

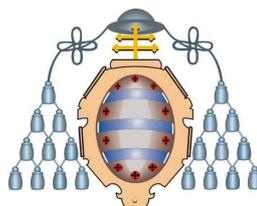
Universidad de Oviedo

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica
Programa de Doctorado: Química Organometálica

**Desarrollo de rutas
quimioenzimáticas para la
producción de aminas y derivados de
aminoácidos ópticamente activos**

Tesis Doctoral

María Rodríguez Mata



Universidad de Oviedo

Departamento de Química Orgánica e Inorgánica
Programa de Doctorado: Química Organometálica

**Desarrollo de rutas
quimioenzimáticas para la
producción de aminas y derivados de
aminoácidos ópticamente activos**

**Memoria presentada para optar
al grado de Doctor en Química
por María Rodríguez Mata**

***“Cada nota
deja en cada uno de nosotros
un recuerdo,
pero es toda la melodía
la que cuenta una historia”***

“Aleph”

Paulo Coelho

A mis padres y Ángel

Aunque este momento parecía muy lejano cuando crucé, por primera vez, la puerta de aquél laboratorio que olía “raro”, aquí estamos, fin del trayecto, o más bien, fin de otra etapa. Un buen momento para echar la vista atrás y mostrar mi agradecimiento a todos los que, de una forma u otra, han hecho posible el progreso de esta Tesis Doctoral, tanto en el terreno profesional como en el personal.

Al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, por el apoyo económico que me ha permitido, además del desarrollo del trabajo de investigación en la Universidad de Oviedo, disfrutar de varias estancias tanto en el territorio nacional como en el extranjero, posibilitando ampliar mi conocimiento en otras áreas.

Al Prof. Vicente Gotor Santamaría, por depositar su confianza en mí desde el minuto cero. Por estar presente a lo largo de toda mi formación, desde enseñarme a dar mis primeros pasos en esto de la Química Orgánica (de esto hace ya... casi 9 años!!) hasta permitirme formar parte de su grupo de investigación y descubrir el fascinante mundo de la Biocatálisis.

A Vicente Gotor Fernández, para mí, simplemente, Vicen, a quien tengo que agradecer todos los conocimientos transmitidos y, de un modo especial, el día a día, la atención y disposición continua a pesar de que a veces no resultase fácil, el compartir la alegría de los buenos momentos y el hacer lo imposible para levantarme el ánimo cuando no lo eran tanto, el respeto mutuo, la confianza y la amistad forjada a lo largo de los años, en definitiva, por ser una mezcla “jefe-papí” como la copa de un pino!!

Al Prof. Carlos Cativiela, por la buena relación mantenida a través de colaboraciones en diversos proyectos y por la cálida acogida en su grupo de investigación durante tres meses. Gracias también a todos ellos y, en particular, a Alicia y Javi.

A la Prof. Gillian Stephens, a su grupo de investigación y, en especial, a Stephen Hall y Pawel Mordaka, por iniciarme con infinita paciencia en el mundo de la biología molecular y la microbiología.

A los Prof. Francisca Rebolledo y Félix Rodríguez, porque sus conocimientos e ideas hicieron posible superar algún que otro bache.

A todos y cada uno de los compañeros que han pasado por el Biolabgo a lo largo de estos cinco años, con los que he tenido la oportunidad de compartir mucho más que un espacio de trabajo. A Edu (EGU), Ibo y Gonza, porque la experiencia es un grado, y la vuestra me ha servido de ayuda en múltiples ocasiones. A Niko y Edu, por vuestra paciencia en mis inicios, y por los millones de consejos y sugerencias. A mis “compis” de viajes, porque sólo Portugal, Galicia, Valladolid, Italia, Andalucía, las Islas Azores y nosotros sabemos lo que hemos vivido. A mi querido Box 2, con sus idas y venidas de gente de ambos lados del Atlántico, porque sea el de “los chungos” o no, os habéis convertido en mi otra familia, dentro y fuera del labo. A los que fueron mis chicos del segundo, por estar siempre preparados con una sonrisa y un buen rato de palique cuando me acercaba a pedir algo (aunque a veces fuese sólo una excusa...). A Larita, por su inestimable ayuda y por sus “Todo saldrá bien”. Y, especialmente, a mis hermanitos: Sergio y María, porque tantas cosas compartidas han creado un vínculo muy muy especial.

A mis inorgánicos favoritos, por adoptarme como sólo vosotros sabéis y considerarme una más.

Al resto de gente del departamento, porque el buen ambiente y el compañerismo que se respira hace que el trabajo diario sea mucho más fácil y agradable.

A todos mis mañicos (aunque muchos de vosotros lo seáis sólo de forma adoptiva), por hacerme sentir en casa, en pocos días, en una ciudad desconocida para mí. Por los monólogos, las tapas, los “Cortos”, los viajes, aquella despedida que nunca olvidaré, las visitas allá donde estuviese, y esas conversaciones en la distancia que espero sigan manteniéndose.

A las amistades que se crearon durante y se forjaron después de la carrera: Ana G., Fran, Sandra, David... porque aunque los caminos de algunos de nosotros hayan tomado rumbos diferentes, siempre hay momentos para el reencuentro.

A mis Fraters, mi rincón cántabro en tierras asturianas, porque sin vosotras esto no hubiera sido lo mismo. A Ángela, mi Pagui, simplemente por estar siempre ahí, en los ratos buenos y en los no tan buenos, pase lo que pase. A M^a Luisa, por las “Chapas” compartidas y, porque siendo ajena a todo esto, has sabido valorar lo que hago, comprenderme y llegar a reconocer que “Este año Quifi es más abstracta que nunca”. Y Ana... no sé por donde empezar, son tantas cosas y años en común... Quizás por aquél “¿Nos vamos a Oviedo a hacer Químicas?” que dio un vuelco a mi vida y la convirtió en lo que ahora es.

A mis amigos-familia (en algunas ocasiones el límite es difuso) de Mataporquera y Reinosa, porque aunque a veces las visitas a la tierruca no fueron tan frecuentes como me hubiera gustado, siempre habéis contado conmigo para todo.

A toda mi familia, abuelos, tíos, primos y, especialmente, a mis padres y mi hermano, porque aunque nunca tuvisteis muy claro qué era eso que me llevaba tantas horas y me mantenía siempre tan ocupada, confiasteis en mí. Por vuestra educación, por enseñarme que con esfuerzo y ganas, nada es imposible. Por tantas horas de teléfono para mantenerme al día, para apoyarme y darme ánimos cuando más falta hacían o, simplemente, para darme envidia con una buena tortilla de patata.

A todos, por todo, GRACIAS.

ABREVIATURAS

Å	Angstroms
ABA	2-Aminobenzamida
Ac	Acetilo
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
A.L.	Ácido de Lewis
Alloc	Aliloxicarbonilo
APCI⁺	Ionización química a presión atmosférica en modo positivo
Ar	Arilo
Asp	Ácido aspártico o aspartato
Bmim	1-Butil-3-metilimidazolio
Bn	Bencilo
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo
Bt	Benzotriazolilo
Bu	Butilo
ⁱBu	Isobutilo
^tBu	<i>tert</i> -Butilo
BuLi	Butilitio
Bz	Benzoílo
°C	Grados Celsius
c	Cuatriplete
c	Conversión
CAL-A	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> tipo A
CAL-B	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> tipo B
Cat.	Catalizador
Cbz o Z	Benciloxicarbonilo
CLEA	Agregados enzimáticos entrecruzados (Cross-Linked Enzyme Aggregates)
cm	Centímetros
¹³C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono
CRL	Lipasa de <i>Candida rugosa</i>
conv.	Conversión
Cy	Ciclohexilo
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete

da	Doblete ancho
DEAD	Azodicarboxilato de dietilo
dd	Doble doblete
ddd	Doble doblete desdoblado
DEPT	Aumento de distorsión por transferencia de polarización (Distorsion Enhancement by Polarization Transfer)
ΔG	Energía libre de Gibbs
DIBAL-H	Hidruro de diisobutilaluminio
DIPEA	<i>N</i> -Etilidiisopropilamina
DKR	Resolución cinética dinámica (Dynamic Kinetic Resolution)
DMAP	4-(<i>N,N</i>)-Dimetilamino piridina
DMBA	Ácido <i>N,N'</i> -dimetilbarbitúrico
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMP	2,4-Dimetilpentan-3-ol
DMSO	Dimetilsulfóxido
dt	Doble triplete
E	Enzima
<i>E</i>	Razón enantiomérica
<i>E</i>_a	Energía de activación
ee	Exceso enantiomérico
ee_s	Exceso enantiomérico de sustrato
ee_p	Exceso enantiomérico de producto
EM	Espectrometría de masas
eq.	Equivalentes
ESI⁺	Ionización por electrospray en modo positivo
Et	Etilo
Fmoc	Fluorenilmetoxicarbonilo
g	Gramo
GDH	Glucosa deshidrogenasa
Glu	Ácido glutámico o glutamato
GP	Grupo protector
¹H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
h	Horas, sextuplete
His	Histidina

HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (High-Performance Liquid Chromatography)
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución (High Resolution Mass Spectrometry)
Hz	Hertzios
EI⁺	Ionización por impacto electrónico en modo positivo
IPA	Isopropanol
IR	Espectroscopía de infrarrojo
IT	Intermediario tetrahédrico
J	Constante de acoplamiento
K_{cat}	Constante de velocidad
K_M	Constante de Michaelis Menten
KR	Resolución cinética (Kinetic Resolution)
LDH	Lactato deshidrogenasa
Leu	Leucina
LiHMDS	Bis(trimetilsilil)amiduro de litio
LIs	Líquidos iónicos
m	Multiplete
<i>m</i>	<i>meta</i>
μL	Microlitro
M	Molaridad
MacOEt	Metoxiacetato de etilo
MAO	Monoamino oxidasa
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo
mg	Miligramo
MHz	Megahertzio
Min	Minuto
mL	Mililitro
mmol	Milimol
MOM	Metoximetilo
m/z	Relación masa/carga
v	Frecuencia
N	Concentración normal
NAD(H)	Dinucleótido de nicotinamida-adenina

NMDA	<i>N</i> -Metil-D-aspartato
Nu	Nucleófilo
o	<i>orto</i>
Oic	Ácido octahidroindol-2-carboxílico
Oct	Octilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Producto
p	<i>para</i>
PF	Punto de fusión o producto final
Ph	Fenilo
Phe	Fenilalanina
PNZ	<i>p</i> -nitrobenciloxicarbonilo
POP	Prolil oligopeptidasa
PP	Producto de partida
PPL	Lipasa de páncreas porcino
ppm	Partes por millón
PPTS	<i>p</i> -toluensulfonato de piridinio
Pr, ⁿPr	Propilo
ⁱPr	Isopropilo
PSL	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> , actualmente conocida como <i>Burkholderia cepacia</i>
PSL-C I o II	PSL de tipo I o II, inmovilizadas en un soporte cerámico
PSL-D	PSL inmovilizada sobre diatomita, comercializada por Sigma-Aldrich
PSL IM	PSL inmovilizada sobre diatomita, comercializada por Amano Enzyme Europe Ltd.
q	Quintuplete
Rdto.	Rendimiento
Ref.	Referencia
RML	Lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i>
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
R_f	Factor de retención
S, Sustr.	Sustrato
s	Singulete

sa	Singulete ancho
Ser	Serina
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SSRI	Inhibidores selectivos de la reabsorción de la serotonina (Selective Serotonin Re-uptake Inhibitors)
t	Triplete
t	Tiempo
T	Temperatura
t.a.	Temperatura ambiente
TBAB	Bromuro de tetrabutilamonio
TBDMS	<i>tert</i> -butildimetilsililo
TBME	<i>tert</i> -Butilmetil éter
TDI	Tartrato de diisopropilo
Tf	Triflato o trifluorometanosulfonato
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Trimetilsililo
TLC	Cromatografía de capa fina (Thin Layer Chromatography)
t_R	Tiempo de retención
Tr	Tritilo, trifenilmetilo
Troc	2,2,2-tricloroetoxicarbonilo
Ts	Tosilo o <i>p</i> -toluensulfonilo
U	Unidades enzimáticas
uma	Unidad de masa atómica
UV	Ultravioleta
Val	Valina
W	Vatios
ω-TA	ω-Transaminasa

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
<u>0.1. QUÍMICA SOSTENIBLE</u>	4
<u>0.2. IMPORTANCIA DE LA QUIRALIDAD EN LA INDUSTRIA. BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL</u>	6
<u>0.3. BIOCATÁLISIS</u>	8
0.3.1. DESARROLLO HISTÓRICO	8
0.3.2. ENZIMAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS	10
0.3.3. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS	12
0.3.4. LIPASAS	13
0.3.4.1. Mecanismo de Actuación	16
0.3.4.2. Razones Cinéticas para la Selectividad	18
0.3.4.3. Enantioselectividad y Reconocimiento Quiral	19
0.3.5. NUEVAS TENDENCIAS	23
0.3.5.1. Promiscuidad Catalítica	23
0.3.5.2. Diseño Racional de Biocatalizadores	25
<u>0.4. OBJETIVOS GENERALES</u>	27
PARTE I. AMINAS ÓPTICAMENTE ACTIVAS	29
<u>I.0.1. IMPORTANCIA DE LAS AMINAS QUIRALES</u>	32
<u>I.0.2. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE AMINAS ENANTIOENRIQUECIDAS</u>	32
CAPÍTULO 1. Preparación quimioenzimática de 1-etanaminas precursoras de compuestos con actividad biológica	39

Índice

ANTECEDENTES	41
<u>I.1.1.1. (S)-RIVASTIGMINA</u>	44
I.1.1.1.1. SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICAS.....	45
<u>I.1.1.2. AMINAS DERIVADAS DE PIRIDINAS FLUORADAS</u>	49
I.1.1.2.1. RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA DE DERIVADOS DE HETEROARILETANAMINAS.....	51
OBJETIVOS	57
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
<u>I.1.3.1. SÍNTESIS QUÍMICA Y RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA DEL PRECURSOR NITROGENADO DE LA (S)-RIVASTIGMINA</u>	64
I.1.3.1.1. PREPARACIÓN QUÍMICA DE LA 1-(3- METOXIFENIL)ENTANAMINA RACÉMICA (4) Y DE LAS AMIDAS (±)-5a-b.....	64
I.1.3.1.2 RESOLUCIÓN CINÉTICA DE LA 1-(3- METOXIFENIL)ENTANAMINA (4) MEDIANTE PROCESOS DE AMINÓLISIS CATALIZADOS POR LIPASAS.....	65
I.1.3.1.3 COMPARACIÓN ENTRE LOS PROCESOS DE RESOLUCIÓN CINÉTICA ENZIMÁTICA DEL ALCOHOL 3 Y LA AMINA 4.....	68
<u>I.1.3.2. SÍNTESIS QUÍMICA Y RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA DE 1-(PIRIDIN-3-IL)ETANAMINAS FLUORADAS</u>	69
I.1.3.2.1. PREPARACIÓN DE 1-(PIRIDIN-3-IL)ETANAMINAS RACÉMICAS SUSTITUÍDAS EN LA POSICIÓN 6 (9a,b).....	70
I.1.3.2.2. PREPARACIÓN DE LA 1-(5-FLUOROPIRIDIN-3- IL)ETANAMINA [(±)-9c].....	73
I.1.3.2.3. SÍNTESIS DE AMIDAS RACÉMICAS 11a-c Y 12a-c.....	75
I.1.3.2.4. RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA DE LAS AMINAS (±)-9a-c A TRAVÉS DE PROCESOS DE ACILACIÓN ENANTIOSELECTIVA CATALIZADOS POR LA CAL-B.....	76

CONCLUSIONES	79
PARTE EXPERIMENTAL	83
<u>I.1.5.1. GENERAL</u>	85
<u>I.1.5.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS</u>	86
<u>I.1.5.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS</u>	88
I.1.5.3.1. PRECURSORES DE LA (R)-RIVASTIGMINA	88
I.1.5.3.1.1. Síntesis del 1-(3-Metoxifenil)etanol [(±)-3]	88
I.1.5.3.1.2. Síntesis de la 1-(3-Metoxifenil)etanamina [(±)-4] ...	88
I.1.5.3.1.3. Síntesis de la N-[1-(3-Metoxifenil)etil]acetamida [(±)-5a]	89
I.1.5.3.1.4. Síntesis de la 2-Metoxi-N-[1-(3-metoxifenil)etil]acetamida [(±)-5b]	89
I.1.5.3.1.5. Procedimiento General para la Resolución Cinética de la 1-(3-Metoxifenil)etanamina Racémica 4 mediante Acetilación Catalizada por la CAL-B	90
I.1.5.3.2. PRECURSORES DE LAS AMINAS FLUORADAS	90
I.1.5.3.2.1. Síntesis del 6-Fluoropiridin-3-carbonitrilo (7a)	90
I.1.5.3.2.2. Procedimiento General para la Preparación de las Cetonas 8a y 8b	91
I.1.5.3.2.3. Procedimiento General para la Síntesis de las Aminas Racémicas 9a y 9b	91
I.1.5.3.2.4. Síntesis de 1-(5-Fluoropiridin-3-il)etanol [(±)-10c]	91
I.1.5.3.2.5. Preparación de 1-(5-Fluoropiridin-3-il)-etanamina [(±)-9c]	92
I.1.5.3.2.6. Procedimiento General para la Síntesis de las Amidas Racémicas 11a-c y 12a-c	93

I.1.5.3.2.7. Procedimiento General para la Resolución Cinética de las Aminas (\pm)-9a-c mediante Acilación Catalizada por la CAL-B	93
<u>I.1.5.4. DATOS EXPERIMENTALES</u>	94
CAPÍTULO 2. Preparación quimioenzimática de 1-aril y 1-heteroarilpropan-2-aminas a través de procesos de resolución cinética clásica o dinámica	107
ANTECEDENTES	109
<u>I.2.1.1. IMPORTANCIA Y APLICACIONES</u>	112
<u>I.2.1.2. SÍNTESIS ESTEREOSELECTIVAS ENZIMÁTICAS</u>	114
I.2.1.2.1. RESOLUCIONES CINÉTICAS CLÁSICAS (KR) MEDIANTE ACILACIÓN DE AMINAS RACÉMICAS CATALIZADAS POR LIPASAS.....	115
I.2.1.2.2. RESOLUCIONES CINÉTICAS DINÁMICAS (DKR).....	118
OBJETIVOS	127
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	131
<u>I.2.3.1. SÍNTESIS DE 1-ARIL Y 1-HETEROARILPROPAN-2- AMINAS RACÉMICAS Y SUS METOXIACETAMIDAS CORRESPONDIENTES</u>	134
<u>I.2.3.2. RESOLUCIÓN DE AMINAS CATALIZADA POR LA CAL-B</u>	136
I.2.3.2.1. RESOLUCIÓN CINÉTICA CLÁSICA (KR).....	136
I.2.3.2.2. ASIGNACIÓN DE CONFIGURACIONES ABSOLUTAS.....	141
I.2.3.2.3. RESOLUCIÓN CINÉTICA DINÁMICA (DKR)	142

CONCLUSIONES	147
PARTE EXPERIMENTAL	151
<u>I.2.5.1. GENERAL</u>	153
<u>I.2.5.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS</u>	153
<u>I.2.5.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS</u>	155
I.2.5.3.1. Síntesis del 1-(Trifenilmetil)-1 <i>H</i> -imidazol-4- carbaldehído (13e).....	155
I.2.5.3.2. Procedimiento General para la Síntesis de las 1-(Hetero)arilpropan-2-aminas Racémicas 15a-e	156
I.2.5.3.3. Procedimiento General para la Síntesis de las Amidas Racémicas 16a-e y 17a-e.....	157
I.2.5.3.4. Procedimiento General para la Resolución Cinética de las Aminas Racémicas 15a-e mediante Acilación Catalizada por la CAL-B	157
I.2.5.3.5. Procedimiento General para la Resolución Cinética Dinámica (DKR) de las Aminas Racémicas 15a-c,e.....	158
<u>I.2.5.4. DATOS EXPERIMENTALES</u>	159
PARTE II. DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS ÓPTICAMENTE ACTIVOS	167
<u>II.0.1. SÍNTESIS ENZIMÁTICA ASIMÉTRICA DE AMINOÁCIDOS Y DERIVADOS</u>	170
<u>II.0.2. PREPARACIÓN DE DERIVADOS DE ÁCIDOS AMINOFOSFÓNICOS</u>	173

CAPÍTULO 3. Síntesis estereoselectiva de β-aminoácidos mediante rutas quimioenzimáticas. Aplicación en la síntesis de la (S)-Dapoxetina.....	175
ANTECEDENTES.....	177
<u>II.3.1.1. β-AMINOÁCIDOS Y SUS DERIVADOS</u>	180
II.3.1.1.1. IMPORTANCIA Y APLICACIONES	180
II.3.1.1.2. PREPARACIÓN ENANTIOSELECTIVA DE β-AMINOÉSTERES.....	181
II.3.1.1.2.1. Síntesis Química Asimétrica	182
II.3.1.1.2.2. Procesos Enzimáticos	184
II.3.1.1.2.2.1. Resoluciones mediante acilación del grupo amino	185
II.3.1.1.2.2.2. Resoluciones mediante transesterificación o hidrólisis del grupo éster	187
II.3.1.1.2.2.3. Otras transformaciones	190
<u>II.3.1.2. (S)-DAPOXETINA.....</u>	192
II.3.1.2.1. IMPORTANCIA Y APLICACIONES	192
II.3.1.2.2. SÍNTESIS ASIMÉTRICA	193
II.3.1.2.2.1. Métodos Químicos	193
II.3.1.1.2.2. Métodos Quimioenzimáticos.....	195
OBJETIVOS.....	197
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	201
<u>II.3.3.1. SÍNTESIS DE β-AMINOÉSTERES RACÉMICOS Y SUS AMIDAS Y CARBAMATOS CORRESPONDIENTES.....</u>	204
<u>II.3.3.2. RESOLUCIÓN CINÉTICA DE LOS β-AMINOÉSTERES CATALIZADA POR LIPASAS.....</u>	207

II.3.3.2.1. RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA POR ACILACIÓN	208
II.3.3.2.2. RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA POR HIDRÓLISIS.....	210
II.3.3.2.2.1. Optimización de Parámetros con el Sustrato Modelo 21a.....	210
II.3.3.2.2.2. Extensión al Resto de β -aminoésteres.....	215
<u>II.3.3.3. DETERMINACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA DE LOS PRODUCTOS DE LA HIDRÓLISIS</u>	218
<u>II.3.3.4. SÍNTESIS TOTAL DE LA (S)-DAPOXETINA</u>	219
CONCLUSIONES	221
PARTE EXPERIMENTAL	225
<u>II.3.5.1. GENERAL</u>	227
<u>II.3.5.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS</u>	228
<u>II.3.5.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS</u>	230
II.3.5.3.1. SÍNTESIS Y RESOLUCIÓN DE LA FAMILIA DE β - AMINOÉSTERES 21a-k	230
II.3.5.3.1.1. Procedimiento General para la Síntesis de β - Aminoácidos (20b-k)	230
II.3.5.3.1.2. Procedimiento General para la Esterificación de Aminoácidos. Síntesis de los β -Aminoésteres 21a-k.....	230
II.3.5.3.1.3. Procedimiento General para la Síntesis de las Metoxiacetamidas 22b-c,h-k.....	231
II.3.5.3.1.4. Procedimiento General para la Síntesis de los Carbamatos de Bencilo 23a,d-g	231
II.3.5.3.1.5. Procedimiento para la Resolución Cinética del 3-Amino-3-fenilpropanoato de Metilo Racémico (21a) mediante Acilación Catalizada por Lipasas.....	232
II.3.5.3.1.6. Procedimiento General para la Hidrólisis Enzimática de los β -Aminoésteres Racémicos 21a-k	232

Índice

II.3.5.3.2. SÍNTESIS TOTAL DE LA (S)-DAPOXETINA.....	233
II.3.5.3.2.1. Síntesis del 3-Amino-3-fenilpropan-1-ol (24).....	233
II.3.5.3.2.2. Síntesis del 3-Amino- <i>O-tert</i> -butildimetilsilil-3-fenilpropan-1-ol (25)	233
II.3.5.3.2.3. Síntesis del 3-(<i>N,N</i> -Dimetilamino)-3-fenilpropan-1-ol (26)	234
II.3.5.3.2.4. Síntesis de la <i>N,N</i> -Dimetil-1-fenil-3-(naftalen-1-iloxi)propan-1-amina (Dapoxetina, 18)	234
<u>II.3.5.4. DATOS EXPERIMENTALES</u>	235
CAPÍTULO 4. Síntesis estereoselectiva de α-aminoésteres cíclicos mediante procesos de resolución cinética	255
ANTECEDENTES	257
<u>II.4.1.1. L-OIC Y SUS DERIVADOS</u>	260
II.4.1.1.1. SÍNTESIS QUÍMICAS Y RESOLUCIONES NO ENZIMÁTICAS.....	264
II.4.1.1.2. APROXIMACIONES ENZIMÁTICAS PARA LA OBTENCIÓN DE α -AMINOÉSTERES CÍCLICOS ENANTIOENRIQUECIDOS.....	268
OBJETIVOS	275
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	279
<u>II.4.3.1. DERIVADOS DE CONFIGURACIÓN (2S*,3aS*,7aS*)</u>	282
II.4.3.1.1. SÍNTESIS QUÍMICA DE LOS α -AMINOÉSTERES 29a-b Y SUS CORRESPONDIENTES CARBAMATOS RACÉMICOS 30a-b	282

II.4.3.1.2. RESOLUCIÓN CINÉTICA DE LOS α -AMINOÉSTERES MEDIANTE PROCESOS DE ALCOXICARBONILACIÓN ENZIMÁTICA	285
II.4.3.1.3. DETERMINACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA DEL α -AMINOÉSTER (+)-(2 <i>R</i> ,3 <i>aR</i> ,7 <i>aR</i>)-29b Y SU CARBAMATO (-)-(2 <i>S</i> ,3 <i>aS</i> ,7 <i>aS</i>)-30b.....	287
II.4.3.2. DERIVADOS DE CONFIGURACIÓN (2<i>R</i>[*],3<i>aS</i>[*],7<i>aS</i>[*]).....	289
II.4.3.2.1. SÍNTESIS QUÍMICA DEL CARBAMATO RACÉMICO	289
II.4.3.2.2. RESOLUCIÓN CINÉTICA DEL α -AMINOÉSTER (<i>R</i> [*] , <i>S</i> [*] , <i>S</i> [*])-29b MEDIANTE PROCESOS DE ALCOXICARBONILACIÓN ENZIMÁTICA	290
CONCLUSIONES	291
PARTE EXPERIMENTAL.....	295
<u>II.4.5.1. GENERAL</u>	<u>297</u>
<u>II.4.5.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS</u>	<u>298</u>
<u>II.4.5.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS</u>	<u>300</u>
II.4.5.3.1. Síntesis del Ácido (2 <i>S</i> [*] ,3 <i>aS</i> [*] ,7 <i>aS</i> [*])-Octahidroindol-2-carboxílico [(2 <i>S</i> [*] ,3 <i>aS</i> [*] ,7 <i>aS</i> [*])-28]	300
II.4.5.3.2. Síntesis del (2 <i>S</i> [*] ,3 <i>aS</i> [*] ,7 <i>aS</i> [*])-Octahidroindol-2-carboxilato de Metilo [(2 <i>S</i> [*] ,3 <i>aS</i> [*] ,7 <i>aS</i> [*])-29a]	300
II.4.5.3.3. Síntesis del Carbamato (2 <i>S</i> [*] ,3 <i>aS</i> [*] ,7 <i>aS</i> [*])- <i>N</i> -Aliloxycarbonil-octahidroindol-2-carboxilato de Metilo [(2 <i>S</i> [*] ,3 <i>aS</i> [*] ,7 <i>aS</i> [*])-30a]	300
II.4.5.3.4. Síntesis del (2 <i>S</i> [*] ,3 <i>aS</i> [*] ,7 <i>aS</i> [*])-Octahidroindol-2-carboxilato de Bencilo [(2 <i>S</i> [*] ,3 <i>aS</i> [*] ,7 <i>aS</i> [*])-29b]	301
II.4.5.3.5. Síntesis del Carbamato (2 <i>S</i> [*] ,3 <i>aS</i> [*] ,7 <i>aS</i> [*])- <i>N</i> -Aliloxycarbonil-octahidroindol-2-carboxilato de Bencilo [(2 <i>S</i> [*] ,3 <i>aS</i> [*] ,7 <i>aS</i> [*])-30b]	301

II.4.5.3.6. Procedimiento General para la Resolución Cinética Enzimática de los Aminoésteres (2S*,3aS*,7aS*)-29a y (2S*,3aS*,7aS*)-29b por Alcoxicarbonilación.....	302
II.4.5.3.7. Preparación del Carbamato Racémico (2S*,3aS*,7aS*)- y Ópticamente Activo (2R,3aR,7aR)-N- (terc-Butoxicarbonil)octahidro-indol-2-carboxilato de Bencilo (32)	302
<u>II.4.5.4. DATOS EXPERIMENTALES</u>	303
CAPÍTULO 5. Síntesis química de α-aminofosfonatos cíclicos y resolución cinética enzimática.....	309
ANTECEDENTES.....	311
<u>II.5.1.1. ESTRUCTURA Y APLICACIONES</u>	314
<u>II.5.1.2. PREPARACIÓN DE AMINOFOSFONATOS CÍCLICOS</u>	315
II.5.1.2.1. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE ÁCIDOS AMINOFOSFÓNICOS EN FORMA RACÉMICA.....	315
II.5.1.2.2. SÍNTESIS DE ÁCIDOS AMINOFOSFÓNICOS Y DERIVADOS ÓPTICAMENTE ACTIVOS	318
<u>II.5.1.3. RESOLUCIONES CINÉTICAS ENZIMÁTICAS PARA LA OBTENCIÓN DE AMINOFOSFONATOS QUIRALES</u>	321
OBJETIVOS.....	325
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	329
<u>II.5.3.1. SÍNTESIS QUÍMICA DE DERIVADOS DE ÁCIDOS α-AMINOFOSFÓNICOS</u>	332

II.5.3.1.1. SÍNTESIS DE LAS LACTAMAS N-PROTEGIDAS	
34a-c	333
II.5.3.1.2. REDUCCIÓN DEL GRUPO CARBONILO.	
PREPARACIÓN DE LOS HEMIAMINALES 35a-c	333
II.5.3.1.3. METILACIÓN FORMAL DEL GRUPO HIDROXILO	
PARA DAR LUGAR A LOS ÉTERES DE HEMIAMINAL 36a-c	335
II.5.3.1.4. PREPARACIÓN DE LOS α-AMINOFOSFONATOS	
PROTEGIDOS (\pm)-37a-c	336
II.5.3.1.5. DESPROTECCIÓN DEL GRUPO AMINO PARA LA	
OBTENCIÓN DE LOS α -AMINOFOSFONATOS (\pm)-38a-c.....	337
II.5.3.1.6. SÍNTESIS DE LOS CARBAMATOS DE ALILO (\pm)-	
40a-c Y DESPROTECCIÓN PARA OBTENER LOS α -	
AMINOFOSFONATOS LIBRES (\pm)-38a-c.....	338
<u>II.5.3.2. RESOLUCIÓN CINÉTICA ENZIMÁTICA MEDIANTE</u>	
<u>PROCESOS DE ALCOXICARBONILACIÓN DE LOS α-</u>	
<u>AMINOFOSFONATOS RACÉMICOS 38a-c</u>	340
II.5.3.2.1. RESOLUCIÓN DEL (PIRROLIDIN-2-	
IL)FOSFONATO DE DIMETILO (\pm)-38a.....	341
II.5.3.2.2. RESOLUCIÓN DEL (PIPERIDIN-2-IL)FOSFONATO	
DE DIMETILO (\pm)-38b	346
II.5.3.2.3. RESOLUCIÓN DEL (AZEPAN-2-IL)FOSFONATO	
DE DIMETILO (\pm)-38c	347
CONCLUSIONES	349
PARTE EXPERIMENTAL	353
<u>II.5.5.1. GENERAL</u>	355
<u>II.5.5.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS</u>	356
<u>II.5.5.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS</u>	358

II.5.5.3.1. Procedimiento General para la Protección de Lactamas con el Resto Benciloxycarbonilo. Síntesis de los Compuestos 34a-c.....	358
II.5.5.3.2. Síntesis del 2-Hidroxi-pirrolidina- y 2-Hidroxi-azepina-1-carboxilato de Bencilo (35a,c).....	358
II.5.5.3.3. Síntesis del 2-Hidroxi-piperidina-1-carboxilato de Bencilo (35b).....	359
II.5.5.3.4. Síntesis del 2-Metoxi-pirrolidina- y 2-Metoxi-azepano-1-carboxilato de Bencilo (36a,c).....	359
II.5.5.3.5. Síntesis del 2-Metoxi-piperidina-1-carboxilato de Bencilo (36b).....	360
II.5.5.3.6. Procedimiento General para la Síntesis de los Aminofosfonatos Protegidos Racémicos 37a-c	360
II.5.5.3.7. Procedimiento General para la Hidrogenación de los Compuestos 37a-c. Síntesis de los α -Aminofosfonatos (\pm)-38a-c	360
II.5.5.3.8. Procedimiento General para la Derivatización de α -Aminofosfonatos. Síntesis de los Carbamatos de Alilo (\pm)-40a-c	361
II.5.5.3.9. Procedimiento General para la Desprotección de los Carbamatos de Alilo 40a,b para Obtener los α -aminofosfonatos 38a,b	361
II.5.5.3.10. Protección de la Fosfoprolina 38a con el Resto Tosilo. Síntesis de la Sulfonamida Racémica 41a.....	362
II.5.5.3.11. Procedimiento General para la Resolución Cinética Enzimática de los Aminofosfonatos (\pm)-38a-c por Alcoxicarbonilación	362
II.5.5.4. DATOS EXPERIMENTALES.....	363
REFERENCIAS	373

INTRODUCCIÓN

El objetivo fundamental de esta Tesis Doctoral es la preparación estereoselectiva de diferentes derivados quirales de tipo amina y aminoácido. Para ello, y dada la creciente necesidad de desarrollar procesos respetuosos con el medio ambiente, se ha combinado el uso de procesos químicos convencionales con el desarrollo de biotransformaciones. La Biocatálisis es una de las metodologías encuadradas en el área de la Química Sostenible (“Green Chemistry”), y está jugando un papel cada día más importante en la síntesis industrial de compuestos de interés debido a que se ajusta perfectamente a muchos de sus principios básicos. Por este motivo, parece oportuno incluir una breve introducción acerca de qué es la Química Sostenible y qué lugar ocupan en ella los biocatalizadores, así como explicar el modo de actuación de estos, especialmente el de las lipasas, por ser los enzimas empleados en este trabajo de investigación.

0.1. QUÍMICA SOSTENIBLE

Las empresas químicas, tanto farmacéuticas como de cualquier otra índole, están siendo cada vez más reguladas por parte de los organismos competentes para que desarrollen procesos benignos con el medio ambiente, lo cual debe ser compatible con ciertas restricciones económicas, de calidad y de tiempo para que los procesos químicos industriales sean viables.¹ El objetivo de esta aproximación es diseñar productos y procesos innovadores que no sólo sean competitivos, sino que también cumplan criterios de *sostenibilidad*, concepto introducido en 1987 por la Comisión Mundial de Medio Ambiente y Desarrollo y definido como “el desarrollo que satisface las necesidades actuales pero sin comprometer la capacidad de futuras generaciones para satisfacer las suyas propias”.² Esta tendencia hacia lo que se conoce como *tecnologías sostenibles* se engloba dentro de dos conceptos como son la “Green Chemistry” (Química Verde o Química Sostenible) y la “White Biotechnology” (Biotecnología Blanca o Biotecnología Industrial), los cuales relacionan estos procesos llevados a cabo de un modo medioambientalmente aceptable o minimizando su toxicidad.³ En este contexto la Biocatálisis se presenta como una metodología sintética muy útil, ya que se trata de una de las tecnologías más ecológicas para la síntesis de moléculas quirales dado que los enzimas actúan con elevadas regio- y estereoselectividades en condiciones suaves de reacción.⁴

La aplicación de los 12 principios de la Química Sostenible o Química Verde, los cuales han sido recogidos de forma nemotécnica en el término

¹ a) J. M. Woodley, *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 321-327; b) H.-P. Meyer, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 180-188.

² K. Buchholz, V. Kasche, U. T. Bornscheuer, *Biocatalysts and enzyme technology*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2005**.

³ M. J. Hernáiz, A. R. Alcántara, J. I. García, J. V. Sinisterra, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 9422-9437.

