79 (59), 67 (47)

<sup>312</sup> Furukawa, N.; Takahashi, F.; Kawai, T.; Kishimoto, K.; Ogawa, S.; Oae, S. *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1983**, *16*, 167-180.

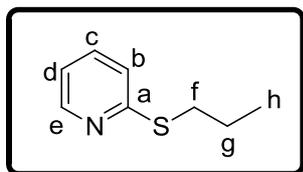
---

---

2-(Propiltio)piridina, 39a

---

---



Líquido marrón claro

**Rendimiento:** 59%

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NS

**Peso Molecular:** 153.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.83

**IR** (KBr): 3050, 2929, 1579, 1454 cm<sup>-1</sup>

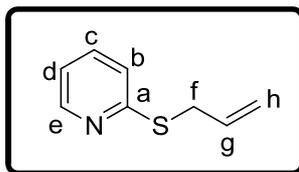
**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz): δ 1.21 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, 3H<sub>i</sub>), 1.85-1.92 (m, 2H<sub>g</sub>), 3.27 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 2H<sub>f</sub>), 7.19-7.20 (m, 1H<sub>d</sub>), 7.40 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.1 Hz, 1H<sub>b</sub>), 7.72-7.75 (m, 1H<sub>c</sub>), 8.52 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.2 Hz, 1H<sub>e</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz): δ 14.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>i</sub>), 24.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>g</sub>), 33.4. (CH<sub>2</sub>, C<sub>f</sub>), 120.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 123.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>), 138.0 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>c</sub>), 150.5 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 161.4 (C<sub>ar</sub>, C<sub>a</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 176 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>AgNS (M+Ag)<sup>+</sup>: 259.9658; encontrada: 259.9654

**2-(Aliltio)piridina, 40a**



Líquido marrón claro

**Rendimiento:** 56%

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NS

**Peso Molecular:** 151.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.90

**IR** (KBr): 3050, 2923, 1636, 1579, 1454 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 3.83 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.8 Hz, 2H<sub>f</sub>), 5.10 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 0.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 10.1 Hz, 1H<sub>h</sub>), 5.32 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 0.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 15.0 Hz, 1H<sub>h</sub>), 5.89-6.03 (m, 1H<sub>g</sub>), 6.95-6.99 (m, 1H<sub>d</sub>), 7.17 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.1 Hz, 1H<sub>b</sub>), 7.46 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.0 Hz, 1H<sub>e</sub>), 8.42 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.0 Hz, 1H<sub>c</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 32.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>f</sub>), 117.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>h</sub>), 119.4 (CH, C<sub>g</sub>), 122.1 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 133.7 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>), 135.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>c</sub>), 149.3 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 158.4 (C<sub>ar</sub>, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 151 (M<sup>+</sup>, 21%), 136 (100), 124 (15), 118 (36), 79 (35)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>AgNS (M+Ag)<sup>+</sup>: 257.9507; encontrada: 257.9503

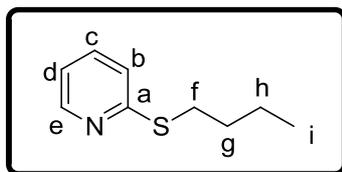
---

---

2-(Butiltio)piridina, 41a

---

---



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 82%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>NS

**Peso Molecular:** 167.3 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.90

**IR** (KBr): 3100, 2958, 1579, 1556 cm<sup>-1</sup>

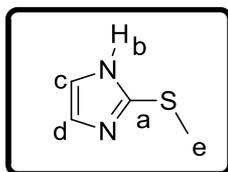
**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz): δ 1.13 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.0 Hz, 3H<sub>i</sub>), 1.61-1.70 (m, 2H<sub>h</sub>), 1.80-1.90 (m, 2H<sub>g</sub>), 3.31 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 2H<sub>f</sub>), 7.21-7.26 (m, 1H<sub>d</sub>), 7.43 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.0 Hz, 1H<sub>b</sub>), 7.77 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.0 Hz, 1H<sub>c</sub>), 8.53-8.54 (m, 1H<sub>e</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz): δ 14.3 (CH<sub>3</sub>, C<sub>i</sub>), 23.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>h</sub>), 31.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>g</sub>), 32.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>f</sub>), 120.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 123.5 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>), 138.0 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>c</sub>), 150.5 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 168.5 (C<sub>ar</sub>, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 167 (M<sup>+</sup>, 28%), 138 (72), 125 (100), 111 (72), 78 (64)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>AgNS (M+Ag)<sup>+</sup>: 273.9820; encontrada: 273.9823

**2-(Metiltilio)-1H-imidazol, 42a<sup>313</sup>**



Sólido marrón

**Rendimiento:** 15%

**Fórmula empírica:** C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>S

**Peso Molecular:** 114.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.26

**P<sub>f</sub>**: 135.3-137.4°C

**IR** (KBr): 2925, 1551, 1415, 1330 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz): δ 2.71 (s, 3H<sub>e</sub>), 7.23 (s, 2H<sub>c,d</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz): δ 17.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>e</sub>), 124.8 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>c,d</sub>), 142.0 (C<sub>ar</sub>, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 114 (M<sup>+</sup>, 80%), 99 (16), 81 (100), 72 (80), 45 (27)

<sup>313</sup> Kister, J.; Assef, G.; Miller, G.; Metzger, J. *Can. J. Chem.* **1979**, *57*, 813-821.

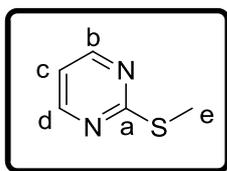
---

---

2-(Metiltio)pirimidina, 43a<sup>314</sup>

---

---



Aceite marrón

**Rendimiento:** 49%

**Fórmula empírica:** C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>S

**Peso Molecular:** 126.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.70

**IR** (KBr): 2900, 1570, 1455, 1330 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.54 (s, 3H<sub>e</sub>), 6.92-6.95 (m, 1H<sub>c</sub>), 8.49 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.9 Hz, 2H<sub>b,d</sub>)

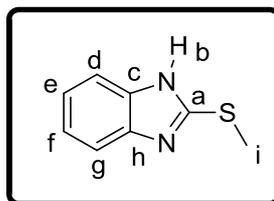
**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 13.9 (CH<sub>3</sub>, C<sub>e</sub>), 116.1 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>c</sub>), 157.0 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>b,d</sub>), 172.9 (C<sub>ar</sub>, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 126 (M<sup>+</sup>, 100%), 80 (58), 73 (32), 53 (39)

---

<sup>314</sup> Integrated Spectral Database System of Organic Compounds. (Los datos fueron obtenidos del Instituto Nacional de Ciencia Industrial y Tecnología Avanzada).

**2-(Metiltio)-1H- benzo[d]imidazol, 44a<sup>315</sup>**



Sólido blanco

**Rendimiento:** 38%

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>S

**Peso Molecular:** 164.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.30

**P<sub>f</sub>**: 202.3-203.5°C

**IR** (KBr): 2950, 1655, 1679, 1470 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz): δ 2.89 (s, 3H<sub>i</sub>), 7.32-7.36 (m, 2H<sub>d,g</sub>), 7.62-7.64 (m, 2H<sub>e,f</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz): δ 14.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>i</sub>), 115.0 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>d,g</sub>), 123.2 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>e,f</sub>), 140.8 (2C<sub>ar</sub>, C<sub>c,h</sub>), 153.8 (C<sub>ar</sub>, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 164 (M<sup>+</sup>, 100%), 140 (14), 131 (86), 122 (29), 91 (19)

<sup>315</sup> Witanowski, M.; Stefaniak, L. *Bull. Pol. Acad. Sci. Chem.* **1987**, 35, 305-320.

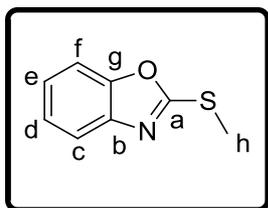
---

---

2-(Metiltio)benzoxazol, 47a<sup>303</sup>

---

---



Aceite marrón

**Rendimiento:** 87%

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>NOS

**Peso Molecular:** 165.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (90% Hexano/AcOEt): 0.62

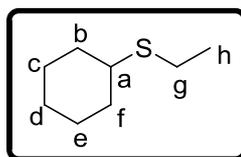
**IR** (KBr): 2980, 1689, 1500, 1025 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.78 (s, 3H<sub>h</sub>), 7.25 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, H<sub>e</sub>), 7.30 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.1 Hz, H<sub>d</sub>), 7.46 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.8 Hz, H<sub>f</sub>), 7.63 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.6 Hz, H<sub>c</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 14.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>h</sub>), 109.8 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 118.3 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>c</sub>), 123.7 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 124.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 141.9 (C<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>), 151.9 (C<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 165.7 (C<sub>ar</sub>, C<sub>a</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 165 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

**Ciclohexil etil sulfuro, 50a**



Líquido amarillo claro

**Rendimiento:** 72%

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>S

**Peso Molecular:** 144.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (100% Hexano): 0.18

**IR** (KBr): 3010, 2928, 2852, 1448, 1262 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.21-1.29 (m, 8H<sub>h,c,d,e</sub>), 1.59-1.62 (m, 1H<sub>c</sub>), 1.74-1.76 (m, 2H<sub>b,f</sub>), 1.94-1.98 (m, 2H<sub>b,f</sub>), 2.15-2.65 (m, 3H<sub>a,g</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 15.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>h</sub>), 23.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 25.8 (2CH<sub>2</sub>, C<sub>b,f</sub>), 26.1 (2CH<sub>2</sub>, C<sub>c,e</sub>), 33.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>g</sub>), 43.0 (CH, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 144 (M<sup>+</sup>, 5%), 82 (7), 67 (7), 40 (100)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>NaS (M+Na)<sup>+</sup>: 167.0865; encontrada: 167.0869

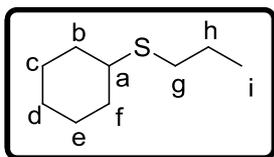
---

---

Ciclohexil propil sulfuro, 51a

---

---



Líquido amarillo claro

**Rendimiento:** 40%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>S

**Peso Molecular:** 158.3 g/mol

**R<sub>f</sub>** (100% Hexano): 0.10

**IR** (KBr): 3010, 2929, 2853, 1448, 1261 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 0.94 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.1 Hz, 3H<sub>i</sub>), 1.21-1.36 (m, 6H<sub>c,e,d,h</sub>), 1.53-1.65 (m, 2H<sub>c,e</sub>), 1.74-1.77 (m, 2H<sub>b,f</sub>), 1.93-2.03 (m, 2H<sub>b,f</sub>), 2.51 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 2H<sub>g</sub>), 2.58-2.63 (m, 1H<sub>a</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 13.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>i</sub>), 23.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>h</sub>), 25.8 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 26.1 (2CH<sub>2</sub>, C<sub>c,e</sub>), 32.1 (2CH<sub>2</sub>, C<sub>b,f</sub>), 33.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>g</sub>), 43.4 (CH, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 158 (M<sup>+</sup>, 30%), 115 (19), 82 (75), 67 (77), 55 (58), 40 (100)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>NaS (M+Na)<sup>+</sup>: 181.1027; encontrada: 181.1022

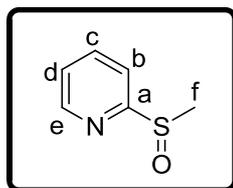
---

---

(±)-2-(Metilsulfinil)piridina, (±)-35b

---

---



Aceite amarillo claro

**Rendimiento:** 72%

**Fórmula empírica:** C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NOS

**Peso Molecular:** 141.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.50

**IR** (KBr): 2924, 1644, 1579, 1426, 1032 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): 2.86 (s, 3H<sub>f</sub>), 7.35-7.40 (m, 1H<sub>d</sub>), 7.91-8.01 (m, 2H<sub>b,c</sub>), 8.61 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.7 Hz, 1H<sub>e</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 41.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>f</sub>), 119.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 124.5 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>), 138.0 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>c</sub>), 149.5 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 169.5 (C<sub>ar</sub>, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 141 (M<sup>+</sup>, 15%), 124 (7), 93 (32), 78 (100), 51 (46)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NNaOS (M+Na)<sup>+</sup>: 164.0141; encontrada: 164.0135

---

---

(S)-2-(Metilsulfinil)piridina, (S)-35b

---

---

**Rendimiento:** 95%

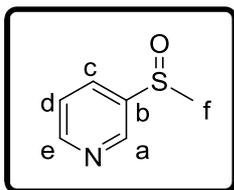
---

---

(±)-3-(Metilsulfinil)piridina, (±)-36b

---

---



Aceite amarillo claro

**Rendimiento:** 35%

**Fórmula empírica:** C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NOS

**Peso Molecular:** 141.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.28

**IR** (KBr): 2921, 1651, 1580, 1416, 1020 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz): δ 3.09 (s, 3H<sub>f</sub>), 7.82-7.87 (m, 1H<sub>d</sub>), 8.37-8.41 (m, 1H<sub>c</sub>), 8.92 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 3.5 Hz, 1H<sub>e</sub>), 9.04 (s, 1H<sub>a</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz): δ 43.7 (CH<sub>3</sub>, C<sub>f</sub>), 126.3 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 134.1 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>c</sub>), 143.7 (C<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>), 146.6 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 153.3 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 141 (M<sup>+</sup>, 100%), 126 (65), 78 (81), 51 (84)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NNaOS (M+Na)<sup>+</sup>: 164.0141; encontrada: 164.0140

---

---

(S)-3-(Metilsulfinil)piridina, (S)-36b

---

---

**Rendimiento:** 90% (S)-36b: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -34.3 (c 1.21, acetona), *ee* 99%.

---

---

(R)-3-(Metilsulfinil)piridina, (R)-36b<sup>316</sup>

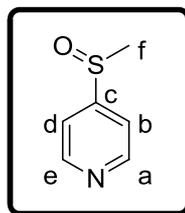
---

---

(R)-36b: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +15.6 (c 0.84, acetona), *ee* 70%.

<sup>316</sup> Método de Kagan.

(±)-4-(Metilsulfinil)piridina, (±)-37b



Aceite amarillo

**Rendimiento:** 20%

**Fórmula empírica:** C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NOS

**Peso Molecular:** 141.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.38

**IR** (KBr): 2921, 1620, 1579, 1408, 1021 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz): δ 2.91 (s, 3H<sub>f</sub>), 7.78 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.2 Hz, 2H<sub>b,d</sub>), 8.80 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 3.9 Hz, 2H<sub>a,e</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz): δ 43.4 (CH<sub>3</sub>, C<sub>f</sub>), 120.0 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>b,d</sub>), 151.5 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>a,e</sub>), 158.1 (C<sub>ar</sub>, C<sub>c</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 141 (M<sup>+</sup>, 4%), 125 (100), 92 (30), 79 (20), 51 (29)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NOS (M+H)<sup>+</sup>: 142.0321; encontrada: 142.0338

(R)-4-(Metilsulfinil)piridina, (R)-37b

**Rendimiento:** 50% (R)-37b: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +41.1 (c 0.95, acetona), ee 99%.

(R)-4-(Metilsulfinil)piridina, (R)-37b<sup>316</sup>

(R)-37b: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +13.8 (c 0.50, acetona), ee 55%.

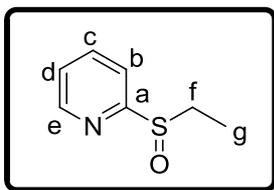
---

---

(±)-2-(Etilsulfinil)piridina, (±)-38b

---

---



Aceite amarillo claro

**Rendimiento:** 10%

**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>NOS

**Peso Molecular:** 155.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.28

**IR** (KBr): 2963, 1650, 1580, 1449, 1024 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.19 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.5 Hz, 3H<sub>g</sub>), 2.86-2.93 (m, 1H<sub>f</sub>), 3.12-3.23 (m, 1H<sub>f</sub>), 7.34-7.39 (m, 1H<sub>d</sub>), 7.89-7.99 (m, 2H<sub>b,c</sub>), 8.62 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.6 Hz, 1H<sub>e</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 5.3 (CH<sub>3</sub>, C<sub>g</sub>), 47.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>f</sub>), 120.3 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 124.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>), 137.7 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>c</sub>), 149.5 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 164.0 (C<sub>ar</sub>, C<sub>a</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 178 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>NNaOS (M+Na)<sup>+</sup>: 178.0297; encontrada: 178.0310

---

---

(S)-2-(Etilsulfinil)piridina, (S)-38b

---

---

**Rendimiento:** 85% (S)-38b: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -56.2 (c 1.05, acetona), ee 99%.

---

---

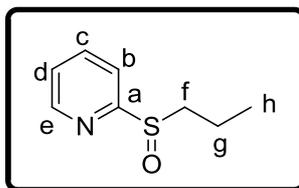
(R)-2-(Etilsulfinil)piridina, (R)-38b<sup>316</sup>

---

---

(R)-38b: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +29.1 (c 0.69, acetona), ee 28%.