⁴ a) J. Tao, J.-H. Xu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 43-50; b) I. Andrews, P. Dunn, J. Hayler, B. Hinkley, D. Hughes, B. Kaptein, K. Lorenz, S. Mathew, T. Rammeloo, L. Wang, A. Wells, T. D. White, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 22-30; c) C. M. Clouthier, J. N. Pelletier, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585-1605.

inglés PRODUCTIVELY (productivamente) y se detallan a continuación, puede aumentar la eficacia de las síntesis químicas:⁵

- 1.- **Prevent wastes** (Minimizar la generación de residuos en vez de limpiar o tratar los que se han formado)
- 2.- **Renewable materials** (Utilizar materias primas renovables siempre que sea técnicamente posible y viable económicamente)
- 3.- **Omit derivatization steps** (Evitar pasos de protección y desprotección innecesarios, porque requieren el uso de reactivos adicionales y generan más cantidad de residuos)
- 4.- **Degradable chemical products** (Emplear productos químicos que, al final de su función, se degraden en otros inocuos para el medio ambiente)
- 5.- **Use safe chemicals** (Diseñar métodos sintéticos que utilicen y generen sustancias que posean poca o nula toxicidad tanto para la salud humana como para el medio ambiente)
- 6.- **Catalytic reagents** (Utilizar catalizadores lo más selectivos posible en lugar de reactivos estequiométricos)
- 7.- **Temperature, pressure ambient** (Condiciones suaves de reacción para reducir el consumo energético, teniendo en cuenta su impacto ambiental y económico)
- 8.- **In-process monitoring** (Desarrollar métodos analíticos que permitan una detección en tiempo real para prevenir y controlar la formación de sustancias peligrosas)
- 9.- **Very few auxiliary substances** (Minimizar el uso de sustancias auxiliares cuando sea posible y, en caso de necesidad, garantizar su inocuidad)
- 10.- **E-factor, maximise feed in product** (Economía atómica: diseñar procesos eficaces que maximicen la incorporación de los materiales utilizados en los productos finales. E = residuos/productos)

⁵ a) S. L. Y. Tang, R. L. Smith, M. Poliakoff, *Green Chem.* **2005**, *7*, 761-762; b) N. Ran, L. Zhao, Z. Chen, J. Tao, *Green Chem.* **2008**, *10*, 361-372; c) P. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301-312; d) T. Hudlicky, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3995-3997.

Introducción

11.- Low toxicity of chemical products (Sintetizar productos químicos de baja toxicidad, preservando su efectividad)

12.- Yes, it is safe (Química segura. Emplear las sustancias en la forma adecuada para minimizar el riesgo de accidentes como fugas, explosiones o fuegos)

0.2. IMPORTANCIA DE LA QUIRALIDAD EN LA INDUSTRIA. BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL

Como es bien sabido desde hace décadas, prácticamente todos los acontecimientos bioquímicos que tienen lugar en un organismo están gobernados por enzimas y, por tanto, se llevan a cabo en un entorno quiral. Por eso parece obvio pensar que los dos enantiómeros de un compuesto bioactivo dado, como puede ser un fármaco o un producto agroquímico, presenten distintas respuestas biológicas.⁶ Por eso los dos enantiómeros de una misma molécula deben ser considerados como especies diferentes a pesar de poseer propiedades fisicoquímicas idénticas. El isómero que presenta una mayor actividad se conoce como *eutómero*, mientras que su homólogo de menor, o incluso indeseada actividad, se denomina *distómero*. El intervalo de acción de este último puede variar entre una actividad baja (aunque positiva), nula o tóxica. Probablemente por sus trágicas consecuencias, el ejemplo más conocido de un medicamento cuyo distómero puede causar serios efectos secundarios es la Talidomida.⁷ Este fármaco, desarrollado a mediados del siglo pasado, fue ampliamente utilizado por sus propiedades analgésicas, tranquilizantes y, especialmente, por su capacidad para aliviar las náuseas durante el embarazo. Sin embargo, fue administrado en su forma racémica, lo que originó que miles de bebés nacieran con deformaciones. Investigaciones posteriores revelaron que era debido a que solamente el enantiómero *R* presenta propiedades terapéuticas, siendo el *S* el responsable de las malformaciones en los embriones.⁸ A pesar de esto, la

⁶ R. Crossley, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 8155-8178.

⁷ B. Kasprzyk-Hordern, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4466-4503.

⁸ Aunque actualmente se sabe que el isómero "seguro" de la talidomida puede convertirse en su epímero teratogénico a pH fisiológico, se está volviendo a utilizar en algunos países con el apoyo de la Organización Mundial de la Salud (OMS), porque se ha confirmado su

mayor parte de los agentes bioactivos quirales se utilizan actualmente como racematos debido a la dificultad que supone la separación de sus enantiómeros, al alto coste de su síntesis estereoselectiva o, simplemente, porque en el momento del descubrimiento del fármaco sólo se tuvo en cuenta la mezcla racémica para los estudios de farmacología, toxicología y teratología clínicas. Sin embargo, esta situación ha cambiado con el paso del tiempo debido a la creciente presión ejercida por la legislación de los países más desarrollados, obligando a superar pruebas cada vez más estrictas antes de permitir la salida al mercado de un fármaco.

Actualmente, más del 50% de los medicamentos disponibles comercialmente son moléculas quirales⁹ y, aunque la utilización de la catálisis metálica para su síntesis ha prevalecido en los últimos años,¹⁰ la reproducibilidad de los procesos, la estabilidad de los catalizadores y el tratamiento de los residuos suelen ser problemáticos. Por este motivo, las compañías farmacéuticas, entre otras, están integrando cada vez mayor variedad de métodos para la síntesis asimétrica de sus productos. Si esto se une a la tendencia de las empresas a desarrollar procesos que reduzcan los costes e incrementen los criterios de calidad, seguridad, salud y respeto hacia el medio ambiente, tenemos como resultado un traslado del trabajo de investigación en el campo de la Biocatálisis de la academia a la industria.¹¹ Así, las biotransformaciones se han convertido en una buena alternativa ya que, debido a su alta eficacia tanto química como energética, se adaptan perfectamente a los principios de la Química Sostenible, previniendo la generación de desechos y limitando el uso de reactivos orgánicos peligrosos. Además, tiene lugar una economía importante de átomos al evitar secuencias de protección y desprotección.

Los enzimas son unos catalizadores dignos de ser destacados, puesto que son capaces de aceptar un amplio número de moléculas

eficacia contra enfermedades como la lepra y en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, como el mieloma múltiple, aplicándose especialmente en casos en los que los tratamientos convencionales (quimio y radioterapia) no tienen éxito o no son viables.

⁹ K. K.-C. Liu, S. M. Sakya, C. J. O'Donnell, A. C. Flick, J. Li, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1136-1154.

¹⁰ J. Magano, J. R. Dunetz, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 2177-2150.

¹¹ R. Wohlgemuth, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 713-724.

Introducción

complejas como sustratos, presentando además una elevada enantio-, quimio- y regioselectividad. Por otro lado, debido a esta selectividad en condiciones suaves de reacción, las biotransformaciones ofrecen grandes ventajas sobre la síntesis química convencional. Así, además de generar menos residuos y emisiones de gas, se evitan problemas de isomerización, racemización, epimerización y reordenamiento químico de los compuestos.¹²

Sin embargo, para que la expansión de la Biocatálisis en el ámbito industrial sea factible, es necesario desarrollar tecnologías que permitan el diseño de nuevos enzimas modificados en el laboratorio, los cuales sean capaces de llevar a cabo transformaciones concretas para las que han sido concebidos, y ser eficaces, además, en la elaboración de productos a gran escala.¹³

0.3. BIOCATÁLISIS

0.3.1. DESARROLLO HISTÓRICO

Las células vivas son sistemas extraordinariamente complejos donde tienen lugar un elevado número de reacciones químicas, mediadas por unos catalizadores denominados enzimas.¹⁴ Sin su existencia, la química llevada a cabo por estas células, llamada metabolismo, ocurriría demasiado despacio como para permitir vivir al organismo.¹⁵

La historia de los enzimas y su aplicación en Biocatálisis se remonta a miles de años atrás, en el antiguo Egipto. Allí, algunos enzimas procedentes de microorganismos se usaron, por ejemplo, en la cocina, en la producción de alcohol o en la fabricación de queso. Pero a lo largo de los siglos XVIII y XIX, la aplicación de la Biocatálisis se ha visto desarrollada en unas bases más científicas.

¹² a) R. N. Patel, *ACS Catal.* **2011**, *1*, 1056-1074; b) J. Magano, J. R. Dunetz, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 2177-2250; c) S. D. Roughley, A. M. Jordan, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3451-3479.

¹³ W.-D. Fessner, N. J. Turner, M.-X. Wang, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2189-2190.

¹⁴ D. E. Roberston, U. T. Bornscheuer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 164-165.

¹⁵ F. Beisson, A. Tiss, C. Riviere, R. Verger, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2000**, 133-153.

Dos de los hitos históricos más importantes que permiten considerar la Biocatálisis como una herramienta de trabajo útil para los químicos orgánicos son el descubrimiento en 1984 de la posibilidad de utilizar la catálisis enzimática en disolventes orgánicos¹⁶ y, por otro lado, el desarrollo de nuevos enzimas aparte de los existentes en la naturaleza, gracias a la tecnología del ADN recombinante y a la posibilidad de modificar la estructura de las proteínas, prácticas habituales desde principios del siglo XXI.¹⁷

El uso de las biotransformaciones se está expandiendo y cobrando importancia rápidamente en el campo de la biotecnología industrial.¹⁸ Actualmente, los enzimas son ampliamente utilizados en la síntesis de polímeros y en la elaboración de productos tanto farmacéuticos como alimentarios, procesos en los cuales se requiere una alta selectividad por parte de los biocatalizadores y, a su vez, una amplia aceptación de sustratos en el centro catalítico de los enzimas. Además, también pueden obtener beneficio de esta práctica otras áreas como los (bio)materiales y la bionanotecnología.¹⁹

Sin embargo, actualmente la Biocatálisis sólo cubre una parte del amplio espectro de reacciones químicas existentes. Por eso, uno de los actuales retos de la comunidad científica es el diseño de biocatalizadores capaces de llevar a cabo nuevas transformaciones, haciendo uso de herramientas como el diseño computacional *de novo*, la metagenómica, la mutagénesis y la evolución dirigida. Aunque el muestreo de enzimas sigue siendo una técnica habitual en Biocatálisis, un conocimiento de su

¹⁶ a) A. Zaks, A. M. Klibanov, *Science* **1984**, *224*, 1249-1251; b) G. Carrea, S. Riva, *Organic synthesis with enzymes in non-aqueous media*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2008**.

¹⁷ Revisiones bibliográficas: a) C. A. Tracewell, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 3-9; b) M. T. Reetz, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5767-5778; c) C. Jäckel, D. Hilvert, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 753-759; d) A. S. Bommarius, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 793-794; e) S. Lutz, *Science* **2010**, *329*, 285-287; f) M. B. Quin, C. Schmidt-Dannert, *ACS Catal.* **2011**, *1*, 1017-1021.

¹⁸ a) R. Wohlgemuth, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 713-724; b) S. Sánchez, A. L. Demain, *Org. Process. Res. Dev.* **2011**, *15*, 224-230; c) S. Wenda, S. Illner, A. Mell, U. Kragl, *Green Chem.* **2011**, *13*, 3007-3047.

¹⁹ a) A. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 548-556; b) S. Panke, M. Held, M. Wubbolts, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 272-279; c) V. Gotor, S. Flitsch, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 185-186.

Introducción

estructura tridimensional puede hacer posible el diseño racional de las modificaciones en su secuencia de aminoácidos con el fin de sintetizar nuevos catalizadores (ingeniería de proteínas) con importantes aplicaciones en el campo sintético, mecanístico, industrial y médico.

Los tres objetivos principales que plantea actualmente el diseño molecular son: explicar el comportamiento de los enzimas, sugerir cómo cambiar la selectividad de una reacción mediante modificaciones en el sustrato, enzima o condiciones de reacción y por último, predecir el grado de estereoselectividad de una reacción catalizada por un enzima.

Además, la elevada promiscuidad catalítica que presentan muchos biocatalizadores, entendida esta como la habilidad que presenta su centro activo para catalizar distintas transformaciones,²⁰ está siendo un área en expansión que permitirá abrir, en un futuro, un amplio abanico de posibilidades para llevar a cabo procesos industriales, especialmente en el sector farmacéutico.

0.3.2. ENZIMAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS

El descubrimiento a finales del siglo pasado de la posibilidad de extender la Biocatálisis tradicional en medios acuosos a disolventes orgánicos ha permitido aplicar esta metodología a la preparación de gran cantidad de productos orgánicos de interés industrial que presentan escasa solubilidad o estabilidad en agua.²¹ Además, la eliminación del agua del medio de reacción es un proceso tedioso y caro debido a su elevado punto de ebullición y calor de vaporización, pudiendo ocurrir otras reacciones laterales no deseadas como hidrólisis, racemización, polimerización o descomposición.

²⁰ a) K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231-238; b) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504-4523; c) A. Babbie, N. Tokuriki, F. Hollfelder, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 200-207; d) Q. Wu, B.-K. Liu, X.-F. Lin, *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 1966-1988; e) M. S. Humble, P. Berglund, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3391-3401.

²¹ a) A. M. Klibanov, *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 141-144; b) A. M. Klibanov, *Nature* **2001**, *409*, 241-246; c) A. Ghanem, H. Y. Aboul-Enein, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3331-3351.

A continuación se muestran las ventajas que pueden ofrecer las biotransformaciones en disolventes orgánicos frente al uso de los convencionales medios acuosos:²²

- La recuperación de los productos es más sencilla debido al bajo punto de ebullición de los disolventes orgánicos, aumentando con ello el rendimiento aislado de los mismos.
- Los sustratos no polares pueden ser transformados más rápidamente debido a su mayor solubilidad.
- Se minimiza la desactivación del enzima y/o su inhibición por los sustratos o productos (por ejemplo en sistemas bifásicos).
- Apenas tienen lugar reacciones laterales indeseadas, como pudieran ser fenómenos de hidrólisis.
- Los enzimas inmovilizados se pueden recuperar por simple filtración al final del proceso.
- La desnaturalización de los enzimas también se ve minimizada (excepto en etanol).
- El equilibrio termodinámico se desplaza en el sentido de favorecer la síntesis frente a la hidrólisis.

Aunque, naturalmente, los disolventes orgánicos pueden tener efectos nocivos sobre el medio ambiente, es posible su reciclaje con el propósito de reutilizarlos como disolventes o en mezclas de combustibles alternativos.

Más recientemente, el uso de enzimas en medios no acuosos se ha extendido a través del empleo de fluidos supercríticos²³ y líquidos iónicos,²⁴

²² a) K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry*, 5th Ed., Springer, New York (EEUU), **2004**; b) A. Ghanem, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1721-1754.

²³ a) O. Miyawaki, K. Nakamura en *Enzyme reactions in supercritical fluids. Lipid Biotechnology*, Eds. T. M. Kuo, H. W. Gardner, Marcel Dekker Inc., New York (EEUU), **2002**, capítulo 34, 689-702; b) Kamat, G. Critchley, E. J. Beckman, A. J. Russell, *Biotecnol. Bioeng.* **2004**, *46*, 610-620; c) P. Lozano, T. de Diego, J. L. Iborra en *Immobilization of enzymes and cells*, Ed. J. M. Guisan, Humana Press Inc, Totowa (New Jersey, EEUU), **2006**, capítulo 24, 269-282; d) Z. J. Dijkstra, R. Merchant, J. T. F. Keurentjes, *J. Supercrit. Fluids* **2007**, *41*, 102-108.

²⁴ a) R. A. Sheldon, R. M. Lau, M. J. Sorgedragar, F. van Rantwijk, K. R. Sheldon, *Green Chem.* **2002**, *4*, 147-151; b) F. Rantwijk, R. Sheldon, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2757-2785; c)

Introducción

que poseen propiedades modulables en su actuación como disolventes. Además, su uso reduce la cantidad de compuestos volátiles de desecho, lo que supone un importante paso en la dirección marcada por los principios de la Química Verde, siendo posible en el caso de los líquidos iónicos su sencillo reciclaje y utilización.²⁵

0.3.3. INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

En la práctica, el empleo de enzimas aislados como catalizadores en síntesis orgánica conlleva, principalmente, cuatro inconvenientes:

- su inestabilidad en las condiciones de reacción necesarias para llevar a cabo la transformación,
- problemática recuperación del enzima para su reutilización,
- difícil separación de reactivos y/o productos,
- y baja productividad en procesos industriales debido a la inhibición de los enzimas a concentraciones altas de sustratos y/o productos.

Estos problemas de estabilidad, recuperación y reciclabilidad se pueden solucionar, al menos en parte, mediante la inmovilización del enzima, técnica que incluye tanto la adhesión del mismo sobre un soporte sólido, bien por adsorción o por enlaces covalentes, como la unión de moléculas proteicas entre sí (entrecruzamiento o “crosslinking”). Otra alternativa que puede utilizarse es confinar el biocatalizador en un área restringida del que no pueda salir, pero que permita mantener su actividad catalítica y una libre entrada y salida tanto de los sustratos como de los productos (matrices sólidas de gel o polímero, micelas, fibras huecas o reactores de membrana). De esta forma, la catálisis homogénea que tenía lugar empleando un enzima nativo, se convierte en heterogénea, con las ventajas que esto supone:

- fácil separación del catalizador para su reciclaje (mediante procesos de filtración, centrifugación, etc.),

P. Domínguez de María, Z. Maugeri, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 220-225; d) http://www.scitopics.com/Biocatalysis_in_ionic_liquids.html

²⁵ P. Lozano, *Green Chem.* **2010**, *12*, 555-569.

- aplicación en procesos en continuo,
- incremento de la estabilidad del enzima a variaciones de pH y temperatura, etc.

Sin embargo, estos métodos de inmovilización no suelen ser efectivos al 100%, observándose en muchos casos una disminución de la actividad debido a modificaciones químicas en la superficie de la proteína o a problemas de difusión y acceso del sustrato al centro activo de la misma. Además, el rendimiento del proceso de unión del enzima al soporte no suele ser muy alto, y el precio de estos puede llegar a ser superior al del catalizador mismo, por lo que es necesario llegar a un compromiso que asegure la rentabilidad de su empleo en los procesos industriales. Así, la aplicación comercial de los biocatalizadores depende fundamentalmente del desarrollo de métodos efectivos de inmovilización que permitan incrementar la estabilidad, eficiencia y selectividad de los enzimas, pero con unos costes razonables que los hagan industrial y comercialmente viables.²⁶

Por otro lado, aparte de las económicas, los biocatalizadores inmovilizados pueden ofrecer ventajas a nivel práctico y de aplicación ya que, al contrario que los enzimas libres que pueden penetrar en la piel, son hipoalergénicos, lo que lleva a la consecución de unas condiciones de trabajo más seguras.

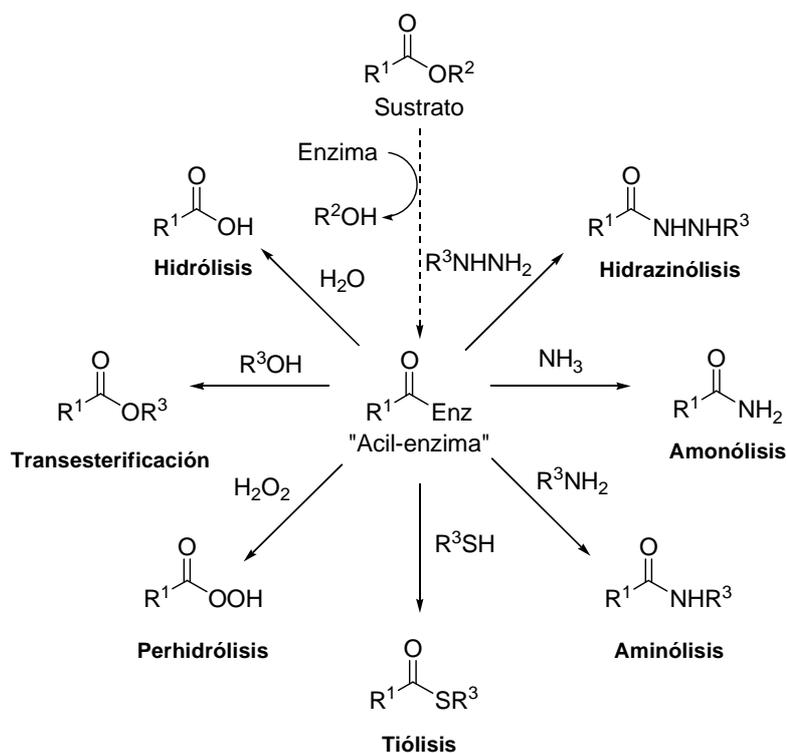
0.3.4. LIPASAS

Las lipasas son enzimas pertenecientes a la familia de las serín-hidrolasas que se pueden encontrar en animales, plantas, levaduras, hongos y bacterias. Por ejemplo, en humanos y animales superiores, las lipasas desempeñan un papel muy importante en el proceso nutricional, ya que se encargan de hidrolizar los triacilglicéridos ingeridos en la dieta y que no pueden atravesar las paredes intestinales para su posterior aprovechamiento en la producción de energía química.

²⁶ a) D. N. Tran, K. J. Balkus Jr., *ACS Catal.* **2011**, *1*, 956-968; b) R. A. Sheldon, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 213-223.

Introducción

Este tipo de enzimas, además de ser, probablemente, las hidrolasas más utilizadas en síntesis orgánica para la producción de compuestos ópticamente activos, presentan gran variedad de aplicaciones en otras áreas, como la alimentación (producción de queso, modificación de grasas naturales y aceites, etc.) o la higiene (enzimas en detergentes para la ropa, síntesis de ésteres para el cuidado personal, etc.).² Esta variada aplicabilidad es debida a que las lipasas tienen la capacidad de aceptar una gran variedad de compuestos como sustratos (Esquema 0-1).



Esquema 0-1. Transformaciones catalizadas por lipasas

Así, además de su reacción más conocida tradicionalmente, la hidrólisis de ésteres en medios acuosos o en disolventes orgánicos, las lipasas son capaces de catalizar en disolventes orgánicos anhidros y dependiendo del nucleófilo utilizado, un amplio número de reacciones,

como son la alcoholólisis (o transesterificación), la perhidrólisis, la tiólisis, la aminólisis, la amonólisis o la hidrazinólisis, entre otras.²⁷

La diferencia más importante que presentan las lipasas frente a otros enzimas similares, como pueden ser las esterasas, es su interacción fisicoquímica con los sustratos. Mientras que las esterasas muestran una cinética de Michaelis Menten (considerada “normal”) según la cual su actividad aumenta con la concentración de sustrato, las lipasas no son prácticamente activas cuando el sustrato está disuelto en su forma monomérica (concentración baja). Sin embargo, cuando se supera el límite de solubilidad de éste en un disolvente acuoso, y comienza a formarse una segunda fase lipofílica, tiene lugar un acusado aumento de la actividad de la lipasa. El hecho de que las lipasas no hidrolicen los sustratos hasta que no se supere una concentración determinada (concentración micelar crítica) es conocido como *activación interfacial*. La razón para este fenómeno ha resultado ser un proceso de reorganización en la estructura del enzima. Una lipasa disuelta en agua se encuentra en su forma inactiva, puesto que un segmento de su cadena polipeptídica cubre su centro activo a modo de “tapa”. Sin embargo, cuando el enzima se pone en contacto con una interfase agua/lípido, se produce un cambio conformacional en el que esta cadena con estructura de α -hélice se abre, liberando el acceso al centro activo y, por tanto, activando la lipasa.^{21a}

Estos catalizadores no requieren del uso de un cofactor para su correcto funcionamiento (normalmente con precios muy elevados) y se pueden usar en su forma libre o inmovilizada. Al contrario que los catalizadores metálicos, las lipasas son muy estables, de fácil adquisición, generalmente baratas y, como se ha comentado anteriormente, aceptan un gran número de sustratos. Actúan en la interfase agua-lípido, por lo que no requieren sustratos especialmente solubles en agua, incluso algunas lipasas presentan especial afinidad por medios hidrofóbicos. Así, su eficiencia en disolventes orgánicos, su seguridad en el uso, su fácil manipulación y las condiciones suaves en las que operan (temperatura

²⁷ a) V. Gotor, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2189-2197; b) C. Carboni-Oerlemans, P. Domínguez de María, B. Tuin, G. Bargeman, A. van der Meer, R. van Gemert, *J. Biotechnol.* **2006**, *126*, 140-151.

Introducción

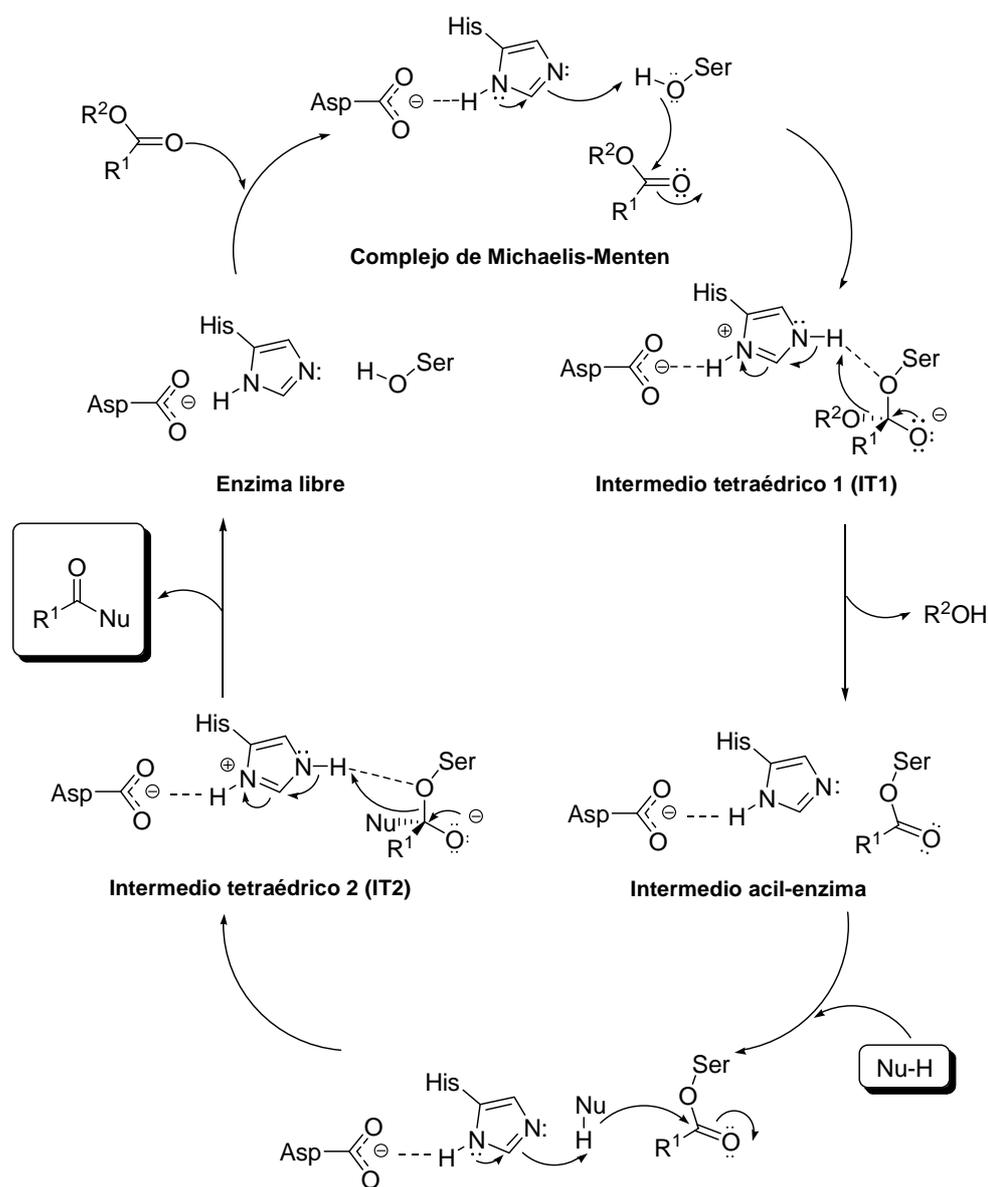
ambiente y pH neutro), hacen de ellas herramientas muy útiles y atractivas para la síntesis orgánica. Además de estos aspectos prácticos, la mayoría de los enzimas son respetuosos con el medio ambiente y completamente biodegradables, ciñéndose estrechamente a los principios dictados por la Química Sostenible.

0.3.4.1. Mecanismo de Actuación

Teniendo en cuenta el conocimiento que se posee actualmente de la estructura y el modo de actuación de los enzimas, es difícil imaginar que aún queden bioquímicos que un día pensaron que los enzimas no poseían una estructura ordenada.²⁸ Fue en 1926, tras la cristalización de una ureasa, cuando se llegó a la conclusión de que no sólo tenían una estructura perfectamente definida, sino que la destrucción de ésta podía anular su actividad enzimática.

En 1894, E. Fischer propuso el primer mecanismo de acción enzimática, el modelo rígido “llave-candado” como modo de unión sustrato-enzima. Pero este modelo no podía explicar por qué numerosos enzimas podían catalizar la transformación de gran cantidad de compuestos con diferentes características estructurales, y no sólo de sus sustratos naturales. Por eso, cincuenta años después, Koshland Jr. estableció que la superficie del enzima era flexible, y que sólo el sustrato adecuado podía ser capaz de impulsar las interacciones adecuadas que conducen a la catálisis. Surge así el concepto de “*acoplamiento inducido*”, vigente actualmente, y que se puede comparar al modo de unión de una mano (sustrato) con un guante (enzima). Además, la proximidad y la orientación del sustrato y los grupos responsables de la catálisis son cruciales, ya que la labor fundamental de los enzimas es acercar las especies a través de una geometría determinada que favorezca la reacción, estabilizando los intermedios de mayor energía mediante interacciones electrostáticas, es decir, ayudando a las especies reaccionantes a cruzar la barrera de la energía de activación.

²⁸ D. Ringe, G. A. Petsko, *Science* **2008**, 320, 1428-1429.



Esquema 0-2. Mecanismo de actuación de las serín-hidrolasas

Las lipasas pueden diferir ampliamente en el número de aminoácidos presentes en su estructura primaria. Por ejemplo, la lipasa de *Candida rugosa* (CRL) contiene más de 500 aminoácidos, mientras que la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B) sólo posee 317. El rasgo común de todas ellas es que su centro activo está construido en torno a tres

Introducción

aminoácidos: serina (Ser), ácido aspártico (Asp) o glutámico (Glu) e histidina (His), conocidos como *triada catalítica*.^{21b} Esta triada catalítica, junto con algunos otros residuos estabilizantes de oxoaniones, regulan el poder catalítico de las lipasas y su mecanismo de actuación en la acilación de un nucleófilo en presencia de un éster, conocido como el de las serín-hidrolasas, se muestra en el Esquema 0-2.

La especial disposición de los grupos de la triada catalítica hace que enzima y sustrato se asocien de modo no covalente, disminuyendo el pK_a del hidroxilo de la serina y posibilitando un ataque nucleofílico de éste sobre el carbonilo del sustrato R^1COOR^2 . De este modo, el grupo acilo del sustrato queda unido covalentemente al enzima, formándose en primer lugar el intermedio tetraédrico 1 (IT1). Este sufre entonces una reorganización electrónica y atómica por la que se libera el alcohol R^2OH , regenerando el carbonilo y dando paso así al intermedio acil-enzima. En el siguiente paso, el nucleófilo (Nu-H) ataca al grupo carbonilo de dicho intermedio, formando de manera similar el intermedio tetraédrico 2 (IT2) que, finalmente, evoluciona para recuperar el catalizador y liberar el producto final de la reacción (R^1CONu).

0.3.4.2. Razones Cinéticas para la Selectividad

Como en cualquier otra reacción catalítica, un enzima (E) acelera la reacción disminuyendo la barrera energética entre el sustrato (S) y el producto (P), conocida como energía de activación (E_a).^{21a} Estudios cinéticos han revelado que en la reacción enzimática hay un paso de discriminación enantiomérica que origina la transformación más favorable de uno de los enantiómeros en detrimento del otro.²⁹ La estereoselectividad inducida por el enzima es debida a la diferencia de energía existente entre los complejos enzima-sustrato formados en el estado de transición para cada uno de los enantiómeros ($[ES_R]^\ddagger$ para el R y $[ES_S]^\ddagger$ para el S, $[EA]^\ddagger$ y $[EB]^\ddagger$ en el diagrama de la Figura 0-1). El valor de esta diferencia ($\Delta\Delta G^\ddagger$) es una medida directa de la selectividad de la reacción, y va a determinar también la pureza óptica del producto.

²⁹ T. Ema, *Curr. Org. Chem.* **2004**, 8, 1009-1025.

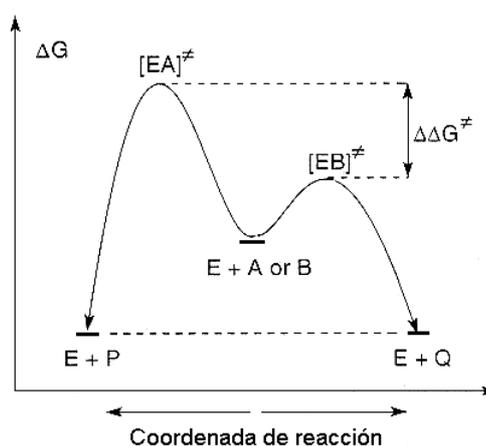


Figura 0-1. Diagrama de energía para una reacción enantioselectiva catalizada enzimáticamente

0.3.4.3. Enantioselectividad y Reconocimiento Quiral

Actualmente, cuando se diseña una biotransformación, se emplean muchos recursos y tiempo en la búsqueda del enzima más adecuado, de ahí que sea muy interesante y beneficioso poder predecir el mecanismo de reacción. De esta manera, desde que tuvo lugar la expansión de la Biotatálisis en los años 80, se han descrito varias reglas empíricas y modelos para explicar la formación de los productos enzimáticos.³⁰ Sin embargo, asignar la configuración absoluta de una molécula obtenida a través de una reacción catalizada con un determinado enzima es un método relativo, no absoluto, puesto que no está basado en la estructura molecular del compuesto, sino en las semejanzas con una segunda molécula cuya configuración ya esté establecida.³¹

Un modelo enzimático describe el mecanismo de la enantioselectividad en reacciones biocatalizadas sin predecir el grado de la misma, sino diciendo únicamente cuál es el enantiómero que reacciona más rápido. Un ejemplo clásico es la regla empírica de Kazlauskas para el reconocimiento quiral de las lipasas. Esta regla establece que la mayoría

³⁰ a) R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 2656-2665; b) K. Lemke, M. Lemke, F. Theil, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 6268-6273.

³¹ Q. Jing, R. J. Kazlauskas, *Chirality* **2008**, 20, 724-735.

Introducción

de las lipasas presentan la misma enantioselectividad hacia un sustrato concreto, aunque la enantioselectividad sea diferente. Esto se traduce en un modelo del centro activo de las lipasas que consiste en dos bolsillos o huecos de tamaños diferentes, uno grande (L, del inglés "large") y otro mediano (M, del inglés "medium") (Figura 0-2).

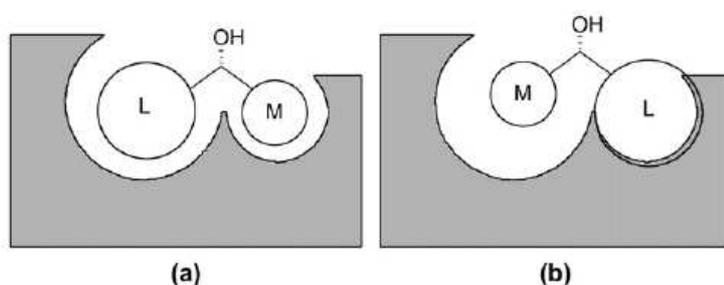


Figura 0-2. Enantiómero que reacciona más rápido (a) y más lento (b), en base al modelo del centro activo de las lipasas derivado de la regla de Kazlauskas

La enantioselectividad para un sustrato que posee un sustituyente grande y otro mediano (como es el caso del alcohol secundario de la figura, también válido para aminas primarias quirales) se explica asumiendo que, si el sustrato se somete a una resolución empleando una lipasa, el enantiómero que reacciona más rápido se une al centro activo como se muestra en la Figura 0-2a. Sin embargo, cuando reacciona el otro enantiómero, está obligado a acomodarse de tal forma que su sustituyente grande queda incrustado en el hueco de menor tamaño (Figura 0-2b). Las repulsiones estéricas que origina esta disposición hacen que la triada catalítica no pueda llevar a cabo su función, la energía de activación para la formación del intermedio tetraédrico 2 aumente y la velocidad de reacción sea menor. Asumiendo que el sustituyente más voluminoso tiene prioridad sobre el mediano a la hora de asignar la estereoquímica, reaccionará preferentemente el enantiómero *R*, tanto en reacciones de transesterificación (o aminólisis en el caso de las aminas) como de hidrólisis. Esta regla se ha aplicado con éxito a un gran número de lipasas, siendo su empleo muy extendido en el campo de la Biocatálisis.

La pureza enantiomérica de un compuesto quiral se expresa en términos del valor de su *exceso enantiomérico* (*ee*), que se define como:

$$\% ee_R = \frac{[R]-[S]}{[R]+[S]} \times 100 \text{ para } [R] > [S]$$

Ecuación 0-1

donde [R] es la concentración del enantiómero de configuración R, y [S] la correspondiente al enantiómero S. Así, para un compuesto racémico, el valor del *ee* es cero, mientras que para uno enantioméricamente puro alcanza el 100%.

Como las lipasas son quirales, tienen la capacidad de distinguir entre los dos enantiómeros de una mezcla racémica. El progreso del exceso enantiomérico del producto (*ee_p*) y del sustrato (*ee_s*) frente al grado de conversión para una resolución cinética se recoge en la Figura 0-3.

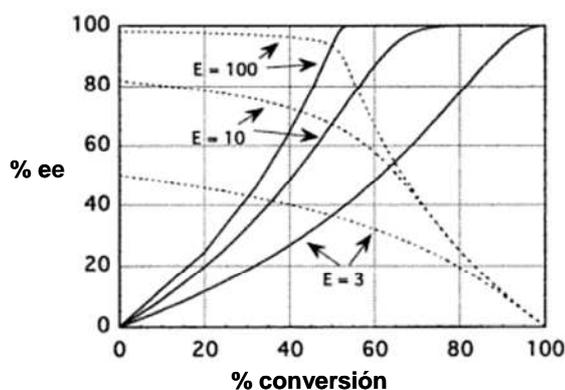


Figura 0-3. Representación de la evolución del *ee_p* (línea discontinua) y *ee_s* (línea continua) en función de la conversión, en una resolución cinética irreversible catalizada por una lipasa, dependiendo del valor de enantioselectividad (*E*) del proceso

Cuando la conversión es baja, el *ee_s* es muy pequeño o nulo porque el sustrato es aproximadamente racémico, y el enzima prácticamente sólo cataliza la transformación del enantiómero favorecido, obteniéndose un elevado *ee_p*. A medida que la reacción avanza, la concentración del enantiómero favorecido decrece y el enzima empieza a detectar una concentración relativa superior del otro enantiómero, aumentando la probabilidad de ser transformado. El parámetro elegido para describir la

Introducción

enantioselectividad del proceso se denomina *razón enantiomérica* (E), y su valor, adimensional, se define como la relación entre las constantes específicas de los dos enantiómeros:

$$E = \frac{(K_{\text{cat}}/K_M)_R}{(K_{\text{cat}}/K_M)_S}$$

Ecuación 0-2

donde K_{cat} es la constante de velocidad y K_M es la constante de Michaelis-Menten. Esta ecuación ha sido desarrollada en términos del exceso enantiomérico del sustrato (ee_S) o del producto (ee_P) y de la *conversión* (c).³²

$$E = \frac{\ln[1-c(1+ee_P)]}{\ln[1-c(1-ee_P)]} = \frac{\ln[1-c(1-ee_S)]}{\ln[1-c(1+ee_S)]}$$

Ecuación 0-3

donde c se define como:

$$c = \frac{ee_S}{ee_S + ee_P}$$

Ecuación 0-4

Como la estimación de la E mediante esta ecuación no es muy fiable, ya que los métodos empleados normalmente para calcular la conversión carecen de un alto grado de exactitud, se desarrolló otra ecuación donde E se expresa únicamente en función de ee_S y ee_P :

$$E = \frac{\ln\left[\frac{1-ee_S}{1+ee_S/ee_P}\right]}{\ln\left[\frac{1+ee_S}{1+ee_S/ee_P}\right]}$$

Ecuación 0-5

³² a) C.-S. Chen, S.-H. Wu, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2812-2817; b) C.-S. Chen, C. J. Sih, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 695-707.

0.3.5. NUEVAS TENDENCIAS

0.3.5.1. Promiscuidad Catalítica

Promiscuidad es un término introducido recientemente en el campo de la enzimología, pero ¿qué significado tiene? En rasgos generales, se puede decir que un enzima promiscuo es aquel que hace cosas que, en principio, no debería o, al menos, no está diseñado para hacer. A pesar de que en cursos básicos de introducción a la bioquímica se enseña que los enzimas son específicos tanto para los sustratos como para las reacciones que catalizan, a veces pueden alejarse, en mayor o menor medida, del papel que desempeñan en la naturaleza.³³

La promiscuidad se puede clasificar en tres categorías, aunque ninguna de ellas es excluyente, pudiendo darse combinaciones de las mismas:^{20a}

- de condición: cuando los enzimas presentan actividad catalítica en condiciones de reacción que difieren de las naturales, como los medios anhidros, las temperaturas extremas o las variaciones en el pH;
- de sustrato: cuando son capaces de transformar otros sustratos además de los habituales;
- y catalítica o enzimática: cuando los enzimas catalizan diferentes transformaciones químicas a través de distintos mecanismos y/o estados de transición.

A pesar de la novedad del término, en la bibliografía se pueden encontrar casos de reacciones biocatalizadas promiscuamente desde finales del siglo XIX y principios del XX, cuando se comenzó a estudiar la actividad de los enzimas en medios orgánicos o incluso la formación de enlaces C-C.³⁴

³³ a) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6032-6040; b) P. Berglund, S. Park, *Curr. Org. Chem.* **2005**, *9*, 325-336; c) O. Khersonsky, C. Roodveldt, D. S. Tawfik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 498-508.

³⁴ a) A. C. Hill, *J. Chem. Soc.* **1898**, *73*, 634-658; b) J. H. Kastle, A. S. Loevenhart, *Am. Chem. J.* **1900**, *24*, 491-525; c) C. Neuberg, J. Hirsch, *Biochem. Z.* **1921**, *115*, 282-310; d) P. Rona, E. Chain, R. Ammon, *Biochem. Z.* **1931**, *247*, 113-145.

Introducción

Algunos científicos consideran que, además de ser responsable de la formación de metabolitos secundarios, la promiscuidad de los enzimas fue el punto de partida para su evolución divergente. De esta forma, una ligera actividad sobre sustratos no naturales producida por una sola mutación, pudo convertir al enzima nativo en un catalizador mucho más eficiente, permitiendo sobrevivir al organismo. De una forma similar, en el laboratorio, una función promiscua puede llevar al desarrollo de catalizadores que proporcionen nuevas rutas sintéticas que no estén disponibles en ese momento. Así, la promiscuidad de condición se ha empleado a lo largo de muchos años para llevar a cabo reacciones con poca cantidad de agua, o incluso en medios anhidros, para favorecer la síntesis de ésteres frente a la hidrólisis. Además, la promiscuidad de sustrato también se ha explotado en numerosas aplicaciones sintéticas, lo que ha permitido su introducción en los procesos industriales. Recientemente, la promiscuidad catalítica, por la que los enzimas catalizan de forma accidental o inducida nuevas reacciones, se ha empezado a reconocer también como una herramienta de gran valor tanto en el campo de la investigación como de la síntesis, pudiendo encontrar nuevas funciones catalíticas en los enzimas tradicionales.

Por ejemplo, en los últimos años han aparecido múltiples casos de reacciones no convencionales catalizadas por enzimas hidrolíticas,^{20b} cuya función tradicional es la ruptura de enlaces empleando agua como nucleófilo. Así, se ha descrito la formación catalizada por lipasas y proteasas de enlaces C-C o C-heteroátomo a través de reacciones de Knoevenagel, aldólica, Henry, Mannich, Michael (y su versión aza-Michael) o Baylis-Hillman, entre otras,³⁵ e incluso reacciones de oxidación³⁶ o

³⁵ a) Y. A. Sonawane, S. B. Phadtare, B. N. Borse, A. R. Jagtap, G. S. Shankarling, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1456-1459; b) T. He, K. Li, M.-Y. Wu, X.-W. Feng, N. Wang, H.-Y. Wang, C. Li, X.-Q. Yu, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *67*, 189-194; c) K. P. Dhake, P. J. Tambade, R. S. Singhal, B. M. Bhanage, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 4455-4458; d) S.-J. Chai, Y.-F. Lai, J.-C. Xu, H. Zheng, Q. Zhu, P.-F. Zhang, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 371-375; e) M. López-Iglesias, E. Busto, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2345-2353.

³⁶ a) C. Branneby, P. Carlqvist, A. Magnusson, K. Hult, T. Brinck, P. Berglund, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 874-875; b) M. Svedendahl, P. Carlqvist, C. Branneby, O. Allnér, A. Frise, K. Hult, P. Berglund, T. Brinck, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2443-2451.

adiciones Markovnikov,³⁷ ampliando la aplicabilidad de las reacciones enzimáticas en síntesis orgánica.

Además, como se verá en el apartado siguiente, esta inusual actividad catalítica puede ser mejorada (si ya existía) o incluso provocada (en enzimas inactivos para esa transformación) a través de la ingeniería de proteínas.³⁸

0.3.5.2. Diseño Racional de Biocatalizadores

A pesar de que los primeros ejemplos de aplicación de los enzimas como biocatalizadores en síntesis orgánica datan de más de un siglo, hasta hace aproximadamente 25 años los investigadores únicamente tenían acceso a un limitado conjunto de enzimas disponible comercialmente para una reacción dada. En el caso de que ninguna de ellas mostrase suficiente actividad y/o especialmente enantioselectividad, la única forma de intentar mejorarlas era llevar a cabo modificaciones en el medio (disolventes, temperaturas, etc.) o en el sustrato (agentes acilantes, etc.). Por otro lado, si lo que se pretendía era buscar nuevos biocatalizadores, era necesario hacer un exhaustivo “screening” de numerosas fuentes microbianas, requiriendo enormes cantidades de tiempo. Pero los enzimas aislados directamente de la naturaleza raramente poseen la combinación ideal de características (reacción que catalizan, selectividad...) y actividad requeridas en las aplicaciones con una cierta importancia económica.³⁹ Por eso, a pesar del elevado número de enzimas descritos hasta la fecha, la necesidad de nuevos catalizadores con propiedades mejoradas en cuanto a aceptación de sustratos, estabilidad a diferentes temperaturas y pHs, enantioselectividad o enantiopreferencia, tolerancia a disolventes, etc. es constante.⁴⁰ Para satisfacer estas demandas existen, básicamente, tres estrategias:

³⁷ W. B. Wu, N. Wang, J. M. Xu, Q. Wu, X. F. Lin, *Chem. Commun.* **2005**, 2348-2350.

³⁸ R. J. Kazlauskas, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, 9, 195-201.

³⁹ R. J. Fox, G. W. Huisman, *Trends Biotechnol.* **2008**, 26, 132-138.

⁴⁰ a) G. A. Behrens, A. Hummel, S. K. Padhi, S. Schätzle, U. T. Bornscheuer, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 2191-2215; b) A. S. Bommarius, J. K. Blum, M. J. Abrahamson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, 15, 194-200.

Introducción

- búsqueda de nuevos enzimas
- modificación de enzimas ya conocidos y caracterizados
- diseño *de novo* de biocatalizadores completamente nuevos

En el segundo epígrafe estaría englobada la técnica conocida como *evolución dirigida*, que consiste en imitar la evolución de la naturaleza, pero acelerándola en el laboratorio. Esto se consigue llevando a cabo ciclos iterativos de:

- i) generación de librerías de genes mutados
- ii) expresión de estos genes para dar lugar a proteínas con mutaciones
- iii) "screening" de la actividad de dichas proteínas para la propiedad deseada. La mejor proteína encontrada se emplea entonces como patrón en las siguientes rondas de mutagénesis

De esta forma se ha conseguido mejorar la actividad, ampliar la especificidad de sustrato e incluso invertir la selectividad de algunas lipasas tan conocidas y empleadas como las lipasas de *Candida antarctica* de tipo A o B, o la de *Pseudomonas aeruginosa*.⁴¹

Otra técnica alternativa consiste en manipular la actividad de los enzimas a través de alteraciones químicas,⁴² las cuales no originan perturbaciones importantes en su estructura, pero le dotan de nuevas propiedades fisicoquímicas. Esto se consigue a través de la *ingeniería del código genético*, que consiste en sustituir la totalidad de un determinado aminoácido en la proteína por un derivado sintético, originando proteínas con una diversidad química que no puede encontrarse en la naturaleza.

⁴¹ a) M. T. Reetz, M. Puls, J. D. Carballeira, A. Vogel, K.-E. Jaeger, T. Eggert, W. Thiel, M. Boccola, N. Otte, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 106-112; b) K. Engström, J. Nyhlén, A. G. Sandström, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7038-7042; c) T. Ema, S. Kamata, M. Takeda, Y. Nakano, T. Sakai, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5440-5442; d) P. B. Juhl, K. Doderer, F. Hollmann, O. Thum, J. Pleiss, *J. Biotechnol.* **2010**, *150*, 474-480.

⁴² M. G. Hoesl, C. G. Acevedo-Rocha, S. Nehring, M. Royter, C. Wolschner, B. Wiltschi, N. Budisa, G. Antranikian, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 213-221.

En los próximos años podremos ver numerosos y exitosos avances en el área de las biotransformaciones, ya que se combinarán los métodos de “screening”, la biotecnología, la bioinformática y la química para generar nuevas rutas sintéticas más cortas, eficientes y que empleen materiales de partida más baratos para preparar moléculas con un elevado grado de complejidad y con aplicaciones tanto en ciencias de los materiales como en química especializada.⁴³

0.4. OBJETIVOS GENERALES

La preparación de aminas y aminoácidos ha despertado un creciente interés debido a su presencia tanto en compuestos con actividad biológica en el ámbito farmacéutico y agrícola, como en unidades estructurales orgánicas (“building blocks”) empleadas en síntesis asimétrica, donde pueden desempeñar, además, la función de ligandos quirales o catalizadores.⁴⁴ En particular, el sector industrial ha prestado especial atención en el desarrollo de metodologías asimétricas que conduzcan a este tipo de compuestos en su forma ópticamente activa de la forma más limpia y sencilla posible, encontrando en la Biocatálisis una herramienta ideal con la que conseguir sus objetivos: la síntesis de fármacos (o sus intermedios) quirales y compuestos de alto valor añadido.^{12a,45}

Por este motivo, el objetivo fundamental perseguido a lo largo del presente trabajo de investigación es el desarrollo de métodos robustos y reproducibles para la síntesis asimétrica de derivados de amina y aminoácidos, prestando especial atención a la optimización de métodos biocatalíticos en la resolución cinética o resolución cinética dinámica de racematos.

⁴³ B. M. Nestl, B. A. Nebel, B. Hauer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 187-193.

⁴⁴ V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Curr. Opin. Drug. Discov. Dev.* **2009**, *12*, 784-797.

⁴⁵ M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 788-824.

Introducción

Hasta este momento, se ha mostrado una introducción general acerca de los principios de la Biocatálisis, su evolución en el tiempo y su presencia cada vez más importante tanto en el campo de la investigación como en el industrial, prestando una especial atención a las lipasas, por ser los enzimas empleados en este trabajo.

A continuación, se presentan los resultados de esta Tesis Doctoral, la cual se ha dividido en dos partes por la clara diferencia existente en sus temáticas:

1. Preparación quimioenzimática de aminas ópticamente activas.
2. Síntesis estereoselectiva de derivados de aminoácidos.

En ellas se abordará la síntesis asimétrica de diferentes tipos de compuestos nitrogenados, para cada uno de los cuales se hará una revisión previa de los antecedentes existentes, prosiguiendo con los resultados más relevantes obtenidos en cada uno de los casos.

PARTE I

AMINAS ÓPTICAMENTE ACTIVAS

Las aminas quirales enantioméricamente puras son moléculas que poseen un elevado valor debido a sus múltiples aplicaciones, pudiendo actuar como intermedios en la síntesis de principios activos de fármacos, como agentes de resolución para la separación de enantiómeros a través de la formación de sales diastereoméricas o como ligandos en síntesis asimétrica, bien empleando metales de transición u organocatalizadores. En la primera parte de este trabajo de investigación se prestará especial atención a la preparación de fármacos quirales como la Rivastigmina, así como de compuestos con potencial actividad biológica, ya sean derivados fluorados de piridina o 2-propanaminas sustituidas. Todas ellas contienen aminas primarias como núcleo común en su esqueleto y por ello, a continuación, se ha realizado un breve resumen sobre la importancia de las aminas ópticamente activas y su preparación mediante metodologías enzimáticas.

I.0.1. IMPORTANCIA DE LAS AMINAS QUIRALES

Las aminas quirales poseen un elevado poder como farmacóforos, es decir, suelen constituir la unidad de menor tamaño responsable de la actividad biológica de un fármaco, debido a la alta densidad de información estructural que poseen y a su habilidad inherente para formar puentes de hidrógeno. Es por ello que muchos compuestos bioactivos presentan este grupo funcional en su estructura. En la Figura I-1 se han representado algunos ejemplos junto con su aplicación probada en el tratamiento de distintos desórdenes.

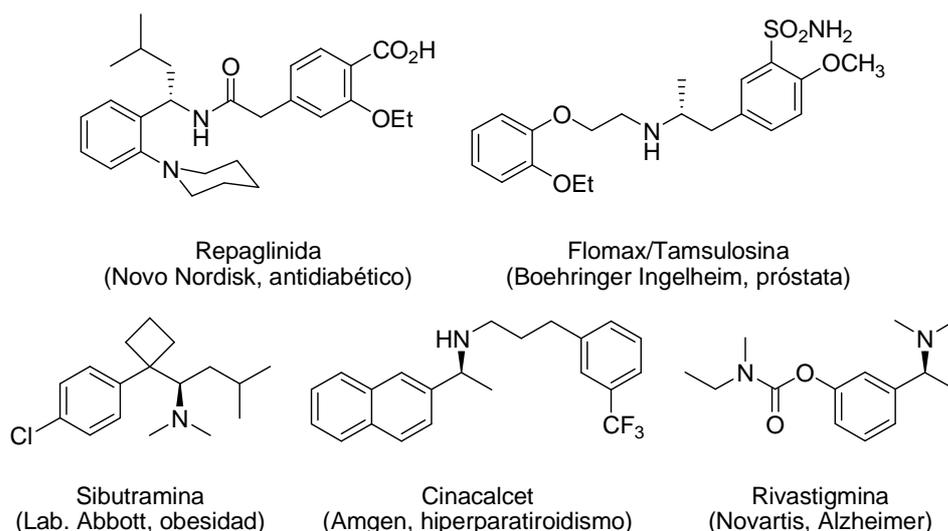
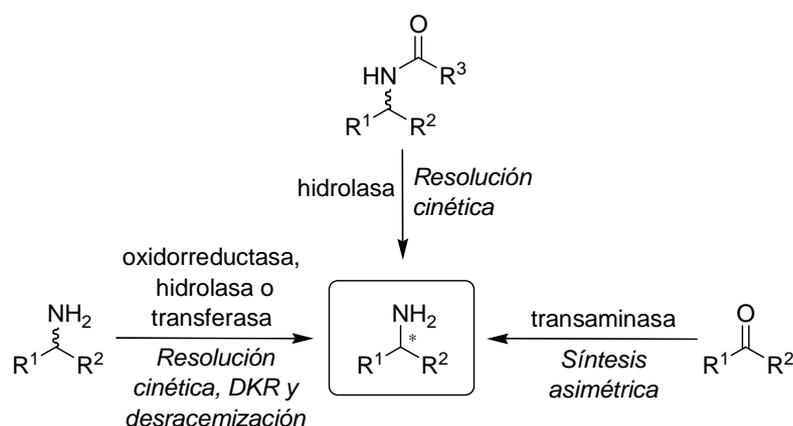


Figura I-1. Ejemplos de fármacos con aminas quirales en su estructura

I.0.2. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE AMINAS ENANTIOENRIQUECIDAS

A pesar de que los métodos químicos tradicionales de síntesis estereoselectiva de aminas, como la aminación reductiva de cetonas, la hidrogenación catalítica de iminas o enaminas, o la alquilación de iminas, entre otros, siguen siendo los más comúnmente utilizados, en las últimas dos décadas las biotransformaciones han demostrado ser alternativas prácticas y elegantes a estos métodos asimétricos clásicos (Esquema I-1).^{44,46}

⁴⁶ a) M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42-51; b) N. J. Turner, M. D. Truppo, Biocatalytic routes to nonracemic amines en *Chiral amine synthesis: methods*,



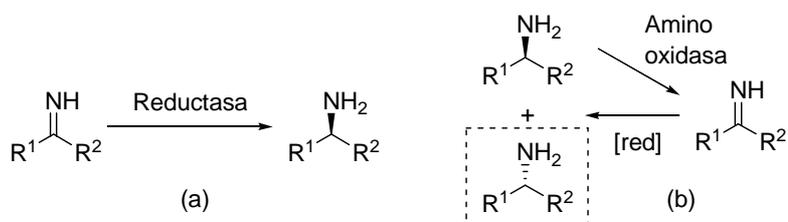
Esquema I-1. Aproximaciones biocatalíticas para la síntesis de aminas quirales

Sin embargo, cada uno de los métodos posee ventajas y desventajas en términos de i) disponibilidad de los productos de partida, ii) eficiencia del proceso respecto a otros métodos, iii) tipos de aminas quirales que pueden ser sintetizadas (primarias, secundarias y/o terciarias), iv) disponibilidad del biocatalizador y v) posible requerimiento de reciclaje del cofactor.

Las oxidorreductasas (EC 1) son capaces de catalizar biotransformaciones de una manera muy selectiva hacia la formación de aminas quirales (Esquema I-2) mediante:

- la reducción de iminas, empleando generalmente metaloenzimas
- o bien mediante procesos de desracemización enzimática donde se combina el uso de una monoamino oxidasa, selectiva para la oxidación de un enantiómero, con un agente reductor no selectivo con el que se reduce la imina obtenida en el paso de oxidación enzimática. Esta metodología permite obtener un solo enantiómero de la amina de partida a través de continuos ciclos de oxidación-reducción en "one-pot".

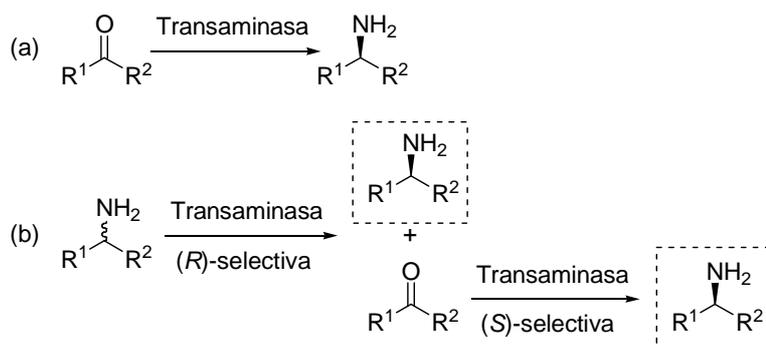
Parte I



Esquema I-2. Formación de aminas quirales a través de: (a) reducción selectiva de iminas; (b) desracemización mediante ciclos de oxidación-reducción

Ambos métodos permiten, por tanto, alcanzar rendimientos hasta del 100% en la obtención de una amina enantiopura, lo que les hace muy atractivos en síntesis asimétrica.

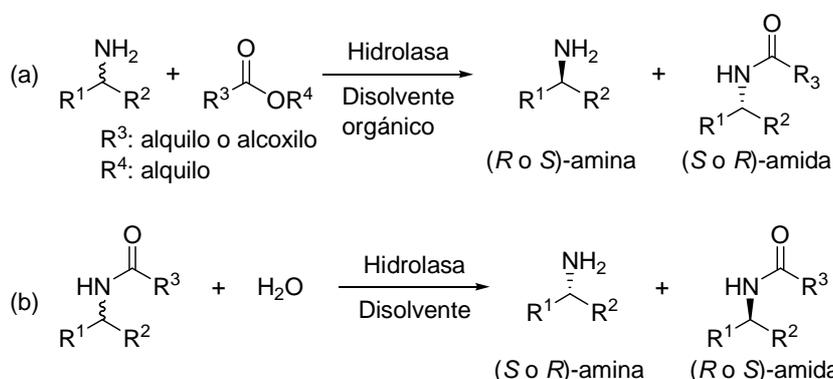
Dentro de la clase de las transferasas (EC 2), el uso de transaminasas (EC 2.6) para la producción de aminas ópticamente activas también se ha estudiado exhaustivamente en los últimos años, puesto que estos enzimas son capaces de catalizar la transformación estereoselectiva de cetonas proquirales o aminas racémicas en aminas con quiralidad en su carbono en posición α (Esquema I-3).



Esquema I-3. Síntesis de aminas enantioméricamente puras empleando transaminasas: (a) partiendo de una cetona proquiral, a través de un proceso de aminación reductiva; (b) reacción en cascada de dos transaminasas complementarias sobre una mezcla racémica

Finalmente, cabe destacar las hidrolasas (EC 3), más concretamente lipasas y proteasas, por ser los enzimas empleados en las primeras resoluciones de aminas, a finales de la década de los 80 y principios de los 90.⁴⁷

Dentro de este grupo de biocatalizadores, las lipasas y las acilasas son los enzimas más empleados en la producción estereoselectiva de aminas, generalmente mediante reacciones de acilación o, de forma complementaria, de hidrólisis de la amida. Los procesos más utilizados son las resoluciones cinéticas clásicas ("Kinetic Resolutions", KR), las cuales permiten obtener tanto el producto como el sustrato en forma ópticamente enriquecida (Esquema I-4). La mayor limitación de esta estrategia es que sólo se puede alcanzar un rendimiento máximo del 50% de cada uno de ellos en forma enantiopura, aunque por otra parte puede resultar de interés si se necesita disponer de los dos enantiómeros por separado, por ejemplo para el estudio y comparación de su actividad biológica.



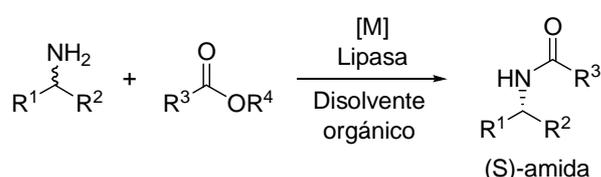
Esquema I-4. Obtención de aminas y amidas ópticamente activas a través de procesos catalizados por hidrolasas: (a) acilación de aminas empleando ésteres no activados o carbonatos; (b) hidrólisis de amidas en medios orgánicos o disoluciones reguladoras

Las resoluciones cinéticas dinámicas ("Dynamic Kinetic Resolutions", DKRs) son capaces de superar la limitación inherente a las resoluciones clásicas, permitiendo alcanzar un rendimiento teórico del 100% de uno solo

⁴⁷ a) A. Zaks, A. M. Klibanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 3192-3196; b) H. Kitaguchi, P. A. Fitzpatrick, J. E. Huber, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3094-3095; c) A. M. Klibanov, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 114-120; d) A. L. Guthman, E. Meyer, E. Kalerin, F. Polyak, J. Sterling, *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *40*, 760-767.

Parte I

de los enantiómeros del producto final.⁴⁸ En estos procesos se combina el uso de una hidrolasa y un agente de racemización del enantiómero que reacciona más lento en el proceso enzimático, generalmente un catalizador metálico, el cual permite que el sustrato se encuentre racémico en todo momento (Esquema I-5).



Esquema I-5. Resolución cinética dinámica (DKR) combinando el uso de una lipasa y un agente de racemización metálico [M]

Aunque estas dos aproximaciones partiendo de sustratos racémicos son las más empleadas, y en las que está basada esta Tesis Doctoral, algunos compuestos aquirales también pueden ser transformados en moléculas ópticamente activas empleando hidrolasas. Es el caso de las cetoximas (en un proceso de hidrogenación, racemización y acilación “one-pot”)⁴⁹ o las diaminas proquirales⁵⁰ (mediante un proceso de monoalcoxicarbonilación), permitiendo en ambos casos el aislamiento de las correspondientes aminas o carbamatos con elevados rendimientos.

Como es bien sabido, la resolución cinética enzimática de aminas racémicas está basada, fundamentalmente, en reacciones entre una amina primaria⁵¹ o secundaria⁵² (menos frecuente) con un donador de acilo adecuado en un disolvente orgánico. Las lipasas en general, y en concreto la de *Pseudomonas cepacia* (PSL, actualmente conocida como

⁴⁸ a) J. H. Lee, K. Han, M.-J. Kim, J. Park, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 999-1015; b) H. Pellissier, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 3769-3802.

⁴⁹ K. Han, J. Park, M.-J. Kim, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4302-4304.

⁵⁰ N. Ríos-Lombardía, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 14, 5709-5718.

⁵¹ a) F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 501-519; b) V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 797-812.

⁵² a) G. F. Breen, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1427-1430; b) A. J. Blacker, M. J. Stirling, M. I. Page, *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11*, 642-648; c) M. Stirling, J. Blacker, M. I. Page, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1247-1250.

Burkholderia cepacia) y de *Candida antarctica* tipo A (CAL-A)⁵³ y B (CAL-B)^{51b}, son catalizadores muy útiles para la acilación enantioselectiva de grupos amino, puesto que en muy escasas ocasiones son capaces de hidrolizar un enlace amida⁵⁴ y, por tanto, la reacción es irreversible.

Otro aspecto a tener en cuenta en la resolución enzimática de aminas es la naturaleza del agente acilante. Por un lado debe ser lo suficientemente reactivo como para permitir que las biotransformaciones transcurran con unas velocidades de reacción razonables, pero no demasiado altas porque se podría producir la *N*-acilación convencional de forma paralela a la catalizada por el enzima, lo que produciría una importante disminución del exceso enantiomérico de la amida formada. Mientras que por otro, también hay que considerar el efecto que el grupo liberado podría causar. Por ejemplo, los donores de acilo irreversibles como los ésteres de vinilo e isopropenilo, comúnmente empleados en la resolución de alcoholes, no son apropiados cuando se trabaja con aminas debido a que éstas pueden reaccionar con el acetaldehído y la acetona, productos de tautomerización de los alcoholes vinílico e isopropenílico liberados, respectivamente, dando lugar a la formación de iminas como subproductos de reacción.

Por este motivo, en la primera parte de este trabajo de investigación, enfocada a la síntesis y resolución de aminas primarias, se emplearán como donores de acilo el acetato de etilo, por su fácil accesibilidad, bajo coste y sencilla eliminación del medio de reacción al poseer un punto de ebullición muy bajo, o bien el metoxiacetato de etilo, agente acilante ligeramente activado que ya ha sido empleado con éxito en acilaciones de aminas con la CAL-B.⁵⁵ Esta activación es debida a un débil puente de hidrógeno entre el átomo de oxígeno en posición β del metoxiacetato del

⁵³ P. Domínguez de María, C. Carboni-Oerlemans, B. Tuin, G. Bargeman, A. van der Meer, R. van Gemert, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2005**, *37*, 36-46.

⁵⁴ a) X.-G. Li, M. Lähitie, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1857-1861; b) A. Liljeblad, P. Kallio, M. Vainio, J. Niemi, L. T. Kanerva, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 886-895.

⁵⁵ a) M. A. J. Veld, K. Hult, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 5416-5421; b) H. Ismail, R. M. Lau, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 1511-1516; c) A. N. Parvulescu, E. Van der Eycken, P. A. Jacobs, D. E. de Vos, *J. Catal.* **2008**, *255*, 206-212; d) A. N. Parvulescu, P. A. Jacobs, D. E. de Vos, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 113-121.

Parte I

intermedio acil-enzima y un hidrógeno de la amina reactiva (consultar mecanismo de las serín hidrolasas, Esquema 0-2 en página 17).⁵⁶

⁵⁶ M. Cammenberg, K. Hult, S. Park, *ChemBioChem* **2006**, 7,1745-1749.

CAPÍTULO 1

***Preparación quimioenzimática de
1-etanaminas precursoras de compuestos
con actividad biológica***

ANTECEDENTES

Las aminas quirales ópticamente activas constituyen un grupo de moléculas muy atractivas y versátiles como unidades estructurales orgánicas (“building blocks”) para la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos. Su complicada accesibilidad, así como su elevado coste económico, pueden ser solventados, en parte, mediante el empleo de la Biocatálisis.⁵⁷

En este capítulo se estudiarán la síntesis y resolución cinética enzimática de diversas etanaminas, en dos partes bien diferenciadas (Figura 1-1). En la primera de ellas se tratará la resolución cinética clásica de la 1-(3-metoxifenil)etanamina, precursor clave en la síntesis del fármaco (S)-Rivastigmina, mientras que en la segunda parte se llevará a cabo la síntesis y resolución enzimática de una serie de piridiletanaminas fluoradas, compuestos de gran interés por su posible uso en la preparación de moléculas más complejas con actividad biológica.

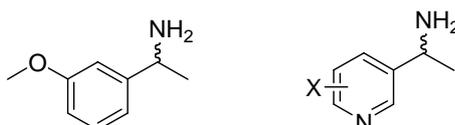


Figura 1-1. Estructura de las etanaminas racémicas objeto de estudio en este capítulo

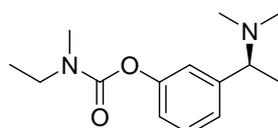
⁵⁷ K. Laumen, M. Kittlemann, O. Ghisalba, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, 19-20, 55-66.

Antecedentes

I.1.1.1. (S)-RIVASTIGMINA

La (S)-Rivastigmina, comercializada en forma de la sal (S)-tartrato por la empresa Novartis bajo el nombre de Exelon[®], es un parasimpaticomimético que ha sido empleado, desde su aceptación en el año 2000, para el tratamiento clínico de la demencia asociada con la enfermedad de Alzheimer en etapas tempranas,⁵⁸ un trastorno cerebral que lentamente destruye la memoria, la capacidad para pensar, aprender, comunicarse y realizar las actividades diarias. También es posible su utilización para el tratamiento de personas con Parkinson,⁵⁹ enfermedad cerebral y del sistema nervioso cuyos síntomas son movimientos lentos, debilidad muscular, caminar arrastrando los pies y, de nuevo, pérdida de la memoria.

La Rivastigmina pertenece a una clase de medicamentos llamados inhibidores de la acetilcolinesterasa, los cuales mejoran la función mental al aumentar la cantidad de una sustancia natural, la acetilcolina, en diversas regiones cerebrales. En su estructura (Figura 1-2), presenta un grupo carbamato que lo convierte en un fármaco de larga duración,⁶⁰ capaz de reaccionar covalentemente con el centro activo del enzima, evitando así la necesidad de su administración cada cortos periodos de tiempo.



(S)-1

Figura 1-2. Estructura de la (S)-Rivastigmina (1), nombre común del carbamato de *N*-etil-*N*-metil-3-[1-(dimetilamino)etil]fenilo

⁵⁸ a) Y. Pan, X. Xianghua, X. Wang, *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *140*, 902-912; b) M. R. Farlow, J. L. Cummings, *Am. J. Med.* **2007**, *120*, 388-397; c) G. Figiel, C. Sadowsky, *Curr. Med. Res. Opin.* **2008**, *24*, 157-166; d) J. Birks, J. Grimley Evans, V. Iakovidou, M. Tsolaki, F. E. Holt, *Cochrane Database Syst. Rev.* **2009**, *2*, CD001191; e) S. Gauthier, A. Juby, W. Dalziel, B. Rehel, R. Schechter, *Curr. Med. Res. Opin.* **2010**, *26*, 1149-1160.

⁵⁹ M. Emre, *CNS Drugs* **2006**, *20*, 748-750.

⁶⁰ R. J. Polinsky, *Clin. Ther.* **1998**, *20*, 634-647.