**(±)-2-(Propilsulfinil)piridina, (±)-39b**



Aceite amarillo claro

**Rendimiento:** 63%

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NOS

**Peso Molecular:** 169.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.40

**IR** (KBr): 2966, 1650, 1577, 1453, 1030 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz): δ 1.25 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.3 Hz, 3H<sub>h</sub>), 1.73-1.99 (m, 1H<sub>g</sub>), 2.02-2.09 (m, 1H<sub>g</sub>), 3.07-3.17 (m, 1H<sub>f</sub>), 3.26-3.35 (m, 1H<sub>f</sub>), 7.70-7.74 (m, 1H<sub>d</sub>), 8.08-8.14 (m, 1H<sub>b</sub>), 8.22-8.31 (m, 1H<sub>c</sub>), 8.85 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.8 Hz, 1H<sub>e</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz): δ 13.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>h</sub>), 16.8 (CH<sub>2</sub>, C<sub>g</sub>), 57.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>f</sub>), 121.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 126.7 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>), 140.1 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>c</sub>), 151.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 164.8 (C<sub>ar</sub>, C<sub>a</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 192 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NNaOS (M+Na)<sup>+</sup>: 192.0454; encontrada: 192.0455

**(S)-2-(Propilsulfinil)piridina, (S)-39b**

**Rendimiento:** 6%

**(S)-39b:** [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -23.8 (*c* 0.85, acetona), *ee* 99%.

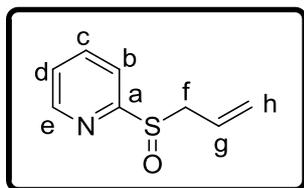
---

---

(±)-2-(Alilsulfinil)piridina, (±)-40b

---

---



Aceite amarillo claro

**Rendimiento:** 61%

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NOS

**Peso Molecular:** 167.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.43

**IR** (KBr): 2928, 1637, 1578, 1425, 1029 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 3.58 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 13.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, 1H<sub>f</sub>), 3.83 (dd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 13.1 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.2 Hz, 1H<sub>f</sub>), 5.15 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 17.7 Hz, 1H<sub>h</sub>), 5.26 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 9.0 Hz, 1H<sub>h</sub>), 5.57-5.69 (m, 1H<sub>g</sub>), 7.35 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.3 Hz, 1H<sub>d</sub>), 7.89-7.90 (m, 2H<sub>b,c</sub>), 8.60 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.6 Hz, 1H<sub>e</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 57.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>f</sub>), 120.5 (CH, C<sub>g</sub>), 123.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>h</sub>), 124.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 125.0 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>), 137.7 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>c</sub>), 149.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 163.5 (C<sub>ar</sub>, C<sub>a</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 190 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NNaOS (M+Na)<sup>+</sup>: 190.0303; encontrada: 190.0306

---

---

(S)-2-(Alilsulfinil)piridina, (S)-40b

---

---

**Rendimiento:** 19% (S)-40b: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -39.8 (c 0.75, acetona), *ee* 99%.

---

---

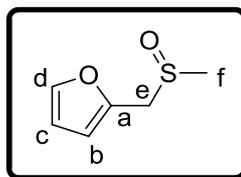
(R)-2-(Alilsulfinil)piridina, (R)-40b<sup>316</sup>

---

---

(R)-40b: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +1.3 (c 0.95, acetona), *ee* 5%.

**(±)-2-Furfurilmetil metil sulfóxido, (±)-45b<sup>215</sup>**



Aceite marrón

**Rendimiento:** 75%

**Fórmula empírica:** C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>S

**Peso Molecular:** 144.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.48

**IR** (KBr): 3072, 2923, 1645, 1500, 1020 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.51 (s, 3H<sub>f</sub>), 4.00 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 12.3 Hz, 1H<sub>e</sub>), 4.09 (d, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 12.3 Hz, 1H<sub>e</sub>), 6.38 (sa, 2H<sub>c,b</sub>), 7.41 (sa, 1H<sub>d</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 37.9 (CH<sub>3</sub>, C<sub>f</sub>), 52.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>e</sub>), 111.1 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>c</sub>), 111.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>), 143.5 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 143.8 (C<sub>ar</sub>, C<sub>a</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, m/z): 167 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]

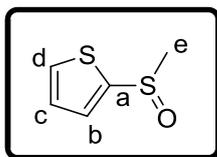
---

---

(±)-2-(Metilsulfinil)tiofeno, (±)-46b<sup>317</sup>

---

---



Aceite amarillo

**Rendimiento:** 80%

**Fórmula empírica:** C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>OS<sub>2</sub>

**Peso Molecular:** 146.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.45

**IR** (KBr): 3050, 2942, 1652, 1525, 1030 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.91 (s, 3H<sub>e</sub>), 7.18 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 4.9 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 3.8 Hz, 1H<sub>c</sub>), 7.52 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 3.7 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> 1.5 Hz, 1H<sub>b</sub>), 7.69 (dd, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.0 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> 1.6 Hz, 1H<sub>d</sub>)

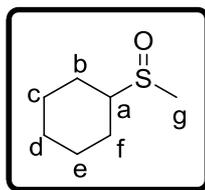
**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): 22.9 (CH<sub>3</sub>, C<sub>e</sub>), 126.5 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>c</sub>), 128.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>), 130.5 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 142.1 (C<sub>ar</sub>, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 146 (M<sup>+</sup>, 51%), 131 (100)

---

<sup>317</sup> Boyd, D. R.; Sharma, N. D.; Gunaratne, N.; Haughey, S. A.; Kennedy, M. A.; Malone, J. F.; Allen, C. C. R.; Dalton, H. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 984-994.

**(±)-Ciclohexil metil sulfóxido, (±)-49b**



Líquido amarillo claro

**Rendimiento:** 98%

**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>OS

**Peso Molecular:** 146.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.25

**IR** (KBr): 2931, 1451, 1033 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz): δ 1.58-1.66 (m, 5H<sub>c,d,e</sub>), 1.91-1.94 (m, 1H<sub>c</sub>), 2.08-2.13 (m, 3H<sub>b,f</sub>), 2.28-2.31 (m, 1H<sub>b</sub>), 2.84 (s, 3H<sub>g</sub>), 2.85-2.88 (m, 1H<sub>a</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz): δ 25.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 26.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>e</sub>), 26.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 26.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>f</sub>), 27.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 35.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>g</sub>), 61.6 (CH, C<sub>a</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, *m/z*): 146 (M<sup>+</sup>, 7%), 83 (51), 67 (71), 55 (92), 40 (100)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>NaOS (M+Na)<sup>+</sup>: 169.0658; encontrada: 169.0649

**(S)-Ciclohexil metil sulfóxido, (S)-49b**

**Rendimiento:** 91%

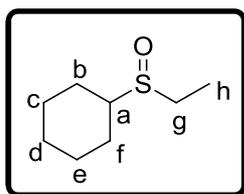
---

---

(±)-Ciclohexil etil sulfóxido, (±)-50b<sup>313</sup>

---

---



Líquido transparente

**Rendimiento:** 98%

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>OS

**Peso Molecular:** 160.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.20

**IR** (KBr): 2958, 2872, 1420, 1230, 1025 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.20-1.49 (m, 7H<sub>c,e,d,h</sub>), 1.66-1.69 (m, 1H<sub>e</sub>), 1.80-1.89 (m, 3H<sub>b,f,c</sub>), 1.90-2.19 (m, 2H<sub>b,f</sub>), 2.47-2.62 (m, 3H<sub>a,g</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 15.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>h</sub>), 23.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 25.8 (2CH<sub>2</sub>, C<sub>c,e</sub>), 26.1 (2CH<sub>2</sub>, C<sub>b,f</sub>), 33.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>g</sub>), 43.0 (CH, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 160 (M<sup>+</sup>, 35%), 83 (100), 61 (12)

---

---

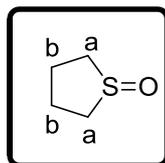
(*R*)-Ciclohexil etil sulfóxido, (*R*)-50b<sup>316</sup>

---

---

(*R*)-50b: [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +0.7 (*c* 1.05, acetona), *ee* 29%.

**Tetrahidrotiofeno-1-óxido, 52b<sup>318</sup>**



Aceite amarillo

**Rendimiento:** 52%

**Fórmula empírica:** C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>OS

**Peso Molecular:** 104.1 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.20

**IR** (KBr): 2950, 1651, 1411, 1303, 1022 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.99-2.04 (m, 2H<sub>b</sub>), 2.40-2.44 (m, 2H<sub>b</sub>), 2.82-2.88 (m, 4H<sub>a</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 25.2 (2CH<sub>2</sub>, C<sub>a</sub>), 54.2 (2CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 104 (M<sup>+</sup>, 53%), 63 (33), 100 (55), 41 (21)

<sup>318</sup> Ali, M. H.; Hartman, M.; Lamp, K.; Schmitz, C.; Wenciewicz, T. *Synth. Commun.* **2006**, *36*, 1779-1786.

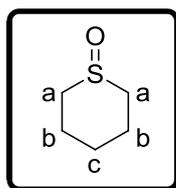
---

---

**Tetrahidro-2*H*-tiopiran-1-óxido, 53b**<sup>319</sup>

---

---



Líquido incoloro

**Rendimiento:** 63%

**Fórmula empírica:** C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>OS

**Peso Molecular:** 118.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.25

**IR** (KBr): 2932, 1650, 1415, 1282, 1022 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.41-1.60 (m, 3H<sub>b,c</sub>), 1.93-2.25 (m, 3H<sub>b</sub>), 2.69-3.00 (m, 4H<sub>a</sub>)

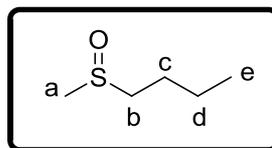
**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 18.8 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 23.9 (2CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 48.5 (2CH<sub>2</sub>, C<sub>a</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 118 (M<sup>+</sup>, 60%), 101 (18), 69 (84), 63 (67), 41 (100)

---

<sup>319</sup> Ward, D. E.; Rasheed, A.; Gillis, H. M.; Beye, G. E.; Jheengut, V.; Achonduh, G. T. *Synthesis* **2007**, *10*, 1584-1586.

**(±)-*n*-Butil metil sulfóxido, (±)-54b<sup>320</sup>**



Aceite amarillo

**Rendimiento:** 76%

**Fórmula empírica:** C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>OS

**Peso Molecular:** 120.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.25

**IR** (KBr): 2960, 2937, 1652, 1038 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz): δ 1.18 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.6 Hz, 3H<sub>e</sub>), 1.63-1.77 (m, 2H<sub>d</sub>), 1.87-1.98 (m, 2H<sub>c</sub>), 2.82 (s, 3H<sub>a</sub>), 2.90-3.13 (m, 2H<sub>b</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz): δ 14.3 (CH<sub>3</sub>, C<sub>e</sub>), 23.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 26.0 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 38.4 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 54.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 120 (M<sup>+</sup>, 9%), 64 (100), 41 (88)

**(*S*)-*n*-Butil metil sulfóxido, (*S*)-54b**

**Rendimiento:** 88%

**(*S*)-54b:** +32.5 (*c* 0.5, EtOH), *ee* 99%.

<sup>320</sup> Li, X-B.; Liu, J. T. *Chin. J. Chem.* **2007**, 25, 1309-1311.

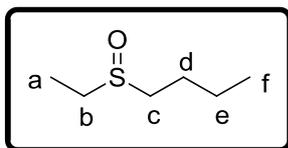
---

---

(±)-*n*-Butil etil sulfóxido, (±)-55b

---

---



Aceite amarillo

**Rendimiento:** 64%

**Fórmula empírica:** C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>OS

**Peso Molecular:** 134.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.28

**IR** (KBr): 2962, 2935, 1648, 1040 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz): δ 1.18 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, 3H<sub>f</sub>), 1.51 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.6 Hz, 3H<sub>a</sub>), 1.63-1.77 (m, 2H<sub>e</sub>), 1.88-1.98 (m, 2H<sub>d</sub>), 2.86-3.11 (m, 4H<sub>b,c</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz): δ 7.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>f</sub>), 14.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 23.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>e</sub>), 26.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 46.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 52.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 134 (M<sup>+</sup>, 6%), 118 (26), 78 (100), 41 (81)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>NaOS (M+Na)<sup>+</sup>: 157.0658; encontrada: 157.0668

---

---

(*S*)-*n*-Butil etil sulfóxido, (*S*)-55b

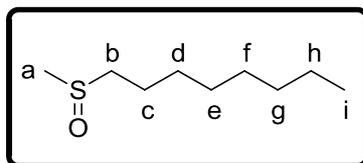
---

---

**Rendimiento:** 89%

(*S*)-55b: +16.4 (*c* 0.78, EtOH), *ee* 99%.

(±)-Metil octil sulfóxido, (±)-56b<sup>308</sup>



Sólido blanco

**Rendimiento:** 34%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>20</sub>OS

**Peso Molecular:** 176.3 g/mol

**R<sub>f</sub>** (95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.25

**P<sub>f</sub>**: 36.1-38.2°C

**IR** (KBr): 2927, 2855, 1288, 1041 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 0.82 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.4 Hz, 3H<sub>i</sub>), 1.21-1.42 (m, 10H<sub>d,e,f,g,h</sub>), 1.67-1.74 (m, 2H<sub>c</sub>), 2.51 (3H<sub>a</sub>), 2.55-2.92 (m, 2H<sub>b</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 14.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>i</sub>), 22.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>h</sub>), 22.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>g</sub>), 28.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>f</sub>), 28.8 (CH<sub>2</sub>, C<sub>e</sub>), 28.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>d</sub>), 31.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 38.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 54.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>)

**EM** (ESI<sup>+</sup>, m/z): 199 [(M+Na)<sup>+</sup>, 100%]



# **CAPÍTULO 5**

***Evaluación del potencial  
biocatalítico de la flavín-  
monooxigenasa de  
Methylophaga sp. SK1  
(mFMO)***



Los xenobióticos, como por ejemplo medicamentos, pesticidas u otros agentes químicos, han de ser biotransformados una vez introducidos en el organismo. Las células poseen sistemas enzimáticos que actúan sobre estos compuestos, introduciendo en ellos una o más funcionalidades que aumentan su reactividad y facilitan su excreción. Existe una gran familia de enzimas que han evolucionado en eucariotas y procariotas con este fin, la de las citocromo P450 (EC 1.14.14.1).<sup>321</sup> Estas hemoproteínas son capaces de catalizar además de hidroxilaciones, epoxidaciones, desalquilaciones y oxidaciones de heteroátomos, reacciones de deshalogenación, deshidrogenaciones y reacciones de deshidratación de forma selectiva.<sup>322</sup>

---

<sup>321</sup> (a) Fukami, T.; Katoh, M.; Yamazaki, H.; Yokoi, T.; Nakajima, M. *Chem. Res. Toxicol.* **2008**, *21*, 720-725; (b) Niwa, T.; Murayama, N.; Yamazaki, H. *Curr. Drug. Metab.* **2008**, *9*, 453-462.

<sup>322</sup> (a) Sono, M.; Roach, M. P.; Coulter, E. D.; Dawson, J. H. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2841-2888; (b) Urlacher, V. B.; Bell, S. G.; Wong, L.-L. en *Modern Bioxidation*. Eds. Schmid, R. D.; Urlacher, V. B. Wiley-VCH, Weinheim **2007**, 99-122; (c) Jusling, M. K.; Cornelissen, S.; Buehler, B.; Schmid, A. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, *12*, 177-186.

Sin embargo, existe otra familia de monooxigenasas, mucho menos extensa y conocida, que también juega un papel fundamental en la eliminación de toxinas, las flavín-monooxigenasas (FMOs) (EC 1.14.13.8).<sup>30,323</sup> Aunque el papel biológico de ambos tipos de enzimas es similar, poseen importantes diferencias respecto a la aceptación de sustratos, mecanismo de reacción y propiedades cinéticas.<sup>324</sup>

### 5.1. FLAVÍN-MONOOXIGENASAS

Las flavín-monooxigenasas (FMOs) pertenecen a la clase B de las flavoproteín-monooxigenasas.<sup>27</sup> Dentro de las principales características de estos enzimas podemos destacar que están codificados por un único gen, emplean NADPH como cofactor (permaneciendo el NADP<sup>+</sup> unido durante el ciclo catalítico) y poseen dos dominios de unión, uno para el NADPH y otro para el FAD.

#### 5.1.1. HISTORIA DE LAS FLAVÍN-MONOOXIGENASAS

El primer trabajo sobre estas monooxigenasas data de 1960.<sup>325</sup> En él se describió que existían unos enzimas en los microsomas de hígado porcino que catalizaban la oxidación dependiente de NADPH de azocompuestos y aminoderivados en la mantequilla amarilla y en algunos tintes. Años más tarde, Ziegler y colaboradores mostraron interés en la naturaleza de estos enzimas, llamados por entonces “amina oxidasas de función mixta”. Estudiaron la oxidación de la *N,N*-dimetilanilina catalizada por microsomas de hígado porcino, utilizando un ensayo colorimétrico para detectar el correspondiente *N*-óxido.<sup>326</sup> Este estudio fue extendido a una amplia variedad de vertebrados, siendo detectada la mayor actividad enzimática para los enzimas provenientes del hígado de cerdo.<sup>327</sup> Gracias a la enorme cantidad disponible de este tejido, años más tarde fue posible el aislamiento y purificación de este enzima.<sup>328</sup>

---

<sup>323</sup> Cashman, J. R. *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.* **2003**, 6, 486-493.

<sup>324</sup> Cashman, J. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 338, 599-604.

<sup>325</sup> Miller, J. A.; Kramer, J. W.; Miller, E. C. *Cancer Res.* **1960**, 20, 950-962.

<sup>326</sup> Pettit, F. H.; Orme-Johnson, W.; Ziegler, D. M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1964**, 16, 444-448.

<sup>327</sup> Machinist, J. M.; Dehner, E. W.; Ziegler, D. M. *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, 125, 858-864.

<sup>328</sup> Ziegler, D. M.; Mitchell, C. H. *Arch. Biochem. Biophys.* **1972**, 150, 116-125.