Aunque existen varios compuestos capaces de inhibir la acción de la acetilcolinesterasa, la Rivastigmina fue seleccionada para las pruebas clínicas por su estabilidad química y su perfil farmacológico *in vivo* (tolerancia en el organismo y especial selectividad hacia las regiones del cerebro más afectadas por la degeneración neuronal).⁶¹ Por este motivo, actualmente se buscan análogos que incluyan otras peculiaridades estructurales, como puedan ser una conformación más restringida o la presencia de heteroátomos como el azufre, habiendo llegado a encontrarse sustancias casi 200 veces más activas que la propia Rivastigmina.⁶²

I.1.1.1.1. SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICAS

Cuando en 2008 nuestro grupo de investigación decidió trabajar en el desarrollo de una ruta quimioenzimática para la síntesis de la (S)-Rivastigmina,⁶³ aún no se habían descrito preparaciones de esta molécula donde se involucrara el empleo de enzimas, conociéndose únicamente procesos basados en metodologías químicas convencionales que generalmente implicaban la utilización de ácidos quirales, como el L-tartárico, para la separación de los enantiómeros del racemato aprovechando las diferentes propiedades de cristalización de las sales diastereoméricas.⁶⁴ Alternativamente, en 2003, Charette y colaboradores describieron una metodología eficaz consistente en la adición estereoselectiva de dimetilzinc a una imina, catalizada por bistriflato de cobre (II) y un ligando quiral de fósforo.⁶⁵

⁶¹ a) B. R. Williams, A. Nazarians, M. A. Gill, *Clin. Ther.* **2003**, 25, 1634-1653; b) A. Enz, R. Amstutz, H. Boddeke, G. Gmelin, J. Malanowski, *Prog. Brain Res.* **1993**, 98, 431-438.

⁶² M. L. Bolognesi, M. Bartolini, A. Cavalli, V. Andrisano, M. Rosini, A. Minarini, C. Melchiorre, *J. Med. Chem.* **2004**, 47, 5945-5952.

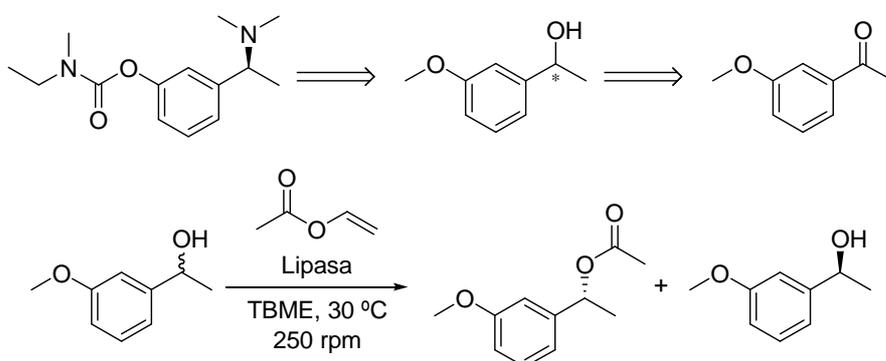
⁶³ J. Mangas-Sánchez, M. Rodríguez-Mata, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 5304-5310.

⁶⁴ a) Z-H. Wang, S. E. Horne, K. S. K. Murthy, *WO 2007/098573T*; b) J. Henar, A. Overeem, T. Lambertus, *WO 2008/037433 A1*.

⁶⁵ A. A. Boezio, J. Pytkowicz, A. Côté, A. B. Charette, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 14260-14261.

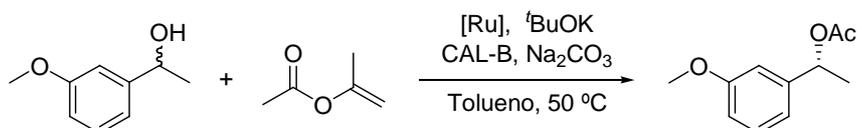
Antecedentes

Así, en un análisis retrosintético de la estructura de la Rivastigmina, nuestro grupo de investigación seleccionó el 3-metoxi-1-feniletanol en su forma racémica como un precursor adecuado para la preparación de la (S)-Rivastigmina (parte superior del Esquema 1-1) ya que, además, presenta un fácil acceso sintético a partir de la 3-metoxiacetofenona, sustrato comercialmente accesible y de bajo coste. Tanto la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B) como la de *Pseudomonas cepacia* (PSL) fueron capaces de acetilar con elevada selectividad el enantiómero *R* del alcohol y en tiempos de reacción muy cortos, especialmente la CAL-B (parte inferior del Esquema 1-1). Además, fue posible llevar el proceso a escala multigramo y un eficiente reciclaje del enzima inmovilizado, pudiendo ser utilizado sucesivas veces sin pérdida aparente de su actividad.



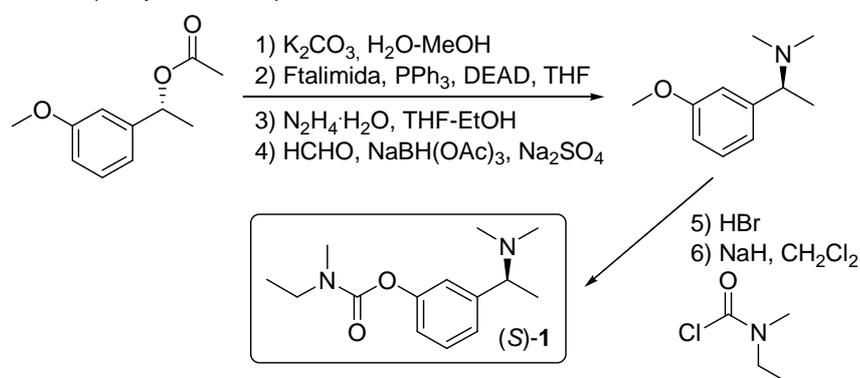
Esquema 1-1. Análisis retrosintético de la (S)-Rivastigmina (arriba) y resolución enzimática del alcohol racémico precursor mediante un proceso de acetilación con diferentes lipasas (abajo)

Con el fin de superar la limitación inherente a las resoluciones cinéticas del 50% de rendimiento máximo y con vistas a una posible aplicación industrial, se llevó a cabo su resolución cinética dinámica con CAL-B y un complejo organometálico de rutenio, obteniendo el acetato enantiopuro con un rendimiento del 91% (Esquema 1-2).



Esquema 1-2. Resolución cinética dinámica del alcohol precursor de la Rivastigmina empleando CAL-B y un complejo organometálico de rutenio

Finalmente, partiendo del (*R*)-acetato enantiopuro, se diseñó una ruta de síntesis que permitió acceder a la (*S*)-Rivastigmina a través de 6 pasos consistentes en: i) hidrólisis del grupo éster, ii) sustitución de la función alcohol por amino con inversión de la configuración, mediante reacción de Mitsunobu y posterior desprotección, iii) metilación del grupo amino, iv) ruptura del enlace C-O del sustituyente metoxilo y v) formación del grupo carbamato (Esquema 1-3).⁶³



Esquema 1-3. Síntesis global de la (*S*)-Rivastigmina

Recientemente, otros grupos de investigación han desarrollado rutas quimioenzimáticas alternativas. Así, Kim y colaboradores consiguieron hacer una resolución cinética dinámica enzimática a temperatura ambiente del intermedio de tipo alcohol con el grupo carbamato ya formado en la molécula, introduciendo como novedad el empleo de un complejo de rutenio unido a un polímero de poliestireno (Figura 1-3), permitiendo así el reciclaje de ambos catalizadores.⁶⁶

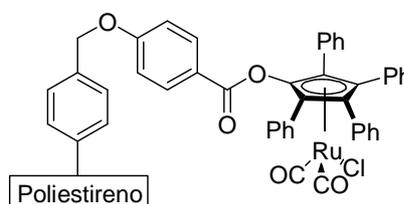
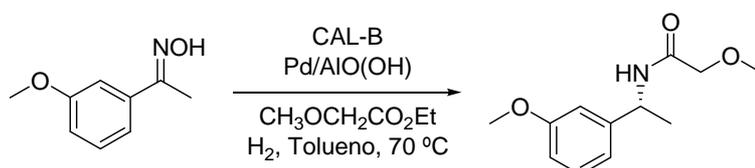


Figura 1-3. Catalizador de rutenio soportado sobre un polímero de estireno

⁶⁶ K. Han, C. Kim, J. Park, M.-J. Kim, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3105-3108.

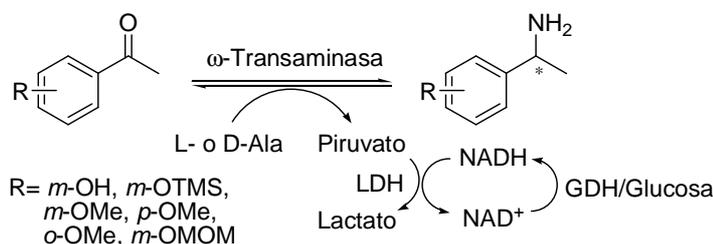
Antecedentes

Este mismo grupo también describió en 2010 la acilación reductiva asimétrica de una cetoxima, cocatalizada por un nanocatalizador de paladio y CAL-B, que culminó en la síntesis del calcimimético (+)-NPS R-568.⁶⁷ El problema de este método, si el objetivo fuese la síntesis de la (S)-Rivastigmina, es que, aunque con muy buenos rendimientos (85%) y excesos enantioméricos (98% ee), se obtiene la amida de estereoquímica contraria (Esquema 1-4).



Esquema 1-4. Acilación reductiva asimétrica de una cetoxima empleando hidrógeno, metoxiacetato de etilo y una mezcla de dos catalizadores, uno metálico y otro enzimático

Por último, el grupo del profesor Faber ha desarrollado un nuevo proceso biocatalítico para la síntesis de la (S)-Rivastigmina empleando ω -transaminasas en lugar de hidrolasas (Esquema 1-5).⁶⁸ Como se comentó en la introducción, estas enzimas son capaces de transformar cetonas proquirales en aminas primarias enantioenriquecidas, lo que ha permitido reducir el número de pasos de la síntesis, a costa de emplear un sistema enzimático más complejo para desplazar el equilibrio, así como una escala de reacción mucho menor (aproximadamente 100 mg).

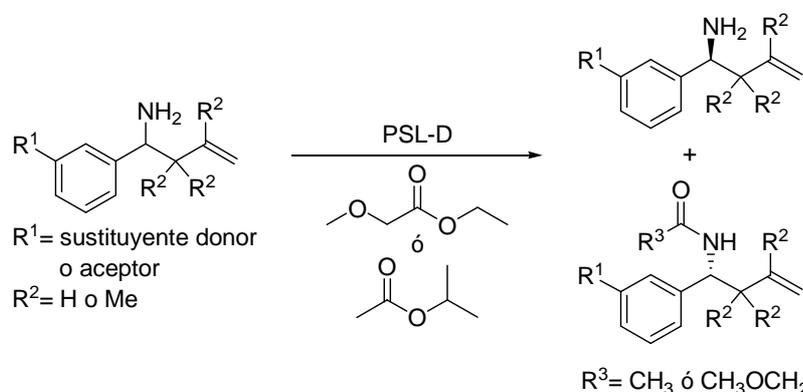


Esquema 1-5. Transaminación de diferentes derivados de la acetofenona utilizando ω -transaminasas y un sistema de reciclaje del cofactor compuesto por una serie de reacciones enzimáticas en cadena que emplea la glucosa como fuente de hidrógeno

⁶⁷ K. Han, C. Kim, J. Park, M.-J. Kim, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3536-3537.

⁶⁸ M. Fuchs, D. Koszelewski, K. Tauber, W. Kroutil, K. Faber, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5500-5502.

Recientemente, el grupo de la profesora Kanerva ha desarrollado la síntesis quimioenzimática de la amina homoalílica⁶⁹ donde, a pesar de que el sustituyente mediano es alilo en lugar de metilo, la resolución es posible ajustando cuidadosamente los diferentes parámetros de reacción, obteniéndose en todos los casos la amida en forma enantiopura en las reacciones catalizadas por PSL inmovilizada en diatomita (Esquema 1-6).



Esquema 1-6. Resolución cinética de aminas homoalílicas catalizada por PSL-D

I.1.1.2. AMINAS DERIVADAS DE PIRIDINAS FLUORADAS

En la segunda parte de este capítulo se estudiará la síntesis y resolución de una serie de piridinetanaminas fluoradas. Actualmente no se encuentran descritas rutas sintéticas estereoselectivas para este tipo de aminas, si bien sus motivos estructurales presentan interesantes propiedades.

El empleo de las 1-heteroariletanaminas ópticamente activas como ligandos quirales formando parte de complejos metálicos con aplicación en procesos de síntesis estereoselectiva se conoce desde hace aproximadamente dos décadas.⁷⁰ Por otro lado, la presencia de sustituyentes fluorados en compuestos bioactivos está cada día más

⁶⁹ A. Hietanen, T. Saloranta, S. Rosenberg, E. Laitinen, R. Leino, L. T. Kanerva, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 909-919.

⁷⁰ J. W. Canary, C. S. Allen, J. M. Castagnetto, Y. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8484-8485.

Antecedentes

extendida, debido a los efectos fisicoquímicos que este elemento produce en las moléculas de las que forma parte.⁷¹

A pesar de que el flúor es el decimotercer elemento más abundante en la corteza terrestre, sólo se han identificado 13 compuestos orgánicos fluorados naturales, encontrándose en su mayor parte formando sales insolubles que no pueden ser, por tanto, absorbidas por los organismos. Esto es debido a que el potencial de oxidación del flúor impide la existencia de una haloperoxidasa capaz de incorporar oxidativamente un átomo de flúor (como ocurre con el cloro, el bromo o el yodo) y a que la baja nucleofilia del ión fluoruro no permite su introducción mediante una sustitución nucleófila en condiciones naturales. Por lo tanto, dado que apenas hay compuestos organofluorados en la naturaleza, es interesante cuestionarse por qué hasta 1957 no se había desarrollado ningún fármaco con flúor y el 20-25% de los existentes actualmente contienen, al menos, uno de estos átomos (Figura 1-4).⁷²

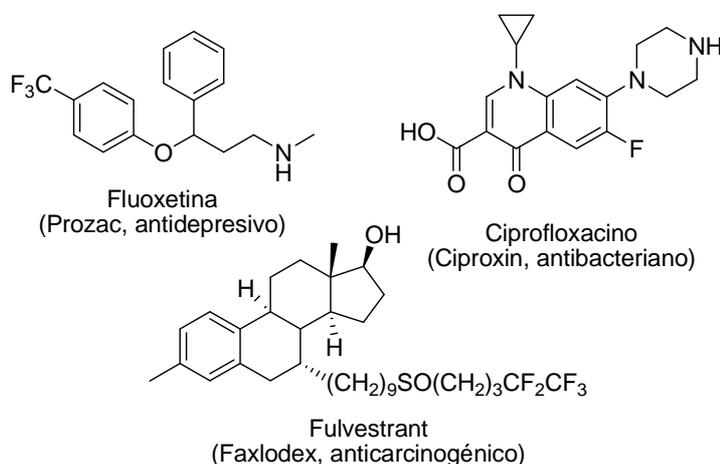


Figura 1-4. Selección de moléculas para ilustrar la gran diversidad estructural de los fármacos fluorados y la variedad de enfermedades que pueden tratarse aprovechando la química del flúor

⁷¹ a) K. Müller, C. Faeh, F. Diederich, *Science* **2007**, 317, 1881-1886; b) K. L. Kirk, *Org. Process Res. Dev.* **2008**, 12, 305-321; c) S. Purser, P. R. Moore, S. Swallow, V. Gouverneur, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 320-330; d) W. K. Hagmann, *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 4359-4369; e) P. V. Ramachandran, *Future Med. Chem.* **2009**, 1, 771-772.

⁷² R. Filler, R. Saha, *Future Med. Chem.* **2009**, 1, 777-791.

Su especial naturaleza (alta electronegatividad, pequeño tamaño y muy diferente reactividad química respecto al H) transmite a ciertas medicinas una gran variedad de propiedades, incluyendo una mejora en cuanto a estabilidad metabólica, biodisponibilidad e interacciones proteína-ligando, además de variar su capacidad de adsorción, distribución y excreción.

La sustitución de un átomo de hidrógeno por uno de flúor puede modificar profundamente las preferencias conformacionales de una molécula pequeña debido a su tamaño y sus efectos estereoelectrónicos. Por ejemplo, el fuerte efecto electroatractor del F es capaz de acidificar los grupos funcionales vecinos o disminuir la basicidad de anilinas, piridinas y quinolinas. Por otro lado, la introducción de grupos fluoruro o trifluorometilo en una molécula también origina un cambio en sus interacciones dipolares: mientras que la fluoración de alcanos decrece su lipofilia, su presencia en anillos aromáticos, adyacentes a un sistema π o que contenga grupos funcionales con heteroátomos, incrementa esta lipofilia y puede polarizar fuertemente la molécula inicial.

Por este motivo, aunque no se debe sobreestimar la profunda influencia que están teniendo las moléculas organofluoradas en el descubrimiento de nuevos fármacos, ya que en gran parte está originada por el creciente número de compuestos de partida fluorados disponibles comercialmente, está claro que el efecto que provoca la presencia de átomos de flúor en una molécula abre puertas a nuevas estrategias para dar solución a problemas dentro del programa de desarrollo de medicamentos.

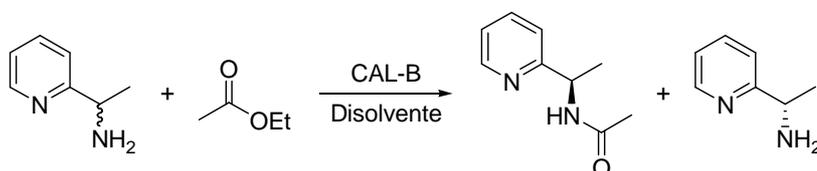
I.1.1.2.1. RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA DE DERIVADOS DE HETEROARILETANAMINAS

Como en el caso de la 1-(3-metoxifenil)etanamina estudiada en el apartado anterior, la obtención de este tipo de compuestos ópticamente activos se ha llevado a cabo, fundamentalmente, a través de procesos de resolución con ácidos quirales o alquilación asimétrica de iminas. Sin embargo, la naturaleza de algunos compuestos heterocíclicos puede requerir condiciones suaves de reacción para prevenir la degradación del

Antecedentes

anillo, hecho que lleva a utilizar la Biocatálisis como herramienta sintética para introducir quiralidad. Además, la metodología consistente en la acilación enantioselectiva de las aminas racémicas catalizada por lipasas, emplea reactivos de muy bajo coste y toxicidad y los procedimientos experimentales son muy sencillos.⁷³ Aunque se han descrito numerosas y variadas técnicas con diferentes productos de partida y biocatalizadores para la obtención de derivados de piridina ópticamente activos,⁷⁴ aquí nos centraremos únicamente en la resolución cinética enzimática de aminas racémicas.

Así, en nuestro grupo de investigación se llevó a cabo, por primera vez, la resolución enzimática de la 1-(piridin-2-il)etanamina (Esquema 1-7), empleando CAL-B como biocatalizador, acetato de etilo como donador de acilo y 1,4-dioxano, o el propio acetato de etilo, como disolvente, obteniéndose con elevados excesos enantioméricos tanto la amina remanente (84-90%) como la amida formada (91-93%).⁷⁵



Esquema 1-7. Resolución cinética de la 1-(piridin-2-il)etanamina

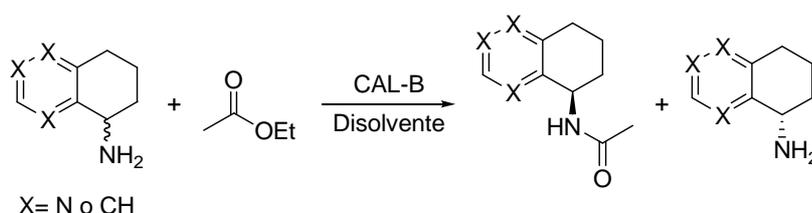
La CAL-B también fue la lipasa más eficaz en la resolución cinética de 1-heteroarilaminas primarias bicíclicas mediante acetilación enantioselectiva, logrando obtener, en general, tanto el sustrato de partida como el producto formado, con altos rendimientos y purezas ópticas (Esquema 1-8).⁷⁶

⁷³ G. Carrea, S. Riva, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2226-2254.

⁷⁴ V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor, en *Targets in Heterocyclic Systems: Chemistry and Properties*, Ed. O. A. Attanasi, D. Spinelli, Società Chimica Italiana, Roma, **2008**, Vol. 12, capítulo 15, 414-437.

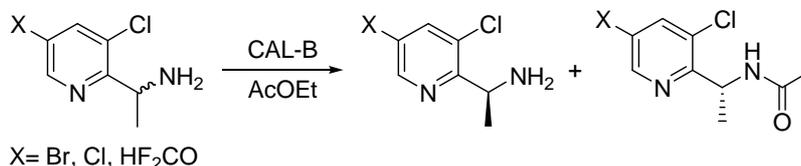
⁷⁵ L. E. Iglesias, V. M. Sánchez, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, *8*, 2675-2677.

⁷⁶ K. A. Skupinska, E. J. McEachern, I. R. Baird, R. T. Skerlj, G. J. Bridger, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3546-3551.



Esquema 1-8. Acetilación enantioselectiva de 1-heteroarilaminas primarias bicíclicas

De una forma similar, Sigmund y DiCosimo describieron la acetilación catalizada por lipasas de diferentes 2-(1-aminoetil)-3-cloropiridinas racémicas sustituidas en la posición 5.⁷⁷ A pesar de probar 17 lipasas diferentes, sólo la CAL-B mostró cierta enantioselectividad (Esquema 1-9). Cabe destacar que para el sustrato con X= HF₂CO, el empleo de metoxiacetato de metilo como agente acilante condujo a enantioselectividades más bajas.



Esquema 1-9. Acetilación enantioselectiva catalizada por CAL-B de 2-(1-aminoetil)-3-cloropiridinas racémicas sustituidas en la posición 5

Continuando con el estudio de los derivados clorados de piridina, en nuestro grupo de investigación se sintetizaron y resolvieron enzimáticamente un amplio panel de 2- y 3-(1-aminoalquil)-4-cloropiridinas, con el fin de estudiar la influencia que el resto alquilo tenía en la selectividad del enzima.⁷⁸ Puesto que previamente se habían estudiado los derivados de tipo alcohol,^{51b,79} se decidieron emplear las mismas lipasas (CAL-B y PSL) para poder comparar el comportamiento de los diferentes derivados. Así, empleando acetato de etilo o metoxiacetato de etilo como donores de acilo, y TBME como disolvente, se encontró que ambas enzimas presentaban un alto grado de enantioselectividad cuando R¹= Me

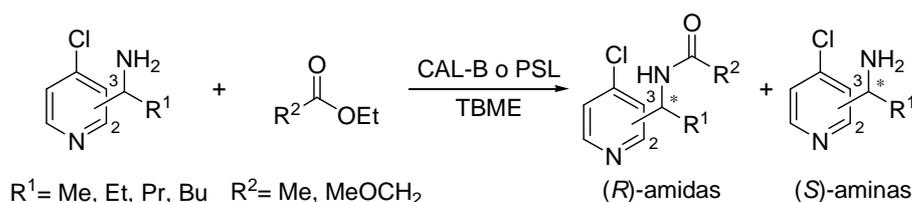
⁷⁷ A. E. Sigmund, R. DiCosimo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2797-2799.

⁷⁸ O. Torre, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1481-1488.

⁷⁹ a) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3427-3435; b) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1007-1016.

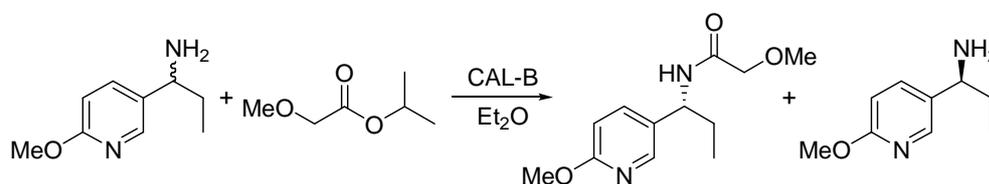
Antecedentes

o Et, observándose un importante descenso de la misma al alargar la cadena en uno o más átomos de carbono (Esquema 1-10).



Esquema 1-10. Resolución cinética mediante acilación catalizada por lipasas de 2- y 3-(1-aminoalquil)-4-cloropiridinas

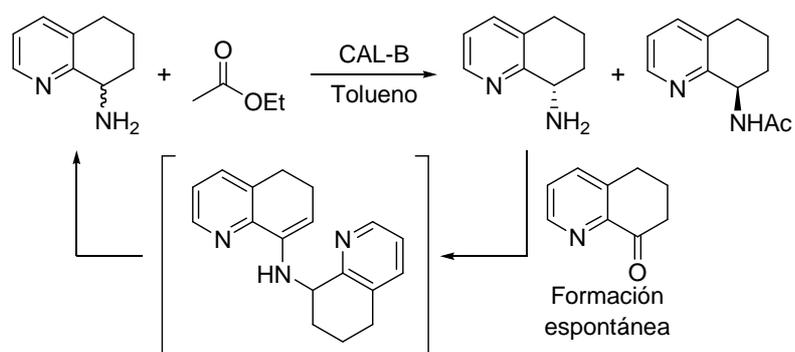
En 2008, Ditrich demostró la gran capacidad que tienen los enzimas, en este caso la CAL-B, para aceptar diferentes sustratos, logrando la resolución de una serie de aminas con gran variedad estructural, entre ellas un derivado de piridina (Esquema 1-11), con excelentes resultados en cuanto a pureza enantiomérica y rendimiento.⁸⁰ Para ello, introdujo como novedad el empleo del metoxiacetato de isopropilo como agente acilante.



Finalmente, Bridger y colaboradores observaron, por primera vez, la posibilidad de que suceda una resolución cinética dinámica espontánea. Así, cuando la 8-amino-5,6,7,8-tetrahydroquinolina fue acilada estereoselectivamente con acetato de etilo en presencia de CAL-B se obtuvo la amida ópticamente activa con rendimientos superiores al 60% (Esquema 1-12). Una posible explicación para la racemización del sustrato de partida puede ser la formación en el medio de reacción de la cetona análoga, seguida por una secuencia de condensación con la amina remanente de configuración *S* y una posterior hidrólisis de la enamina formada.⁸¹

⁸⁰ K. Ditrich, *Synthesis* **2008**, 14, 2283-2287.

⁸¹ J. B. Crawford, R. T. Skerlj, G. J. Bridger, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 669-671.



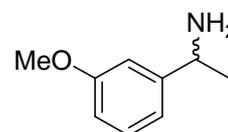
Esquema 1-12. Resolución cinética dinámica de la 8-amino-5,6,7,8-tetrahidroquinolina con CAL-B, donde sucede la racemización *in situ* de la amina remanente

OBJETIVOS

En los antecedentes de este capítulo ha quedado patente la importancia de las aminas quirales como precursores de moléculas más complejas, así como por su empleo en química médica y organocatálisis. Este hecho, unido al excelente potencial mostrado por las lipasas para llevar a cabo biotransformaciones estereoselectivas, nos ha llevado a plantearnos una serie de objetivos en este capítulo. Estos se dividen, dependiendo de las estructuras objeto de estudio, en:

1. Precursores de la (S)-Rivastigmina.

1.1. La preparación en forma racémica de 1-(3-metoxifenil)etanamina.

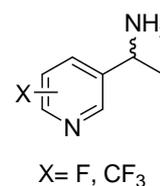


1.2. El estudio de la resolución cinética enzimática de este compuesto con el fin de obtener la (S)-amina en forma enantiopura para poder llevar a cabo, posteriormente, la síntesis global del fármaco.

1.3. La comparación del comportamiento de los biocatalizadores frente a la transformación de dos compuestos análogos pero de naturaleza diferente (alcohol y amina).

2. 1-(Piridin-3-il)etanaminas fluoradas.

2.1. La síntesis química de una serie de piridinetanaminas racémicas con sustituyentes fluorados, de una manera directa y reproducible.



2.2. La aplicación de hidrolasas en reacciones de aminólisis para desarrollar métodos adecuados de resolución cinética clásica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este apartado se presenta en dos partes claramente diferenciadas. Por un lado, se describe la síntesis y resolución de la amina precursora del fármaco (S)-Rivastigmina, mientras que por el otro, se detallan las condiciones en las que se prepararon una familia de aminas derivadas de piridiniletanaminas fluoradas, así como la separación de sus enantiómeros mediante resoluciones cinéticas catalizadas por lipasas.

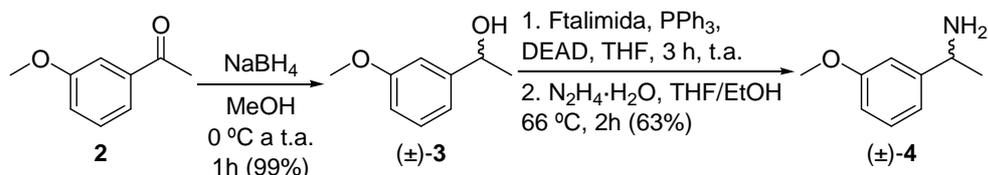
Resultados y Discusión

I.1.3.1. SÍNTESIS QUÍMICA Y RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA DEL PRECURSOR NITROGENADO DE LA (S)-RIVASTIGMINA

Como se ha comentado con anterioridad, la (S)-Rivastigmina [(S)-1] se ha descrito como un importante fármaco empleado en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Parkinson.⁵⁸⁻⁶² Así, se ha llevado a cabo un estudio complementario al presentado en los antecedentes de este capítulo, con el fin de intentar mejorar la ruta sintética propuesta. Basados en los buenos resultados obtenidos en la resolución del 1-(3-metoxifenil)etanol racémico, se analizará en detalle la resolución de la amina análoga, la 1-(3-metoxifenil)etanamina.

I.1.3.1.1. PREPARACIÓN QUÍMICA DE LA 1-(3-METOXIFENIL)ETANAMINA RACÉMICA (4) Y DE LAS AMIDAS (±)-5a-b

Para la obtención de la amina racémica **4** se empleó la metodología previamente desarrollada en nuestro grupo de investigación con el sustrato ópticamente activo (Esquema 1-13)⁶³.



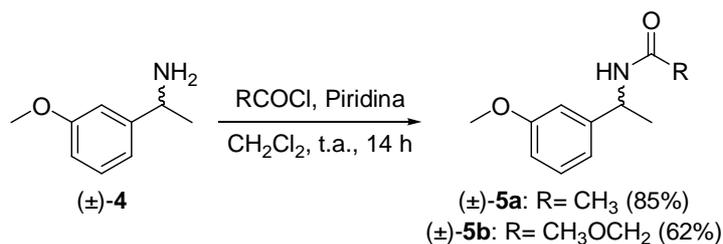
Esquema 1-13. Síntesis química de la 1-(3-metoxifenil)etanamina racémica a partir de 3-metoxiacetofenona

Así, inicialmente se llevó a cabo la reducción del grupo carbonilo de la 3-metoxiacetofenona (**2**), compuesto accesible comercialmente a bajo coste, empleando un ligero exceso de borohidruro sódico (NaBH₄) en metanol, lo que permitió aislar, tras columna cromatográfica, el 1-(3-metoxifenil)etanol con un rendimiento cuantitativo. A continuación, el alcohol **3** se hizo reaccionar en las condiciones de Mitsunobu.⁸² En una primera etapa, se activa el alcohol con trifenilfosfina (PPh₃) y azodicarboxilato de etilo (DEAD) en tetrahidrofurano (THF) seco para favorecer su sustitución por la ftalimida. De este modo se obtiene la amina

⁸² a) O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, 1-28; b) T. Y. S. But, P. H. Toyi, *Chem. Asian J.* **2007**, 2, 1340-1355.

protegida, la cual es liberada posteriormente por reacción con hidrazina monohidratada ($N_2H_4 \cdot H_2O$) en una mezcla de THF y etanol a 66 °C. El rendimiento global de los dos pasos es del 63%.

Con el fin de poder calcular las conversiones de las biotransformaciones, así como los excesos enantioméricos tanto de sustrato como de producto, fue necesario optimizar la separación de sus enantiómeros. Para ello, se seleccionó la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) empleando una columna de relleno quiral (ver parte experimental). Por este motivo fue necesaria una derivatización con diferentes cloruros de acilo (cloruro de acetilo o de metoxiacetilo), en diclorometano seco y en presencia de piridina (Esquema 1-14), obteniendo las amidas racémicas **5a-b** tras purificación por columna cromatográfica.



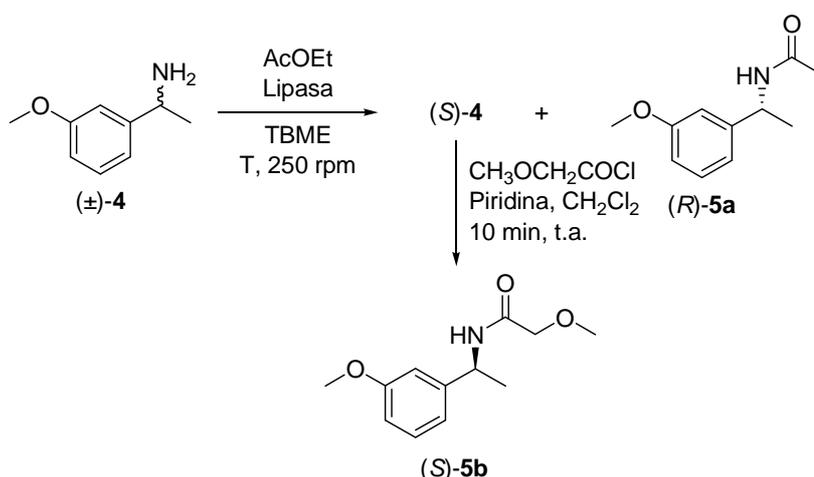
Esquema 1-14. Síntesis química de las amidas racémicas **5a-b**

De esta forma, además de posibilitar el análisis de la amina remanente en forma de la amida **5b**, se sintetizó el que será el producto final de la reacción enzimática empleando acetato de etilo como donador de acilo (**5a**).

I.1.3.1.2. RESOLUCIÓN CINÉTICA DE LA 1-(3-METOXIFENIL)ETANAMINA (4) MEDIANTE PROCESOS DE AMINÓLISIS CATALIZADOS POR LIPASAS

Una vez obtenida la amina racémica **4** se llevó a cabo su resolución cinética enzimática (Esquema 1-15), estudiando los diferentes parámetros de reacción que pueden influir en los procesos de aminólisis catalizados por lipasas, como son el tipo de biocatalizador, el tiempo de reacción y la temperatura (Tabla 1-1).

Resultados y Discusión



Esquema 1-15. Resolución cinética enzimática de la 1-(3-metoxifenil)etanamina catalizada por lipasas y derivatización de la amina remanente (S)-4 para la medida del exceso enantiomérico del sustrato

Con el objetivo de comparar el comportamiento de los enzimas que habían dado tan buenos resultados en la resolución del alcohol, en el caso de la amina análoga se seleccionaron la CAL-B y la PSL-C I. Las biotransformaciones se llevaron a cabo en *tert*-butilmetil éter (TBME) y se emplearon 3 equivalentes de acetato de etilo (AcOEt), utilizando una proporción 2:1 en peso de enzima:sustrato, en lugar de la 1:1 usada con el alcohol. Para controlar el transcurso de la reacción, se tomaron alícuotas en intervalos de tiempo regulares, transformando *in situ* la amina remanente con cloruro de metoxiacetilo, que se inyectaron en el HPLC para medir el exceso enantiomérico de sustrato (derivatizado en forma de la amida **5b**) y de producto (**5a**).

Tabla 1-1. Resolución cinética de (±)-4 catalizada por lipasas utilizando AcOEt como agente acilante y TBME como disolvente a 250 rpm

Entrada	Lipasa	T (°C)	t (h)	ee _s ^a (%)	ee _p ^a (%)	c ^b (%)	E ^c
1	CAL-B	30	27	94	>99	49	>200
2	PSL-C I	30	120	8	90	8	21
3	CAL-B	45	19	98 (34)	>99 (43)	50	>200

^a Excesos enantioméricos de sustrato (ee_s) y de producto (ee_p) determinados por HPLC. Rendimientos aislados entre paréntesis. ^b $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$. ^c $E = \ln[(1-c)(1-ee_s)] / \ln[(1-c)(1+ee_p)]$

Tras una primera prueba a 30 °C, ya se pueden observar claras diferencias entre las biotransformaciones catalizadas por las distintas lipasas (entradas 1 y 2). Así, mientras que la CAL-B acetila estereoselectivamente el enantiómero *R* permitiendo aislar la acetamida enantiopura, y la amina remanente de configuración *S* con elevada pureza óptica en 27 h (entrada 1), la PSL es muy poco activa en estas condiciones y menos selectiva, alcanzándose conversiones únicamente del 8% tras 120 h de reacción y un exceso enantiomérico de la amida de sólo un 90% (entrada 2).

A continuación, con el fin de acelerar el proceso, se elevó la temperatura a 45 °C, condiciones en las que se obtuvieron mejores resultados (entrada 3), ya que en sólo 19 h fue posible aislar tanto sustrato como producto de forma prácticamente enantiopura y con buenos rendimientos aislados tras purificación por columna cromatográfica en gel de sílice, teniendo en cuenta que la aproximación está basada en un proceso de resolución cinética clásica.

Finalmente, aunque las configuraciones absolutas del sustrato y del producto podrían establecerse recurriendo a la regla de Kazlauskas,³⁰⁻³¹ se compararon los valores de las rotaciones ópticas de los compuestos enantioméricamente puros con los descritos en la bibliografía, confirmando así los resultados predichos por el modelo (ver parte experimental).⁸³

⁸³ Amina: H. B. Mereyala, S. R. Koduru, V. N. Cheemalapati, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 259-267; Amida: M. Hu, F.-L. Zhang, M.-H. Xie, *Lett. Org. Chem.* **2007**, *4*, 126-128.

I.1.3.1.3. COMPARACIÓN ENTRE LOS PROCESOS DE RESOLUCIÓN CINÉTICA ENZIMÁTICA DEL ALCOHOL 3 Y LA AMINA 4⁶³

Como procedimiento alternativo al ya descrito en nuestro grupo de investigación para la síntesis de la (S)-Rivastigmina, se ha desarrollado un método que permite resolver la amina racémica precursora de dicho fármaco de manera eficiente. Así, empleando la CAL-B como biocatalizador en un proceso de acilación con acetato de etilo a 45 °C, ha sido posible la obtención tanto de la amina (S)-4 como de la acetamida (R)-5a con excelente pureza óptica, si bien la comparación con los resultados obtenidos para el 1-(3-metoxifenil)etanol requiere destacar una serie de puntos:

1. La lipasa de *Pseudomonas cepacia* actúa de forma completamente diferente frente a los dos sustratos. Por un lado, mientras que ha demostrado ser capaz de acilar de forma altamente enantioselectiva el alcohol (\pm)-3 en 4 h de reacción, tanto su actividad como su selectividad frente a la acilación de la amina (\pm)-4 han resultado ser mucho menores, no logrando alcanzar el 10% de conversión tras 120 h, con cuatro veces más de catalizador, y obteniendo una discreta *E* cuyo valor se mantuvo en torno a 20.
2. Aunque la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B ha mostrado una excelente enantioselectividad ($E > 200$) frente a los dos sustratos, la cinética respecto a la amina ha resultado ser mucho más lenta (19 h frente a las 1.5 h necesarias para lograr un 50% de conversión del alcohol, a pesar de usar el doble de enzima)
3. Por otro lado, mientras que el enantiómero con aplicación práctica en el caso de la resolución del alcohol era el *R* y, por tanto, era necesaria una desprotección previa del acetilo para su posterior transformación en (S)-Rivastigmina, en este caso se obtiene directamente la amina de configuración *S* en su forma libre, por tratarse del enantiómero de cinética más lenta, lo que permite continuar la síntesis del fármaco evitando un paso de reacción (ver Esquema 1-3 en página 47).

4. También es interesante remarcar que en este caso no sería factible una resolución cinética dinámica (DKR), ya que la mezcla racémica sería transformada completamente en la (*R*)-amida, enantiómero opuesto al requerido para la preparación de la Rivastigmina de mayor actividad.⁸⁴

Por estos motivos, y con vistas a una posible aplicabilidad en la industria farmacéutica, se concluye que, aunque este proceso transcurre con una excelente selectividad, el procedimiento resultaría menos adecuado que el desarrollado previamente para el precursor hidroxilado, ya que emplea mayor cantidad de catalizador, las reacciones son más largas y, al no ser posible una DKR, se desaprovecha el 50% del material de partida.

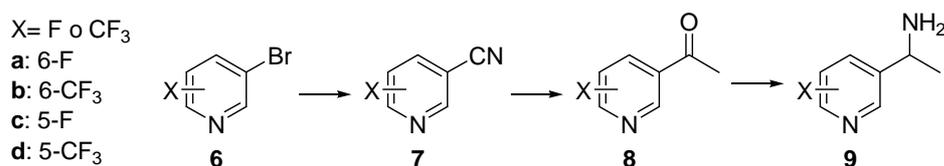
I.1.3.2. SÍNTESIS QUÍMICA Y RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA DE 1-(PIRIDIN-3-IL)ETANAMINAS FLUORADAS

El interés mostrado por la comunidad científica hacia los compuestos fluorados en los últimos años, así como la relevancia de las aminas quirales en diversos campos como son la farmacología o la catálisis asimétrica, nos llevó a plantearnos la posibilidad de aunar ambos conceptos en la síntesis quimioenzimática de una familia de etanaminas enantioenriquecidas con sustituyentes piridínicos fluorados, conteniendo bien un átomo de flúor o un resto trifluorometilo en las posiciones 5 ó 6 del anillo de piridina.

Para ello, se diseñó una ruta sintética general que pudiera ser aplicada, en principio, a todos los sustratos (Esquema 1-16). Esta ruta consta de tres pasos: la sustitución de un bromo por la función nitrilo en el anillo aromático, seguida de una adición del anión metiluro para la obtención de la cetona que, finalmente, será transformada en la correspondiente amina a través de una reacción de aminación reductiva.

⁸⁴ Y. Kim, J. Park, M.-J. Kim, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 5581-5584.

Resultados y Discusión



Una vez propuesta la ruta sintética, se comprobó la disponibilidad comercial de cada uno de los intermedios, adquiriendo de diferentes proveedores aquellos que se encontrasen en una fase más avanzada de la síntesis.

I.1.3.2.1. PREPARACIÓN DE 1-(PIRIDIN-3-IL)ETANAMINAS RACÉMICAS SUSTITUÍDAS EN LA POSICIÓN 6 (9a,b)

Cabe mencionar que el derivado de trifluorometilo **7b** está disponible comercialmente, por lo que no fue necesaria su preparación.

Inicialmente, y antes de emplear los compuestos **6** como sustratos de partida, se intentó acoplar la 3-bromopiridina y el cianuro de cobre (I) en *N,N*-dimetilformamida (DMF) a 120 °C, empleando L-prolina como organocatalizador,⁸⁵ pero no se observó la formación del producto deseado. El acoplamiento tampoco fue posible en presencia de microondas y sin catalizador.⁸⁶ Por ello, decidimos explorar otras rutas con distintas fuentes de cianuro, como el complejo K₄[Fe(CN)₆] en presencia de yoduro de cobre (I) y *N*-metilimidazol a 150 °C,⁸⁷ o con yoduro de potasio, acetato de cobre (II) y bromuro de tetrabutilamonio (TBAB) y radiación de microondas⁸⁸ pero, de nuevo, los resultados no fueron positivos.

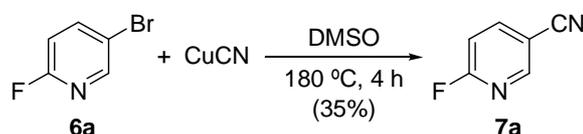
⁸⁵ D. Wang, L. Kuang, Z. Li, K. Ding, *Synlett* **2008**, 69-72.

⁸⁶ R. J. Arvela, N. E. Leadbeater, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9122-9125.

⁸⁷ T. Schareina, A. Zapf, A. Cotté, N. Müller, M. Beller, *Synthesis* **2008**, 3351-3355.

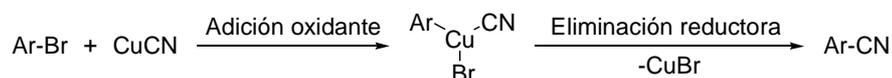
⁸⁸ Y. Ren, W. Wang, S. Zhao, X. Tian, J. Wang, W. Yin, L. Cheng, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4595-4597.

Finalmente, aunque con bajo rendimiento tras la purificación por columna cromatográfica en gel de sílice neutro,⁸⁹ la obtención del nitrilo fue posible a través de una reacción de Rosenmund-von Braun en la que la cianación del haluro aromático tiene lugar mediante el calentamiento con cianuro de cobre (I) a 180 °C empleando dimetilsulfóxido (DMSO) como disolvente (Esquema 1-17).⁹⁰



Esquema 1-17. Preparación del 6-fluoropiridin-3-carbonitrilo (**7a**) a través de una cianación de Rosenmund-von Braun

El mecanismo propuesto para esta reacción involucra la formación de especies de Cu (III) a través de una adición oxidante del bromuro de arilo. A continuación, este intermedio sufre una eliminación reductora que conduce al producto final (Esquema 1-18).



Esquema 1-18. Posible mecanismo para la transformación de bromuros de arilo en los correspondientes nitrilos a través de especies intermedias de Cu (III)

La obtención de las cetonas **8a,b** se llevó a cabo mediante una adición de yoduro de metilmagnesio sobre los correspondientes carbonitrilos disueltos en dietil éter a 0 °C. Después de 4 horas de agitación a temperatura ambiente, tras las que se observa un cambio en la coloración de la reacción de amarillo a rojo intenso, y una posterior hidrólisis ácida, los compuestos finales se aíslan con rendimientos entre bajos y moderados tras un proceso de extracción y de purificación por columna cromatográfica (Esquema 1-19).

⁸⁹ En la segunda parte de este capítulo, las purificaciones de todos los compuestos por cromatografía de columna se llevan a cabo con gel de sílice neutro por obtenerse mejores rendimientos al quedar menos retenidos los compuestos y evitar posibles descomposiciones originadas por el medio ligeramente ácido del gel de sílice común.

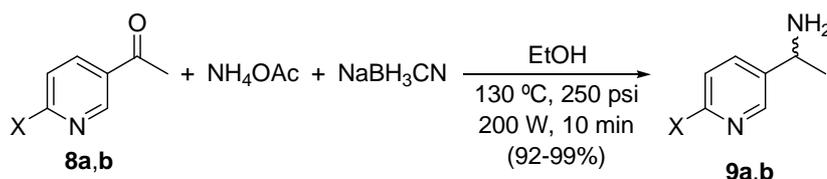
⁹⁰ C.-H. Lee, E. K. Bayburt, S. DiDomenico Jr., I. Drizin, A. R. Gomtsyan, J. R. Koenig, R. J. Perner, R. G. Schmidt Jr., S. C. Turner, T. K. Jinkerson, G. Z. Zheng, **2005**, U. S. Patent, 0113576 A1.

Resultados y Discusión



Esquema 1-19. Preparación de las cetonas **8a,b** mediante la adición de un reactivo de Grignard (MeMgI) a la función nitrilo del producto de partida

La última etapa para la obtención de las aminas racémicas **9a,b** consiste en una aminación reductiva de las cetonas **8a,b**. Inicialmente se trató de aplicar un procedimiento consistente en la reacción de la cetona con formiato de amonio, actuando a la vez como fuente de nitrógeno y reductor, en presencia de paladio soportado sobre carbón como catalizador,⁹¹ pero al encontrarse la funcionalidad en una posición bencílica, los únicos productos formados fueron los correspondientes 1-(piridin-3-il)etanolos. Por ello se decidió emplear acetato amónico y el cianoborohidruro de sodio como agente reductor que, en combinación con el empleo de radiación de microondas,⁹² permitió acceder a las 1-(piridin-3-il)etanaminas **9a,b** con excelentes rendimientos, 92% para **9a** y 99% para **9b** (Esquema 1-20).



Esquema 1-20. Transformación de las cetonas **8a,b** en las aminas bencílicas **9a,b** a través de una aminación reductiva aplicando radiación de microondas

El empleo de este agente reductor es debido a su versatilidad y a su capacidad de reducir selectivamente ciertas funciones orgánicas en presencia de otras.⁹³ Así, por ejemplo, se ha demostrado que en condiciones neutras apenas se observa reducción de aldehídos y cetonas, mientras que los iones iminio se reducen de forma mucho más rápida,^{93a} lo

⁹¹ J. González-Sabín, V. Gotor, F. Rebolledo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, 13, 1315-1320.

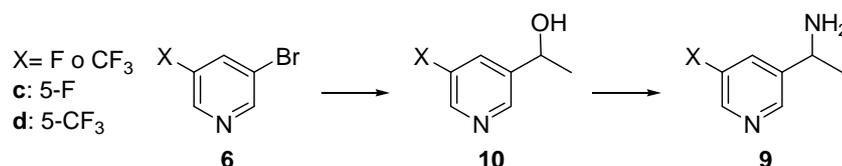
⁹² L. Dong, S. Aleem, C. A. Fink, *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 5210-5212.

⁹³ a) R. F. Borch, M. D. Bernstein, H. D. Durst, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 2897-2904; b) C. F. Lane, *Synthesis* **1975**, 135-146.

que permite llevar a cabo estos procesos de aminación reductiva de aldehídos o cetonas mediante la simple reacción de los mismos con una amina en presencia de cianoborohidruro de sodio. Además, este procedimiento es válido para todo tipo de aldehídos y cetonas sin impedimentos estéricos, pudiendo emplear, además, tanto aminas primarias como secundarias o, como en nuestro caso, iones amonio. El único requisito necesario es la presencia de una fuente de protones que permita generar dicho ión iminio en el medio de reacción.

I.1.3.2.2. PREPARACIÓN DE LA 1-(5-FLUOROPIRIDIN-3-IL)ETANAMINA [(±)-9c]

Una vez optimizados los procedimientos con las piridinas sustituidas en la posición 6 se abordó la preparación de los derivados con sustituyentes en la posición 5. Desafortunadamente, la metodología anterior no resultó ser efectiva para las 3-bromopiridinas con grupos fluorados en la posición 5, por lo que fue necesario un cambio en la aproximación sintética. Así, se propuso una nueva ruta para acceder a las aminas 5-sustituídas racémicas **9c,d** (Esquema 1-21), la cual consiste en un acoplamiento del derivado bromado de piridina con acetaldehído para dar lugar al alcohol que será transformado, mediante una reacción de Mitsunobu, en la correspondiente amina.

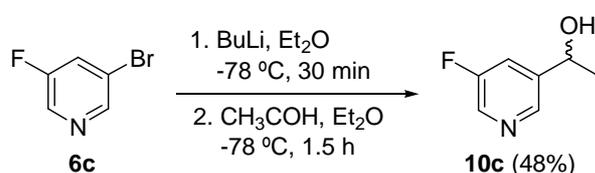


Esquema 1-21. Ruta sintética propuesta para la obtención de las aminas **9c,d** sustituidas en la posición 5 del anillo de piridina

Para que se pueda producir el primer paso de acoplamiento, es necesaria una reacción “umpolung”, es decir, una transformación del sustrato inicial que permita llevar a cabo una inversión de la polaridad en la que un carbono inicialmente electrófilo, como es el de la posición 3, pueda ser convertido en un nucleófilo capaz de reaccionar con un aldehído. Esta transformación es posible mediante su tratamiento a $-78\text{ }^\circ\text{C}$ con un reactivo

Resultados y Discusión

organolítico como es el butil-litio⁹⁴ seguida de la adición del acetaldehído (Esquema 1-22). De esta forma, aunque el derivado **10c** se aisló con un rendimiento moderado (48%), no fue posible la formación del análogo trifluorometilado **10d**, por lo que únicamente se continuó la síntesis de los derivados 5-fluoro sustituidos.

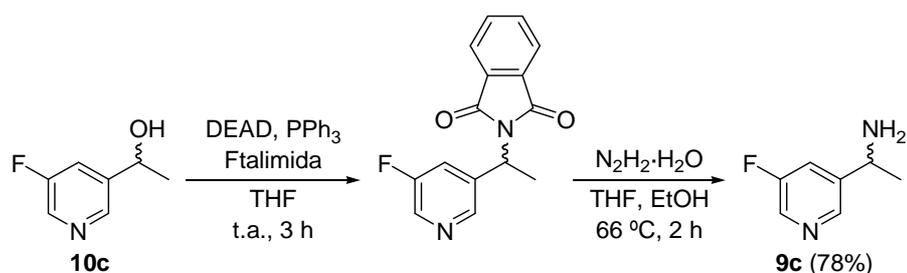


Esquema 1-22. Acoplamiento de la bromopiridina **6c** con acetaldehído para la formación del alcohol **10c** mediante una reacción “umpolung”

Cabe destacar además que, en función de la casa comercial en la que se adquiriera el butil-litio, es posible la obtención mayoritaria del producto de acoplamiento del acetaldehído por la posición 6 de la piridina, entre otros productos secundarios. En este caso, la elevada acidez del hidrógeno situado en esta posición, por encontrarse próximo a dos átomos de elevada electronegatividad, hace que sea más sencilla la desprotonación que el intercambio del bromo.

A continuación, la transformación del grupo hidroxilo en amino se llevó a cabo empleando las condiciones de la reacción de inversión de Mitsunobu. En un primer paso, el alcohol se activa con azodicarboxilato de dietilo (DEAD) y trifenilfosfina para facilitar su sustitución con ftalimida, generando una amina enmascarada intermedia que no es necesario aislar, y cuya desprotección se consigue con un tratamiento de la misma con hidrazina monohidratada a 66 °C en una mezcla de THF y etanol (Esquema 1-23). De esta forma, la amina final se aísla con un rendimiento del 78% tras los dos pasos de reacción y una extracción en continuo con posterior purificación por columna cromatográfica.

⁹⁴ Y. Hari, S. Matsugu, H. Inohara, Y. Hatanaka, M. Akabane, T. Imanishi, S. Obika, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 4176-4180.

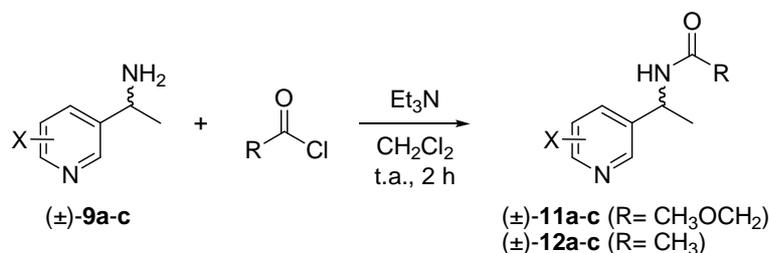


Esquema 1-23. Empleo de la reacción de Mitsunobu y posterior desprotección para la obtención de la amina **9c** a partir de su alcohol precursor racémico **10c**

I.1.3.2.3. SÍNTESIS DE AMIDAS RACÉMICAS **11a-c** Y **12a-c**

La elevada polaridad de las aminas impidió de nuevo la separación de sus enantiómeros mediante HPLC, por lo que fue necesaria su derivatización en forma de amida. Además, a parte de preparar de forma racémica el que sería el producto final de las reacciones enzimáticas con metoxiacetato de etilo como donador de acilo, las metoxiacetamidas (\pm)-**11a-c**, se sintetizaron también las acetamidas (\pm)-**12a-c** con dos objetivos: la medida de los excesos enantioméricos tanto del sustrato remanente (derivatizado en forma de acetamida) como del producto formado y la posibilidad de hacer un seguimiento de las reacciones mediante el análisis por HPLC de pequeñas alícuotas tomadas del medio de reacción a intervalos regulares de tiempo.

La preparación de las amidas se llevó a cabo haciendo reaccionar las aminas libres con cloruro de metoxiacetilo o de acetilo en presencia de trietilamina y a temperatura ambiente (Esquema 1-24).



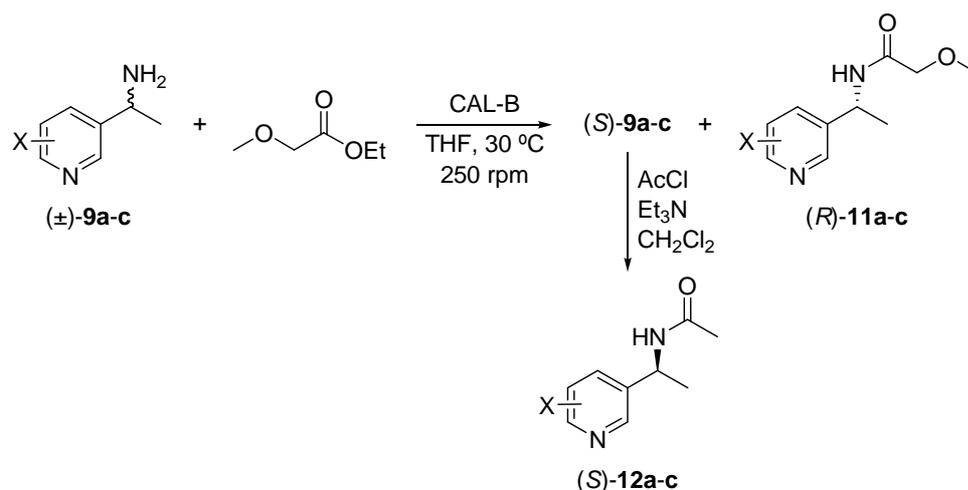
Esquema 1-24. Síntesis de las metoxiacetamidas (\pm)-**11a-c** y las acetamidas (\pm)-**12a-c**

Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos en la separación de los enantiómeros de cada una de las amidas se encuentran recogidos en la parte experimental al final de este capítulo.

I.1.3.2.4. RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA DE LAS AMINAS (\pm)-9a-c A TRAVÉS DE PROCESOS DE ACILACIÓN ENANTIOSELECTIVA CATALIZADOS POR LA CAL-B

Una vez sintetizadas las aminas racémicas objeto de estudio y optimizados los métodos analíticos para la medida de los excesos enantioméricos y el seguimiento de las reacciones, se abordó su resolución enzimática empleando la CAL-B como biocatalizador, enzima que mejores resultados había ofrecido en la resolución enzimática de sustratos de estructura similar.⁷⁵⁻⁸¹ Asimismo, esta vez se seleccionó el metoxiacetato de etilo como agente acilante por estar ligeramente más activado respecto al acetato de etilo, pretendiendo que las biotransformaciones transcurriesen de forma más rápida, pero manteniendo un elevado grado de estereoespecificidad por parte de la lipasa.⁵⁵⁻⁵⁶ Por motivos de solubilidad, en este caso se empleó como disolvente el THF y se trabajó con una concentración 0.1 M de sustrato (Esquema 1-25).



Esquema 1-25. Resolución cinética mediante un proceso de acilación enantioselectiva catalizada por CAL-B, y derivatización de los sustratos remanentes en forma de acetamida para permitir la medida del e_e s

Se comenzó haciendo una prueba en blanco con cada uno de los sustratos, es decir, una comprobación de que las reacciones no tienen lugar en ausencia del enzima, algo totalmente imprescindible para que las biotransformaciones transcurran con buenas selectividades. Establecidas y confirmadas estas premisas, se abordó el estudio de resolución de las aminas (\pm)-**9a-c**.

Las reacciones transcurrieron con una excelente enantioselectividad, alcanzándose conversiones cercanas al 50% en periodos comprendidos entre 2 y 7 horas (Tabla 1-2). Así, esta nueva metodología hizo posible la obtención de las metoxiacetamidas (*R*)-**11a-c** en forma enantiopura y las aminas remanentes de configuración *S* con elevados excesos enantioméricos (90-96%).

Tabla 1-2. Resolución cinética de las aminas (\pm)-**9a-c**^a

Sustrato	X	t (h)	ee _S (%) ^b	ee _P (%) ^b	c (%) ^c	E ^d
9a	6-F	2	96	>99	49	>200
9b	6-CF ₃	3	94	>99	49	>200
9c	5-F	4	90	>99	47	>200

^a Condiciones de la reacción enzimática: amina **9a-c** racémica en relación 1:1 en peso respecto a la CAL-B, metoxiacetato de etilo (5 equivalentes), THF (0.1 M), 30 °C y 250 rpm.
^b Determinados por HPLC. ^c $c = ee_S / (ee_S + ee_P)$. ^d $E = \ln[(1-c)(1- ee_S)] / \ln[(1-c)(1+ ee_P)]$

Los resultados muestran que aquellos sustratos con sustituyentes en la posición 6 de la piridina (entradas 1 y 2) reaccionan de forma más rápida con el agente acilante, lo que puede ser debido a una interacción más favorable con las cadenas laterales de los aminoácidos que se encuentran formando el centro activo de la proteína, ya que el pequeño tamaño del átomo de flúor no debería, en principio, generar los suficientes impedimentos estéricos como para originar una diferencia de reactividad tan elevada (entradas 1 y 3).

En el caso de la amina **9c**, por transcurrir el proceso de forma más lenta, se pudo llevar a cabo un análisis temporal de su resolución enzimática (Figura 1-5), tomando alícuotas a intervalos regulares de

Resultados y Discusión

tiempo (cada 1 ó 2 h, dependiendo del grado de avance de la reacción).⁹⁵ Así se observó que en las tres primeras horas la reacción transcurre con una cinética similar al resto, aunque algo más lenta, produciéndose una importante ralentización de la misma a continuación. Finalmente, tras 7 horas de reacción se logró alcanzar un 49% de conversión, lo que permitió aislar la amida final y la amina remanente con un exceso enantiomérico >99% y del 95%, respectivamente.

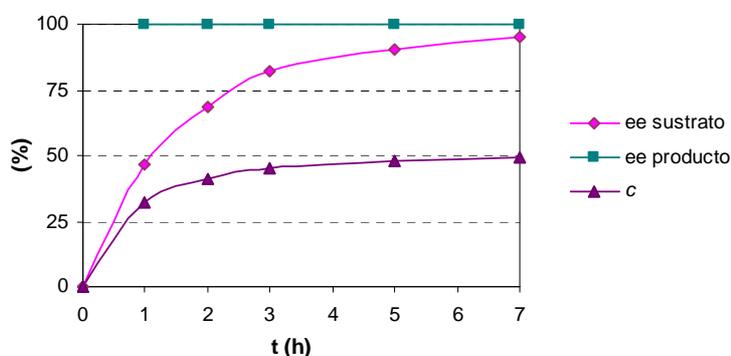


Figura 1-5. Seguimiento temporal de la resolución cinética de la amina (±)-9c

La asignación de las configuraciones absolutas de sustratos y productos está basada en la regla empírica de Kazlauskas³⁰ y en la comparación con la selectividad mostrada por la CAL-B con el sustrato anterior³¹ ya que, debido a la novedad estructural de estas aminas, no se encuentra descrito en la bibliografía el valor de su rotación óptica, ni de ningún derivado en el que puedan ser transformadas, para poder comparar sus valores.

⁹⁵ Se tomaron alícuotas de 20 μL , se disolvieron en CH_2Cl_2 y se añadió una pequeña cantidad de K_2CO_3 y una gota de cloruro de acetilo. Se agitaron durante 15 min a 900 rpm a 25 $^\circ\text{C}$, se evaporó el disolvente, y se redisolvieron en un disolvente adecuado para su inyección directa en HPLC tras una filtración de la muestra.

CONCLUSIONES

Las conclusiones correspondientes a este capítulo se encuentran divididas en dos partes en función de la naturaleza de los compuestos tratados:

1. Precursores de la (S)-Rivastigmina.

1.1. La 1-(3-metoxifenil)etanamina se ha sintetizado de forma racémica a través de una ruta sintética sencilla y eficaz.

1.2. Se ha estudiado el proceso de resolución enzimática de esta amina a través de una acilación enantioselectiva con acetato de etilo, lo que ha permitido obtener tanto la amina libre como la acetamida final con elevados excesos enantioméricos cuando la lipasa de Candida antarctica de tipo B fue empleada como biocatalizador.

1.3. Por tratarse de una metodología alternativa a la resolución del alcohol análogo, pero menos efectiva por necesitar un mayor tiempo de reacción y una carga superior de biocatalizador, se considera menos apropiada que la anterior ruta propuesta, pero los resultados obtenidos complementan los estudios previos en la preparación quimioenzimática de la (S)-Rivastigmina.

2. 1-(Piridin-3-il)etanaminas fluoradas.

2.1. Se ha llevado a cabo la síntesis de una familia de 1-(piridin-3-il)etanaminas con diferentes patrones de sustitución con restos fluorados en el anillo, empleando metodologías alternativas en función de su reactividad.

2.2. Las resoluciones enzimáticas de estas aminas racémicas empleando metoxiacetato de etilo como agente acilante y la CAL-B como biocatalizador han transcurrido con excelentes selectividades y tiempos cortos de reacción, aislando las amidas en forma enantiopura y las aminas con excesos enantioméricos muy altos.

2.3. Se ha observado una diferente cinética de las biotransformaciones en función de la localización del sustituyente fluorado, encontrándose procesos más rápidos cuando este se encuentra en la posición 6 del anillo de piridina frente a la 5.

PARTE EXPERIMENTAL

I.1.5.1. GENERAL

La lipasa de *Candida antarctica* tipo B (CAL-B, Novozyme SP-435L, 7300 PLU/g) inmovilizada por adsorción sobre Lewatit E fue donada por Novozymes, mientras que la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PSL-C I, 1019 U/g) inmovilizada sobre partículas de cerámica, fue suministrada por Sigma-Aldrich.

Todos los demás reactivos se adquirieron a Acros Organics, Aldrich, Fluka o Merck, sin ser necesarios tratamientos previos para su purificación.

Los disolventes empleados en reacciones sintéticas se sometieron previamente a un tratamiento de secado, almacenándose bajo atmósfera de nitrógeno. El TBME, el THF y el éter se secaron sobre sodio empleando como indicador benzofenona, mientras que el diclorometano, el metanol y el DMSO se secaron sobre hidruro cálcico.

I.1.5.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

I.1.5.2.1. CROMATOGRAFÍA EN GEL DE SÍLICE

Para la cromatografía en capa fina se han utilizado cromatofolios de gel de sílice POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄ (0.25 mm de espesor), los cuales llevan incorporado un revelador ultravioleta, comercializados por Merck. Como reveladores se utilizaron una disolución acuosa al 1% de KMnO₄, 5% de K₂CO₃ y un 5% de NaOH en 200 mL de agua; o bien una disolución formada por etanol (93%), ácido acético glacial (1%), ácido sulfúrico fumante (3.5%) y *p*-anisaldehído (2.5%), dependiendo de la naturaleza de los sustratos a analizar.

Para la cromatografía de columna de los compuestos de la primera parte se empleó gel de sílice 60 (230-240 Mesh) adquirida a Merck, mientras que para los derivados de piridina se utilizó gel de sílice neutro 60A (32-63 UM), de la casa comercial ICN.

I.1.5.2.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

El seguimiento de las reacciones de acilación enzimática y la medida de los excesos enantioméricos de sustratos y productos, se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100, empleando las columnas quirales Chiralcel OD y Chiralpak IA e IC (25 × 0.46 cm). La detección empleada fue visible-ultravioleta a 210 y 215 nm, utilizando como fase móvil mezclas de hexano/isopropanol o hexano/etanol.

I.1.5.2.3. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (IR)

Se registraron los espectros en un espectrómetro Perkin-Elmer 1720-X FT empleando pastillas de KBr (muestras sólidas) o en ventanas de NaCl (aceites). Las bandas de tensión se indican en valores de ν máxima y se expresan en cm⁻¹.

I.1.5.2.4. ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM)

Las medidas de masa exacta se llevaron a cabo con un espectrómetro Bruker ESI-TOF empleando las técnicas de ESI⁺ o EI⁺. Los valores en ambos casos se refieren a unidades de masa atómica (uma).

I.1.5.2.5. PUNTOS DE FUSIÓN (PF)

Se han llevado a cabo con un aparato Gallenkamp en tubos capilares abiertos y por tanto sus valores no están corregidos.

I.1.5.2.6. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H-RMN, ¹³C-RMN y secuencia de pulsos DEPT han sido realizados con espectrómetros Bruker AC-300, DPX-300 y AV-300 (300.13 MHz para ¹H y 75.5 MHz para ¹³C).

Los desplazamientos químicos se dan en valores de (δ) en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento en Hertzios (Hz).

Los calibrados se hicieron sobre la señal del CDCl₃ o CD₃OD (¹³C, 76.95 ó 49.50 ppm), o del CHCl₃ o CH₃OH (¹H, 7.26 ó 3.35 ppm) residual.

I.1.5.2.7. ROTACIÓN ÓPTICA ESPECÍFICA

Se han medido con un polarímetro Perkin-Elmer 241 (unidades 10⁻¹ cm² × grado × g⁻¹), empleando la lámpara de sodio (D).

I.1.5.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS

I.1.5.3.1. PRECURSORES DE LA (R)-RIVASTIGMINA

I.1.5.3.1.1. Síntesis del 1-(3-Metoxifenil)etanol [(±)-3]

Sobre una disolución de 3-metoxiacetofenona (**2**, 3.00 g, 20 mmol) en MeOH seco (77 mL) se adiciona borohidruro de sodio (1.14 g, 30 mmol) a 0 °C y bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se deja agitando a temperatura ambiente durante 1 h. El exceso de hidruro se destruye adicionando H₂O (5 mL) lentamente a 0 °C y a continuación se evapora el MeOH. La disolución acuosa se lleva a pH 3-4 con HCl 3 N y se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 15 mL). Las fases orgánicas se combinan, se secan con Na₂SO₄, se filtran y el disolvente se evapora bajo presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice (40% AcOEt/Hexano), obteniéndose el alcohol racémico **3** como un aceite incoloro (99% de rendimiento aislado).

I.1.5.3.1.2. Síntesis de la 1-(3-Metoxifenil)etanamina [(±)-4]

Sobre una disolución del alcohol (±)-**3** (568 mg, 3.73 mmol) en THF seco (19 mL), se añaden sucesivamente trifetilfosfina (1.15 g, 4.37 mmol) y ftalimida (550 mg, 3.73 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La disolución se enfría a 0 °C y se añade gota a gota el DEAD (687 µL, 4.37 mmol). Esta mezcla se deja agitando a temperatura ambiente durante 3 h, tiempo tras el cual no se detecta material de partida tras análisis por TLC (40% AcOEt/Hexano). El disolvente orgánico se evapora bajo presión reducida y sobre el mismo crudo de reacción se lleva a cabo la desprotección del grupo amino sin necesidad de purificación adicional previa. Así, este crudo resultante se disuelve en THF (50 mL) y EtOH (8.7 mL), añadiendo a continuación la hidrazina monohidratada (1.36 mL, 28.01 mmol) gota a gota. La reacción se agita a 66 °C durante 2 h, tras las cuales se enfría la disolución a temperatura ambiente y la suspensión blanca formada tras ese tiempo se filtra en placa y se lava con THF (15 mL). El disolvente se evapora bajo presión reducida y posteriormente se añade HCl 3 N (10 mL), extrayendo la disolución con CH₂Cl₂ (3 x 15 mL) y desechando las fases orgánicas. Posteriormente se alcaliniza la fase acuosa con NaOH 3 N (15

mL) y se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 15 mL). Se combinan las fases orgánicas, se secan sobre Na₂SO₄, se filtran y el disolvente se evapora bajo presión reducida. Finalmente el nuevo crudo de reacción se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH 96/4/0.4), obteniéndose la amina (±)-**4** como un aceite incoloro (63% de rendimiento aislado).

I.1.5.3.1.3. Síntesis de la *N*-[1-(3-Metoxifenil)etil]acetamida [(±)-5a**]**

Sobre una disolución de la amina racémica **4** (37 mg, 0.25 mmol) en CH₂Cl₂ seco (1.6 mL) se añade piridina (24.8 µL, 0.31 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La disolución resultante se enfría a 0 °C y se añade gota a gota cloruro de acetilo (43.8 µL, 0.62 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 14 h, tiempo tras el cual no se detecta material de partida mediante análisis por TLC (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH 96/4/0.4). La mezcla de reacción se evapora bajo presión reducida y el crudo resultante se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (80% AcOEt/Hexano), aislándose la amida (±)-**5a** como un aceite naranja (85%).

I.1.5.3.1.4. Síntesis de la 2-Metoxi-*N*-[1-(3-metoxifenil)etil]acetamida [(±)-5b**]**

Sobre una disolución de la amina racémica **4** (37 mg, 0.25 mmol) en CH₂Cl₂ seco (1.6 mL) se añade piridina (24.8 µL, 0.31 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La disolución resultante se enfría a 0 °C y se añade cloruro de metoxiacetilo (56.3 µL, 0.62 mmol) lentamente. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 14 h, tiempo tras el cual no se detecta material de partida mediante análisis por TLC (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH 96/4/0.4). La mezcla de reacción se evapora bajo presión reducida y el crudo resultante se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (80% AcOEt/Hexano), aislándose la amida (±)-**5b** como un sólido amarillo pálido (62%).

I.1.5.3.1.5. Procedimiento General para la Resolución Cinética de la 1-(3-Metoxifenil)etanamina Racémica **4 mediante Acetilación Catalizada por la CAL-B**

Sobre una suspensión de la correspondiente amina (\pm)-**4** (50 mg, 0.33 mmol) y la CAL-B (100 mg) en TBME seco, se añade acetato de etilo (97 μ L, 0.99 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La reacción se mantiene con agitación orbital (250 rpm) a 30 ó 45 °C, siguiendo el transcurso de la reacción mediante el análisis por HPLC de alícuotas tomadas regularmente hasta que la conversión alcanza aproximadamente el 50% (19 ó 27 h a 45 ó 30 °C, respectivamente). Entonces, se para la reacción filtrando el enzima y lavándolo con CH₂Cl₂ (5 x 1 mL). Se evapora el disolvente y los productos presentes en el residuo se separan mediante cromatografía de columna en gel de sílice (gradiente de eluyentes 0-50% MeOH/AcOEt), obteniendo la amina (*S*)-**4** y la acetamida (*R*)-**5a** con rendimientos del 34 y el 43%, respectivamente. Para determinar el exceso enantiomérico de la amina remanente, se trató esta con cloruro de metoxiacetilo, lo que permitió obtener la correspondiente metoxiacetamida (*S*)-**5b** que se analizó por HPLC, al igual que la acetamida.