Desde entonces, este tipo de enzimas se han caracterizado en numerosos organismos (conejos, ratas, perros, chimpancés y humanos) y en diferentes tejidos (pulmón, hígado, riñón, etc.).<sup>329</sup>

### 5.1.2. TIPOS, ORIGEN Y FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LAS FLAVÍN-MONOOXIGENASAS

Las flavín-monooxigenasas son capaces de oxidar un amplio número de heteroátomos como azufre, selenio, nitrógeno, boro e yodo.<sup>330</sup> Fundamentalmente se conocen ejemplos de oxidaciones de compuestos de nitrógeno, siendo las aminas terciarias sustratos excelentes para estas enzimas que se convierten en derivados *N*-óxido. Las aminas secundarias se metabolizan a hidroxilaminas y nitronas, mientras que las aminas primarias se oxidan a hidroxilaminas y oximas y las hidracinas a hidrazonas. Entre los sustratos típicos de las FMO se encuentran la trimetilamina, la (*S*)-nicotina y numerosos fármacos como los antipsicóticos tricíclicos, la cimetidina, la ranitidina y el verapamilo.<sup>331</sup>

Las FMOs son sintetizadas por mamíferos, levaduras, plantas y bacterias. En humanos y otros mamíferos se expresan hasta cinco isoformas (FMO1, FMO2, FMO3, FMO4 y FMO5).<sup>332</sup> La expresión de las diferentes isoformas de la FMO es específica del tejido y de la especie. Las isoformas del mismo tejido entre diferentes especies tienen una similitud mayor del 80%, mientras que las isoformas de diferentes tejidos dentro de la misma especie tienen una semejanza mayor del 60%. En general podemos decir que las FMO1, 3 y 5 se encuentran en el hígado y los riñones, mientras que la FMO2 en los pulmones. La forma que predomina en el hígado humano adulto es la FMO3, responsable del metabolismo hepático de una gran cantidad de fármacos.<sup>333</sup>

<sup>329</sup> Cascales, M. en *Mecanismos de hepatotoxicidad*. Ed. Real Academia de Doctores, Madrid **2001**, 73-98.

<sup>330</sup> (a) Ziegler, D. M. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1993**, *33*, 179-199; (b) Cashman, J. R. *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, *8*, 166-181; (c) Ganther, H. E.; Lawrence, J. R. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 12299-12310.

<sup>331</sup> Rettie, A. E.; Fisher, M. B. en *Handbook of drug metabolism*. Ed. Woolf, T. F. Marcel Dekker Inc, Nueva York **1999**, 132-151.

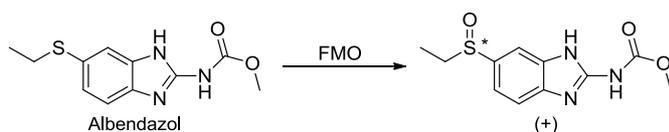
<sup>332</sup> Algunos ejemplos recientes: (a) Phillips, I. R.; Shephard, E. A. *Trends Pharm. Sci.* **2008**, *29*, 294-301; (b) Sadeghi, S. J.; Meirinhos, R.; Catucci, G.; Dodhia, V. R.; Di Nardo, G.; Gilardi, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 458-459.

<sup>333</sup> (a) Furnes, B.; Feng, J.; Sommer, S. S.; Schlenk, D. *Drug. Metab. Dispos.* **2003**, *31*, 187-193; (b) Hernández, D.; Janmohamed, A.; Chandan, P.; Phillips, I. R.; Shephard, E. A.

## Capítulo 5

Ciertas mutaciones del gen *FMO3* humano se han relacionado con anomalías en la degradación de fármacos y agentes químicos, así como con ciertas enfermedades metabólicas. Un ejemplo bien conocido es la trimetilaminuria por la *N*-oxigenación anormal de la trimetilamina.<sup>334</sup> En condiciones normales la colina y el óxido de trimetilamina se ingieren en la dieta y se degradan por las bacterias del intestino produciendo trimetilamina, la cual se absorbe y transporta al hígado donde se oxida por la *FMO3* a *N*-óxido de trimetilamina, que se excreta por vía urinaria. En el caso de la trimetilaminuria, existe una deficiente actividad de la *FMO3*, lo que ocasiona una menor oxidación de la trimetilamina. Ésta se acumula y tiene que ser eliminada como tal por orina, sudor y aliento, originando el síndrome de olor corporal a pescado.

La mayoría de las flavín-monooxigenasas en eucariotas son proteínas que se encuentran asociadas a la membrana celular, lo cual dificulta en gran medida su aislamiento. Este hecho hace que apenas hayan sido utilizadas en procesos biocatalíticos.<sup>335</sup> Un ejemplo recogido en la bibliografía es la oxidación de un antihelmíntico (Figura 5.1), el albendazol, catalizado por una *FMO* aislada que se encuentra en el hígado de ratas. La sulfoxidación de este fármaco es la principal ruta metabólica y el primer paso en su metabolismo. El correspondiente (+)-sulfóxido fue obtenido con un exceso enantiomérico de 37% a 59%.<sup>336</sup>



**Figura 5.1.** Sulfoxidación del albendazol catalizada por una *FMO* aislada de hígado de ratas.

*Pharmacogenetics* **2004**, *14*, 117-130; (c) Cashman, J. R.; Zhang, J. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2006**, *46*, 65-100.

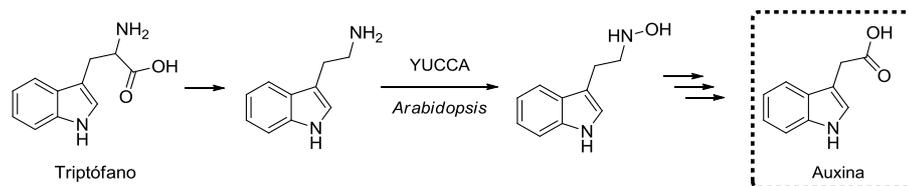
<sup>334</sup> Cashman, J. R.; Camp, K.; Fakharzadeh, S. S.; Fennessey, P. V.; Hines, R. N.; Mamer, O. A.; Mitchell, S. C.; Preti, G.; Schlenk, D.; Smith, R. L.; Tjoa, S. S.; Williams, D. E.; Yannicelli, S. *Curr. Drug. Metabol.* **2003**, *4*, 151-170.

<sup>335</sup> (a) Rettie, A. E.; Bogucki, B. D.; Lim, I.; Meier, G. P. *Mol. Pharmacol.* **1990**, *27*, 643-651; (b) Rettie, A. E.; Lawton, M. P.; Sadeque, A. J. M.; Meier, G. P.; Philpot, R. M. *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *311*, 369-377; (c) Nnane, I. P.; Damani, L. A. *Xenobiotica* **2003**, *33*, 83-91.

<sup>336</sup> Moroni, P.; Buronfosse, T.; Longin-Sauvageon, C.; Delatour, P.; Benoit, E. *Drug. Metab. Dispos.* **1995**, *23*, 160-165.

Al contrario de las FMOs de origen animal, las FMOs en levaduras no oxidan compuestos nitrogenados,<sup>337</sup> siendo activas con tioles. Se cree que su papel fisiológico es el de modulador de los tioles celulares, es decir, se requieren para generar un plegamiento adecuado en las proteínas que poseen puentes de disulfuro mediante el aporte de un ambiente oxidante en el retículo endoplasmático.<sup>338</sup>

En plantas, las flavín-monooxigenasas participan en la biosíntesis de auxina, una hormona crucial en el desarrollo de éstas.<sup>339</sup> Se ha descrito que la flavín-monooxigenasa YUCCA cataliza un paso clave en la biosíntesis de auxina en las plantas herbáceas de género *Arabidopsis* (Figura 5.2). Esta biotransformación consiste en la *N*-oxidación de la triptamina, sustrato proveniente de la descarboxilación del triptófano. Éste es el paso limitante de la velocidad de reacción en la síntesis de auxina de muchas plantas.



**Figura 5.2.** Biooxidación de triptamina a su correspondiente hidroxilamina catalizada por la FMO YUCCA. Paso clave en la biosíntesis de auxina.

Existen varios ejemplos de FMOs bacterianas. Uno de ellos es la FMO aislada de la bacteria que participa en la simbiosis con escarabajos de *Paederus Fuscipes*, que es capaz de catalizar una reacción de Baeyer-Villiger para formar el policétido pederina (un importante agente antitumoral).<sup>340</sup> Además, recientemente se ha clonado el primer gen de una FMO de origen bacteriano (*Methylophaga* sp. SK1).<sup>341</sup> La sobreexpresión y

<sup>337</sup> (a) Suh, J-K.; Poulsen, L. L.; Ziegler, D. M.; Robertus, J. D. *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, *336*, 268-274; (b) Wood, V.; Gwilliam, R.; Rajandream, M. A.; Lyne, M.; Lyne, R.; Stewart, A.; Sgouros, J.; Peat, N.; Hayles, J.; Baker, S.; *et al. Nature* **2002**, *415*, 871-880.

<sup>338</sup> (a) Suh, J-K.; Poulsen, L. L.; Ziegler, D. M.; Robertus, J. D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 2687-2691; (b) Suh, J-K.; Poulsen, L. L.; Ziegler, D. M.; Robertus, J. D. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *15*, 317-322.

<sup>339</sup> (a) Zhao, Y.; Christensen, S. K.; Fankhauser, C.; Cashman, J. R.; Cohen, J. D.; Weigel, D.; Chory, J. *Science* **2001**, *291*, 306-309; (b) Schlaich, N. L. *Trends Plants Sci.* **2007**, *12*, 412-418.

<sup>340</sup> Piel, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 14002-14007.

<sup>341</sup> Choi, H. S.; Kim, J. K.; Cho, E. H.; Kim, Y. C.; Kim, J. I.; Kim, S. W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *306*, 930-936.

caracterización del enzima reveló que era capaz de oxidar un gran número de aminas, así como de producir índigo.

### 5.1.3. **FLAVÍN-MONOOXIGENASA DE METHILOPHAGA sp. SK1 (mFMO)**

La bacteria *Methilophaga* sp. SK1 fue aislada del mar en Mokpo, Corea. Crece en medios con metanol, aminas metiladas y dimetilsulfuros pero no en metano. Utiliza como fuente de energía trimetilamina. Un gen de esta bacteria fue aislado y expresado en *E. coli*, generándose en el medio de cultivo azul de índigo. La secuencia de aminoácidos de este gen mostró una similitud del 30% con flavín-monooxigenasas procedentes de mamíferos, por lo que se estableció que éste era un ejemplo de una FMO en procariotas.

La secuencia de la mFMO consta de 1371 bases que codifican 356 aminoácidos. Es un homodímero de peso molecular 105 kDa. Posee como cofactor FAD (una molécula por monómero), unido no covalentemente al enzima. Contiene las tres secuencias de residuos características de las FMOs: dominio del FAD (GXGXXG), dominio de NADPH (GXSXXA) y secuencia típica de FMO (FXGXXXHXXXF). Además, las actividades catalíticas con una serie de sustratos como trimetilamina, tiourea, cisteamina, L-glutaciona, (S)-nicotina y el espectro de absorción (máximos de absorción próximos a 365 y 440 nm) coinciden con las de otras flavín-monooxigenasas eucariotas. La mFMO posee una ventaja frente a éstas, ya que es un enzima soluble y no asociado a la membrana celular, por lo que su sobreexpresión es más fácil.

La *E. coli* que expresa mFMO fue capaz de producir hasta 160 mg de índigo por litro en un medio de triptófano tras 12 horas de cultivo. Años más tarde este resultado fue optimizado, llegando a producirse 920 mg de índigo por litro tras 24 horas.<sup>342</sup> El mecanismo que se postula para este proceso, es que la triptofanasa de *E. coli* cataliza la conversión de triptófano en indol, el cual es oxidado por la mFMO. Este óxido de indol es convertido en indoxil en el medio de reacción y dos moléculas de éste dimerizan espontáneamente, generándose índigo.

El mecanismo catalítico de la mFMO ha sido estudiado y es muy similar al de otras flavoproteín-monooxigenasas (Figura I4, página 11). La adición de NADPH rápidamente conlleva la reducción de la flavina, que a su vez reacciona con el oxígeno molecular generando la C4a-hidroperoxiflavina.

---

<sup>342</sup> Han, G. H.; Shin, H-J. Kim, S. W. *Enzyme Microb. Technol.* **2008**, *42*, 617-623.

Este intermedio es estabilizado por los aminoácidos del centro activo del enzima y por la unión con el NADP<sup>+</sup>, manteniéndose así hasta que se incorpora el sustrato susceptible de ser oxidado. En caso de que no hubiera sustrato, la C4a-hidroperoxiflavina se descompone para dar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Como resultado final, un átomo de oxígeno es introducido en el sustrato, mientras el segundo es eliminado en forma de H<sub>2</sub>O a la vez que se recupera la flavina oxidada. El paso limitante de velocidad en este proceso es para muchas FMOs la eliminación de agua. Por ejemplo, en la FMO1 de hígado de cerdo, este paso es diez veces más lento que el resto.<sup>30a</sup>

Recientemente ha sido elucidada la estructura cristalina de la mFMO unida a NADPH, aunque no fue posible la obtención de cristales con un sustrato unido al enzima.<sup>343</sup> Esta estructura es muy similar a la de otra FMO de una levadura cuya estructura ha sido previamente elucidada, la de *Schizosaccharomyces pombe*.<sup>30b</sup> Como se puede observar en la Figura. 5.3, la estructura de la mFMO está constituida fundamentalmente por dos dominios. Uno más grande que corresponde al sitio de unión con el FAD (residuos de 1-169 y 281-461) y otro de unión al NADPH (residuos 170-280). Ambos están conectados a través de un *linker*.

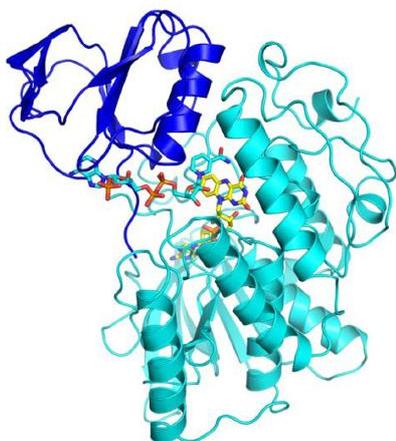
El centro activo del enzima muestra un hueco o hendidura para el acoplamiento del NADP<sup>+</sup>. De esta forma, esta molécula puede posicionarse de modo que orienta su C4 reactivo fuera del N5 de la flavina, para que su grupo amida sea capaz de establecer dos enlaces de hidrógeno con la flavina (N5 y O4). Existe un residuo importante, la Tyr212, cuya cadena lateral junto con la ribosa del NADP<sup>+</sup> generan una barrera que protege la cavidad del centro activo del disolvente. Este hecho favorece la estabilidad del intermedio C4a-hidroperoxiflavina durante el ciclo catalítico.

Los estudios de modelización sobre este biocatalizador determinaron que el NADP<sup>+</sup> es capaz de estabilizar la C4a-hidroperoxiflavina mediante otros enlaces distintos a los anteriormente descritos. Esta molécula se posiciona de tal forma que es capaz de establecer enlaces de hidrógeno a través del grupo 2-hidroxilo de su ribosa con los dos oxígenos del carbono C4a del intermedio C4a-hidroperoxiflavina. La disposición del NADP<sup>+</sup> permite al intermedio estabilizarse mediante interacciones polares con el residuo Asn78.

Ambas consideraciones (estructura cristalina y modelización molecular) concuerdan en que existe una estabilización de la C4a-hidroperoxiflavina

<sup>343</sup> Alfieri, A.; Malito, E.; Orru, R.; Fraaije, M. W.; Mattevi, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 6572-6577.

gracias al  $\text{NADP}^+$ . Esta molécula protege al centro activo y mediante un ambiente lleno de enlaces de hidrógeno aumenta el tiempo de vida media del intermedio. Por tanto la finalidad del NADPH es doble, reducción del FAD y estabilización de la C4a-hidroperoxiflavina. Estos resultados fueron corroborados posteriormente mediante técnicas de mutagénesis dirigida y utilizando análogos de NADPH.<sup>344</sup>



**Figura 5.3.** Estructura de la flavín-monooxigenasa de *Methilophaga* sp. SK1 (mFMO) obtenida por rayos X.

### 5.2. MONOOXIGENASAS AUTOSUFICIENTES

Recientemente se ha clonado un nuevo biocatalizador capaz de catalizar reacciones de Baeyer-Villiger de forma autosuficiente.<sup>181</sup> Se trata de una proteína bifuncional, denominada CRE-BVMO (CRE del inglés *Coenzyme Regenerating Enzyme*), en la que se combina la actividad catalítica de una BVMO con la capacidad de reciclar el cofactor de una fosfito deshidrogenasa (PTDH), enzima que cataliza la oxidación de fosfito a fosfato (Figura 5.4).

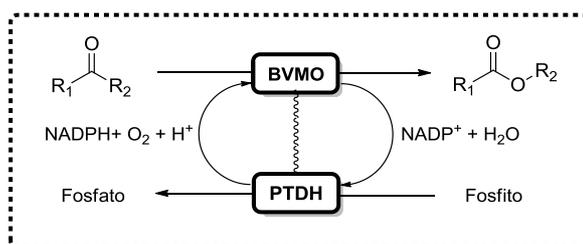
Se escogió este enzima para la regeneración de cofactor debido a su alta selectividad y fácil accesibilidad a su sustrato, fosfito.<sup>345</sup> Además, el

---

<sup>344</sup> Orru, R.; Torres Pazmiño, D. E.; Fraaije, M. W.; Mattevi, A. *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 35021-35028.

<sup>345</sup> (a) Metcalf, W. W.; Wolfe, R. S. *J. Bacteriol.* **1998**, 180, 5547-5558; (b) García Costas, A. M.; White, A. K.; Metcalf, W. W. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 17429-17436; (c) Vrtis, J. M.;

equilibrio termodinámico de la oxidación de fosfito está favorecido, lo que hace a la reacción prácticamente irreversible.<sup>346</sup>



**Figura 5.4.** Regeneración de cofactor mediante enzimas fusionadas CRE-BVMOs.

Para llevar a cabo la preparación de este enzima bifuncional, se ha fusionado el gen de una BVMO y el de un mutante de la fosfito deshidrogenasa de *Pseudomonas stutzeri* (PTDH E175A/A176R), y se han expresado en *E. coli*. En un primer estudio las BVMOs escogidas como modelos fueron PAMO, CHMO<sub>Acineto</sub> y CPMO. El vector pCRE-BVMO expresa la correspondiente BVMO unida covalentemente por una pequeña cadena de aminoácidos (**Ser-Arg-Ser-Ala-Ala-Gly**) a la PTDH. Se observaron muy buenos niveles de expresión de todas ellas, por lo que posteriormente fueron aisladas. Se obtuvieron de 10-50 mg de enzima soluble pura por litro de cultivo, excepto para la CRE-CPMO, para la que no ha sido posible la purificación de la proteína.<sup>347</sup>

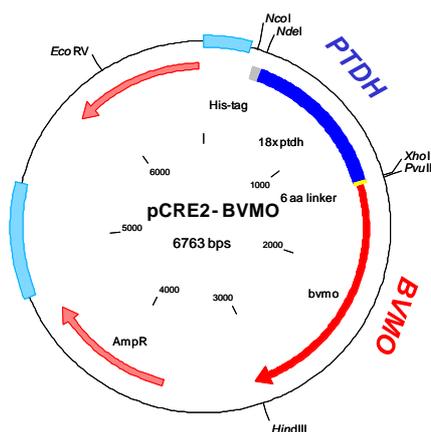
La actividad catalítica de estas nuevas BVMOs recombinantes se analizó como enzimas aislados, en células enteras y en el extracto libre de células. La ventaja de este nuevo sistema es que no requiere la adición de un segundo enzima para regenerar el cofactor, únicamente se ha de añadir el cosustrato, en este caso fosfito sódico. La subunidad fosfito deshidrogenasa se encarga de oxidar el fosfito a fosfato, reduciendo el NADP<sup>+</sup> a NADPH, que será empleado por la BVMO. Se observó que las CRE-BVMOs mantenían el mismo perfil de sustrato que las correspondientes BVMOs no fusionadas, conservando su estabilidad, actividad y selectividad.

White, A. K.; Metcalf, W.W.; van der Donk, W. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3257-3259.

<sup>346</sup> Woodyer, R. D.; van der Donk, W. A.; Zhao, H. *Biochemistry* **2003**, *42*, 11604-11614.

<sup>347</sup> Iwaki, H.; Hasegawa, Y.; Wang, S.; Kayser, M. M.; Lau, P. C. K. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 5671-5684.

Este estudio fue mejorado y ampliado posteriormente, sintetizándose una nueva generación de enzimas bifuncionales CRE2-BVMOs (PTDH-BVMOs).<sup>348</sup> Se fusionó el gen de un nuevo mutante de PTDH más termoestable, optimizándose el codón de éste con objeto de mejorar la expresión del enzima en la *E. coli*. Además se introdujo una cadena de histidinas en el extremo *N*-terminal de la PTDH para facilitar su purificación (Figura 5.5). Se amplió el rango de BVMOs estudiadas, empleándose también HAPMO, PAMO<sub>M446G</sub> y EtaA. Las CRE2-BVMOs purificadas mostraron una misma actividad y estereoselectividad que las BVMOs no fusionadas incluso a altas temperaturas.



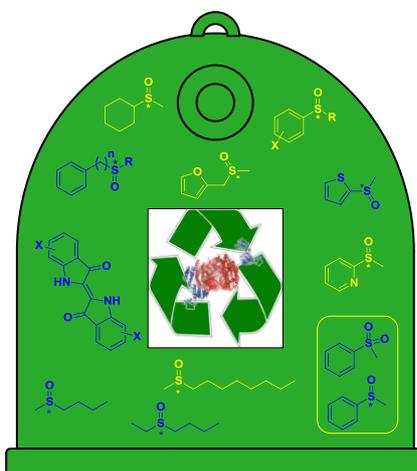
**Figura 5.5.** Vector de expresión pCRE2-BVMO.

Con el objeto de incrementar el número de biocatalizadores fusionados, se aplicó esta metodología de fusión a otras monooxigenasas. Así, el mismo grupo de investigación llevó a cabo la fusión de la citocromo P450BM3 y la mFMO con la PTDH de *Pseudomonas stutzeri*, generando los catalizadores bifuncionales PTDH-P450BM3 (CRE2-P450BM3) y PTDH-mFMO (CRE2-mFMO). Este último biocatalizador será estudiado exhaustivamente en el presente capítulo.

*Debido a los pocos ejemplos descritos en la bibliografía en los que se utilizan FMOs en procesos biocatalíticos, y para demostrar la aplicabilidad de los biocatalizadores fusionados, nos hemos planteado estudiar el*

<sup>348</sup> Torres Pazmiño, D. E.; Riebel, A.; de Lange, J.; Rudroff, F.; Mihovilovic, M. D.; Fraaije, M. W. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2595-2598.

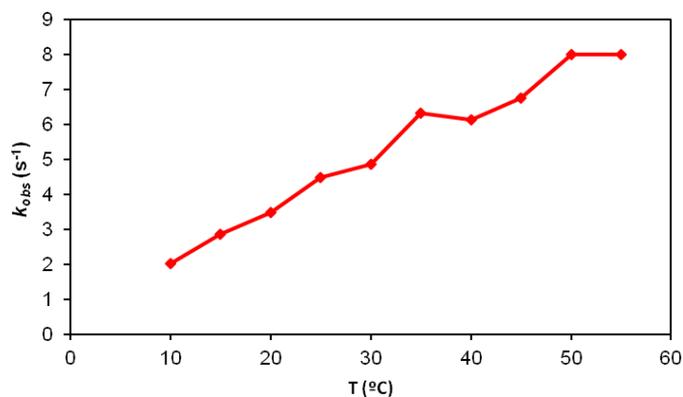
*potencial biocatalítico del enzima autosuficiente PTDH-mFMO en reacciones de oxidación, fundamentalmente en N-oxidaciones sobre indoles y en procesos de sulfoxidación asimétrica. Asimismo, se analizará la influencia de parámetros como el pH y la temperatura en las propiedades biocatalíticas de este enzima. Además, se estudiará el efecto de la concentración de sustrato y la presencia de medios de reacción no convencionales disolución tampón-cosolvente orgánico, con el objeto de optimizar los procesos biocatalizados por la PTDH-mFMO.*





### 5.3. ESTUDIO CINÉTICO DE LAS PROPIEDADES BIOCATALÍTICAS DE LA PTDH-mFMO

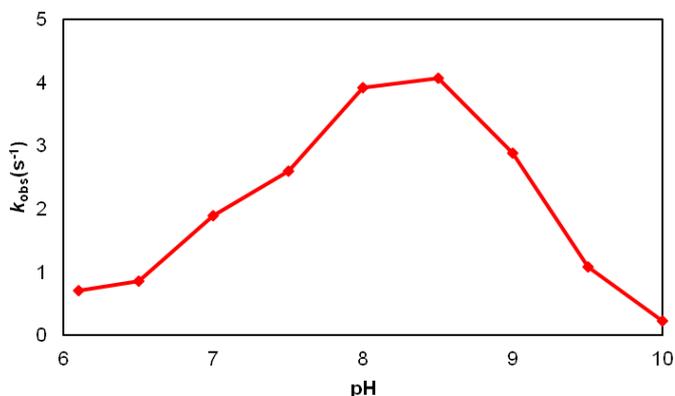
En primer lugar, se llevaron a cabo una serie de estudios cinéticos sobre la PTDH-mFMO con el fin de poseer un mayor conocimiento acerca de este enzima bifuncional. Así, se analizó el efecto de la temperatura sobre la actividad catalítica del biocatalizador en la oxidación de su sustrato favorito, la trimetilamina. Se utilizó como medio de reacción una disolución de Tris/HCl pH 8.5. Como se puede observar en la Figura 5.6, al aumentar la temperatura de reacción se observa una mayor actividad catalítica del enzima hasta un máximo a 55°C.



**Figura 5.6.** Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la PTDH-mFMO en la oxidación de la trimetilamina.

A raíz de estos resultados se analizó la termoestabilidad del enzima. A temperaturas cercanas a 50°C o 60°C la inactivación del enzima es casi inmediata, perdiendo toda su actividad a los pocos minutos. Se observó que la incubación de la PTDH-mFMO a 42°C durante 1 hora provocaba la pérdida total de su actividad como mFMO, pero no como PTDH, que seguía siendo activa. La desactivación fue más lenta al incubar el biocatalizador a 35°C. El tiempo de vida media de ésta era de 5 horas. Finalmente un último estudio a 25°C demostró que el enzima era estable durante, al menos, un día, por lo que fue la temperatura escogida para el resto de experimentos.

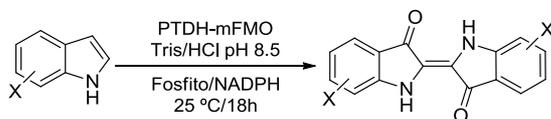
A continuación estudiamos el efecto del pH en la actividad de la PTDH-mFMO en la oxidación de la trimetilamina a 25°C, empleando una disolución Tris/HCl. Como se puede observar en la Figura 5.7, se produce un máximo en la actividad del enzima cuando se trabaja a pHs alrededor de 8.0 ( $k_{\text{obs}}=3.9 \text{ s}^{-1}$ ) y 8.5 ( $k_{\text{obs}}=4.1 \text{ s}^{-1}$ ). A pH 6.0 la actividad es muy baja ( $k_{\text{obs}}=0.7 \text{ s}^{-1}$ ), mientras que si trabajamos a pH mayores de 9.0, se observa un decrecimiento muy pronunciado de la actividad enzimática, alcanzándose una  $k_{\text{obs}}=0.2 \text{ s}^{-1}$  para pH 10.0.



**Figura 5.7.** Efecto del pH en la oxidación de la trimetilamina catalizada por la PTDH-mFMO.

#### 5.4. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE DERIVADOS DE INDOL CATALIZADA POR LA PTDH-mFMO

En estudios precedentes ha sido comentada la capacidad de la mFMO de generar índigo a partir de indol.<sup>341,342</sup> Este hecho fue también visible en el crecimiento de las células de *E. coli* que expresan la PTDH-mFMO, ya que el cultivo se volvía de un color azul oscuro. Para corroborar si es posible utilizar este enzima para la síntesis de otros derivados de índigo, se incubó la PTDH-mFMO con una serie de indoles sustituidos a 25°C y en una disolución tampón 50 mM Tris/HCl pH 8.5. Este ensayo colorimétrico demostró que todos los sustratos fueron aceptados por el enzima, ya que hubo un cambio de color en todos los pocillos tras 18 horas de incubación, como se muestra en la Figura 5.8.





**Figura 5.8.** Oxidación del indol y sus derivados catalizada por la PTDH-mFMO.

Se analizó la actividad catalítica de la PTDH-mFMO con estos derivados de indol (Tabla 5.1). Los sustratos estudiados poseen valores de  $k_{\text{obs}}$  muy similares, desde 0.04 hasta 0.09 s<sup>-1</sup>. Estas actividades catalíticas son muy bajas por lo que estos compuestos distan mucho de ser los sustratos preferidos para este enzima. Como se muestra en la Tabla 5.1, el indol fue el sustrato biotransformado con mayor eficacia, observándose valores cercanos en la oxidación del 2-metilindol y del 6-cloroindol.

**Tabla 5.1.** Constantes catalíticas para la oxidación del indol y sus derivados catalizada por la PTDH-mFMO.

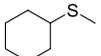
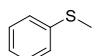
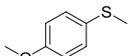
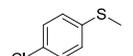
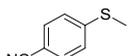
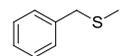
Entrada	Sustrato	$K_{\text{obs}}(\text{s}^{-1})^{\text{a}}$
1	Indol	0.09
2	4-Cloroindol	0.06
3	5-Cloroindol	0.07
4	6-Cloroindol	0.08
5	7-Cloroindol	0.06
6	5-Bromoindol	0.07
7	5-Nitroindol	0.04
8	5-Hidroindol	0.04
9	5-Metilindol	0.04
10	5-Metoxindol	0.04
11	2-Metilindol	0.08

<sup>a</sup> Para todos los compuestos, las desviaciones estándar fueron menores del ±5%.

### 5.5. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE SULFUROS CATALIZADA POR LA PTDH-mFMO

En la literatura se ha descrito que la mFMO es capaz de oxidar heteroátomos, por lo que nos planteamos la sulfoxidación de una serie de sulfuros proquirales de diversa naturaleza catalizada por la PTDH-mFMO. Para comprobar si este enzima mostraba actividad frente a este tipo de sustratos y con objeto de comparar esta actividad con la mostrada para la trimetilamina, analizamos los parámetros cinéticos de la PTDH-mFMO en la sulfoxidación de algunos sulfuros. Como se muestra en la Tabla 5.2, la PTDH-mFMO presenta una elevada eficiencia catalítica hacia la trimetilamina (entrada 1). Todos los sulfuros estudiados poseen valores de  $K_M$  bastante buenos (100-600  $\mu\text{M}$ ). Sin embargo, sus valores de  $k_{\text{cat}}$  son bajos (0.2-0.5  $\text{s}^{-1}$ ), obteniéndose el valor más alto en la oxidación del *n*-butil etil sulfuro (**55a**). Estas bajas actividades hacen que la eficiencia catalítica no supere el valor de  $6.6 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , una cifra del orden de 100 veces menor que la obtenida en la oxidación de la trimetilamina.

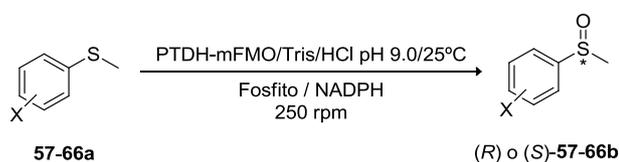
**Tabla 5.2.** Parámetros cinéticos para la sulfoxidación de sulfuros proquirales catalizada por la PTDH-mFMO.

Entrada	Sustrato	Estructura	$K_M(\mu\text{M})$	$k_{\text{cat}}(\text{s}^{-1})$	$k_{\text{cat}}/K_M(\text{mM}^{-1} \text{ s}^{-1})$
1			8±1	4.7±0.10	590
2	<b>49a</b>		350±13	0.19±0.01	0.54
3	<b>55a</b>		94±3	0.62±0.02	6.6
4	<b>57a</b>		170±8	0.45±0.01	2.6
5	<b>59a</b>		220±15	0.23±0.01	1.0
6	<b>61a</b>		87±6	0.25±0.02	2.9
7	<b>65a</b>		590±10	0.29±0.01	0.49
9	<b>69a</b>		470±12	0.34±0.01	0.72

### 5.5.1. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE DERIVADOS DE TIOANISOL

Debido a que la PTDH-mFMO mostró actividad con todos los sulfuros probados, nos propusimos inicialmente estudiar la oxidación asimétrica de una serie de derivados de tioanisol. Las reacciones fueron llevadas a cabo en disolución tampón 50 mM Tris/HCl pH 9.0 y a 25°C. Como se observa en la Tabla 5.3, en la mayoría de las oxidaciones se obtiene el sulfóxido con configuración *S*. La sulfoxidación del tioanisol (**57a**) fue la más rápida (entrada 1), obteniéndose un 95% de (*S*)-metil fenil sulfóxido [(*S*)-**57b**] en 8 horas. El exceso enantiomérico obtenido fue moderado ( $ee=35\%$ ). Al introducir sustituyentes en el anillo aromático se produjo un descenso en la actividad enzimática, obteniendo en todos los casos (entradas 2-10) una menor conversión en casi el doble del tiempo (15 horas). Desafortunadamente no hemos podido establecer una correlación entre la naturaleza del sustituyente aromático y la actividad enzimática. Sin embargo, se puede observar que aquellos derivados con un grupo dador débil en posición *para*- o un átomo de cloro en cualquier posición del anillo (compuestos **59-63a**, respectivamente), experimentan las mayores conversiones ( $c=66-81\%$ , entradas 3-7). Las enantioselectividades más altas ( $\geq 90\%$ ) fueron encontradas en la oxidación de metil *p*-tolil sulfuro (**60a**) y el *p*-clorofenil metil sulfuro (**61a**) a sus (*S*)-sulfóxidos (entradas 4 y 5). La PTDH-mFMO fue también capaz de catalizar la sulfoxidación de los derivados *p*-hidroxi (**58a**), *p*-metoxi (**59a**) y *o*-cloro (**63a**) con buenas enantioselectividades ( $ee=81\%$ , 70% y 75%, respectivamente). Sin embargo, la oxidación de *m*-clorofenil metil sulfuro (**62a**) y de aquellos derivados con grupos electrón-atractores en posición *para* (**64-66a**), se produjo con baja o moderada selectividad, como se muestra en las entradas 6 y 8-10.