I.1.5.3.2. PRECURSORES DE LAS AMINAS FLUORADAS

I.1.5.3.2.1. Síntesis del 6-Fluoropiridin-3-carbonitrilo (7a**)**

En un tubo sellado provisto de imán se introduce cianuro de cobre (I) (5.22 g, 58.30 mmol) y se llevan a cabo tres ciclos de vacío-argón. A continuación, y manteniendo la atmósfera inerte, se añaden sucesivamente dimetilsulfóxido seco (16 mL) y 3-bromo-6-fluoropiridina (0.50 mL, 4.86 mmol). La suspensión resultante se agita durante 4 h a 180 °C. Tras alcanzar temperatura ambiente, se añade agua (20 mL) y el producto de la reacción se extrae con acetato de etilo (5 x 30 mL). Se mezclan las fases orgánicas y se lavan con una disolución saturada de cloruro de sodio (20 mL). Se seca la fase orgánica sobre Na₂SO₄, se filtra y se evapora el disolvente bajo presión reducida. El crudo de reacción resultante se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice neutro (gradiente 10-15% AcOEt/Hexano), aislándose el carbonitrilo **7a** como un sólido blanco (35%).

I.1.5.3.2.2. Procedimiento General para la Preparación de las Cetonas 8a y 8b

Sobre una disolución en atmósfera de nitrógeno del carbonitrilo **7a** o **7b** (1.84 mmol) en éter dietílico seco (6.1 mL) a 0 °C, se añade gota a gota y con embudo de adición, una disolución 3 M de yoduro de metil magnesio en Et₂O (2.4 mL, 7.34 mmol). Se añade 1 mL más de Et₂O para lavar los restos del embudo y se agita a temperatura ambiente durante 4 h. En este tiempo se observa una transición de la disolución amarilla inicial a una de color marrón-rojizo intenso. La mezcla de reacción se vierte sobre una disolución saturada de NH₄Cl en agua 0.3 M (6 mL) a 0 °C y se añade HCl concentrado hasta alcanzar pH 1. Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante una noche y se lleva a pH 9 con una disolución acuosa de amoníaco. Finalmente se extrae con Et₂O (3 x 15 mL) y se combinan las fases orgánicas, que posteriormente se secan con Na₂SO₄. Se filtra y se evapora el disolvente bajo presión reducida, obteniendo un crudo que se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice neutro (20% AcOEt/Hexano), obteniéndose la cetona correspondiente como un aceite amarillo pálido (**8a**: 22%; **8b**: 44%).

I.1.5.3.2.3. Procedimiento General para la Síntesis de las Aminas Racémicas 9a y 9b

En un vial adecuado para microondas se introduce la cetona de partida (0.79 mmol), acetato de amonio (917 mg, 11.90 mmol), cianoborohidruro de sodio (60 mg, 0.95 mmol) y etanol (1.8 mL). La mezcla resultante se agita y se calienta a 130 °C durante 10 minutos en un reactor de microondas (200 W, 250 psi). El etanol se elimina bajo presión reducida y el crudo de reacción se purifica mediante columna cromatográfica en gel de sílice neutro (gradiente 10-30% MeOH/CH₂Cl₂), obteniéndose la correspondiente amina en forma de aceite amarillo (**9a**: 92%; **9b**: 99%).

I.1.5.3.2.4. Síntesis de 1-(5-Fluoropiridin-3-il)etanol [(±)-10c]

Sobre una disolución de 3-bromo-5-fluoropiridina (450 mg, 2.56 mmol) en éter dietílico seco (13 mL) a -78 °C, se añade una disolución 1.6 M de butil-litio en hexano (1.76 mL, 2.81 mmol) gota a gota y bajo

Parte Experimental

atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agita durante 30 minutos a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a la suspensión amarilla formada se le añade lentamente, con embudo de adición y manteniendo la atmósfera inerte, una disolución de acetaldehído recién destilado ($360\text{ }\mu\text{L}$, 6.39 mmol) en Et_2O (1 mL), agitando la disolución a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1.5 h adicionales. Sobre la suspensión de color naranja formada se añade agua (10 mL) y se deja que alcance temperatura ambiente. Se añade HCl 1 N hasta pH 8 y el producto se extrae con Et_2O ($8 \times 10\text{ mL}$). Las fases orgánicas combinadas se secan sobre Na_2SO_4 , se filtran y se evapora el disolvente bajo presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante columna cromatográfica en gel de sílice neutro (80% AcOEt/Hexano), obteniéndose el alcohol **10c** en forma de aceite amarillo (48%).

I.1.5.3.2.5. Preparación de 1-(5-Fluoropiridin-3-il)etanamina [(±)-9c]

Sobre una disolución del alcohol **10c** (170 mg , 1.20 mmol) en THF seco (13 mL), se añaden sucesivamente trifetilfosfina (379 mg , 1.45 mmol) y ftalimida (177 mg , 1.20 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno y la disolución resultante se enfría a $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. A continuación se añade DEAD ($228\text{ }\mu\text{L}$, 1.44 mmol), gota a gota y manteniendo la atmósfera inerte, y se agita durante 3 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se evapora el disolvente bajo presión reducida y, sin purificación adicional, se lleva a cabo la desprotección de la amina. Para ello, el crudo de reacción se disuelve en una mezcla de THF (16 mL) y etanol (3 mL) y se añade hidrazina monohidratada ($438\text{ }\mu\text{L}$, 9.03 mmol). La mezcla resultante se calienta a $66\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 h hasta observar la formación de una suspensión blanca. Tras enfriar la reacción hasta temperatura ambiente, esta suspensión se filtra en placa porosa, se lava con THF ($3 \times 2\text{ mL}$) y se evapora el disolvente. Sobre este residuo se añade HCl 3 N (10 mL) y se hace una extracción con CH_2Cl_2 ($2 \times 10\text{ mL}$). La fase acuosa se alcaliniza con NaOH sólida hasta pH 10 y se extrae en continuo con CH_2Cl_2 durante una noche. La fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 , se filtra y se evapora el disolvente bajo presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante columna cromatográfica en gel de sílice neutro (gradiente de eluyentes $10\text{-}30\%$ $\text{MeOH/CH}_2\text{Cl}_2$), obteniéndose la amina (\pm)-**9c** en forma de aceite amarillo pálido (78%).

I.1.5.3.2.6. Procedimiento General para la Síntesis de las Amidas Racémicas 11a-c y 12a-c

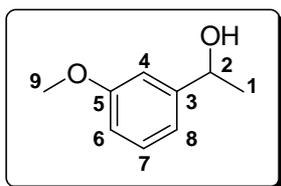
Sobre una disolución de la amina racémica **9a-c** (0.11 mmol) en CH₂Cl₂ (0.7 mL) se añade trietilamina (37 µL, 0.27 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La disolución resultante se enfría a 0 °C y se añade gota a gota cloruro de acetilo o de metoxiacetilo (0.27 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h, tiempo tras el cual no se detecta material de partida mediante análisis por TLC (diferentes mezclas 10-30% MeOH/CH₂Cl₂, dependiendo del compuesto). La mezcla de reacción se evapora bajo presión reducida y el crudo resultante se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice neutro (3 ó 5% MeOH/CH₂Cl₂ en función del compuesto), aislándose las correspondientes amidas (±)-**11a-c** o (±)-**12a-c** como semi-sólidos o sólidos de colores variables entre blanco y amarillo.

I.1.5.3.2.7. Procedimiento General para la Resolución Cinética de las Aminas (±)-9a-c mediante Acilación Catalizada por la CAL-B

Sobre una suspensión de la correspondiente amina racémica **9a-c** (40 mg, 0.1 M) y el enzima (CAL-B, 40 mg) en THF seco, se añade metoxiacetato de etilo (5 equivalentes) bajo atmósfera de nitrógeno. La reacción se mantiene con agitación orbitalica (250 rpm) a 30 °C durante 2-7 h (ver Tabla 1-2), siguiendo el transcurso de la reacción por HPLC hasta que la conversión alcanza aproximadamente el 50%. Entonces, se para la reacción filtrando el enzima y lavándolo con THF (5 x 1 mL). Se evapora el disolvente y los productos presentes en el residuo (la amina **9a-c** y la metoxiacetamida **12a-c** ópticamente activas) se separan mediante cromatografía de columna en gel de sílice neutro (gradiente de eluyentes 5-50% MeOH/CH₂Cl₂). Para determinar el exceso enantiomérico de las aminas (S)-**9a-c**, se trataron las mismas con cloruro de acetilo, lo que permitió obtener las correspondientes acetamidas (S)-**11a-c** que se analizaron por HPLC, al igual que las metoxiacetamidas.

I.1.5.4. DATOS EXPERIMENTALES

1-(3-Metoxifenil)etanol (3)



Fórmula empírica: C₉H₁₂O₂

Aspecto físico: Aceite incoloro

Peso molecular: 152.19 g/mol

R_f (40% AcOEt/Hexano): 0.37

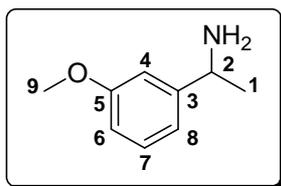
IR (NaCl): ν 3379, 2972, 1602, 1590, 1488, 1369, 1259, 1159, 1045, 857 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.48 (d, 3H, *J* 6.5, H₁), 1.87 (sa, 1H, OH), 3.82 (s, 3H, H₉), 4.86 (c, 1H, *J* 6.4, H₂), 6.81 (ddd, 1H, *J* 8.1, 2.6 y 1.1, H₆), 6.94 (m, 2H, H₄+H₈), 7.26 (t, 1H, *J* 8.1, H₇)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 25.6 (C₁), 55.7 (C₉), 70.7 (C₂), 111.4 (C₄), 113.3 (C₆), 118.2 (C₈), 130.0 (C₇), 148.1 (C₃), 160.2 (C₅)

HRMS (EI⁺) calculado para C₉H₁₂O₂ [M⁺]: 152.0837; experimental: 152.0851

1-(3-Metoxifenil)etanamina (4)



Fórmula empírica: C₉H₁₃NO

Aspecto físico: Aceite incoloro

Peso molecular: 151.21 g/mol

R_f (CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH 96/4/0.4): 0.17

IR (NaCl): ν 3354, 3291, 2964, 1602, 1487, 1259, 1042, 785 cm⁻¹

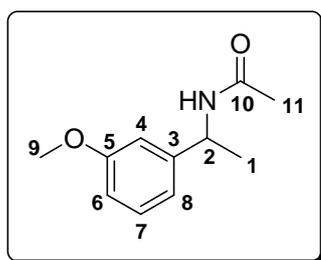
¹H-RMN (MeOD, 300.13 MHz): δ 1.41 (d, 3H, *J* 6.8, H₁), 3.81 (s, 3H, H₉), 4.04 (c, 1H, *J* 6.8, H₂), 6.82 (ddd, 1H, *J* 8.3, 2.3 y 1.0, H₆), 6.94-6.97 (m, 2H, H₄+H₈), 7.26 (t, 1H, *J* 8.3, H₇)

¹³C-RMN (MeOD, 75.5 MHz): δ 25.6 (C₁), 52.7 (C₂), 56.1 (C₉), 113.0 (C₄), 113.9 (C₆), 119.6 (C₈), 131.1 (C₇), 150.0 (C₃), 161.8 (C₅)

HRMS (ESI⁺) calculado para C₉H₁₄NO [(M+H)⁺]: 152.1075; encontrado: 152.1070

Rotación específica: $[\alpha]_D^{20} = -13.6$ (c = 0.74, MeOH), >99% ee (enantiómero S), por acetilación enzimática

N-[1-(3-Metoxifenil)etil]acetamida (5a)



Fórmula Molecular: C₁₁H₁₅NO₂

Aspecto físico: Aceite naranja

Peso molecular: 193.24 g/mol

R_f (80% AcOEt/hexano): 0.26

IR (NaCl): ν 3283, 3068, 2972, 2933, 2837, 1648, 1604, 1552, 1490, 1454, 1436, 1374, 1285, 1258, 1170, 1127, 1039, 963, 874, 784, 700 cm⁻¹

¹H-RMN (MeOD, 300.13 MHz): δ 1.45 (d, *J* 7.1, 3H, H₁), 1.99 (s, 3H, H₁₁), 3.82 (s, 3H, H₉), 5.00 (q, *J* 7.1, 1H, H₂), 6.82 (ddd, *J* 8.2, 2.6 y 1.0, 1H, H₆), 6.93-6.91 (m, 2H, H₄+H₈), 7.26 (t, *J* 8.2, 1H, H₇)

¹³C-RMN (MeOD, 75.5 MHz): δ 22.9 (C₁), 23.1 (C₁₁), 50.6 (C₂), 56.1 (C₉), 113.5 (C₄), 113.8 (C₆), 119.8 (C₈), 131.0 (C₇), 147.3 (C₃), 161.8 (C₅), 172.0 (C₁₀)

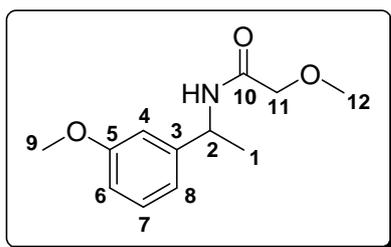
HRMS (ESI⁺) calculada para C₁₁H₁₅NO₂ [(M+H)⁺]: 194.1181; encontrada: 194.1176

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OD	Eluyente: hexano/2-propanol (90:10)
Temperatura: 20 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (+)-(R): 18.4 min	t_R (-)-(S): 33.5 min

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +166.13$ (c 1.0, CHCl₃), >99% ee (enantiómero *R*), por acetilación enzimática

Parte Experimental

2-Metoxi-N-[1-(3-metoxifenil)etil]acetamida (5b)



Fórmula Molecular: C₁₂H₁₇NO₃

Aspecto físico: Sólido amarillo pálido

Peso molecular: 223.27 g/mol

R_f (80% AcOEt/hexano): 0.29

PF: 35-36 °C

IR (KBr): ν 3325, 2997, 2972, 2932, 2839, 2467, 1644, 1601, 1532, 1494, 1460, 1430, 1350, 1320, 1283, 1254, 1199, 1177, 1161, 1114, 1036, 984, 846, 793 cm⁻¹

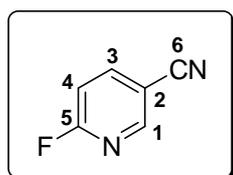
¹H-RMN (MeOD, 300.13 MHz): δ 1.51 (d, *J* 7.1, 3H, H₁), 3.44 (s, 3H, H₁₂), 3.82 (s, 3H, H₉), 3.93 (s, 2H, H₁₁), 5.09 (q, *J* 7.1, 1H, H₂), 6.83 (ddd, *J* 8.1, 2.5 y 0.8, 1H, H₆), 6.96-6.93 (m, 2H, H₄+H₈), 7.26 (t, *J* 8.1 Hz, 1H, H₇)

¹³C-RMN (MeOD, 75.5 MHz): δ 22.6 (C₁), 50.2 (C₂), 56.1 (C₉), 60.0 (C₁₂), 73.2 (C₁₁), 113.5 (C₄), 114.0 (C₆), 119.9 (C₈), 131.1 (C₇), 147.0 (C₃), 161.9 (C₅), 172.0 (C₁₀)

HRMS (ESI⁺) calculada para C₁₂H₁₇NO₃ [(M+H)⁺]: 224.1287; encontrada: 224.1281

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OD	Eluyente: hexano/2-propanol (90:10)
Temperatura: 20 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (R): 12.3 min	t_R (S): 22.1 min

6-Fluoropiridin-3-carbonitrilo (7a)



Fórmula Molecular: C₆H₃FN₂

Aspecto físico: Sólido blanco

Peso molecular: 122.10 g/mol

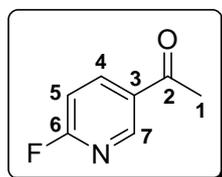
R_f (20% AcOEt/Hexano): 0.40

PF: 51-53 °C

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.10 (ddd, *J* 0.8, 2.9 y 8.6, 1H, H₄), 8.08 (ddd, *J* 2.3, 7.1 y 8.4, 1H, H₃), 8.57-8.58 (m, 1H, H₁)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 107.9 (d, *J* 18, C₂), 110.8 (d, *J* 152, C₄), 115.5 (C₆), 144.3 (d, *J* 37, C₃), 152.2 (d, *J* 67, C₁), 164.8 (d, *J* 990, C₅)

1-(6-Fluoropiridin-3-il)etanona (8a)



Fórmula Molecular: C₇H₆FNO

Aspecto físico: Aceite amarillo pálido

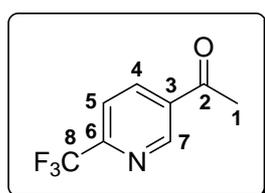
Peso molecular: 139.13 g/mol

R_f (20% AcOEt/Hexano): 0.33

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.60 (s, 3H, H₁), 7.00 (dd, *J* 2.9 y 8.6, 1H, H₅), 8.30-8.37 (m, 1H, H₄), 8.77 (s, 1H, H₇)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 26.5 (C₁), 109.8 (d, *J* 149, C₅), 130.9 (C₃), 141.1 (d, *J* 39, C₄), 149.2 (d, *J* 67, C₇), 165.5 (d, *J* 979, C₆), 194.8 (C₂)

1-[6-(Trifluorometil)piridin-3-il]etanona (8b)



Fórmula Molecular: C₈H₆F₃NO

Aspecto físico: Aceite amarillo pálido

Peso molecular: 189.13 g/mol

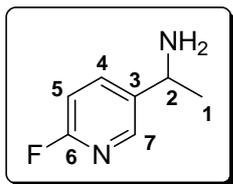
R_f (20% AcOEt/Hexano): 0.31

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 2.64 (s, 3H, H₁), 7.76 (dd, *J* 0.8 y 8.2, 1H, H₅), 8.36 (dd, *J* 1.4 y 8.2, 1H, H₄), 9.17 (dd, *J* 0.8 y 1.4, 1H, H₇)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 26.7 (C₁), 120.4 (C₅), 120.9 (c, *J* 1092, C₈), 134.0 (C₃), 137.0 (C₄), 149.7 (C₇), 150.9 (c, *J* 140, C₆), 195.4 (C₂)

Parte Experimental

1-(6-Fluoropiridin-3-il)etanamina (9a)



Fórmula Molecular: C₇H₉FN₂

Aspecto físico: Aceite amarillo pálido

Peso molecular: 140.16 g/mol

R_f (20% MeOH/CH₂Cl₂): 0.18

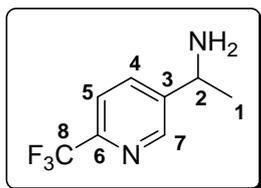
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.56 (d, *J* 6.8, 3H, H₁), 4.38 (sa, 1H, H₂), 6.93 (dd, *J* 8.6 y 2.9, 1H, H₅), 7.92-7.98 (m, 1H, H₄), 8.24 (s, 1H, H₇)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 21.0 (C₁), 47.9 (C₂), 109.8 (d, *J* 148, C₅), 139.9, 140.0 (C₃, C₄), 146.4 (d, *J* 58, C₇), 163.3 (d, *J* 957, C₆)

HRMS (ESI⁺) calculada para C₇H₁₀FN₂ [(M+H)⁺]: 141.0823; encontrada: 141.0835

Rotación Específica: [α]_D²⁰ = -24.1 (c = 0.3, CHCl₃), 96% ee (enantiómero S), por acilación enzimática

1-[6-(Trifluorometil)piridin-3-il]etanamina (9b)



Fórmula Molecular C₈H₉F₃N₂

Aspecto físico: Aceite amarillo

Peso molecular: 190.17 g/mol

R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂): 0.18

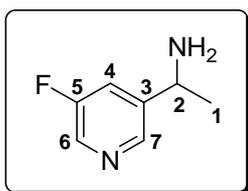
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.61 (d, *J* 6.5, 3H, H₁), 1.89 (sa, 2H, NH₂), 4.51 (c, *J* 6.5, 1H, H₂), 7.70 (d, *J* 8.1, 1H, H₅), 8.04 (d, *J* 8.1, 1H, H₄), 8.77 (s, 1H, H₇)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 22.0 (C₁), 48.6 (C₂), 120.6 (C₅), 121.2 (d, *J* 1089, C₈), 136.2 (C₄), 138.6 (C₃), 147.7 (C₆), 148.8 (C₇)

HRMS (ESI⁺) calculada para C₈H₁₀F₃N₂ [(M+H)⁺]: 191.0791; encontrada: 191.0787

Rotación Específica: [α]_D²⁰ = -7.7 (c = 0.3, CHCl₃), 94% ee (enantiómero S), por acilación enzimática

1-(5-Fluopiridin-3-il)etanamina (9c)



Fórmula Molecular: C₇H₉FN₂

Aspecto físico: Aceite amarillo pálido

Peso molecular: 140.16 g/mol

R_f (30% MeOH/CH₂Cl₂): 0.38

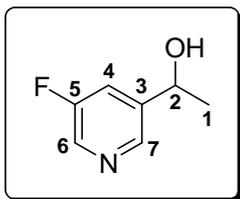
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.38 (d, *J* 6.6, 3H, H₁), 1.82 (sa, 2H, NH₂), 4.21 (c, *J* 6.6, 1H, H₂), 7.45 (dt, *J* 2.0 y 9.6, 1H, H₄), 8.32 (d, *J* 2.8, 1H, H₆), 8.38 (t, *J* 1.8, 1H, H₇)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 25.5 (C₁), 48.4 (C₂), 120.0 (d, *J* 71, C₄), 136.5 (d, *J* 94, C₆), 143.8 (d, *J* 16, C₇), 144.6 (C₃), 159.7 (d, *J* 1018, C₅)

HRMS (ESI⁺) calculada para C₇H₁₀FN₂ [(M+H)⁺]: 141.0823; encontrada: 141.0823

Rotación Específica: [α]_D²⁰ = -13.7 (c = 0.5, CHCl₃), 95% ee (enantiómero S), por acilación enzimática

1-(5-Fluoropiridin-3-il)etanol (10c)



Fórmula Molecular: C₇H₈FNO

Aspecto físico: Aceite amarillo

Peso molecular: 141.14 g/mol

R_f (100% AcOEt): 0.49

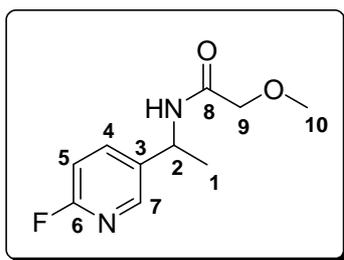
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.40 (d, *J* 6.5, 3H, H₁), 4.86 (c, *J* 6.5, 1H, H₂), 5.05 (sa, 1H, OH), 7.41 (dt, *J* 2.2 y 9.3, 1H, H₄), 8.12 (d, *J* 2.6, 1H, H₆), 8.18 (s, 1H, H₇)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 25.0 (C₁), 66.5 (C₂), 120.2 (d, *J* 73, C₄), 136.0 (d, *J* 95, C₆), 142.5 (d, *J* 16, C₇), 143.9 (d, *J* 11, C₃), 159.5 (d, *J* 1021, C₅)

HRMS (ESI⁺) calculada para C₇H₉FNO [(M+H)⁺]: 142.0663; encontrada: 142.0674

Parte Experimental

N-[1-(6-Fluoropiridin-3-il)etil]-2-metoxiacetamida (11a)



Fórmula Molecular: C₁₀H₁₃FN₂O₂

Aspecto físico: Sólido blanco

Peso molecular: 212.22 g/mol

R_f (3% MeOH/CH₂Cl₂): 0.30

PF: 62-64 °C

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.54 (d, *J* 7.1, 3H, H₁), 3.41 (s, 3H, H₁₀), sistema AB (δ_A = 3.86, δ_B = 3.92 |²*J*_{A,B}| = 15.1, 2H, H₉), 5.19 (q, *J* 7.1, 1H, H₂), 6.76 (da, *J* 7.1, 1H, NH), 6.89 (dd, *J* 8.6 y 3.1, 1H, H₅), 7.75 (dt, *J* 8.1 y 2.6, 1H, H₄), 8.19 (d, *J* 2.2, 1H, H₇),

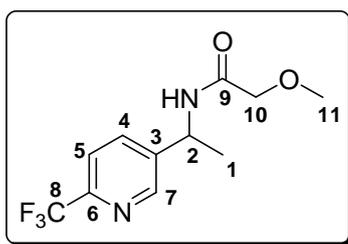
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 21.4 (C₁), 45.3 (C₂), 59.1 (C₁₀), 71.7 (C₉), 109.4 (d, *J* 149.4, C₅), 136.2 (d, *J* 18, C₃), 139.3 (d, *J* 32, C₄), 145.5 (d, *J* 60, C₇), 162.9 (d, *J* 949, C₆), 168.8 (C₈)

HRMS (ESI⁺) calculada para C₁₀H₁₄FN₂O₂ [(M+H)⁺]: 213.1034; encontrada: 213.1022. Calculada para C₁₀H₁₃FN₂NaO₂ [(M+Na)⁺]: 235.0853; encontrada: 235.0835

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralpak IC	Eluyente: hexano/etanol (85:15)
Temperatura: 30 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (-)-(S): 22.1 min	t_R (+)-(R): 25.6 min

Rotación Específica: [α]_D²⁰ = +61.4 (c = 0.5, CHCl₃), >99% ee (enantiómero *R*), por acilación enzimática

N-[1-(6-Trifluorometilpiridin-3-il)etil]-2-metoxiacetamida (11b)



Fórmula Molecular: C₁₁H₁₃F₃N₂O₂

Aspecto físico: Sólido amarillo pálido

Peso molecular: 262.23 g/mol

R_f (5% MeOH/CH₂Cl₂): 0.43

PF: 68-69 °C

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.57 (d, *J* 7.2, 3H, H₁), 3.43 (s, 3H, H₁₁), sistema AB (δ_A = 3.87, δ_B = 3.94 |²J_{A,B}| = 15.1, 2 H, H₁₀), 5.23 (q, *J* 7.2, 1H, H₂), 6.84 (da, *J* 7.2, 1H, NH), 7.65 (d, *J* 8.1, 1H, H₅), 7.81 (d, *J* 8.1, 1H, H₄), 8.70 (s, 1H, H₇)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 21.5 (C₁), 45.9 (C₂), 59.1 (C₁₁), 71.7 (C₁₀), 120.3 (c, *J* 11, C₅), 121.4 (c, *J* 1089, C₈), 135.1 (C₄), 141.8 (C₃), 147.1 (c, *J* 138, C₆), 148.2 (C₇), 169 (C₉)

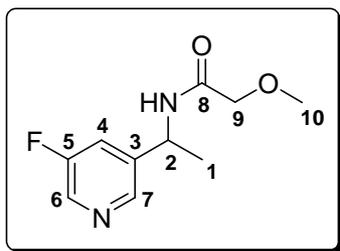
HRMS (ESI⁺) calculada para C₁₁H₁₄F₃N₂O₂ [(M+H)⁺]: 263.1007; encontrada: 263.1021. Calculada para C₁₁H₁₃F₃N₂NaO₂ [(M+Na)⁺]: 285.0827; encontrada: 285.0818

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralpak IA	Eluyente: hexano/etanol (90:10)
Temperatura: 40 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (+)-(R): 11.2 min	t_R (-)-(S): 13.9 min

Rotación Específica: [α]_D²⁰ = +56.5 (c = 1.0, CHCl₃), 99% ee (enantiómero R), por acilación enzimática

Parte Experimental

***N*-[1-(5-Fluoropiridin-3-il)etil]-2-metoxiacetamida (11c)**



Fórmula Molecular: C₁₀H₁₃FN₂O₂

Aspecto físico: Sólido amarillo

Peso molecular: 212.22 g/mol

R_f (5% MeOH/CH₂Cl₂): 0.42

PF: 52-54 °C

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.52 (d, *J* 7.1, 3H, H₁), 3.40 (s, 3H, H₁₀), sistema AB (δ_A = 3.85, δ_B = 3.90 |²*J*_{A,B}| = 15.1, 2 H, H₉), 5.18 (q, *J* 7.1, 1H, H₂), 6.83 (da, *J* 7.1, 1H, NH), 7.34 (dt, *J* 2.1 y 9.4, 1H, H₄), 8.34 (d, *J* 2.6, 1H, H₆), 8.39 (s, 1H, H₇)

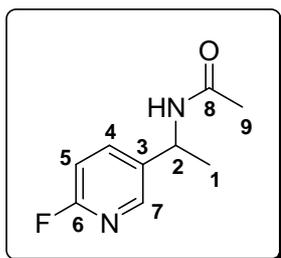
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 21.4 (C₁), 45.5 (C₂), 59.0 (C₁₀), 71.6 (C₉), 120.6 (d, *J* 74, C₄), 136.8 (d, *J* 94, C₆), 140.4 (C₃), 143.6 (d, *J* 16, C₇), 159.4 (d, *J* 1023, C₅), 168.8 (C₈)

HRMS (ESI⁺) calculada para C₁₀H₁₄FN₂O₂ [(M+H)⁺]: 213.1034; encontrada: 213.1023. Calculada para C₁₀H₁₃FN₂NaO₂ [(M+Na)⁺]: 235.0853; encontrada: 235.0842

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralpak IC	Eluyente: hexano/etanol (95:5)
Temperatura: 40 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (-)-(S): 58.3 min	t_R (+)-(R): 61.8 min

Rotación Específica: [α]_D²⁰ = +68.9 (c = 1.0, CHCl₃), >99% ee (enantiómero *R*), por acilación enzimática

N-[1-(6-Fluoropiridin-3-il)etil]acetamida (12a)



Fórmula Molecular: C₉H₁₁FN₂O

Aspecto físico: Semisólido amarillo pálido

Peso molecular: 182.19 g/mol

R_f (5% MeOH/CH₂Cl₂): 0.28

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.50 (d, *J* 7.1, 3H, H₁), 1.99 (s, 3H, H₉), 5.14 (q, *J* 7.1, 1H, H₂), 5.89 (da, *J* 7.1, 1H, NH), 6.89 (dd, *J* 3.1 y 8.6, 1H, H₅), 7.74 (dt, *J* 2.6 y 8.3, 1H, H₄), 8.17 (d, *J* 2.0, 1H, H₇)

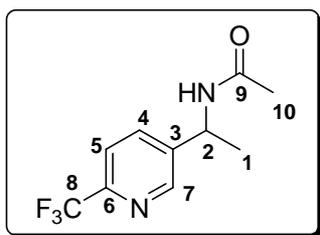
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 21.4 (C₁), 23.2 (C₉), 46.0 (C₂), 109.3 (d, *J* 149, C₅), 136.5 (d, *J* 18, C₃), 139.4 (d, *J* 32, C₄), 145.4 (d, *J* 60, C₇), 162.8 (d, *J* 949, C₆), 169.3 (C₈)

HRMS (ESI⁺) calculada para C₉H₁₂FN₂O [(M+H)⁺]: 183.0928; encontrada: 183.0923. Calculada para C₉H₁₁FN₂NaO [(M+Na)⁺]: 205.0748; encontrada: 205.0740

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralpak IC	Eluyente: hexano/etanol (85:15)
Temperatura: 30 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (S): 11.7 min	t_R (R): 13.9 min

Parte Experimental

N-[1-(6-(Trifluorometil)piridin-3-il)etil]acetamida (12b)



Fórmula Molecular: C₁₀H₁₁F₃N₂O

Aspecto físico: Semisólido amarillo pálido

Peso molecular: 232.20 g/mol

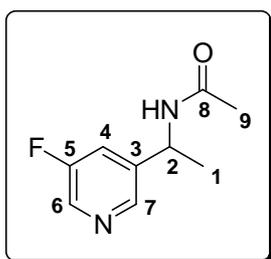
R_f (5% MeOH/CH₂Cl₂): 0.33

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.50 (d, *J* 7.0, 3H, H₁), 1.98 (s, 3H, H₁₀), 5.15 (q, *J* 7.0, 1H, H₂), 6.19 (da, *J* 7.0, 1H, NH), 7.62 (d, *J* 8.1, 1H, H₅), 7.79 (d, *J* 8.1, 1H, H₄), 8.66 (s, 1H, H₇)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 21.4 (C₁), 23.0 (C₁₀), 46.7 (C₂), 120.2 (C₅), 121.4 (c, *J* 1089.1, C₈), 135.1 (C₄), 142.2 (C₃), 146.9 (c, *J* 138, C₆), 148.1 (C₇), 170 (C₉)

HRMS (ESI⁺) calculada para C₁₀H₁₂F₃N₂O [(M+H)⁺]: 233.0896; encontrada: 233.0898. Calculada para C₁₀H₁₁F₃N₂NaO [(M+Na)⁺]: 255.0716; encontrada: 255.0726

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralpak IA	Eluyente: hexano/etanol (90:10)
Temperatura: 40 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (R): 7.5 min	t_R (S): 15.3 min

N-[1-(5-Fluoropiridin-3-il)etil]acetamida (12c)**Fórmula Molecular:** C₉H₁₁FN₂O**Aspecto físico:** Semisólido amarillo pálido**Peso molecular:** 182.19 g/mol**R_f** (5% MeOH/CH₂Cl₂): 0.18

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.51 (d, *J* 7.1, 3H, H₁), 2.00 (s, 3H, H₉), 5.16 (q, *J* 7.1, 1H, H₂), 6.00 (da, *J* 7.1, 1H, NH), 7.35 (d, *J* 9.2, 1H, H₄) 8.40-8.43 (m, 2H, H₆+H₇)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 21.5 (C₁), 23.2 (C₉), 46.3 (C₂), 120.6 (d, *J* 74, C₄), 136.9 (d, *J* 92, C₆), 140.7 (C₃), 143.7 (d, *J* 16, C₇), 159.7 (d, *J* 919, C₅), 169.3 (C₈)

HRMS (ESI⁺) calculada para C₉H₁₂FN₂O [(M+H)⁺]: 183.0928; encontrada: 183.0925. Calculada para C₉H₁₁FN₂NaO [(M+Na)⁺]: 205.0748; encontrada: 205.0752

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralpak IC	Eluyente: hexano/etanol (95:5)
Temperatura: 40 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (S): 33.3 min	t_R (R): 40.7 min

CAPÍTULO 2

***Preparación quimioenzimática de 1-aril y
1-heroarilpropan-2-aminas a través de
procesos de resolución cinética clásica
o dinámica***

ANTECEDENTES

En este capítulo se aborda la preparación estereoselectiva de 1-aril y 1-heteroarilpropan-2-aminas, cuyo carbono asimétrico se encuentra situado una posición más alejada del sustituyente aromático en comparación con los compuestos tratados en el apartado anterior. Esta familia de aminas poseen importantes y atractivas propiedades farmacológicas, fundamentalmente centradas en el tratamiento de diversos problemas de naturaleza psíquica o endocrina, como pueden ser desórdenes del sueño, depresión u obesidad.⁹⁶

⁹⁶ R. A. Glennon, *J. Med. Chem.* 1987, **30**, 1-12.

I.2.1.1. IMPORTANCIA Y APLICACIONES

La 1-fenilpropan-2-amina, conocida como anfetamina, es un potente estimulante del sistema nervioso central, siendo su enantiómero S aquél en el que reside su mayor actividad farmacológica (Figura 2-1).⁹⁷ El uso médico experimental de las anfetaminas comenzó en los años veinte, siendo empleada sobre todo por los militares para combatir la fatiga e incrementar el estado de alerta, pero con el tiempo se llegaron a usar para fines tan variados como la narcolepsia, la obesidad, la depresión, el tratamiento de la sobredosis por sedantes e incluso para la rehabilitación del alcoholismo o la adicción a otras drogas.



Figura 2-1. Estructura de la dexanfetamina, enantiómero dextrógiro que posee la mayor parte de la actividad biológica de la anfetamina

Así durante décadas se han sintetizado análogos a través de la modificación de distintas partes de su estructura, encontrándose actividad en muchos de ellos, tanto en animales como en humanos.⁹⁸ Además, por su relación con uno de los compuestos estudiados en esta parte de la Tesis Doctoral, cabe destacar que algunas anfetaminas también se han conjugado con el fenol derivado de la (S)-Rivastigmina, dando lugar a compuestos bifuncionales capaces de mantener su capacidad de inhibición de la colinesterasa a la vez que liberan al organismo las aminas farmacológicamente activas tras la reacción de carbamoilación de un residuo de serina del centro activo del enzima.⁹⁹

⁹⁷ S. H. Snyder, K. M. Tayler, *Science* **1970**, *168*, 1487-1489.