**Tabla 5.3.** Sulfoxidación de derivados de tioanisol **57-66a** catalizada por la PTDH-mFMO.



## Capítulo 5

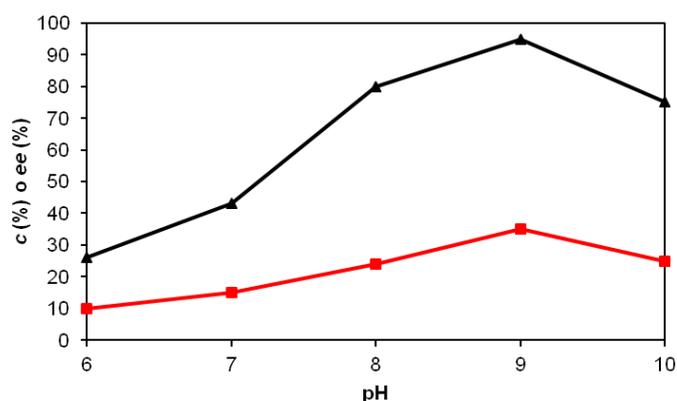
Entrada	Sustrato	X	t(h)	ee(%) <sup>a</sup>	c(%) <sup>b</sup>
1	<b>57a</b>	H	8	35( <i>S</i> )	95
2	<b>58a</b>	<i>p</i> -OH	15	81( <i>S</i> )	37
3	<b>59a</b>	<i>p</i> -OMe	15	70( <i>S</i> )	78
4	<b>60a</b>	<i>p</i> -Me	15	92( <i>S</i> )	66
5	<b>61a</b>	<i>p</i> -Cl	15	95( <i>S</i> )	80
6	<b>62a</b>	<i>m</i> -Cl	15	15( <i>R</i> )	69
7	<b>63a</b>	<i>o</i> -Cl	15	75( <i>R</i> )	81
8	<b>64a</b>	<i>p</i> -COMe	15	21( <i>R</i> )	8
9	<b>65a</b>	<i>p</i> -CN	15	22( <i>R</i> )	50
10	<b>66a</b>	<i>p</i> -NO <sub>2</sub>	15	37( <i>S</i> )	47

<sup>a</sup> Determinado por HPLC.

<sup>b</sup> Determinada por CG.

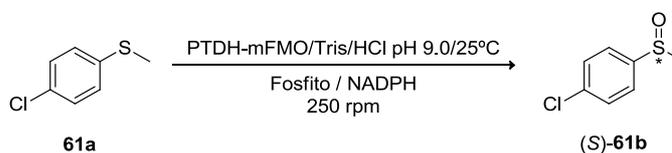
### 5.5.2. ESTUDIO DE ALGUNOS FACTORES QUE AFECTAN A LA CATÁLISIS CON LA PTDH-mFMO

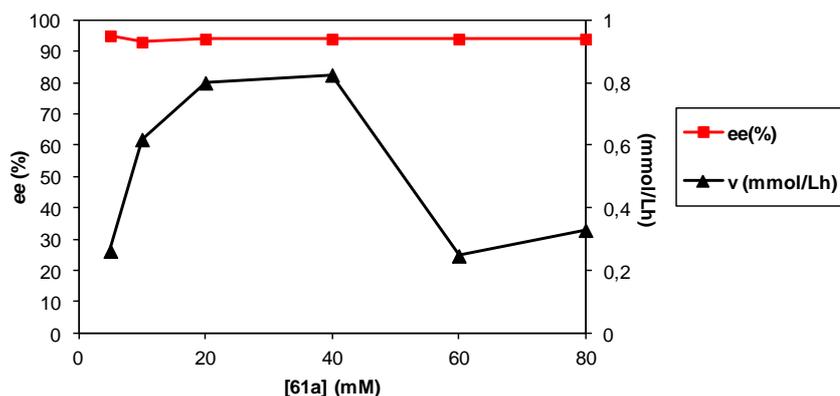
Para profundizar en el conocimiento sobre este nuevo biocatalizador, hemos decidido analizar el efecto del pH sobre la actividad y selectividad de la PTDH-mFMO en la oxidación del tioanisol. Como se muestra en la Figura 5.9 se produce un incremento en la conversión de la sulfoxidación a medida que aumenta el pH. El valor óptimo para este parámetro es pH 9.0, donde se alcanza una conversión de 95%. Al aumentar el pH hasta 10.0, se observa un decrecimiento de la actividad ( $c=75\%$ ). En lo referente a la enantioselectividad, el comportamiento del biocatalizador frente al pH es muy similar. A pHs bajos como 6.0, el exceso enantiomérico del sulfóxido (*S*)-**57b** es muy bajo ( $ee=10\%$ ), sin embargo a medida que aumentamos el pH este valor va aumentando, alcanzándose un 35% a pH 9.0. Al igual que ocurre en la conversión, al incrementar el pH hasta 10.0, se produce un ligero descenso en la pureza óptica ( $ee=30\%$ ). Por tanto, podemos establecer que pH 9.0 es un valor óptimo en cuanto a actividad y selectividad, para llevar a cabo la sulfoxidación de los sulfuros estudiados.



**Figura 5.9.** Efecto del pH en la oxidación del tioanisol (**57a**) catalizada por la PTDH-mFMO. Se representa la conversión ( $\blacktriangle$ ) y el exceso enantiomérico de (*S*)-**57b** ( $\blacksquare$ ).

Debido a los buenos resultados obtenidos con el sustrato *p*-clorofenil metil sulfuro ( $c=80\%$  y  $ee=95\%$ ) y con el objeto de demostrar que este enzima bifuncional puede ser usado como un biocatalizador efectivo, nos propusimos llevar a cabo un escalado de la reacción. Para ello optimizamos previamente la concentración de sustrato en la oxidación. Como muestra la Figura 5.10, el exceso enantiomérico del sulfóxido (*S*)-**61b** no se ve afectado por la concentración de **61a**. A concentraciones entre 20 mM y 40 mM se observa un máximo en la velocidad de reacción (expresada como mmol de **61a** consumidos por litro de disolución por hora), incrementándose ésta, desde valores de  $0.26 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  con 5 mM hasta valores de  $0.82 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  con 40 mM de **61a**. A concentraciones mayores, esta velocidad de reacción disminuye hasta valores cercanos a  $0.30 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .





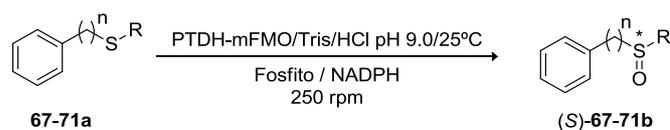
**Figura 5.10.** Efecto de la concentración de sustrato en la oxidación de *p*-clorofenil metil sulfuro (**61a**) catalizada por la PTDH-mFMO.

Una vez optimizada la concentración de sustrato, se llevó a cabo la oxidación de 100 mg de *p*-clorofenil metil sulfuro catalizada por la PTDH-mFMO. Después de 24 horas, se obtuvo (*S*)-**61b** con un 80% de conversión y un 95% de exceso enantiomérico, pudiéndose aislar finalmente este compuesto con un 77% de rendimiento.

### 5.5.3. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA DE OTROS SULFUROS

Nuestro siguiente objetivo fue la sulfoxidación de otros sulfuros aromáticos. Como muestra la Tabla 5.4, la oxidación del fenil etil sulfuro (**67a**) y del fenil propil sulfuro (**68a**) es un proceso bastante selectivo, ya que se obtienen los correspondientes (*S*)-sulfoxidos **67b** y **68b** con una buena pureza óptica ( $ee \geq 70\%$ , entradas 1-2). Sin embargo, las conversiones alcanzadas son menores, incluso a tiempos de reacción más largos, que las obtenidas para el tioanisol. Un comportamiento opuesto se observa en la sulfoxidación del bencil metil sulfuro (**69a**) y bencil etil sulfuro (**70a**). La PTDH-mFMO mostró una alta actividad frente a estos compuestos, generando un 91% de (*S*)-**69b** y un 75% de (*S*)-**70b** tras 8 horas, aunque la selectividad de ambas oxidaciones fue muy baja ( $ee=17\%$  y  $ee=15\%$ , entradas 3 y 4). Cuando el átomo de azufre se encuentra un carbono más alejado del anillo aromático, como es el caso del fenilpropil metil sulfuro (**71a**), se observó una buena actividad enzimática y un moderado exceso enantiomérico (entrada 5).

También se analizó la sulfoxidación de sustratos aromáticos más voluminosos como el metil naftil sulfuro (**72a**) y el bencil fenil sulfuro (**73a**), pero no se observó reacción en ninguno de los casos.

**Tabla 5.4.** Sulfoxidación de sulfuros aromáticos catalizada por la PTDH-mFMO.

Entrada	Sustrato	n	R	t(h)	ee(%) <sup>a</sup>	c(%) <sup>b</sup>
1	<b>67a</b>	0	Et	15	79( <i>S</i> )	15
2	<b>68a</b>	0	<i>n</i> -Pr	24	71( <i>S</i> )	12
3	<b>69a</b>	1	Me	8	17( <i>S</i> )	91
4	<b>70a</b>	1	Et	8	15( <i>S</i> )	75
5	<b>71a</b>	2	Me	15	36( <i>S</i> )	80

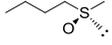
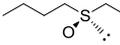
<sup>a</sup> Determinado por HPLC.<sup>b</sup> Determinada por CG

Nos planteamos analizar también la capacidad de la PTDH-mFMO de catalizar la oxidación de otros sulfuros, como por ejemplo, sustratos heteroaromáticos, alifáticos cíclicos y lineales. Como refleja la Tabla 5.5, la oxidación de sustratos heterocíclicos como la 2-(metiltio)piridina (**35a**), el furfurilmetil metil sulfuro (**45a**) y el 2-(metiltio)tiofeno (**46a**) se produjo con alta conversión ( $c \geq 70\%$ , entradas 1-3). Los sulfóxidos (*S*)-**35b** y (*S*)-**46b** se obtuvieron con un exceso enantiomérico moderado (próximo al 50%, entradas 1 y 3), mientras que la formación del furfurilmetil metil sulfóxido [(*R*)-**45b**] tuvo lugar con una baja selectividad ( $ee=20\%$ , entrada 2).

A continuación se estudiaron dos sulfuros alifáticos cíclicos, el ciclohexil metil sulfuro (**49a**) y el tetrahidro-2*H*-tiopirano (**53a**). El enzima mostró una baja actividad y selectividad para el primero, obteniéndose un 14% del (*S*)-sulfóxido con un exceso enantiomérico del 20% (entrada 4), mientras que para el segundo, no se observó reacción alguna (entrada 5).

También fueron analizados sulfuros alifáticos lineales. La PTDH-mFMO fue capaz de oxidar el *n*-butil metil sulfuro (**54a**) y el *n*-butil etil sulfuro (**55a**) con buenas conversiones. Los correspondientes sulfóxidos (*R*)-**54b** y (*R*)-**55b** se obtuvieron con alta pureza óptica ( $ee=85\%$  y  $77\%$ , entradas 6 y 7). Al aumentar la longitud de una de las cadenas alquílicas, se produce un efecto negativo en la actividad enzimática, no observando reacción en la oxidación del metil octil sulfuro (**56a**).

**Tabla 5.5.** Síntesis de sulfóxidos quirales catalizada por la PTDH-mFMO.

Entrada	Sulfóxido	Estructura	ee(%) <sup>a</sup>	c(%) <sup>b</sup>
1	<b>35b</b>		49( <i>S</i> )	83
2	<b>45b</b>		20( <i>R</i> )	72
3	<b>46b</b>		50( <i>S</i> )	76
4	<b>49b</b>		20( <i>S</i> )	14
5	<b>53b</b>		-	≤3
6	<b>54b</b>		85( <i>R</i> )	52
7	<b>55b</b>		77( <i>R</i> )	71
8	<b>56b</b>		-	≤3

<sup>a</sup> Determinado por HPLC.

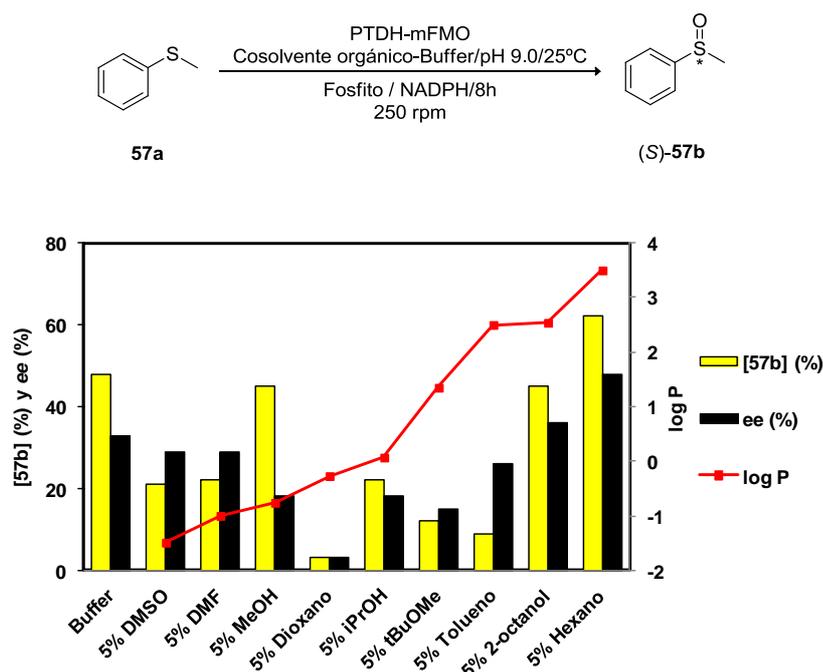
<sup>b</sup> Determinada por CG

#### 5.5.4. OXIDACIÓN ENZIMÁTICA CATALIZADA POR LA PTDH-mFMO EN DISOLVENTES ORGÁNICOS

Como se ha comentado a lo largo de esta Memoria, existen numerosos ejemplos donde se analiza la influencia de los cosolventes orgánicos sobre la actividad y selectividad de BVMOs, incluyendo los estudiados en los capítulos precedentes.<sup>129,130</sup> Por ello nos hemos planteado también analizar el efecto de una serie de cosolventes orgánicos en la oxidación de tioanisol catalizada por la PTDH-mFMO.

Como se muestra en la Figura 5.11, la presencia de casi todos los cosolventes utilizados en una concentración del 5% (v/v) dio lugar a menores conversiones y/o excesos enantioméricos que el uso exclusivo de disolución tampón. Hay que destacar que este estudio se llevó a cabo en ausencia de 1% (v/v) DMSO (cosolvente que favorece la disolución de los sustratos), por ello el porcentaje obtenido de (*S*)-**57b** en disolución tampón es menor que el que figura en la entrada 1 de la Tabla 5.3. En el caso de trabajar con un 5% de 2-octanol, se mantuvieron valores de actividad y selectividad muy similares a los obtenidos en ausencia de cosolventes. Con un 5% de metanol, el biocatalizador no afectó a la actividad de la sulfoxidación, pero sí que se observó un descenso considerable en la selectividad del proceso. Tan solo la adición de un 5% hexano incrementó la

actividad y selectividad enzimática, obteniéndose un 62% de (*S*)-**57b** con un 48% de exceso enantiomérico.



**Figura 5.11.** Efecto del medio de reacción en la biooxidación del tioanisol (**57a**) catalizada por la PTDH-mFMO.

En la entrada 3 de la Tabla 5.6 se muestra que además del 62% de (*S*)-**57b** obtenido en la oxidación del tioanisol con un 5% de hexano, se forma una cantidad apreciable de sulfona **57c** (28%). Este producto de sobreoxidación del sulfuro se observaba en muy bajas proporciones cuando la reacción se lleva a cabo en disolución tampón tanto en presencia como en ausencia de un 1% (v/v) de DMSO (cosolvente utilizado para favorecer la solubilidad de los sustratos), como se indica en las entradas 1 y 2. Para entender mejor estos resultados, realizamos nuevas oxidaciones. Así, la sulfoxidación de **57a** en presencia de un 1% de DMSO y un 5% de hexano genera un 24% de (*S*)-**57b** con un 34% de exceso enantiomérico tras 8 horas (entrada 4). Debido a que no se forma nada de sulfona y teniendo en cuenta los resultados recogidos en las entradas 1, 2 y 3, parece que el hexano posee un efecto activante en la oxidación del sulfoxido, efecto que es suprimido por el DMSO. Por ello, no se obtuvieron cantidades apreciables de sulfona para el resto de sulfuros analizados. Este hecho se corrobora con experimentos sobre el fenil metil sulfoxido ( $\pm$ )-(**57b**) (entradas 6-8). Se puede observar que la presencia de un 1% de DMSO provoca que la cantidad de sulfona no

## Capítulo 5

supere el 10% (entradas 6 y 8), mientras que si la oxidación se lleva a cabo en presencia de un 5% de hexano, se obtiene un 61% de sulfona, aislándose el sulfóxido (*S*)-**57b** remanente con un 72% de exceso enantiomérico (entrada 7). Por lo tanto, se puede decir que el incremento en el exceso enantiomérico observado cuando trabajamos con un 5% de hexano, se debe a la desimetrización del sulfuro proquiral **57a** combinado con la resolución cinética de su sulfóxido ( $\pm$ )-**57b**. Además, se puede postular que el DMSO actúa como un inhibidor competitivo frente al resto de sulfóxidos, debido quizás a su tamaño similar al de la trimetilamina, lo que hace que sea buen sustrato para el enzima.