⁹⁸ a) R. A. Glennon, R. Young, A. E. Hauck, J. D. McKenney, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1984**, *21*, 895-901; b) J. S. Partilla, A. G. Dempsey, A. S. Nagpal, B. E. Blough, M. H. Baumann, R. B. Rothman, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *319*, 237-246; c) M. A. Parker, D. M. Kurrasch, D. E. Nichols, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4661-4669; d) P. S. Clifford, N. Hart, R. B. Rothman, B. E. Blough, G. R. Bratton, P. J. Wellman, *Life Sciences* **2011**, *88*, 586-589.

⁹⁹ J. C. Verheijen, K. A. Wiig, S. Du, S. L. Connors, A. N. Martin, J. P. Ferreira, V. I. Slepnev, U. Kochendörfer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3243-3246.

Para la mayor parte de los compuestos que se discutirán a lo largo de este capítulo ya se han encontrado aplicaciones prácticas, algunas de las cuales se recogen a continuación.

Recientemente se ha demostrado que las 1- y 2-naftilpropan-2-aminas son eficientes inhibidores de una clase de enzimas como son las monoamino oxidasas (MAO),¹⁰⁰ por lo que pueden encontrar aplicación como antidepresivos o en el tratamiento del Parkinson. Esta actividad inhibidora ha resultado ser especialmente intensa en este tipo de compuestos, ya que la riqueza electrónica de los dos anillos fusionados hace que se refuercen las interacciones de tipo π con los residuos aromáticos presentes en el centro activo de la proteína. Además, se ha probado que el derivado con el sustituyente 2-naftilo carece de efectos secundarios relacionados con la estimulación del sistema nervioso central.

También se encuentran descritos en la bibliografía derivados sustituidos con anillos heteroaromáticos como la 1-(1*H*-indol-3-il)propan-2-amina, conocida también como α -metiltryptamina, y sus derivados, para los que se han descrito múltiples propiedades, como pueden ser su capacidad de unión a diferentes receptores de la serotonina,¹⁰¹ la adrenalina (adrenérgicos)¹⁰² o la dopamina,¹⁰³ o su empleo como producto de partida para la síntesis de compuestos con actividades antifúngicas.¹⁰⁴ Dentro de esta familia de aminas también se puede encontrar la α -metilhistamina, cuyo enantiómero *R* es significativamente más potente que el *S*, y se emplea como referente en la actuación de diferentes compuestos como agonistas de los receptores H₃ y H₄ de la histamina, compuesto relacionado fundamentalmente con las reacciones alérgicas pero del que

¹⁰⁰ M. Vilches-Herrera, J. Miranda-Sepúlveda, M. Rebolledo-Fuentes, A. Fierro, S. Lühr, P. Iturriaga-Vasquez, B. K. Cassels, M. Reyes-Parada, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2452-2460.

¹⁰¹ a) D. E. Nichols, D. H. Lloyd, M. P. Johnson, A. J. Hoffman, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1406-1412; b) M. Dukat, C. Smith, K. Herrick-Davis, M. Teitler, R. A. Glennon, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2545-2552.

¹⁰² H. Harada, Y. Hirokawa, K. Suzuki, Y. Hiyama, M. Oue, H. Kawashima, N. Yoshida, Y. Furutani, S. Kato, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1301-1305.

¹⁰³ D. Robaa, C. Enzensperger, S. E. AbulAzm, M. M. Hefnawy, H. I. El-Subbagh, T. A. Wani, J. Lehmann, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7422-7426.

¹⁰⁴ F. Soriano-Agatón, D. Lagoutte, E. Poupon, F. Roblot, A. Fournet, J.-C. Gantier, R. Hocquemiller, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1581-1587.

Antecedentes

actualmente se reconoce también su función como neurotransmisor. Sin embargo, su uso clínico es limitado debido a problemas de absorción, de penetración en el cerebro y de rápida inactivación en humanos, por lo que en la última década se ha sintetizado una gran variedad de análogos mediante modificaciones en la cadena alquílica, la unión de sustituyentes al grupo amino o incluso sustituyendo el imidazol por otro anillo aromático.^{98c,105}

Sin embargo, a pesar de las variadas e importantes aplicaciones clínicas de este tipo de aminas, y las considerables diferencias existentes en su actividad en función de la estereoquímica,¹⁰⁶ son muy escasos los estudios biológicos realizados sobre compuestos enantioméricamente puros, probablemente debido a su limitada disponibilidad.

I.2.1.2. SÍNTESIS ESTEREOSELECTIVAS ENZIMÁTICAS

La versatilidad de los catalizadores enzimáticos ha permitido desarrollar procesos altamente selectivos para la preparación de aminas ópticamente activas.⁴⁶ Además, algunas de estas metodologías basadas en la catálisis enzimática han sido aplicadas a la síntesis de compuestos estructuralmente relacionados con la anfetamina. Así, por ejemplo, las ω -transaminasas (ω -TA) han permitido tanto la resolución como la síntesis de aminas quirales, bien a través de resoluciones cinéticas partiendo de las aminas racémicas en el primero de los casos, o mediante aminación reductiva de cetonas en el segundo.¹⁰⁷

Sin embargo, para la obtención de aminas ópticamente activas, los métodos enzimáticos que se emplean más frecuentemente son las resoluciones cinéticas (KR), las cuales parten de productos racémicos. Estas pueden tener lugar mediante acilación o hidrólisis enantioselectivas de aminas libres o *N*-acilamidas, respectivamente. Además, si el primero

¹⁰⁵ a) H. Stark, M. Krause, A. Rouleau, M. Garbarg, J.-C. Schwartz, W. Schunack, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 191-198; b) K. Neuvonen, H. Neuvonen, F. Fülöp, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3495-3498; c) P. Igel, S. Dove, A. Buschauer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 7191-7199.

¹⁰⁶ A. H. Lewin, G. M. Miller, B. Gilmour, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 7044-7048.

¹⁰⁷ a) D. Koszelewski, D. Pressnitz, D. Clay, W. Kroutil, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4810-4812; b) D. Koszelewski, M. Göritzner, D. Clay, B. Seisser, W. Kroutil, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 73-77.

de los procesos se combina con una racemización química no selectiva de la amina remanente, es posible superar la barrera del 50% de conversión a través de una resolución cinética dinámica (DKR). Puesto que ambas aproximaciones han sido las empleadas para el desarrollo de este capítulo, se comentarán algunos ejemplos destacados en sus respectivos apartados.

I.2.1.2.1. RESOLUCIONES CINÉTICAS CLÁSICAS (KR) MEDIANTE ACILACIÓN DE AMINAS RACÉMICAS CATALIZADAS POR LIPASAS

Con el fin de tener acceso a ambos enantiómeros de diferentes aminas relacionadas estructuralmente con la anfetamina, se han llevado a cabo resoluciones enzimáticas de los correspondientes racematos empleando para ello diferentes biocatalizadores. En la mayoría de los casos, los mejores resultados se han encontrado en los procesos de acilación catalizados por la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B, ya que este tipo de sustratos tienen una estructura muy adecuada para adaptarse al entorno del centro activo de este enzima.

Por otro lado, una adecuada selección del agente acilante es crucial para una resolución cinética satisfactoria de la amina objeto de estudio.¹⁰⁸ En este contexto, el acetato de etilo es, probablemente, el más empleado para desempeñar esta función debido a su bajo coste, fácil manejo y a la posibilidad de utilizarlo, a la vez, como disolvente para la biotransformación. No obstante, han sido numerosos los diferentes donores de acilo estudiados con el fin de obtener resultados más satisfactorios.¹⁰⁹

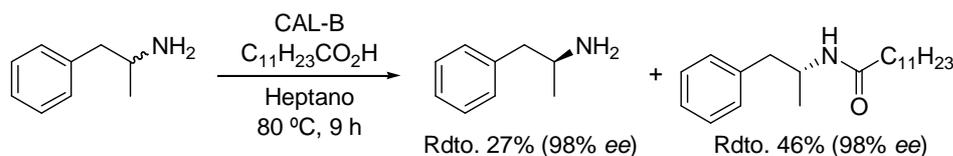
Así, por ejemplo, Nechab y colaboradores describieron la resolución de una amplia familia de aminas con diferentes características estructurales, entre las que se encuentra la anfetamina, empleando ácidos carboxílicos de cadena larga como agentes acilantes, así como sus correspondientes ésteres de etilo, y la CAL-B como biocatalizador

¹⁰⁸ a) U. Hanefeld, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2405-2415; b) A. Goswami, Z. Guo, W. L. Parker, R. N. Patel, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 1715-1719.

¹⁰⁹ M. Paravidino, U. Hanefeld, *Green Chem.* **2011**, *13*, 2651-2657.

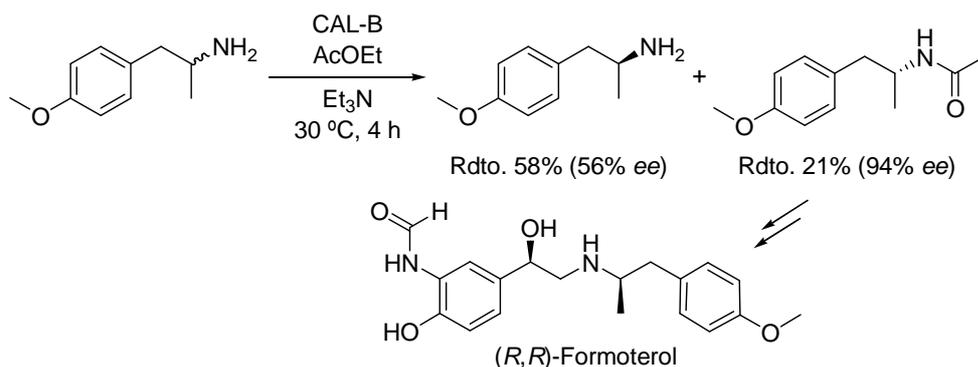
Antecedentes

(Esquema 2-1).¹¹⁰ Sorprendentemente, se encontró que los primeros originaban una marcada aceleración de la reacción, además de conducir a los productos acilados con una mayor enantioselectividad.



Esquema 2-1. Resolución cinética de la anfetamina con la CAL-B, en heptano a 80 °C y empleando ácido láurico como donador de acilo

La resolución del derivado sustituido en la posición *para* del anillo con un grupo metoxilo ha permitido el acceso al broncodilatador (*R,R*)-Formoterol, diastereoisómero de mayor actividad.¹¹¹ Dicha biotransformación, catalizada con la CAL-B, se llevó a cabo en acetato de etilo y empleando trietilamina como aditivo básico (Esquema 2-2). Este ejemplo demuestra el potencial que puede tener la Biocatálisis en la síntesis de productos con actividad biológica ya que, en algunos casos, permite el diseño de rutas sintéticas más cortas y sencillas que las descritas por métodos estrictamente químicos.

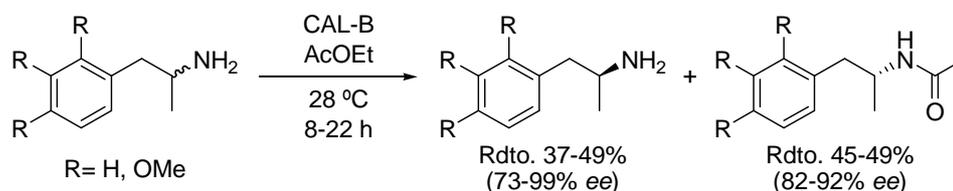


Esquema 2-2. Resolución cinética catalizada por la CAL-B de la amina precursora del (*R,R*)-Formoterol

¹¹⁰ M. Nechab, N. Azzi, N. Vanthuyne, M. Bertrand, S. Gastaldi, G. Gil, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6918-6923.

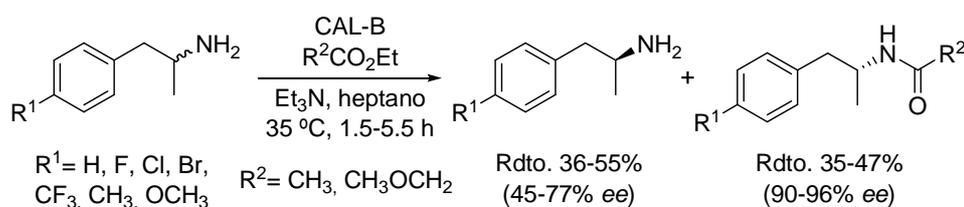
¹¹¹ F. Campos, M. P. Bosch, A. Guerrero, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 2705-2717.

Posteriormente, en nuestro grupo de investigación se extendió el estudio a los compuestos sustituidos en *orto* y *meta*, además del isómero *para* y de la anfetamina modelo, entre otros sustratos, a través de una metodología similar empleando la CAL-B como catalizador en una reacción de acilación llevada a cabo en acetato de etilo (Esquema 2-3).⁹¹ Además, para elevar el exceso enantiomérico de los productos de la reacción enzimática, se recrystalizó cada una de las amidas, obteniendo finalmente todas ellas de forma enantiopura.



Esquema 2-3. Acilación enantioselectiva de aminas catalizada por la CAL-B, empleando acetato de etilo como agente acilante y disolvente

Recientemente, Muñoz y colaboradores han descrito una resolución enzimática de varias 1-fenilpropan-2-aminas, logrando la obtención tanto de la amina remanente como de la amida formada en la reacción biocatalizada con buenos rendimientos y excelentes purzas enantioméricas.¹¹² Aunque en un principio intentaron su resolución a través de la formación de sales diastereoméricas con el ácido L-(+)-tartárico, los resultados no fueron buenos y se decantaron por la opción biocatalítica. Además, al observar que el acetato de etilo conducía a valores de enantioselectividad moderados, optaron por el empleo del metoxiacetato de etilo como agente acilante, logrando llevar a cabo el proceso catalizado por la CAL-B en heptano con buenas selectividades (Esquema 2-4).

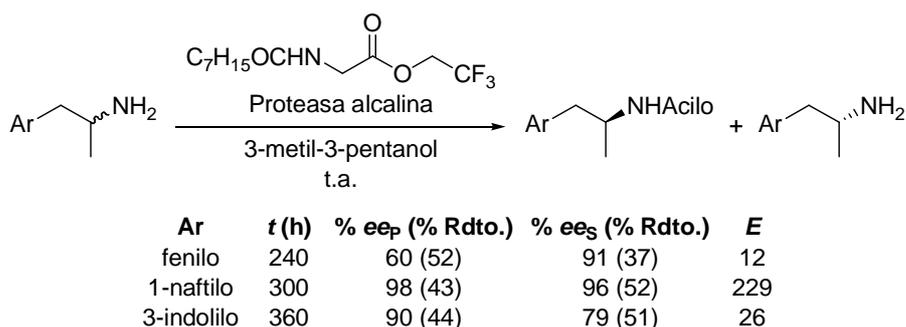


Esquema 2-4. Resolución enzimática de aminas derivadas de la anfetamina con diversas sustituciones en la posición *para* del anillo aromático, catalizada por la CAL-B

¹¹² L. Muñoz, A. M. Rodríguez, G. Rosell, M. P. Bosch, A. Guerrero, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 8171-8177.

Antecedentes

Finalmente, y por tratarse de algunos de los sustratos recogidos en este capítulo, cabe citar la resolución de una familia de aminas con enorme diversidad estructural a través de la acilación con el éster *N*-octanoilglicinato de trifluoroetilo, en 3-metil-3-pentanol como disolvente y empleando como catalizador una proteasa alcalina (Esquema 2-5).¹¹³ En este caso, el enantiómero reactivo es el *S* en vez del *R*, lo que pone de manifiesto la versatilidad de los procesos biocatalíticos y las diferentes opciones disponibles en función de las necesidades de cada momento. En este caso, solamente se obtuvieron buenos resultados con el derivado de naftilo, alcanzándose valores moderados de enantioselectividad para el resto de los casos aquí destacados.



Esquema 2-5. Acilación enantioselectiva de 1-aril y 1-heteroarilpropan-2-aminas catalizada por una proteasa alcalina

I.2.1.2.2. RESOLUCIONES CINÉTICAS DINÁMICAS (DKR)

Las resoluciones cinéticas dinámicas resultan procesos muy atractivos para la transformación de mezclas racémicas en compuestos ópticamente activos ya que, si la resolución cinética es efectiva y la racemización ocurre al mismo tiempo de forma suficientemente rápida, se puede incrementar la eficiencia con la que es sintetizado uno de los enantiómeros. Por tanto, el requisito imprescindible para que una DKR, consistente en una resolución cinética enzimática acompañada por una racemización del sustrato catalizada por un metal, pueda tener fines prácticos es que ambos catalizadores sean compatibles, es decir, que

¹¹³ M. Nechab, L. E. Bliidi, N. Vanthuyne, S. Gastaldi, M. P. Bertrand, G. Gil, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3917-3920.

mantengan su actividad uno en presencia del otro y en unas condiciones de reacción comunes a ambos.¹¹⁴

Desde que en 1996 se describiese la primera resolución cinética dinámica del 1-feniletanol, catalizada por una lipasa y un complejo de rodio,¹¹⁵ y de la 1-feniletilamina, a través de una acetilación catalizada con CAL-B y una racemización favorecida por paladio soportado sobre carbono,¹¹⁶ han sido muchos los grupos de investigación que han intentado aplicar esta eficiente técnica a multitud de alcoholes y aminas,^{48a} siempre en búsqueda de catalizadores que permitan una racemización más eficiente en unas condiciones de reacción más suaves que puedan ser compatibles con los, a menudo termolábiles, catalizadores enzimáticos.

En general, la racemización de las aminas es más difícil que la de los alcoholes y suele requerir condiciones de reacción más drásticas, como pueden ser altas temperaturas y/o medios de reacción fuertemente básicos o reductores que pueden hacer estos métodos incompatibles con otros grupos funcionales existentes en la molécula o con el propio biocatalizador.¹¹⁷ Esto es debido a que las aminas pueden actuar como ligandos para los intermedios metálicos involucrados en el proceso, normalmente de elevada reactividad. Además, los metales de transición pueden romper los enlaces carbono-nitrógeno presentes en las aminas, y los intermedios imínicos son muy sensibles a la humedad. Por este motivo, el número de catalizadores que pueden racemizar alcoholes de forma eficiente es mucho mayor que los capaces de desempeñar una función análoga con las aminas. Así, desde que Reetz y Schimossek emplearon el paladio sobre carbono para este propósito,¹¹⁶ se han descubierto muchos otros catalizadores heterogéneos soportados sobre distintos materiales, siendo mucho menos comunes los catalizadores homogéneos de rutenio de tipo Shvo (Figura 2-2), empleados en esta memoria de investigación, o los de iridio.

¹¹⁴ a) B. Martín-Matute, *Anales Química* **2006**, *102*, 46-52; b) B. Martín-Matute, J.-E. Bäckvall, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 226-232.

¹¹⁵ P. M. Dinh, J. A. Howarth, A. R. Hudnott, J. M. J. Williams, W. Harris, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7623-7626.

¹¹⁶ M. T. Reetz, K. Schimossek, *Chimia* **1996**, *50*, 668-669.

¹¹⁷ Y. Ahn, S.-B. Ko, M.-J. Kim, J. Park, *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 647-658.

Antecedentes

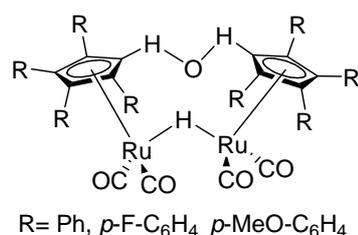
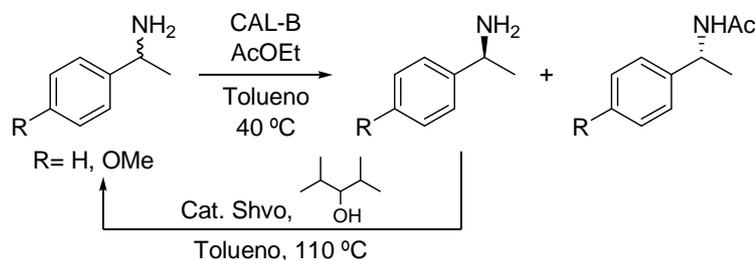


Figura 2-2. Catalizadores de tipo Shvo responsables de la racemización de aminas

Fueron Bäckvall y colaboradores los primeros en emplear el catalizador de Shvo (R= Ph) como agente de racemización de aminas en tolueno a 110 °C.¹¹⁸ Pero este método presenta el inconveniente de la formación de productos secundarios derivados del ataque de una molécula de amina a una imina, generando un aminal que, posteriormente, pierde amoniaco, haciendo la reacción irreversible. Tras probar diferentes alternativas, descubrieron que la adición de un donador de hidrógeno como el 2,4-dimetilpentan-3-ol podía inhibir su formación. Fue este el alcohol seleccionado por estar descrito que, debido a sus impedimentos estéricos, no es un sustrato aceptado por la CAL-B.¹¹⁹ De esta forma, se sentaron las bases de lo que posteriormente se convertiría en una DKR real, ya que en este primer trabajo únicamente se llevaron a cabo dos resoluciones cinéticas secuenciales, la segunda de ellas precedida por un proceso de racemización de la amina remanente (Esquema 2-6). Así, se consiguieron obtener las amidas con un 98% ee y con un rendimiento conjunto próximo al 70%.

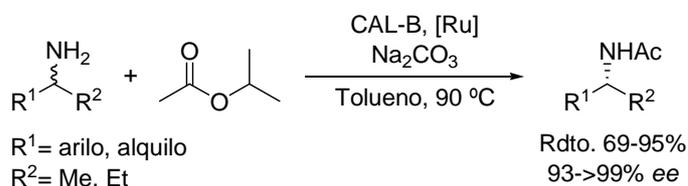


Esquema 2-6. Proceso de racemización combinado con una resolución cinética enzimática de aminas primarias, en tres pasos

¹¹⁸ O. Pàmies, A. H. Éll, J. S. M. Samec, N. Hermanns, J.-E. Bäckvall, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 4699-4702.

¹¹⁹ H. M. Jung, M. J. Koh, M. J. Kim, J. Park, *Org. Lett.* **2000**, 2, 409-411.

Fue en 2005 cuando se llevó a cabo la primera DKR enzimática de aminas empleando este complejo de rutenio,¹²⁰ obteniéndose mejores selectividades al utilizar un catalizador más rico electrónicamente (R= *p*-MeO-C₆H₄) ya que, aunque el paso de deshidrogenación de la amina se veía decelerado, la velocidad de re-adición del hidrógeno era mucho más rápida, reduciendo el tiempo de vida de la imina libre. Además, se observó que si se llevaba a cabo el proceso de acilación de la amina con acetato de isopropilo en tolueno a 90 °C, combinando la CAL-B con el catalizador metálico, únicamente se obtenía una resolución cinética clásica, siendo necesaria la adición de carbonato de sodio para que la DKR tuviese lugar (Esquema 2-7), al eliminarse cualquier traza de ácido (procedente del soporte del enzima, de la posible hidrólisis del éster o de la propia proteína) que pudiera inactivar el catalizador de rutenio. En estas condiciones incluso fue posible la utilización del catalizador de Shvo (R= Ph). El conjunto de aminas sobre las que fue aplicada la resolución cinética dinámica en estas condiciones fue ampliado más tarde.¹²¹



Esquema 2-7. Primera DKR de aminas que utiliza un catalizador de rutenio como agente de racemización

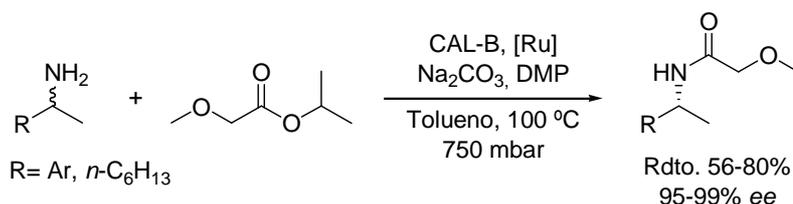
Entonces, Veld y colaboradores diseñaron una metodología para llevar a cabo DKRs combinando todos los factores anteriormente descritos.^{55a} Además, para aumentar la velocidad del proceso de acilación, se empleó metoxiacetato de isopropilo debido a la mayor efectividad mostrada por este tipo de ésteres en procesos de acilación catalizados enzimáticamente.⁵⁵⁻⁵⁶ Sin embargo, los experimentos tuvieron que ser llevados a cabo en condiciones de presión reducida para eliminar el alcohol isopropílico que se iba liberando en el medio de reacción (Esquema 2-8), ya que podía ser oxidado por el catalizador metálico a

¹²⁰ J. Paetzold, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17620-17621.

¹²¹ L. K. Thalén, D. Zhao, J.-B. Sortais, J. Paetzold, C. Hoben, J.-E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3403-3410.

Antecedentes

acetona, reaccionar con la amina y, tras una nueva reducción, formar como producto secundario las correspondientes isopropilaminas. De esta forma, para la mayor parte de las aminas estudiadas se alcanzaron conversiones completas y altas selectividades, aunque los rendimientos aislados no fueron muy altos debido a problemas en la etapa de purificación.

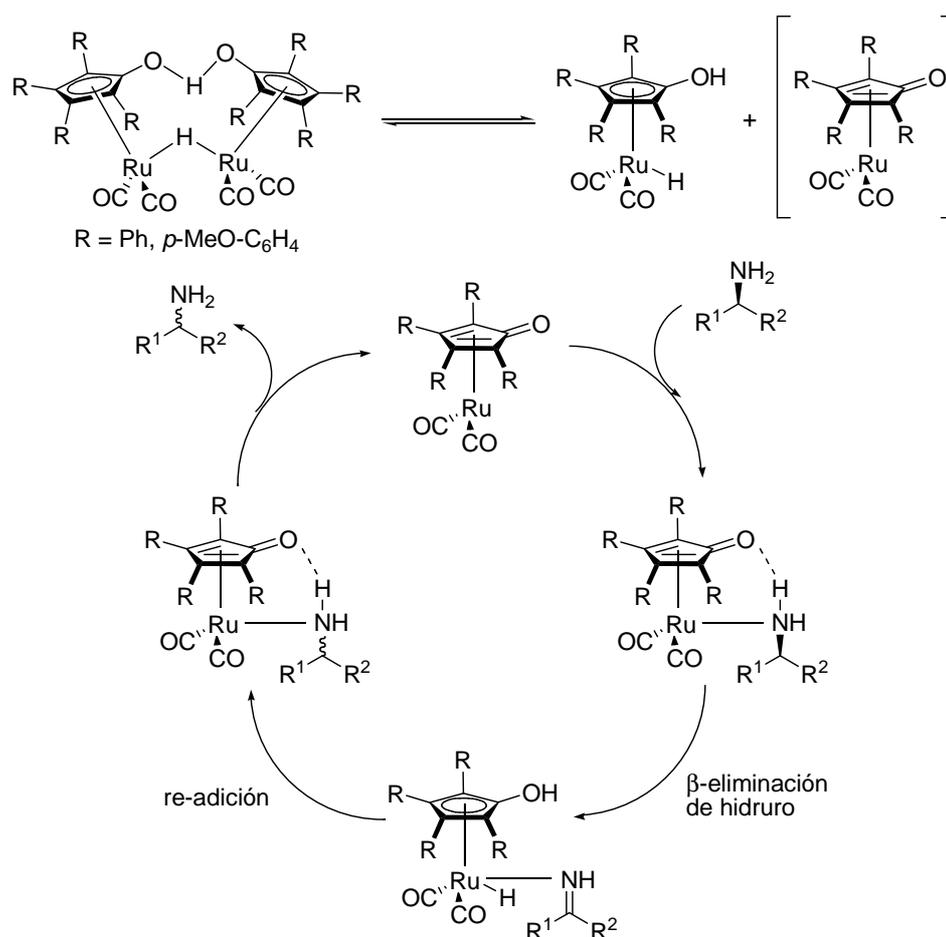


Esquema 2-8. DKR de aminas bencílicas y alifáticas empleando el catalizador de Shvo modificado (R= *p*-MeO-C₆H₄) y 2,4-dimetilpentan-3-ol (DMP) como donador de hidrógeno

Posteriormente, y de nuevo en el grupo del profesor Bäckvall, desarrollaron un procedimiento de gran aplicación práctica puesto que, al emplear carbonato de dibencilo como agente acilante, los productos de la DKR eran las aminas protegidas con el grupo Cbz, el cual podía ser fácilmente eliminado tras un proceso de hidrogenólisis, liberando las aminas enantioenriquecidas.¹²²

El mecanismo de racemización propuesto¹²¹ se encuentra recogido en el Esquema 2-9 y consiste en una deshidrogenación (β -eliminación de hidruro y pérdida de un protón) de la amina quiral, previa coordinación de esta al metal, seguida de una posterior re-adición de hidrógeno a la imina formada. Los productos secundarios se formarían por reacción entre la imina disociada del complejo y la amina presente en el medio de reacción. Para liberar la forma activa del catalizador, el fragmento cuyo átomo de rutenio posee un hueco en su esfera de coordinación (representado entre corchetes), inicialmente es necesaria la ruptura del complejo dinuclear mediante la aplicación de elevadas temperaturas.

¹²² C. E. Hoben, L. Kanupp, J.-E. Bäckvall, *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 977-979.



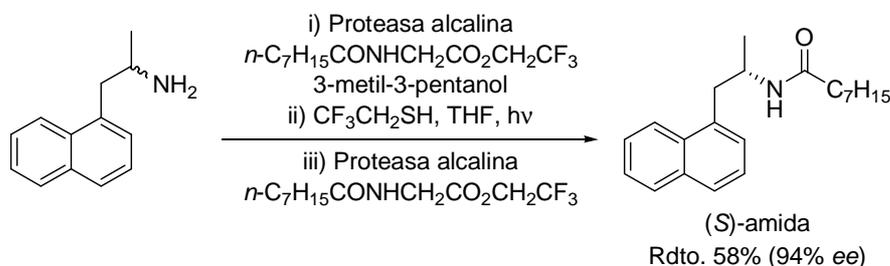
Esquema 2-9. Ciclo catalítico para la racemización de aminas promovida por el catalizador de Shvo y su derivado activado

Este tipo de DKRs quimioenzimáticas se ha llevado a cabo tanto para aminas alifáticas como bencílicas, siendo la racemización de las primeras, en general, más difícil. También se ha comprobado la compatibilidad de diferentes grupos funcionales presentes en el anillo aromático (halogenuros, éteres, nitrilo, nitro, trifluorometilo y selenoéteres) con las condiciones de la DKR, así como la eficacia en caso de poseer restos naftilo o tiofenilo.^{48a}

A pesar de las importantes aplicaciones de muchos de los derivados de anfetamina, hasta la fecha no se conocen procesos de DKR con este tipo de catálisis metálica aplicados a estos sustratos. Sin embargo,

Antecedentes

recientemente se ha desarrollado con éxito un proceso secuencial “one-pot” de la 1-naftilpropan-2-amina que incluye, junto a la resolución enzimática, una racemización radicalaria mediada por radicales sulfanilo, los cuales se forman fotolíticamente a temperatura ambiente. Además, dependiendo del biocatalizador empleado, se puede tener acceso a las amidas tanto de configuración *S* como *R*, simplemente pasando de una proteasa a una lipasa, dado que la disposición espacial de sus triadas catalíticas son imágenes especulares. En el primero de los casos, se lleva a cabo, de forma consecutiva y a temperatura ambiente, una resolución cinética mediante acilación con *N*-octanoilglicinato de trifluoroetilo catalizada por una proteasa alcalina, seguida de una racemización radicalaria inducida por luz y mediada por trifluoroetanotiol y, finalmente, tras interrumpir la irradiación y añadir una segunda porción de agente acilante y enzima, una nueva KR que conduce a las amidas de configuración *S* con un 58% de rendimiento y un 94% de exceso enantiomérico (Esquema 2-10).¹²³



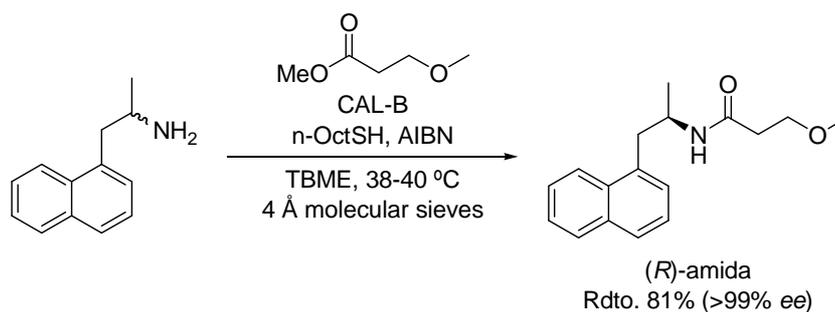
Esquema 2-10. Proceso secuencial (KR + racemización radicalaria + KR) “one-pot” para la obtención de la amida de configuración *S*

Sin embargo, en el segundo de los trabajos, ya se describe una DKR propiamente dicha, puesto que la acilación con β -metoxipropanoato de metilo catalizada por la CAL-B en TBME a 38-40 °C se lleva a cabo de forma simultánea a la racemización radicalaria fotoinducida en presencia de octanotiol y AIBN (Esquema 2-11).¹²⁴ Además, se añaden molecular sieves de 4 Å para atrapar las trazas de agua y metanol liberados al medio

¹²³ L. E. Bliidi, M. Nechab, N. Vanthuyne, S. Gastaldi, M. P. Bertrand, G. Gil, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2901-2903.

¹²⁴ F. Poulhès, N. Vanthuyne, M. P. Bertrand, S. Gastaldi, G. Gil, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7281-7286.

de reacción. Con algunos de los sustratos, como es este caso, para aumentar el grado de conversión a la amida de configuración *R*, se combina con una KR clásica anterior y posterior a la etapa de resolución cinética dinámica.



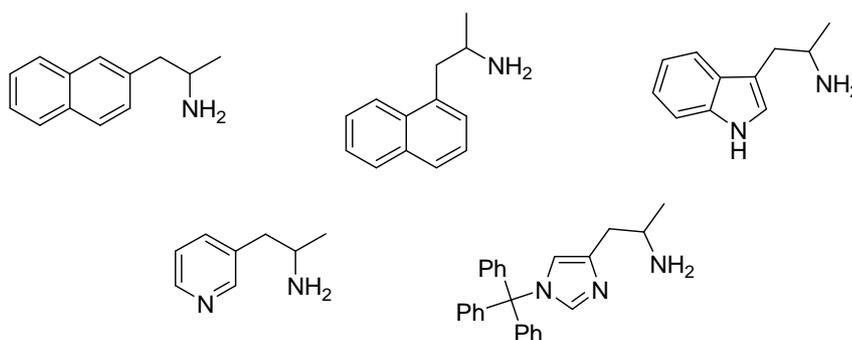
Esquema 2-11. Resolución cinética dinámica de la 1-naftilpropan-2-amina a baja temperatura empleando un mecanismo radicalario para la racemización

Estas DKRs llevadas a cabo a baja temperatura abren una puerta a la formación de amidas ópticamente puras partiendo de sustratos que resultan inestables o sufren reacciones laterales competitivas a temperaturas cercanas a los 100 °C.

OBJETIVOS

Debido al interés que suscita el desarrollo de métodos de síntesis estereoselectivos para la obtención de derivados de la anfetamina, los objetivos propuestos en este capítulo son los que se muestran a continuación:

1. Preparación química de un panel de 1-aril y 1-heteroarilpropan-2-aminas racémicas biológicamente activas.

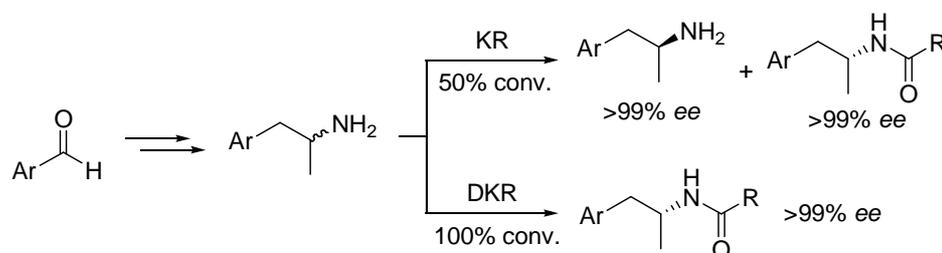


2. Estudio de su comportamiento en procesos de resolución cinética a través de reacciones de aminólisis catalizadas por lipasas.