El hexano posee una estructura parecida a la 1-octilamina, compuesto descrito como activante en las FMOs de origen humano.<sup>349</sup> Por ello nos planteamos su adición en la oxidación del sulfuro **57a** en una concentración 3.0 mM (entrada 5), que es la empleada para este tipo de enzimas. Se observó una mejoría en la conversión con respecto a la oxidación en condiciones normales (del 48% a 76%), pero la enantioselectividad apenas se vio afectada.

**Tabla 5.6.** Efecto del hexano en la sulfoxidación del tioanisol (**57a**) y su sulfóxido ( $\pm$ )-**57b** catalizada por la PTDH-mFMO.

Entrada	Sustrato	Cosolvente	<i>ee</i> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>
1	<b>57a</b>	Ninguno	33( <i>S</i> )	48(2)
2	<b>57a</b>	1% DMSO	35( <i>S</i> )	95(5)
3	<b>57a</b>	5% Hexano	48( <i>S</i> )	90(28)
4	<b>57a</b>	5% Hexano/1% DMSO	34( <i>S</i> )	24
5	<b>57a</b>	3.0 mM OctNH <sub>2</sub>	27( <i>S</i> )	76(7)
6	( $\pm$ )- <b>57b</b>	1% DMSO	5( <i>S</i> )	(8)
7	( $\pm$ )- <b>57b</b>	5% Hexano	72( <i>S</i> )	(61)
8	( $\pm$ )- <b>57b</b>	5% Hexano/1% DMSO	5( <i>S</i> )	(9)

<sup>a</sup> Determinado por HPLC.

<sup>b</sup> Determinada por CG. Cantidad de sulfona entre paréntesis.

<sup>349</sup> Ver por ejemplo: (a) Kashiwayama, E.; Yokoi, T.; Itoh, K.; Itoh, S.; Odomi, M.; Kamataki, T. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *47*, 1356-1363; (b) Tsutsumi, H.; Katagi, M.; Nishiwaka, M.; Tsuchihashi, H.; Kashuya, K.; Igarashi, K. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 1572-1575.

*El biocatalizador fusionado PTDH-mFMO posee una baja termoestabilidad, con un tiempo de vida media a 35°C de 5 horas, siendo estable a 25°C durante al menos 1 día. La mayor actividad enzimática se obtiene a pHs entre 8.0 y 9.0.*

*La PTDH-mFMO es capaz de oxidar indol y análogos a los correspondientes derivados de índigo, pigmentos de elevado interés.*

*Se ha demostrado que este biocatalizador es capaz de catalizar la sulfoxidación de una gran variedad de sulfuros proquirales con diversos resultados en función de la estructura del sustrato. En la sulfoxidación del tioanisol y derivados sustituidos en el anillo aromático, las mejores enantioselectividades se obtienen con el p-tolil metil sulfuro y el p-clorofenil metil sulfuro. Con este sustrato, la mayor velocidad de reacción se observa a una concentración 40 mM de sustrato, lo cual permite escalar el proceso para obtener el (S)-sulfóxido con 77% de rendimiento. Se ha observado que pH 9.0 es óptimo para la sulfoxidación de tioanisol.*

*En las sulfoxidaciones de alquil fenil sulfuros se obtienen altas selectividades y bajas conversiones, al contrario que en la oxidación de alquil bencil sulfuros, que ocurre con una alta actividad y poca selectividad. La oxidación de sustratos heterocíclicos se produce con alta conversión y selectividad de baja a moderada, dependiendo la estructura del sustrato. El biocatalizador muestra baja actividad y selectividad con sustratos alifáticos cíclicos, mientras que con sulfuros lineales se generan los correspondientes sulfóxidos con alta conversión y selectividad.*

*Respecto al efecto de cosolventes en la sulfoxidación de tioanisol catalizada por la PTDH-mFMO, los resultados revelan que la adición de un 5% de hexano activa en cierto modo al enzima, aumentando la pureza óptica del sulfóxido al incrementar la velocidad de sobreoxidación del sulfóxido formado a la correspondiente sulfona. El resto de cosolventes estudiados (excepto el 2-octanol) no mejoraron los resultados obtenidos en disolución tampón.*



Las técnicas instrumentales empleadas para la síntesis y caracterización de los compuestos mencionados en este capítulo, ya se han descrito en la Parte Experimental del Capítulo 1. Únicamente se incluirán en esta sección los apartados referentes a reactivos utilizados, así como los procedimientos sintéticos, experimentales y analíticos que se han desarrollado a lo largo del presente capítulo, incluyendo la caracterización de todos los compuestos relacionados con éste. Los sulfuros empleados pueden consultarse en la Figura 5.12.

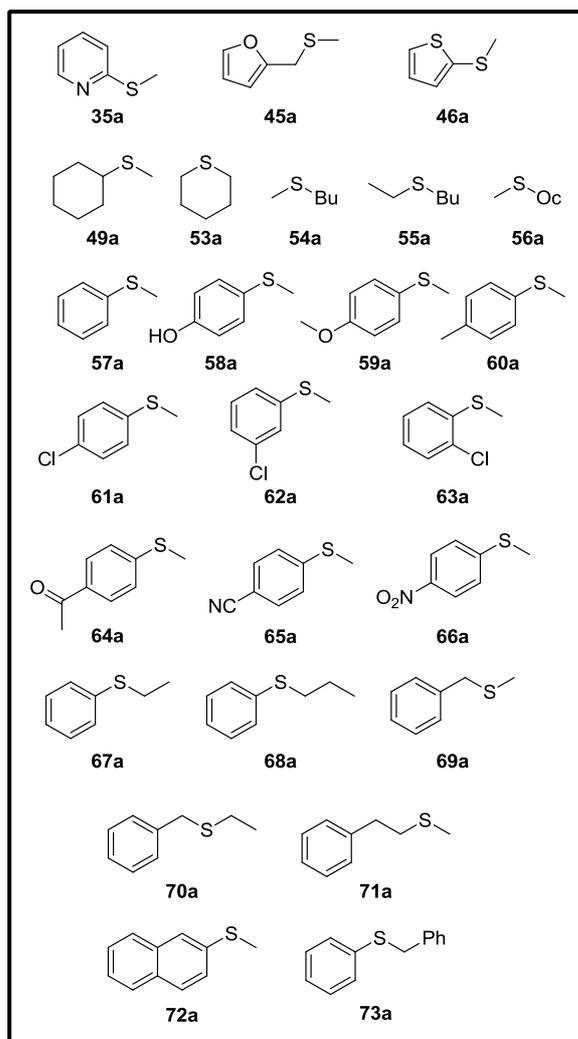


Figura 5.12. Sulfuros utilizados en el presente capítulo.

## 5.6. REACTIVOS GENERALES

Las reacciones de oxidación se han llevado a cabo con el enzima PTDH-mFMO aislado en disolución. Se ha definido una unidad enzimática de PTDH-mFMO como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1.0  $\mu\text{mol}$  de tioanisol a fenil metil sulfóxido por minuto, a pH 9.0 y 25°C, en presencia de NADPH.

Los sulfuros **57a**, **62a**, **63-64a** y la trimetilamina son productos de Sigma-Aldrich-Fluka. Los sustratos **58-61a**, **65-67a**, **72a** y **73a** fueron adquiridos a Alfa Aesar, mientras que **69a** fue suministrado por Acros Organics. Los compuestos **45-46a**, **49a** y **53-56a** son productos comerciales descritos en el Apartado 4.10. Todos los indoles son comercializados por Sigma-Aldrich-Fluka excepto el 4-cloroindol que fue adquirido de Acros Organics. El resto de reactivos y disolventes fueron suministrados por Sigma-Aldrich-Fluka y presentan el mayor grado de pureza posible.

## 5.7. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS

### Síntesis química de los sulfuros **68a** y **70a**.<sup>95</sup>

A una disolución del correspondiente tiol (250 mg, 2.01-2.27 mmol) en MeOH seco (6 mL) y a 0°C, se le añade sodio (1.1 eq.) bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Se deja agitar durante una hora. Posteriormente, se le añade el correspondiente ioduro de alquilo (1.1 eq.) y se deja agitando. Una vez observada la desaparición del producto de partida mediante TLC, se evapora el MeOH y se añade al crudo 6 mL de agua. A continuación se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x10 mL). La fase orgánica es lavada con H<sub>2</sub>O (10 mL). Finalmente se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Los crudos obtenidos no requirieron de una mayor purificación. Se aislaron 259.1 mg de **68a** (75%) y 168.5 mg de **70a** (55%).

### Síntesis química del feniletil metil sulfuro (**71a**).<sup>95</sup>

A una disolución del correspondiente tiol (250 mg, 1.81 mmol) en MeOH seco (6 mL) y a 0°C, se le añade sodio (41.6 mg, 1.1 eq.) y ioduro de metilo (134.9 µL, 1.1 eq.) bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. La reacción se deja agitando y se sigue por TLC (90% hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Después de 12 horas de reacción, se evapora el MeOH y se añade al crudo 6 mL de agua. A continuación se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x10 mL). La fase orgánica es lavada con H<sub>2</sub>O (10 mL). Finalmente se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía de columna usando como eluyente 90% hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se aislaron 110.0 mg de **71a** (40%).

### Síntesis química del acetato de 4-(metiltio)fenilo (**58c**).

El 4-(metiltio)fenol (**58a**) (1.0 g, 7.14 mmol) fue acetilado, bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, con anhídrido acético (1.35 mL, 2.0 eq.) y una cantidad catalítica de 4-DMAP en 12 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco. La reacción se agita a temperatura ambiente y se sigue por TLC (80% hexano/AcOEt). Una vez concluida se lava con una disolución de HCl 1.5 N (4x10 mL).

## Capítulo 5

La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtra y se evaporan los disolventes a presión reducida. No es necesaria una posterior etapa de purificación. Se aislaron 1.17 g de **58c** (90%).

### Síntesis química de los sulfóxidos (±)-**57-71b**.

Se disuelve el correspondiente sulfuro de partida (100 mg, 0.59-0.81 mmol) en una mezcla de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2 mL) y MeOH (3 mL). La reacción se deja agitando y se sigue por TLC. Una vez se observa la desaparición del sustrato, se añade una pequeña cantidad de Pd/C y se deja reaccionar durante 4 horas. Al cabo de ese tiempo, se elimina el paladio filtrando sobre celita y se lava con MeOH. Se evapora el disolvente a presión reducida. Se adiciona H<sub>2</sub>O, se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4x10 mL) y se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La fase orgánica se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. Los rendimientos obtenidos fueron mayores del 56% (Tabla 5.7).

**Tabla 5.7.** Rendimientos y cantidad obtenida en la síntesis de sulfóxidos (±)-**57b-71b**.

Sulfóxidos	Cantidad(mg)	Rdto(%)
(±)- <b>57b</b>	85.8	76
(±)- <b>58b</b>	62.4	56
(±)- <b>59b</b>	66.2	60
(±)- <b>60b</b>	92.6	83
(±)- <b>61b</b>	82.5	75
(±)- <b>62b</b>	107.8	98
(±)- <b>63b</b>	66.0	60
(±)- <b>64b</b>	86.6	79
(±)- <b>65b</b>	64.2	58
(±)- <b>66b</b>	64.5	59
(±)- <b>67b</b>	111.0	≥99
(±)- <b>68b</b>	101.7	92
(±)- <b>69b</b>	91.5	82
(±)- <b>70b</b>	88.4	80
(±)- <b>71b</b>	90.6	82

El rendimiento y la cantidad obtenida del resto de sulfóxidos (±)-**35b**, (±)-**45-46b**, (±)-**49b**, **53b**, (±)-**54-56b** aparecen en el apartado de procedimientos sintéticos del Capítulo 4.

### Oxidación asimétrica de la **1-(4-(metiltio)fenil)etanona (64a)** empleando el método de Kagan.<sup>304</sup>

A una mezcla de tetraisopropóxido de titanio Ti(O-*i*-Pr)<sub>4</sub> (2.97 mL, 2.0 eq.) y (*R,R*)-DET (+)-L-tartrato de dietilo (1.71 mL, 2.0 eq.) en 50 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco, se le añade gota a gota agua destilada (90 µL, 1.0 eq.) bajo atmósfera de N<sub>2</sub> y a 0°C. Se agita hasta que se forma una disolución amarilla

homogénea y entonces se añade el compuesto **64a** (5 mmol). La mezcla resultante se enfría hasta -20 °C y en ese momento se añade una disolución 5.5 M de *tert*-butil hidroperóxido en decano (1 mL, 1.1 eq.). Después de cuatro horas de agitación, se añade gota a gota agua destilada (900 µL, 10.0 eq.). Se deja agitando una hora y posteriormente otra hora más a temperatura ambiente. El gel obtenido se filtra y se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL). El filtrado se mezcla con una disolución de NaOH (5%) en una disolución saturada de cloruro de sodio (30 mL) y se mantiene durante una 1 hora. Después se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3x20 mL). La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente a presión reducida. Se obtuvo un crudo que fue purificado por cromatografía de columna usando como eluyente 95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH. Se aislaron 344.0 mg de (*R*)-**64b** (40%).

#### **Oxidación asimétrica del acetato de 4-(metiltio)fenilo (**58c**) empleando el método de Kagan.<sup>304</sup>**

Este sustrato fue oxidado siguiendo la metodología descrita previamente, añadiéndose un paso adicional de acidificación con HCl 1.0 M antes de la extracción con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Esta etapa se llevó a cabo debido a la hidrólisis del acetato de (*R*)-4-(metilsulfinil)fenilo obtenido en la disolución de NaOH. Se obtuvo un crudo que fue purificado por cromatografía de columna usando como eluyente 95% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH. Se aislaron 124.8 mg de (*R*)-4-(metilsulfinil)fenol (16%) con un exceso enantiomérico del 30%. Una alícuota de este producto fue acetilada siguiendo el mismo procedimiento que en la síntesis de **58c**, con el objeto de determinar la configuración absoluta de **58b**.

Los compuestos descritos previamente, **68a**, **70-71a** y ( $\pm$ )-**57-71b** exhiben propiedades físicas y espectrales de acuerdo con los datos publicados. El compuesto **58c** fue debidamente caracterizado.<sup>350</sup>

### **5.8. ASIGNACIÓN DE CONFIGURACIONES ABSOLUTAS**

Las configuraciones absolutas de los sulfóxidos **57b**, **59-63b** y **65-71b** se han obtenido mediante comparación de los cromatogramas obtenidos mediante HPLC con patrones ya descritos previamente en la bibliografía.<sup>95,351</sup>

<sup>350</sup> Las referencias de los compuestos ya descritos, así como la caracterización completa de los no descritos pueden consultarse en el Apartado 5.11.

<sup>351</sup> Los datos cromatográficos se encuentran recogidos en el Apartado 5.10.

Las configuraciones absolutas de los sulfóxidos **58b** y **64b** fueron establecidas por comparación de los cromatogramas obtenidos mediante HPLC con patrones obtenidos a través de la oxidación asimétrica de los correspondientes sulfuros proquirales **58c** y **64a** empleando (+)-L-tartrato de dietilo, tetraisopropóxido de titanio  $\text{Ti}(\text{O-}i\text{-Pr})_4$  y *tert*-butil hidroperóxido (TBHP).<sup>304</sup> Tanto el sulfóxido **58b** como el 4-(metilsulfinil)fenol (producto obtenido en la sulfoxidación asimétrica de **58c**) fueron acetilados con anhídrido acético y una cantidad catalítica de 4-DMAP en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  para su posterior análisis mediante HPLC.

La configuración absoluta de los compuestos **35b**, **45-46b**, **49b** y **54-55b** se encuentra especificada en el apartado de asignación de configuraciones absolutas del Capítulo 4.

### 5.9. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

#### 5.9.1. CINÉTICA ENZIMÁTICA

##### Determinación de los parámetros cinéticos.

Para la determinación de los parámetros cinéticos de la PTDH-mFMO con los derivados de indol, trimetilamina y los distintos sulfuros **49a**, **55a**, **57a**, **59a**, **61a**, **65a** y **69a**, se determinó la actividad enzimática monitorizando el consumo de NADPH a 340 nm ( $\epsilon_{\text{NAD(P)H},340} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Los estudios cinéticos se realizaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda Bio10 UV/Vis. Todas las medidas se han realizado a 25°C, excepto las medidas para el estudio de la actividad enzimática frente a la temperatura. Los experimentos con el fin de determinar las constantes catalíticas del indol y sus derivados, se llevaron a cabo por triplicado.

Las disoluciones *stock* de los sulfuros (250 mM) y de los indoles (1 M) se prepararon en 1,4-dioxano. La presencia del dioxano apenas modifica la actividad enzimática, mientras que permite incrementar la solubilidad de los sustratos. Esta vez no recurrimos al DMSO porque reacciona con la PTDH-mFMO, interfiriendo en la medición de los parámetros cinéticos. Las disoluciones *stock* 10 mM NADPH,  $\text{NADP}^+$  y fosfito de sodio, así como una 10 mM de trimetilamina, se prepararon en disolución tampón Tris/HCl (50 mM, 35 mM NaCl, pH 8.5).

En un experimento modelo (1 mL), la mezcla de reacción contiene una disolución reguladora de Tris/HCl 25 mM (pH 9.0 para los sulfuros y pH 8.5, para los indoles y la trimetilamina), NADPH (100  $\mu\text{M}$ ), 1% (v/v) dioxano (para las medidas de sulfuros e indoles) y PTDH-mFMO (0.17-1.00  $\mu\text{M}$ ).

Los datos obtenidos fueron ajustados a la ecuación de Michaelis-Menten mediante regresión no lineal empleando el programa SigmaPlot versión 10.0 para Windows. El cálculo de la constante catalítica ( $k_{cat}$ ) y la constante de Michaelis ( $K_M$ ) permite conocer la eficiencia catalítica del enzima con un determinado sustrato ( $k_{cat}/K_M$ ).

### **Estudio de la actividad enzimática frente a la temperatura.**

Para estudiar la actividad enzimática de la PTDH-mFMO frente a la temperatura, se midió este valor monitorizando el descenso de NADPH a 340 nm a diferentes temperaturas (10°C-55°C). La actividad se midió en Tris/HCl (50 mM, 35 mM NaCl, pH 8.5, 1 mL) empleando trimetilamina (100 µM) como sustrato, NADPH (100 µM) y la PTDH-mFMO (0.07 µM).

### **Estudio de la estabilidad térmica de la PTDH-mFMO.**

Para estudiar la estabilidad térmica de la PTDH-mFMO (como mFMO), se midió la actividad enzimática monitorizando el descenso de NADPH a 340 nm. La actividad se midió en Tris/HCl (50 mM, 35 mM NaCl, pH 8.5) empleando trimetilamina (100 µM) como sustrato. A continuación se incubó el enzima durante el tiempo establecido a diferentes temperaturas (60°C, 50°C, 42°C, 35°C y 25°C) y se procedió a medir la actividad de nuevo. De la misma forma se midió la estabilidad térmica de este enzima como PTDH, empleándose fosfito de sodio (5 mM) como sustrato y monitorizándose la formación de NADPH a partir de NADP<sup>+</sup>.

## **5.9.2. PROCEDIMIENTOS PARA LAS REACCIONES ENZIMÁTICAS CATALIZADAS POR LA PTDH-mFMO**

### **Protocolo para la obtención de la PTDH-mFMO aislada.**

Se inicia el precultivo inoculando *E. coli* TOP 10 PTDH-mFMO<sup>+</sup> en 5 mL de medio LB que contiene 50 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina. Se incuba a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente el precultivo se diluye en 500 mL de TB con 50 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina y 0.02 % (p/v) de l-arabinosa. Se incuba a 200 rpm y 24°C durante 36 horas hasta que haya una OD<sub>600</sub> aproximada de 7. Las células se separan por centrifugación (6000 rpm durante 15 minutos a 4°C, en una centrífuga Centrikon T-124), se lavan y se resuspenden en 30 mL de Tris/HCl (50 mM) de pH 7.5. Posteriormente se centrifugan otra vez (4000 rpm durante 45 minutos, 4°C) y se elimina el sobrenadante. Se resuspenden de nuevo en 30 mL de Tris/HCl 50 mM de pH 8.0 con 250 mM de NaCl. A la suspensión de células se le añade FAD, de modo que tengamos una concentración final de 50 µM del cofactor, y se somete a ultrasonidos en un sonicador Digital Branson 50% amplitud, 15 min, 2 seg on/off, 4°C). Los agregados proteicos y restos celulares se eliminan por

centrifugación (15.000 rpm, durante 45 min, 4°C) en una centrífuga Beckman coulter/Allegra 64R con rotor Co650, obteniendo un sobrenadante libre de células, lo que denominamos PTDH-mFMO-CFE. Todos los pasos posteriores de purificación se llevaron a cabo también a 4°C. El PTDH-mFMO-CFE se vierte dentro de una columna de afinidad con 2.5 mL de Ni-seferosa como relleno. Se deja agitando durante una 1 hora. A continuación se lava la columna con 7.5 mL de una disolución 50 mM Tris/HCl (250 mM NaCl, pH 8.0) y con disoluciones tampón Tris/HCl con cantidades crecientes de imidazol hasta elución de la proteína. El enzima obtenido se vierte sobre una columna de exclusión, donde se separa de las sales de imidazol mediante un lavado con 10 mL de disolución 50 mM Tris/HCl (250 mM NaCl, pH 8.0).

La concentración de proteína se obtiene midiendo su absorbancia a 442 nm ( $\epsilon_{\text{PTDH-mFMO},442} = 13.35 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda Bio10 UV/Vis a 25°C. Se obtuvieron 102 mg de la PTDH-mFMO pura por un litro de cultivo.

### **Oxidación de sulfuros 35a, 45-46a, 49a, 53-73a catalizada por la PTDH-mFMO.**

Los correspondientes sulfuros (5 mM) se disuelven en 0.5 mL del medio de reacción disolución tampón Tris/HCl (50 mM, pH 9.0), conteniendo 1% (v/v) DMSO y/o un 5% (v/v) de cosolvente orgánico, si así se indica. Posteriormente se añade fosfito de sodio (10 mM), NADPH (0.2 mM) y 1.0 unidad de la PTDH-mFMO. La mezcla se agita a 250 rpm en un agitador orbital a 25°C durante los tiempos establecidos. Se detiene la reacción extrayendo con AcOEt (2x0.5 mL), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se analiza por CG y/o HPLC con el fin de determinar la conversión y la selectividad de los procesos de oxidación.

### **Preparación enzimática del (S)-1-cloro-4-(metilsulfinil)benceno [(S)-61b] a escala multimiligramo catalizada por la PTDH-mFMO.**

El sulfuro **61a** (100 mg, 0.63 mmol) fue disuelto en una disolución tampón Tris/HCl (50 mM, pH 9.0, 16 mL) conteniendo 1% (v/v) DMSO. Posteriormente se añade fosfito de sodio (80 mM), NADPH (0.2 mM) y la PTDH-mFMO (64.0 U). La mezcla se agita a 25 °C y 250 rpm, en agitador orbital, durante 24 horas. La fase acuosa se extrae con AcOEt (4x15 mL). La fase orgánica se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evapora el disolvente a presión reducida. Los crudos fueron purificados por cromatografía en columna (99% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH), obteniéndose 84.8 mg de (S)-**61b** (77%) con un exceso enantiomérico del 95%.

### **Oxidación del indol y sus derivados catalizada por la PTDH-mFMO.**

Se empleó una placa con 24 pocillos. El indol y sus derivados (5 mM) se disuelven en 0.5 mL del medio de reacción disolución tampón Tris/HCl (50 mM, 35 mM NaCl, pH 8.5), conteniendo 1% (v/v) de DMSO, fosfito de sodio (10 mM), NADPH (0.2 mM) y 1.0 unidad de PTDH-mFMO. La mezcla se agita a 250 rpm en un agitador orbital a 25°C durante 18 horas. La detección de la formación de los productos finales se hizo por vía colorimétrica.

### **5.10. DETERMINACIÓN DE LAS CONVERSIONES Y EXCESOS ENANTIOMÉRICOS**

La determinación de los valores de conversión se ha llevado a cabo mediante cromatografía de gases (Tabla 5.8). Para ello se ha empleado un cromatógrafo Hewlett Packard 6890 Series II equipado con la columna Hewlett-Packard HP1 (metil siloxano entrecruzado, 30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m, 1 bar, N<sub>2</sub>).

**Tabla 5.8.** Determinación de conversiones mediante CG.

Compuesto	Programa <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> (min)
<b>57a</b>	70/0/10/190/0	3.2
(±)- <b>57b</b>	70/0/10/190/0	5.9
<b>57c</b>	70/0/10/190/0	6.5
<b>58a</b>	100/5/3/200/0	8.6
(±)- <b>58b</b>	100/5/3/200/0	19.6
<b>59a</b>	70/0/10/190/0	6.1
(±)- <b>59b</b>	70/0/10/190/0	9.3
<b>60a</b>	70/0/10/190/0	4.5
(±)- <b>60b</b>	70/0/10/190/0	7.4
<b>61a</b>	70/0/10/190/0	5.5
(±)- <b>61b</b>	70/0/10/190/0	8.2
<b>62a</b>	70/0/10/190/0	5.5
(±)- <b>62b</b>	70/0/10/190/0	7.4
<b>63a</b>	70/0/10/190/0	5.5
(±)- <b>63b</b>	70/0/10/190/0	7.4
<b>64a</b>	100/5/3/130/0	12.6
(±)- <b>64b</b>	100/5/3/130/5	19.4
<b>65a</b>	70/5/3/130/0	7.4
(±)- <b>65b</b>	70/0/10/190/0	9.4
<b>66a</b>	70/0/10/190/0	8.9
(±)- <b>66b</b>	70/0/10/190/0	10.6
<b>67a</b>	70/0/10/190/0	3.8
(±)- <b>67b</b>	70/0/10/190/0	7.1
<b>68a</b>	70/0/10/190/0	4.7
(±)- <b>68b</b>	70/0/10/190/0	8.2
<b>69a</b>	70/0/10/190/0	4.1
(±)- <b>69b</b>	70/0/10/190/0	7.6
<b>70a</b>	70/0/10/190/0	4.4
(±)- <b>70b</b>	70/0/10/190/0	7.7
<b>71a</b>	70/5/3/150/0	12.7
(±)- <b>71b</b>	70/5/3/150/0	24.5

<sup>a</sup> Programa: T<sub>inicial</sub> (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/ min)/ T<sub>final</sub> (°C)/ tiempo (min)

t<sub>R</sub>: tiempo de retención.

La determinación de los valores de los excesos enantioméricos se ha llevado a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (Tabla 5.9) empleando un cromatógrafo Hewlett Packard 1100 LC equipado con una columna **A**: OB-H (Daicel, 0.46 cm x 25 cm), **B**: Chiralcel OD (Daicel, 0.46 cm x 25 cm), **C**: Chiralpak IA (Daicel, 0.46 cm x 25 cm), **D**: Chiralcel OD-H (Daicel, 0.46 x 25 cm), **E**: Chiralcel OJ-H (Daicel, 0.45 cm x 25 cm).

**Tabla 5.9.** Determinación de excesos enantioméricos mediante HPLC.

Compuesto	Columna	Condiciones <sup>a</sup>	t <sub>R</sub> (min)	R <sub>s</sub> <sup>182</sup>
(±)- <b>57b</b>	<b>B</b>	H/IPA 90:10, 0.8, 25°C	13.6 ( <i>R</i> ); 16.8 ( <i>S</i> )	8.2
(±)- <b>58b</b> <sup>b</sup>	<b>C</b>	H/EtOH 95:5, 0.7, 20°C <sup>c</sup>	38.7 ( <i>R</i> ); 39.9 ( <i>S</i> )	3.3
(±)- <b>59b</b>	<b>D</b>	H/IPA 90:10, 1.0, 25°C	15.2 ( <i>R</i> ); 17.1 ( <i>S</i> )	3.3
(±)- <b>60b</b>	<b>A</b>	H/IPA 90:10, 0.5, 20°C	20.6 ( <i>R</i> ); 22.9 ( <i>S</i> )	2.2
(±)- <b>61b</b>	<b>A</b>	H/IPA 80:20, 0.8, 30°C	18.5 ( <i>S</i> ); 28.3 ( <i>R</i> )	16.8
(±)- <b>62b</b>	<b>A</b>	H/IPA 80:20, 0.5, 20°C	10.8 ( <i>R</i> ); 14.6 ( <i>S</i> )	10.6
(±)- <b>63b</b>	<b>A</b>	H/IPA 80:20, 0.7, 30°C	17.2 ( <i>S</i> ); 29.6 ( <i>R</i> )	8.6
(±)- <b>64b</b>	<b>E</b>	H/IPA 80:20, 1.0, 30°C	21.9 ( <i>S</i> ); 23.5 ( <i>R</i> )	8.4
(±)- <b>65b</b>	<b>C</b>	H/IPA 80:20, 1.0, 25°C	20.7 ( <i>R</i> ); 23.0 ( <i>S</i> )	4.1
(±)- <b>66b</b>	<b>A</b>	H/IPA 90:10, 0.5, 20°C	39.1 ( <i>S</i> ); 50.0 ( <i>R</i> )	4.3
(±)- <b>67b</b>	<b>B</b>	H/IPA 80:20, 0.5, 20°C	18.1 ( <i>R</i> ); 22.2 ( <i>S</i> )	2.8
(±)- <b>68b</b>	<b>A</b>	H/IPA 80:20, 1.0, 25°C	13.5 ( <i>S</i> ); 16.7 ( <i>R</i> )	11.3
(±)- <b>69b</b>	<b>B</b>	H/IPA 90:10, 0.8, 25°C	18.3 ( <i>R</i> ); 19.8 ( <i>S</i> )	2.4
(±)- <b>70b</b>	<b>B</b>	H/IPA 90:10, 1.0, 25°C	17.7 ( <i>R</i> ); 19.1 ( <i>S</i> )	3.1
(±)- <b>71b</b>	<b>A</b>	H/IPA 80:20, 0.5, 25°C	40.2 ( <i>S</i> ); 42.7 ( <i>R</i> )	1.6

<sup>a</sup> Condiciones: H/IPA= Hexano/2-propanol o H/EtOH= Hexano/Etanol, proporción de eluyente, flujo (mL min<sup>-1</sup>), T(°C).

<sup>b</sup> El compuesto **58b** fue derivatizado al correspondiente acetato.

<sup>c</sup> El flujo de partida fue 95:5 Hexano/EtOH, incrementándose su polaridad hasta 9:1 en 15 minutos y posteriormente de 9:1 a 8:2 en 30 minutos.

t<sub>R</sub>: tiempo de retención.

Los datos relacionados con los sulfuros **35a**, **45a-46a**, **49a**, **53a** y **54a-56a** y sus correspondientes productos de oxidación (±)-**35b**, (±)-**45a-46b**, (±)-**49b**, **53b**, (±)-**54b-56b** se encuentran recogidos en el apartado de determinación de conversiones y excesos enantioméricos del Capítulo 4.

### 5.11. DATOS EXPERIMENTALES

En este apartado se encuentra la caracterización de todos aquellos compuestos utilizados en el presente capítulo que no han sido adquiridos comercialmente. Los criterios de caracterización son los mismos que los utilizados en el Capítulo 1.

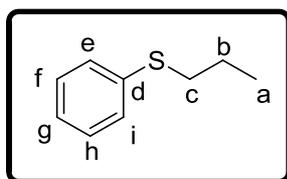
---

---

Fenil propil sulfuro, 68a<sup>95</sup>

---

---



Aceite incoloro

**Rendimiento:** 75%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>S

**Peso Molecular:** 152.3 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.70

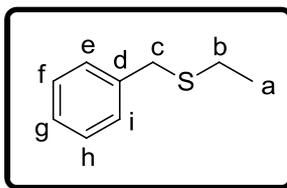
**IR** (KBr): 3025, 2958, 1660, 1520, 1470 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.01 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, 3H<sub>a</sub>), 1.66 (tq, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.3 Hz, 2H<sub>b</sub>), 2.89 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.3 Hz, 2H<sub>c</sub>), 7.10-7.19 (m, 1H<sub>g</sub>), 7.22-7.34 (m, 4H<sub>e,f,h,i</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 13.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 22.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 35.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 125.6 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 128.7 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>f,h</sub>), 128.9 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>e,i</sub>), 136.9 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 152 [(M)<sup>+</sup>, 93%]

**Bencil etil sulfuro, 70a<sup>95</sup>**



Aceite incoloro

**Rendimiento:** 55%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>S

**Peso Molecular:** 152.3 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.65

**IR** (KBr): 3047, 2930, 1640, 1525, 1464 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.24 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.3 Hz, 3H<sub>a</sub>), 2.42 (c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.3 Hz, 2H<sub>b</sub>), 3.75 (s, 2H<sub>c</sub>), 7.20-7.40 (m, 5H<sub>e,f,g,h,i</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 14.4 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 25.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 35.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 126.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 128.5 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>f,h</sub>), 128.8 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e,i</sub>), 138.6 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 152 [(M)<sup>+</sup>, 100%]

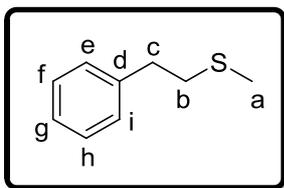
---

---

Feniletil metil sulfuro, 71a<sup>352</sup>

---

---



Aceite incoloro

**Rendimiento:** 40%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>S

**Peso Molecular:** 152.3 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.72

**IR** (KBr): 3065, 2920, 1690, 1530, 1425 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz): δ 2.27 (s, 3H<sub>a</sub>), 2.88-2.93 (m, 2H<sub>b</sub>), 3.03-3.08 (m, 2H<sub>c</sub>), 7.36-7.44 (m, 5H<sub>e,f,g,h,i</sub>)

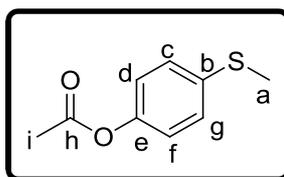
**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz): δ 15.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 37.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 37.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 127.5 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 129.7 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>f,h</sub>), 129.9 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>e,i</sub>), 142.4 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 152 (M<sup>+</sup>, 70%), 104 (75), 91 (73), 61 (100)

---

<sup>352</sup> Cubrilo, J.; Hartenbach, I.; Lissner, F.; Schleid, T.; Niemeyer, M.; Winter, R. F. J. *Organomet. Chem.* **2007**, 692, 1496-1504.

Acetato de 4-(metiltio)fenilo, 58c



Sólido blanco

**Rendimiento:** 90%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>S

**Peso Molecular:** 182.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.37

**P<sub>f</sub>**: 43.2-44.3°C

**IR** (KBr): 3020, 2924, 1760, 1489, 1370, cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CHCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.21 (s, 3H<sub>i</sub>), 2.39 (s, 3H<sub>a</sub>), 6.97 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.8 Hz, 2H<sub>f,d</sub>), 7.21 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.8 Hz, 2H<sub>c,g</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CHCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 15.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 20.4 (CH<sub>3</sub>, C<sub>i</sub>), 121.6 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>d,f</sub>), 127.2 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>c,g</sub>), 135.2 (C<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>), 147.9 (C<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 169.4 (C=O, C<sub>h</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, *m/z*): 182 (M<sup>+</sup>, 41%), 140 (100), 125 (44), 96 (13), 43 (33)

**EMAR** (ESI<sup>+</sup>): calculada para C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>NaO<sub>2</sub>S (M+Na)<sup>+</sup>: 205.0295; encontrada: 205.0294

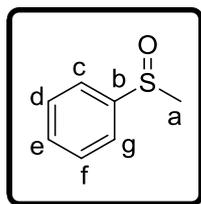
---

---

(±)-Fenil metil sulfóxido, (±)-57b<sup>95</sup>

---

---



Aceite incoloro

**Rendimiento:** 76%

**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>OS

**Peso Molecular:** 140.1 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.28

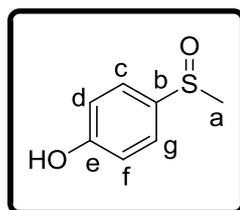
**IR** (KBr): 3035, 2970, 1605, 1503, 1413, 1020 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.50 (s, 3H<sub>a</sub>), 7.17-7.20 (m, 1H<sub>e</sub>), 7.30-7.38 (m, 4H<sub>c,d,f,g</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 15.7 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 124.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 126.5 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>c,g</sub>), 128.7 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>d,f</sub>), 138.3 (C<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 140 [(M)<sup>+</sup>, 90%]

(±)-4-(metilsulfinil)fenol, (±)-58b<sup>353</sup>



Sólido blanco

**Rendimiento:** 56%

**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>S

**Peso Molecular:** 156.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (90% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.47

**P<sub>f</sub>**: 90.0-92.3°C

**IR** (KBr): 3300, 3035, 2920, 1580, 1462, 1025 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz): δ 2.94 (s, 3H<sub>a</sub>), 7.14 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.8 Hz, 2H<sub>d,f</sub>), 7.74 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.8 Hz, 2H<sub>c,g</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz): δ 43.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 117.7 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>d,f</sub>), 127.6 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>c,g</sub>), 135.1 (C<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>), 162.6 (C<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, m/z): 156 (M<sup>+</sup>, 30%), 141 (100%), 125 (15%), 109 (17%)

<sup>353</sup> Zhao, H.; Kayser, M. M.; Wang, Y.; Palkovits, R.; Schueth, F. *Microporous Mesoporous Mater.* **2008**, *116*, 196-203.

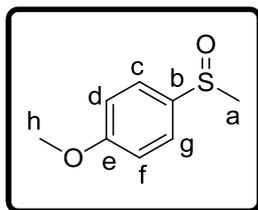
---

---

(±)-1-metoxi-4-(metilsulfinil)benceno, (±)-59b<sup>95</sup>

---

---



Sólido amarillo

**Rendimiento:** 60%

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>S

**Peso Molecular:** 170.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (90% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.57

**P<sub>f</sub>**: 42.1-44.2°C

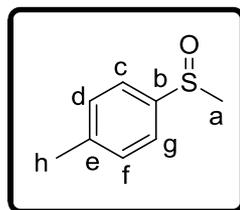
**IR** (KBr): 3453, 2923, 1409, 1021 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.69 (s, 3H<sub>a</sub>), 3.84 (s, 3H<sub>h</sub>), 7.57 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.5 Hz, 2H<sub>d,f</sub>), 7.59 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.5 Hz, 2H<sub>c,g</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 43.7 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 55.4 (CH<sub>3</sub>, C<sub>h</sub>), 114.8 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>d,f</sub>), 125.4 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>c,g</sub>), 136.5 (C<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>), 161.9 (C<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 170[(M)<sup>+</sup>, 90%]

(±)-1-metil-4-(metilsulfinil)benceno, (±)-60b<sup>95</sup>



Sólido blanco

**Rendimiento:** 83%

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>OS

**Peso Molecular:** 154.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (90% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.55

**P<sub>f</sub>**: 41.6-43.5°C

**IR** (KBr): 3050, 2990, 1620, 1480, 1325, 1023 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.39 (s, 3H<sub>h</sub>), 2.65 (s, 3H<sub>a</sub>), 7.27 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.9 Hz, 2H<sub>d,f</sub>), 7.48 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.9 Hz, 2H<sub>c,g</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 21.1 (CH<sub>3</sub>, C<sub>h</sub>), 43.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 123.3 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>d,f</sub>), 129.8 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>c,g</sub>), 141.3 (C<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 142.3 (C<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 154 [(M)<sup>+</sup>, 85%]

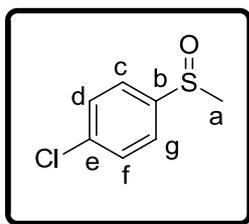
---

---

(±)-1-cloro-4-(metilsulfinil)benceno, (±)-61b<sup>95</sup>

---

---



Sólido blanco

**Rendimiento:** 75%

**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>ClOS

**Peso Molecular:** 174.6 g/mol

**R<sub>f</sub>** (90% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.54

**P<sub>f</sub>**: 47.2-49.4°C

**IR** (KBr): 3020, 2990, 1570, 1460, 1330, 1025 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.69 (s, 3H<sub>a</sub>), 7.47 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.6 Hz, 2H<sub>c,g</sub>), 7.56 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.6 Hz, 2H<sub>d,f</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 43.9 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 124.8 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>c,g</sub>), 129.5 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>d,f</sub>), 137.1 (C<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>), 144.1 (C<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 174 [(M)<sup>+</sup>, 75%]

---

---

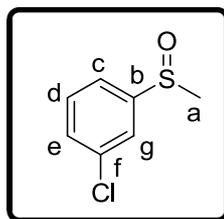
(S)-1-cloro-4-(metilsulfinil)benceno, (S)-61b

---

---

**Rendimiento:** 77%

**(±)-1-cloro-3-(metilsulfinil)benceno, (±)-62b<sup>95</sup>**



Sólido blanco

**Rendimiento:** 98%

**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>ClOS

**Peso Molecular:** 174.6 g/mol

**R<sub>f</sub>** (90% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.64

**P<sub>f</sub>**: 40.3-43.1°C

**IR** (KBr): 3025, 2970, 1680, 1510, 1021 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.70 (s, 3H<sub>a</sub>), 7.41-7.62 (m, 3H<sub>c,d,e</sub>), 7.63 (s, 1H<sub>g</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 43.8 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 121.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>c</sub>), 123.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 130.4 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 130.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 135.5 (C<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 147.6 (C<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 174 [(M)<sup>+</sup>, 100%]

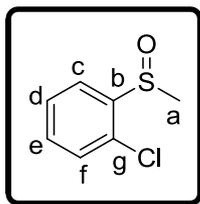
---

---

(±)-1-cloro-2-(metilsulfinil)benceno, (±)-63b<sup>95</sup>

---

---



Aceite incoloro

**Rendimiento:** 60%

**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>ClOS

**Peso Molecular:** 174.6 g/mol

**R<sub>f</sub>** (90% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.57

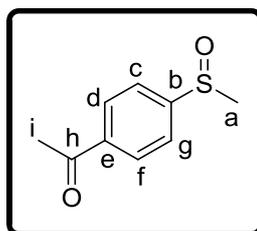
**IR** (KBr): 3025, 2990, 1564, 1500, 1020 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.82 (s, 3H<sub>a</sub>), 7.36-7.55 (m, 3H<sub>d,e,f</sub>), 7.94 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.0 Hz, 1H<sub>c</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 41.5 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 125.2 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>c</sub>), 128.1 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>), 129.7 (C, CH<sub>ar</sub>, C<sub>e,g</sub>), 131.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 143.4 (C<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 174 [(M)<sup>+</sup>, 100%]

**(±)-1-(4-(metilsulfinil)fenil)etanova, (±)-64b<sup>354</sup>**



Sólido blanco

**Rendimiento:** 79%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>S

**Peso Molecular:** 182.3 g/mol

**R<sub>f</sub>** (90% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.54

**P<sub>f</sub>**: 104.6-106.6°C

**IR** (KBr): 3025, 2930, 1690, 1510, 1330, 1025 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.59 (s, 3H<sub>i</sub>), 2.71 (s, 3H<sub>a</sub>), 7.68 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.3 Hz, 2H<sub>c,g</sub>), 8.03 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.3 Hz, 2H<sub>d,f</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 26.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>i</sub>), 43.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 123.5 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>c,g</sub>), 128.9 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>d,f</sub>), 138.7 (C<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 150.6 (C<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>), 196.9 (C=O, C<sub>h</sub>)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 182 [(M)<sup>+</sup>, 73%]

**(R)-1-(4-(metilsulfinil)fenil)etano, (R)-64b<sup>316</sup>**

**(R)-64b:** [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = +90.2 (c 1.00, acetona), *ee* 87%.

<sup>354</sup> Kinen, C. O.; Rossi, L. I.; Hoyos de Rossi, R. *Green Chem.* **2009**, *11*, 223-228.

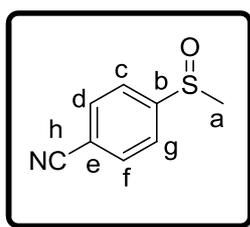
---

---

(±)-4-(metilsulfinil)benzonitrilo, (±)-65b<sup>95</sup>

---

---



Sólido blanco

**Rendimiento:** 58%

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>NOS

**Peso Molecular:** 165.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (90% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.42

**P<sub>f</sub>**: 85.2-87.2°C

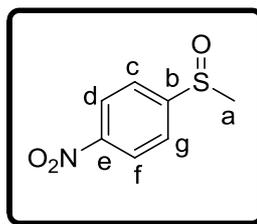
**IR** (KBr): 3010, 2929, 2250, 1460, 1361, 1042 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.73 (s, 3H<sub>a</sub>), 7.73 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.3 Hz, 2H<sub>c,g</sub>), 7.79 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.3 Hz, 2H<sub>d,f</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 43.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 114.6 (CN, C<sub>h</sub>), 115.5 (C<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 124.1 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>c,g</sub>), 132.8 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>d,f</sub>), 151.7 (C<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 165 [(M)<sup>+</sup>, 80%]

**(±)-1-(metilsulfinil)-4-nitrobencono, (±)-66b<sup>95</sup>**



Sólido amarillo

**Rendimiento:** 59%

**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>NO<sub>3</sub>S

**Peso Molecular:** 185.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** (90% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.44

**P<sub>f</sub>**: 173.1-174.1°C

**IR** (KBr): 3417, 2924, 1639, 1550, 1350, 1025 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): 2.79 (s, 3H<sub>a</sub>), 7.83 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.8 Hz, 2H<sub>c,g</sub>), 8.49 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 8.8 Hz, 2H<sub>d,f</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 44.7 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 124.4 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>c,g</sub>), 124.6 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>d,f</sub>), 149.4 (C<sub>ar</sub>, C<sub>e</sub>), 153.1 (C<sub>ar</sub>, C<sub>b</sub>)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 185 [(M)<sup>+</sup>, 100%]

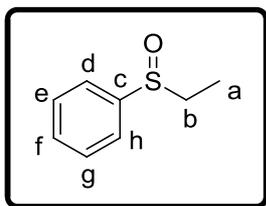
---

---

(±)-Fenil etil sulfóxido, (±)-67b<sup>95</sup>

---

---



Aceite incoloro

**Rendimiento:**  $\geq 99\%$

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>OS

**Peso Molecular:** 154.3 g/mol

**R<sub>f</sub>** (90% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.46

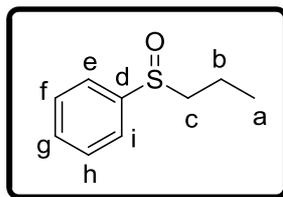
**IR** (KBr): 3035, 2975, 1610, 1505, 1420, 1060 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  1.17 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 9.0 Hz, 3H<sub>a</sub>), 2.76-2.83 (m, 1H<sub>b</sub>), 2.85-2.95 (m, 1H<sub>b</sub>), 7.47-7.58 (m, 3H<sub>e,f,g</sub>), 7.60-7.69 (m, 2H<sub>d,h</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  5.85 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 50.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 124.0 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>d,h</sub>), 129.0 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>e,g</sub>), 143.7 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 146.6 (C<sub>ar</sub>, C<sub>c</sub>)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 154 [(M)<sup>+</sup>, 90%]

**(±)-Fenil propil sulfóxido, (±)-68b<sup>95</sup>**



Sólido blanco

**Rendimiento:** 92%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>OS

**Peso Molecular:** 168.3 g/mol

**R<sub>f</sub>** (90% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.48

**P<sub>f</sub>**: 57.4-58.3°C

**IR** (KBr): 3036, 2970, 1605, 1505, 1410, 1020 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.05 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, 3H<sub>a</sub>), 1.64-1.71 (m, 1H<sub>b</sub>), 1.77-1.84 (m, 1H<sub>b</sub>), 2.75 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 13.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.6 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 6.4 Hz, 1H<sub>c</sub>), 2.81 (ddd, <sup>2</sup>J<sub>HH</sub> 13.0 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 9.5 Hz, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 5.5 Hz, 1H<sub>c</sub>) 7.48-7.54 (m, 3H<sub>f,g,h</sub>), 7.61-7.64 (m, 2H<sub>e,i</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 13.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 15.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 59.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 124.0 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>e,i</sub>), 129.2 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>f,h</sub>), 130.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 145.9 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>)

**EM** (EI<sup>+</sup>, m/z): 168 [(M)<sup>+</sup>, 93%]

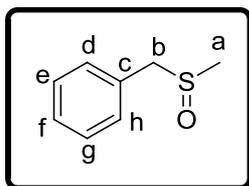
---

---

(±)-Bencil metil sulfóxido, (±)-69b<sup>95</sup>

---

---



Sólido blanco

**Rendimiento:** 82%

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>OS

**Peso Molecular:** 154.1 g/mol

**R<sub>f</sub>** (80% Hexano/AcOEt): 0.27

**P<sub>f</sub>**: 53.0-55.0°C

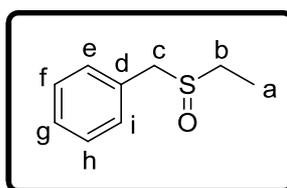
**IR** (KBr): 3035, 2970, 1747, 1605, 1503, 1413, 1234, 1024 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 2.34 (s, 3H<sub>a</sub>), 3.81 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 12.8 Hz, 1H<sub>b</sub>), 3.94 (d, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 12.8 Hz, 1H<sub>b</sub>), 7.16-7.20 (m, 2H<sub>d,h</sub>), 7.23-7.30 (m, 3H<sub>e,f,g</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 37.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 60.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 128.3 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>f</sub>), 128.8 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>e,g</sub>), 129.5 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>d,h</sub>), 129.9 (C<sub>ar</sub>, C<sub>c</sub>)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 154 [(M)<sup>+</sup>, 12%], 91 [100]

**(±)-Bencil etil sulfóxido, (±)-70b<sup>95</sup>**



Sólido blanco

**Rendimiento:** 80%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>OS

**Peso Molecular:** 168.2 g/mol

**R<sub>f</sub>** ((90% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.50

**P<sub>f</sub>**: 51.0-53.0°C

**IR** (KBr): 3030, 2972, 1603, 1504, 1415, 1021 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 1.30 (t, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.4 Hz, 3H<sub>a</sub>), 2.75 (c, <sup>3</sup>J<sub>HH</sub> 7.3 Hz, 2H<sub>b</sub>), 3.89 (s, 2H<sub>c</sub>), 7.30-7.45 (m, 5H<sub>e,f,g,h,i</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 17.2 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 37.0 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 60.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 127.9 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 129.5 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>f,h</sub>), 129.9 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>e,i</sub>), 139.2 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 168 [(M)<sup>+</sup>, 100%]

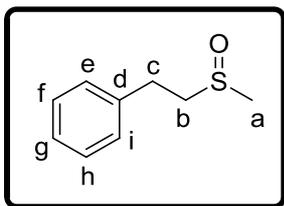
---

---

(±)-Fenietil metil sulfóxido, (±)-71b<sup>95</sup>

---

---



Aceite amarillo claro

**Rendimiento:** 82%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>OS

**Peso Molecular:** 168.3 g/mol

**R<sub>f</sub>** (90% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH): 0.43

**IR** (KBr): 3030, 2969, 1605, 1503, 1415, 1020 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 300.13 MHz): δ 2.84 (s, 3H<sub>a</sub>), 3.18-3.34 (m, 4H<sub>c,b</sub>), 7.39-7.53 (m, 5H<sub>e,f,g,h,i</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CD<sub>3</sub>OD, 75.5 MHz): δ 30.0 (CH<sub>2</sub>, C<sub>c</sub>), 38.6 (CH<sub>3</sub>, C<sub>a</sub>), 56.8 (CH<sub>2</sub>, C<sub>b</sub>), 128.3 (CH<sub>ar</sub>, C<sub>g</sub>), 130.2 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>e,i</sub>), 130.3 (2CH<sub>ar</sub>, C<sub>f,h</sub>), 140.7 (C<sub>ar</sub>, C<sub>d</sub>)

**EM** (APCI<sup>+</sup>, *m/z*): 168 [(M)<sup>+</sup>, 100%]