3. Optimización de condiciones de reacción que permitan llevar a cabo la resolución cinética dinámica de estas aminas empleando un catalizador metálico como agente de racemización.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha comentado en los antecedentes, no han sido muchas las rutas enantioselectivas descritas que permitan acceder a los compuestos derivados de la anfetamina, con potencial o conocida actividad biológica, objeto de estudio de este capítulo. Por este motivo, nos planteamos el desarrollo de una síntesis sencilla y general de estos sustratos en forma racémica a partir de sus correspondientes aldehídos para, a continuación, optimizar su resolución cinética en un proceso de acilación enantioselectiva mediada por la CAL-B. Posteriormente, y con el fin de obtener las correspondientes amidas enantioenriquecidas con mayores rendimientos, se tratará de aplicar una resolución cinética dinámica aprovechando la compatibilidad y la capacidad de actuación de un catalizador enzimático (CAL-B) y uno metálico (Shvo) en las mismas condiciones de reacción (Esquema 2-12).



Esquema 2-12. Plan de trabajo propuesto para la obtención de derivados de la anfetamina en forma enantiopura

I.2.3.1. SÍNTESIS DE 1-ARIL Y 1-HETEROARILPROPAN-2-AMINAS RACÉMICAS Y SUS METOXIACETAMIDAS CORRESPONDIENTES

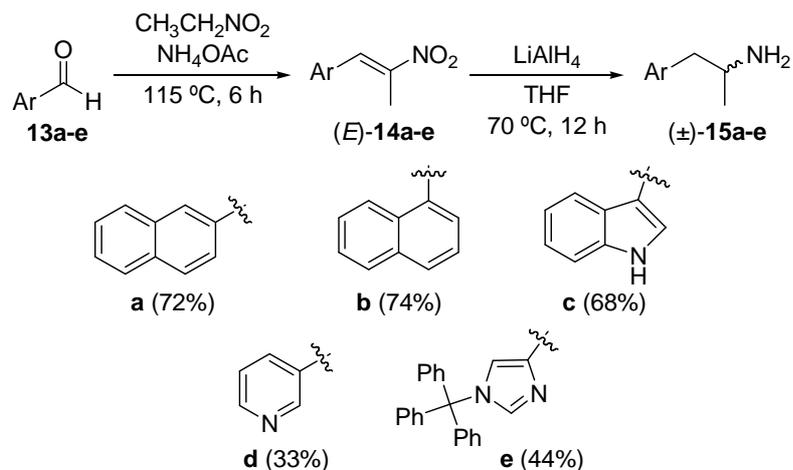
Para la síntesis de las aminas racémicas, se probaron diferentes métodos, todos ellos descritos en la bibliografía y basados en una reacción de Henry (condensación nitroaldólica) seguida de una reducción del nitroalqueno formado. Para la optimización del proceso de síntesis se empleó como sustrato modelo el 2-naftaldehído (**13a**) para, a continuación, extender la metodología al resto de compuestos.

Así, inicialmente se intentó la condensación del aldehído con nitroetano en presencia de ciclohexilamina como base y a reflujo de ácido acético,¹⁰⁰ pero los rendimientos obtenidos en el proceso no fueron suficientemente satisfactorios (10%) debido a la formación de varios subproductos que no se identificaron. Cuando se empleó butilamina como base y la reacción se llevó a cabo a reflujo de tolueno,¹²⁵ la reacción resultó ser demasiado lenta, ya que se necesitó más de una semana para observar la desaparición completa del producto de partida por TLC. En este punto, se decidió emplear acetato de amonio como base y el propio nitroetano como disolvente,¹²⁶ encontrando en este un procedimiento adecuado para la obtención del nitroalqueno buscado (*E*)-**14a** y extensible, por tanto, al resto de sustratos (*E*)-**14b-e**. Sin embargo, cuando se intentó purificar por columna cromatográfica, se observó una pérdida importante de masa respecto al crudo de reacción, por lo que se decidió hacer únicamente una extracción para eliminar los restos de sales y continuar con la ruta de síntesis sin purificación adicional. Para el segundo paso, se optó por el empleo de un reductor fuerte como es el hidruro de litio y aluminio (LiAlH₄) capaz de reducir tanto el doble enlace como el grupo nitro cuando se mantiene a reflujo de THF durante una noche. De esta forma, partiendo de los aldehídos seleccionados **13a-e** (1- y 2-naftil-, 3-indolil-, 3-piridil- y 4-imidazolilcarbaldehído, disponibles comercialmente), y tras una secuencia de dos pasos consistente en una reacción de Henry que da

¹²⁵ A. Foucaud, C. Razorilalana-Rabearivony, E. Loukakou, H. Person, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3639-3644.

¹²⁶ N. Milhazes, R. Calheiros, M. P. M. Marques, J. Garrido, M. N. D. S. Cordeiro, C. Rodrigues, S. Quinteira, C. Novais, L. Peixe, F. Borges, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 4078-4088.

lugar a los correspondientes intermedios (*E*)-nitropropeno **14**, seguida de una reducción con LiAlH₄, se obtienen las correspondientes aminas racémicas **15** con rendimientos entre el 33 y el 74% (Esquema 2-13).



Esquema 2-13. Ruta de síntesis para la obtención de las aminas (±)-**15a-e**, y rendimientos globales obtenidos para cada uno de los derivados

Cabe destacar que, debido a problemas derivados de la nucleofilia del resto imidazol del aldehído disponible comercialmente (*1H*-imidazol-4-carbaldehído), fue necesaria la protección previa de su grupo amino con el resto tritilo.¹²⁷ Se optó por el empleo de este grupo protector tras varios intentos fallidos con otros como el bencilo o el *tert*-butoxicarbonilo (Boc), para los que se observó la formación de mezclas regioisoméricas, así como una desprotección parcial durante los siguientes pasos de la secuencia sintética. Además, teniendo en cuenta los resultados publicados en trabajos anteriores,⁹¹ la unión de un grupo tan grande al anillo de imidazol, puede favorecer la enantiodiscriminación por parte del enzima en la posterior resolución cinética de la amina (±)-**15e**.

A continuación, y antes de comenzar con el estudio de la resolución enzimática de las aminas, fue necesario obtener un método que permitiese tanto el seguimiento temporal de las biotransformaciones como el cálculo de los excesos enantioméricos de sustratos y productos. Para ello se eligió la técnica cromatográfica de HPLC pero, debido a la elevada polaridad de

¹²⁷ J. Wang, H. Li, B. Lou, L. Zu, H. Guo, W. Wang, *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 4321-4332.

Resultados y Discusión

las aminas, fue necesaria una transformación en amidas para su correcto análisis, empleando para ello distintos cloruros de acilo. Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente en diclorometano y en presencia de piridina para neutralizar el cloruro de hidrógeno liberado en el proceso (Esquema 2-14).



Esquema 2-14. Síntesis de amidas racémicas

Los resultados obtenidos en la separación de los enantiómeros de cada una de ellas en el HPLC se encuentran recogidos en la parte experimental al final de este capítulo (Tabla 2-5 en página 155).

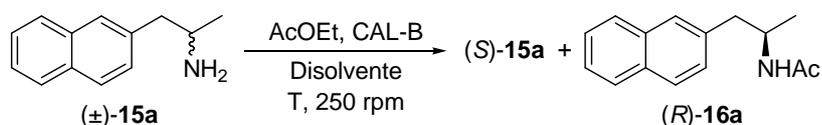
I.2.3.2. RESOLUCIÓN DE AMINAS CATALIZADA POR LA CAL-B

La resolución cinética de las aminas racémicas **15a-e** fue estudiada inicialmente mediante reacciones de aminólisis de ésteres no activados catalizadas por lipasas. Se comenzará mostrando la optimización realizada en los procesos de resolución cinética clásica (KR) para, a continuación, intentar desarrollar una resolución cinética dinámica (DKR) que permita acceder a las amidas enantioenriquecidas y con altos rendimientos.

I.2.3.2.1. RESOLUCIÓN CINÉTICA CLÁSICA (KR)

En nuestro grupo de investigación ya se había llevado a cabo anteriormente la resolución tanto de la anfetamina como de algunos derivados con sustituciones en diferentes posiciones del anillo de fenilo mediante la acilación enzimática del isómero *R*, empleando acetato de etilo como donador de acilo y disolvente, y la CAL-B como biocatalizador.⁹¹ Esta misma metodología se decidió extender a los derivados de tipo naftilo o heteroaromáticos con diferentes patrones estructurales.

Para una primera aproximación, se escogió la 1-(2-naftil)propan-2-amina **15a** por considerarla el sustrato más sencillo, al no poseer heteroátomos y presentar una estructura ligeramente más lineal que la derivada del 1-naftilo (Esquema 2-15).



Esquema 2-15. Estudio de diferentes condiciones para la KR de la amina (±)-**15a** empleando CAL-B como biocatalizador y AcOEt como donador de acilo

Inicialmente se reprodujeron las condiciones de reacción descritas, pero la resolución empleando AcOEt como donador de acilo y disolvente presentó una baja enantioselectividad (Tabla 2-1, entrada 1).

Tabla 2-1. Resolución cinética de la amina (±)-**15a**^a

Entrada	Disolvente	AcOEt	T (°C)	t (h)	ee _p ^b (%)	ee _s ^b (%)	c ^c (%)	E ^d
1	AcOEt	0.2 M	30	48	87	19	18	17
2	TBME (0.1 M)	5 eq.	30	72	84	69	45	26
3	THF (0.2 M)	5 eq.	30	72	96	72	43	96
4	THF (0.1 M)	5 eq.	45	28	93	52	36	46

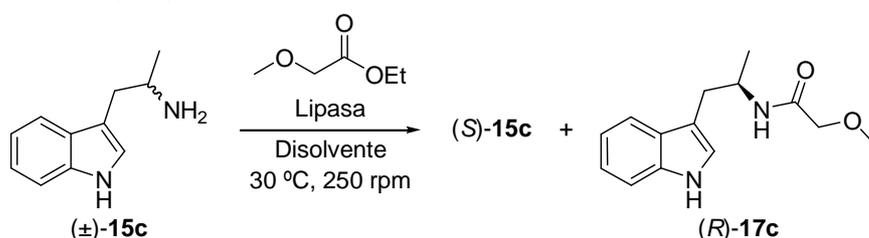
^a Condiciones de la reacción enzimática: amina **15a** racémica (50 mg), CAL-B (50 mg), acetato de etilo, disolvente y 250 rpm. ^b Determinados por HPLC. ^c $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$. ^d $E = \ln[(1-c)(1-ee_s)] / \ln[(1-c)(1+ee_p)]$

Para intentar mejorar la selectividad, se decidió llevar a cabo el proceso utilizando el acetato de etilo únicamente como agente acilante, empleando un disolvente de baja polaridad y comúnmente utilizado en este tipo de procesos enzimáticos como es el TBME, pero las selectividades alcanzadas fueron, de nuevo, moderadas (entrada 2). Entonces, puesto que en muchos casos se ha observado que un cambio de disolvente puede conducir a una variación en la selectividad del enzima, se probó el THF. Además, con el fin de acelerar la cinética de la reacción enzimática, se redujo la cantidad de disolvente, trabajando en este caso con una concentración 0.2 M (entrada 3). Sin embargo, aunque este objetivo no pudo ser cumplido ya que se obtuvieron conversiones muy similares tras 72 h de reacción, lo que sí se observó fue un importante aumento en la enantioselectividad del proceso ($E = 96$). Alentados por este resultado, se

Resultados y Discusión

decidió recuperar la concentración inicial (0.1 M) por si se estuviera produciendo una inhibición del enzima por parte del sustrato y, al mismo tiempo, elevar la temperatura a 45 °C, ya que es bien conocida la termoestabilidad de este enzima (entrada 4). Sin embargo, se encontró que en estas condiciones la enantioselectividad del proceso volvió a verse reducida.

En este momento, y viendo las escasas posibilidades de mejora, se decidió cambiar de donador de acilo y emplear el metoxiacetato de etilo por los buenos resultados que se habían encontrado previamente en la resolución cinética de aminas primarias bencílicas.^{55-56,84} En primer lugar, y tras seleccionar esta vez la 1-(1*H*-indol-3-il)propan-2-amina (**15c**) como sustrato modelo por contener un sustituyente bicíclico y además heteroaromático, se hizo un “screening” de diferentes lipasas para observar su comportamiento frente al proceso de acilación estereoselectiva de la amina (Esquema 2-16).



Esquema 2-16. Estudio de diferentes biocatalizadores y disolventes para la KR de la amina (±)-**15c** empleando metoxiacetato de etilo como donador de acilo

Empleando THF como disolvente, las conversiones alcanzadas fueron muy bajas para todas las lipasas excepto para la CAL-B, aunque la selectividad mostrada hacia la formación de la metoxiacetamida (*R*)-**17c** fue excelente en todos los casos (Tabla 2-2, entradas 1-5). Así, empleando la CAL-B se consiguió aislar tanto la amina (*S*)-**15c** como la metoxiacetamida (*R*)-**17c** con excelente pureza óptica en tan solo tres horas y media de reacción (entrada 5).

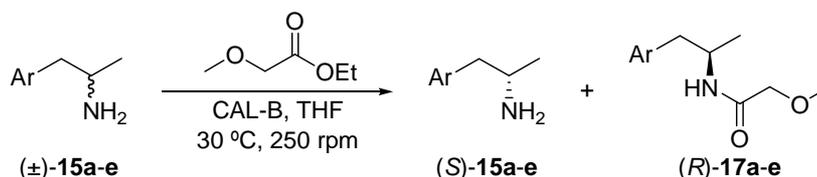
Tabla 2-2. Resolución cinética de la amina (\pm)-**15c**^a

Entrada	Enzima	Disolvente	t (h)	ee _P ^b (%)	ee _S ^b (%)	c ^c (%)	E ^d
1	AK	THF	20	>99	4	4	>200
2	PSL IM	THF	20	>99	<3	<3	>200
3	RML	THF	20	>99	<3	<3	>200
4	PPL	THF	20	>99	7	7	>200
5	CAL-B	THF	3.5	98	>99	51	>200
6	CAL-B	1,4-Dioxano	3.5	97	>99	51	>200
7	CAL-B	TBME	3.5	98	>99	51	>200
8	CAL-B	Tolueno	3.5	95	>99	51	>200

^a Condiciones de la reacción enzimática: amina **15c** racémica (50 mg), lipasa (50 mg), metoxiacetato de etilo (5 equivalentes), disolvente (0.1 M), 30 °C y 250 rpm. ^b Determinados por HPLC. ^c $c = ee_S / (ee_S + ee_P)$. ^d $E = \ln[(1-c)(1-ee_S)] / \ln[(1-c)(1+ee_P)]$

Con el objetivo de optimizar las condiciones de reacción, se llevaron a cabo las resoluciones cinéticas en otros disolventes como el 1,4-dioxano, el *tert*-butilmetil éter (TBME) o el tolueno, manteniendo constantes el resto de variables. En todos ellos se observaron resultados similares, conduciendo a la formación de la amina remanente de configuración S enantiopura tras 3.5 h de reacción (entradas 6-8).

En vista de los buenos resultados obtenidos en el proceso de acilación catalizado por la CAL-B con el sustrato modelo, se decidió extender la metodología a la resolución del resto de aminas racémicas (\pm)-**15a-b,d-e**. De entre los disolventes probados, se escogió el THF por ser el que mejor era capaz de solubilizar todas las aminas (Esquema 2-17).



Esquema 2-17. Resolución cinética de las aminas (\pm)-**15a-e** mediante acilación enantioselectiva con metoxiacetato de etilo catalizada por la CAL-B

Resultados y Discusión

Durante el transcurso de los procesos biocatalíticos se tomaron de forma regular alícuotas que se analizaron, tras el tratamiento adecuado, por HPLC. Esto permitió conocer el estado de las reacciones en cada momento y detenerlas cuando los valores de conversión se encontraban próximos al 50%.

Una vez obtenidos los resultados para todos los sustratos en estas condiciones (Tabla 2-3) se comprobó que, exceptuando la 1-(3-piridil)propan-2-amina (**15d**, entrada 4), era posible acilar el resto de aminas de forma totalmente enantioselectiva, variando los tiempos de reacción necesarios para completar el proceso en función del resto arilo presente. Así, mientras que las aminas derivadas de naftilo **15a,b** (entradas 1 y 2) y de indolilo **15c** (entrada 3) requirieron cortos periodos de tiempo, fue necesario un día de reacción para completar la acilación del 50% del material de partida del derivado tritilado de la α -metilhistamina **15e** (entrada 5). Sin embargo, a pesar de las diferencias de reactividad, en todos los casos se aislaron tanto las aminas remanentes de configuración S como las (*R*)-metoxiacetamidas con elevados excesos enantioméricos.

Tabla 2-3. Resultados obtenidos en la resolución cinética de las aminas (\pm)-**15a-e**^a

Entrada	Sustrato	<i>t</i> (h)	<i>ee_P</i> ^b (%)	<i>ee_S</i> ^b (%)	<i>c</i> ^c (%)	<i>E</i> ^d
1	(\pm)- 15a	5	98 (48)	91 (50)	48	>200
2	(\pm)- 15b	4	>99 (47)	87 (43)	47	>200
3	(\pm)- 15c	3.5	98 (45)	>99 (40)	51	>200
4	(\pm)- 15d	4	85 (52)	98 (17)	54	52
5	(\pm)- 15e	24	96 (42)	97 (36)	50	>200

^a Condiciones de la reacción enzimática: amina **15a-e** racémica (50 mg), CAL-B (50 mg), metoxiacetato de etilo (5 equivalentes), THF (0.1 M), 30 °C y 250 rpm. ^b Determinados por HPLC. Rendimientos aislados entre paréntesis. ^c $c = ee_S / (ee_S + ee_P)$. ^d $E = \ln[(1-c)(1-ee_S)] / \ln[(1-c)(1+ee_P)]$

I.2.3.2.2. ASIGNACIÓN DE CONFIGURACIONES ABSOLUTAS

Para establecer la configuración de los productos obtenidos en la resolución cinética, se recurrió a los datos recogidos en la bibliografía. Así, puesto que se encuentra descrita la síntesis de la amina (S)-**15c**,^{101a} se comparó el valor de su rotación óptica con el del sustrato remanente en el proceso enzimático, encontrándose una coincidencia en el signo, lo que indica claramente que el enantiómero menos reactivo es el de configuración S. Puesto que el resto de sustratos estudiados no se encuentran descritos en su forma enantiopura, se supuso que el enzima mantiene la misma enantioselectividad en el proceso de acilación de todos ellos, lo que llevó a asignar la configuración R a las metoxiacetamidas **17a-e** y S a las aminas remanentes **15a-e**.

Esta suposición está de acuerdo con que la CAL-B sigue la regla de Kazlauskas, según la cual, si al sustituyente de mayor tamaño le corresponde también una mayor preferencia según las reglas de Cahn-Ingold-Prelog, se produce la acilación selectiva de la amina de configuración R. Por otra parte, la baja enantioselectividad encontrada para la amina **15d** se podría explicar también en base al modelo empírico establecido para el centro activo de esta lipasa. Según este modelo, cuanto mayor sea la diferencia de tamaño existente entre los dos sustituyentes unidos al estereocentro, mayor será la enantiodiscriminación ejercida por el enzima. Además, como se propuso al inicio del estudio, la protección con el resto tritilo del anillo de imidazol ha hecho posible la obtención tanto de la amina **15e** como de la amida **17e** con excelentes purzas enantioméricas al verse aumentado de forma importante el tamaño del sustituyente más grande.¹²⁸

¹²⁸ D. Rotticci, F. Hæffner, C. Orrenius, T. Norin and K. Hult, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1998**, *5*, 267-272.

Resultados y Discusión

Por otro lado, también es interesante remarcar que el procedimiento aquí descrito constituye una ruta complementaria a la descrita por Gil y colaboradores,¹¹³ la cual permitía la obtención de las amidas de configuración *S* a través de una resolución enzimática de los sustratos **15b-c** por acilación catalizada por una proteasa alcalina, si bien es cierto que solamente lograron buenos resultados para la amina **15b**, obteniéndose valores de enantioselectividad muy bajos para **15c**.

I.2.3.2.3. RESOLUCIÓN CINÉTICA DINÁMICA (DKR)

Aunque, probablemente, la mayor ventaja de las resoluciones cinéticas clásicas sea la posibilidad de obtener los dos enantiómeros por separado partiendo de una mezcla racémica del sustrato, es evidente que el rendimiento máximo de cada uno de ellos no puede ser superior al 50%. Sin embargo, cuando sólo se pretende obtener uno de ellos, la introducción de un catalizador que racemice *in situ* el sustrato que permanece inalterado en una KR, puede permitir un incremento importante del rendimiento obtenido para este compuesto, pudiendo alcanzar teóricamente el 100%. Puesto que estos procesos, en el caso de la DKR de aminas, ocurren normalmente a elevadas temperaturas,^{48a,114} es necesario seleccionar un biocatalizador que sea capaz de mantener su actividad y selectividad en esas condiciones. En este caso, el enzima elegido es la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B, tanto por los buenos resultados obtenidos en la KR como por su conocida termoestabilidad.

A pesar de que esta metodología haya sido aplicada a un gran número de sustratos de distinta naturaleza como alcoholes,¹²⁹ aminas primarias^{55a,84,121,130} y secundarias^{52c} e incluso amidas derivadas de aminoácidos,¹³¹ sorprendentemente, todavía no ha sido extendida nunca a 1-heteroarilpropan-2-aminas. Por tanto, se decidió estudiar el proceso de

¹²⁹ Ejemplos recientes de DKR de alcoholes secundarios usando enzimas y complejos metálicos: a) J. Deska, C. P. Ochoa, J.-E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 4447-4451; b) Q. Chen, C. Yuan, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 3707-3716; c) E. V. Johnston, K. Bogár, J.-E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4596-4599.

¹³⁰ L. H. Andrade, A. V. Silva, E. C. Pedrozo, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4331-4334.

¹³¹ Y. K. Choi, Y. Kim, K. Han, J. Park, M.-J. Kim, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 9543-9545.

resolución cinética dinámica de los sustratos sobre los que la CAL-B había actuado de forma eficiente, a saber, **15a-c,e**.

Para el desarrollo de los procesos de DKR se seleccionó el catalizador de Shvo, un complejo dimérico de rutenio cuya eficiencia catalítica está basada en su disociación a elevadas temperaturas,¹³² y que ya ha sido empleado como catalizador en numerosas transformaciones en síntesis orgánica.¹³³

Antes de comenzar con las DKRs propiamente dichas, fue necesario optimizar el proceso de racemización de la amina, puesto que este debe ser, al menos, tan rápido como la acilación enzimática para que resulte efectivo. Así, diferentes mezclas formadas por el catalizador de Shvo, la amina enantiopura (S)-**15c** obtenida en las resoluciones cinéticas catalizadas por la CAL-B, carbonato de sodio como base y 2,4-dimetilpentan-3-ol como donador suave de hidrógeno, se mantuvieron durante 22 h a 70 °C en THF, por ser el disolvente más eficaz en las KR, y a 70 ó 100 °C en tolueno, por tratarse del disolvente empleado en los trabajos anteriormente descritos y recogidos en los antecedentes.^{55a,118,120-122} Mientras que 70 °C no resultó ser una temperatura lo suficientemente elevada como para permitir la disociación completa del complejo dimérico de Shvo y con ella la formación de la especie activa del mismo (se recuperó la amina (S)-**15c** con un ee del 76% en tolueno y >95% en THF), el proceso llevado a cabo en tolueno a 100 °C sí que condujo a la amina racémica, demostrando la posibilidad de aplicar estas condiciones al proceso de DKR.

Una vez encontradas las condiciones óptimas para la racemización de la amina enantioenriquecida remanente en el proceso biocatalizado, el siguiente paso consistió en comprobar que, en ausencia de enzima y de complejo metálico, no tenía lugar ningún tipo de reacción cuando la amina se ponía en contacto con el agente acilante y el resto de aditivos en estas

¹³² N. Menashe, Y. Shvo, *Organometallics* **1991**, *10*, 3885-3991.

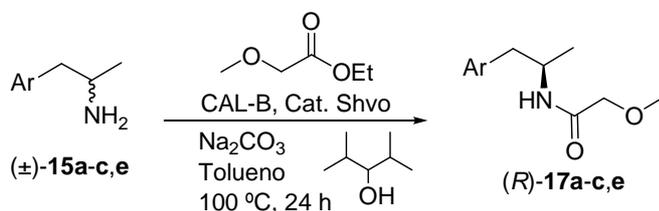
¹³³ B. L. Conley, M. K. Pennington-Boggio, E. Boz, T. J. Williams, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2294-2312.

Resultados y Discusión

mismas condiciones. Así, tras 24 h de reacción a 100 °C en tolueno, no se detectó formación de la metoxiacetamida **17c**.

Por otro lado, para favorecer el proceso de racemización frente al de acilación, y dado que las KR transcurrían en muy cortos periodos de tiempo cuando se empleaban 5 equivalentes de metoxiacetato de etilo como agente acilante, se decidió rebajar la cantidad del mismo a únicamente 2 equivalentes. Además, de nuevo con el propósito de ralentizar la acilación enzimática, se disminuyó la carga de biocatalizador, pasando de una relación 1:1 en peso de sustrato y enzima, a 1:0.25, excepto en el caso de la amina menos reactiva, la derivada de imidazol (**15e**).

Con los parámetros de reacción establecidos, se estuvo en disposición de comenzar con las resoluciones cinéticas dinámicas de cada uno de los sustratos **15a-c,e** (Esquema 2-18).



Esquema 2-18. DKR de las aminas (\pm)-**15a-c,e**

Los resultados obtenidos en las DKRs se encuentran recogidos en la Tabla 2-4. Las reacciones llevadas a cabo con las aminas derivadas del naftilo **15a,b** condujeron a conversiones altas o completas (93->99%) tras 24 h, permitiendo la formación de las metoxiacetamidas (R)-**17a,b** con una elevada estereoselectividad (93-97% ee, entradas 1 y 2). En el caso de los derivados del indol (**15c**) y del imidazol (**15e**), las conversiones alcanzadas también fueron altas (80-87%), así como la pureza óptica de las amidas formadas (R)-**17c,e** (91-97% ee, entradas 3 y 4). Cabe destacar que la generación de productos secundarios, como pueden ser las especies derivadas de la dimerización de las aminas por la presencia en el medio de la forma imínica libre, sólo se detectaron en casos individuales y en cantidades muy pequeñas.

Tabla 2-4. Resultados de la resolución cinética dinámica de las aminas (\pm)-**15a-c,e**^a

Entrada	Sustrato	c (%) ^b	Rdto. (%) ^c	ee _P (%) ^d
1	(\pm)- 15a	>99	58	93
2	(\pm)- 15b	93	50	97
3	(\pm)- 15c	87	86	97
4	(\pm)- 15e	80	74	91

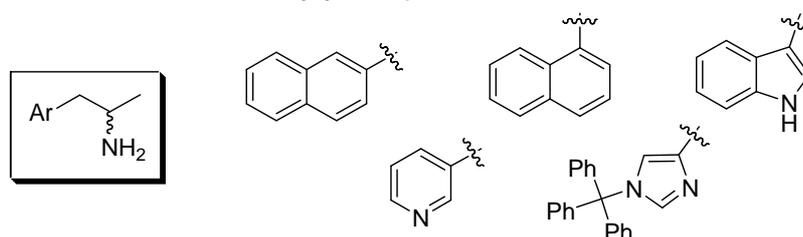
^a Condiciones de la DKR: si bien para las aminas racémicas **15a-c** se empleó una relación 1:0.25 en peso de sustrato y CAL-B, en el caso de la amina **15e** la relación empleada fue 1:1 debido a su más baja reactividad; metoxiacetato de etilo (2 equivalentes); tolueno (0.1 M); 100 °C y agitación magnética durante 24 h (ver parte experimental). ^b Determinadas mediante CG para **15a-c** o por ¹H-RMN para **15e**. ^c Rendimientos aislados tras cromatografía de columna. ^d Determinados mediante HPLC.

A pesar de que todas las amidas se aislaron con excesos enantioméricos superiores al 90%, el menor valor de los mismos en comparación con las KR puede ser debido a la ligera pérdida de enantioselectividad de la CAL-B a temperaturas tan altas. Además, en los estudios preliminares de la KR con el sustrato (\pm)-**15c** ya se pudo observar que el tolueno era, de entre los disolventes probados, el que conducía a la formación del producto con un ee más bajo (Tabla 2-2, entradas 5-8).

Cabe mencionar que la DKR de la amina **15c** también se intentó llevar a cabo en THF a 70 °C pero, como era de esperar por las observaciones previas durante los experimentos de racemización, sólo se alcanzó un 52% de conversión, aislándose la amida y la amina con un 92% y un 97% de exceso enantiomérico, respectivamente.

CONCLUSIONES

En este capítulo se ha llevado a cabo la preparación química de una familia de cinco 1-aril y 1-heteroarilpropan-2-aminas, con reconocida o potencial actividad biológica, a través de una ruta sencilla y eficaz que incluye una reacción de Henry y una posterior reducción.



La lipasa de *Candida antarctica* de tipo B ha mostrado una excelente enantioselectividad en procesos de resolución cinética de la amina mediante acilación, permitiendo la obtención de las amidas de configuración R con elevadas purzas enantioméricas para casi todos los sustratos, resultando menos efectiva en el caso del derivado de piridina.

Aprovechando los buenos resultados obtenidos en la KR y la termoestabilidad de la CAL-B, se ha desarrollado por primera vez un proceso de resolución cinética dinámica de β -isopropilaminas en el que el enzima se combina con un catalizador metálico, conduciendo a la formación de las correspondientes (R)-metoxiacetamidas con altos rendimientos y excesos enantioméricos.

La CAL-B actúa preferentemente sobre el enantiómero de configuración R, lo cual se ha comprobado por comparación de la rotación óptica de uno de los sustratos enantiopuros con el valor descrito en la bibliografía, estando esta preferencia de acuerdo con la regla empírica de Kazlauskas.

La enantioselectividad está favorecida por una mayor diferencia de tamaños entre los sustituyentes unidos al centro estereogénico, manifestado en el importante descenso del valor de E para el derivado de piridina en comparación con el resto de sustratos con restos aromáticos más voluminosos.

PARTE EXPERIMENTAL

I.2.5.1. GENERAL

La lipasa tipo B de *Candida antarctica* (CAL-B, Novozyme 435, 7300 PLU/g, inmovilizada sobre poliacrilamida) y la lipasa de *Rhizomuchor miehei* (RML, Lipozyme RM IM, <15% en peso) fueron donadas por Novozymes (Dinamarca). La lipasa AK (22100 U/g) y la de páncreas porcino de tipo II (PPL, 30-90 U/mg de proteína, empleando triacetina) fueron adquiridas de Sigma-Aldrich. La lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada en tierra de diatomeas (PSL IM, 943 U/g) fue proporcionada por Amano Europe.

Todos los demás reactivos se adquirieron de Aldrich, Prolabo o VWR, sin ser necesarios tratamientos previos para su purificación.

Los disolventes empleados para las acilaciones enzimáticas y para las reacciones en atmósfera inerte fueron sometidos, previamente a su utilización, a un proceso de destilación sobre un desecante adecuado, almacenándose bajo atmósfera de nitrógeno. El TBME, el THF y el tolueno se secaron sobre sodio empleando como indicador benzofenona, mientras que el diclorometano se secó con CaH_2 .

I.2.5.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

I.2.5.2.1. CROMATOGRAFÍA EN GEL DE SÍLICE

Para la cromatografía en capa fina se han utilizado cromatofolios de gel de sílice POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄ (0.25 mm de espesor), los cuales llevan incorporado un revelador ultravioleta, comercializados por Merck. Como revelador se utilizó una disolución acuosa formada por un 1% de KMnO_4 , 5% de K_2CO_3 y un 5% de NaOH en 200 mL de agua.

Parte experimental

Para la cromatografía de columna se empleó gel de sílice 60 (tamaño de partícula: 40-60 μm) adquirida a Merck.

I.2.5.2.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

El seguimiento de las reacciones enzimáticas de acilación, así como la medida de los excesos enantioméricos de los productos formados y de los sustratos remanentes tras su adecuada derivatización y purificación, se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100, con la columna quiral Chiralcel OJ-H (25 x 0.46 cm). La detección empleada es visible-ultravioleta a 210 y 215 nm. Como fase móvil se han empleado mezclas de hexano/isopropanol o hexano/etanol. A continuación, se muestran las condiciones de separación y los tiempos de retención de los dos enantiómeros de cada uno de los sustratos estudiados (Tabla 2-5):

Tabla 2-5. Condiciones de separación en HPLC de los compuestos estudiados en este capítulo

	Ar	R	Columna	Eluyente	T (°C)	Flujo (mL/min)	t _R (min)	
a		Me	OJ-H	Hex:IPA 95:5	40	0.8	22.4 (R)-24.3 (S)	
		MeOCH ₂					19.2 (R)-23.7 (S)	
b		Me		Hex:IPA 90:10	30		18.5 (S)-20.4(R)	
		MeOCH ₂		22.7 (S)-32.5 (R)				
c		Me		Hex:EtOH 85:15	40		0.8	13.9 (R)-16.2 (S)
		MeOCH ₂		17.9 (R)-21.2 (S)				
d		Me		Hex:EtOH 97:3	40		0.8	22.2 (R)-24.2 (S)
		MeOCH ₂		25.6 (R)-28.4 (S)				
e		Me		Hex:EtOH 95:5	40		0.8	6.9 (S)-8.8 (R)
		MeOCH ₂						9.4 (S)-14.0 (R)

I.2.5.2.3. ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM)

Se utilizó la técnica de ionización por electrospray (ESI⁺) con un cromatógrafo HP 1100 acoplado a masas. Los valores en ambos casos se refieren a unidades de masa atómica (uma).

I.2.5.2.4. PUNTOS DE FUSIÓN (PF)

Se han llevado a cabo con un aparato Gallenkamp en tubos capilares abiertos y, por tanto, sus valores no están corregidos.

I.2.5.2.5. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y secuencia de pulsos DEPT han sido realizados con espectrómetros Bruker AV-300, AC-300 y DPX-300 (300.13 MHz para ^1H y 75.5 MHz para ^{13}C).

Los desplazamientos químicos se dan en valores de δ en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hertzios (Hz).

Los calibrados se hicieron sobre la señal del CDCl_3 (^{13}C , 76.95 ppm) o del CHCl_3 residual (^1H , 7.26 ppm).

I.2.5.2.7. ROTACIÓN ÓPTICA ESPECÍFICA

Se han medido con un polarímetro Perkin-Elmer 343 (unidades $10^{-1} \text{ cm}^2 \times \text{grado} \times \text{g}^{-1}$), empleando la lámpara de sodio (D).

I.2.5.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS

I.2.5.3.1. Síntesis del 1-(Trifenilmetil)-1*H*-imidazol-4-carbaldehído (13e)

Sobre una disolución de 1*H*-imidazol-4-carbaldehído (400 mg, 4.16 mmol) en diclorometano anhidro (21 mL), se añade trietilamina (636 μL , 4.58 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno, y la disolución resultante se enfría a 0 °C en baño de hielo. A continuación se añade cloruro de trifenílmetilo (1.28 g, 4.58 mmol) y la mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1.5 h hasta comprobar por TLC (10% MeOH/ CH_2Cl_2) la desaparición completa del material de partida. En este momento, el disolvente se evapora a presión reducida y el crudo de reacción se purifica mediante columna cromatográfica en gel de sílice (50% AcOEt/Hexano) para obtener el derivado tritilado **13e** (1.38 g, 98%) como un sólido blanco.

I.2.5.3.2. Procedimiento General para la Síntesis de las 1-(Hetero)arilpropan-2-aminas Racémicas 15a-e

A una mezcla del correspondiente aldehído **13a-e** (2.96 mmol) y acetato de amonio (57 mg, 0.74 mmol), se le añade nitroetano (5.9 mL) y la suspensión resultante se calienta a reflujo durante 6 h. Pasado este tiempo, se evapora el disolvente y el crudo resultante se extrae con agua (30 mL) –para los derivados de nitropropeno **14a,b**– o con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (30 mL) –para los derivados de nitropropeno **14c-e**– y diclorometano (3 x 30 mL). Se combinan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a presión reducida para obtener los correspondientes 2-nitropropenos **14a-e** con rendimientos cuantitativos. Los datos espectroscópicos de **14a-e** coinciden con los previamente publicados.¹³⁴ Estos compuestos se usaron en la siguiente etapa de reducción sin purificación adicional. Así, el correspondiente nitropropeno **14a-e** (3.12 mmol) se disuelve en THF anhidro (62 mL) y se va añadiendo, de forma gradual y bajo atmósfera de nitrógeno, el LiAlH₄ (355 mg, 9.35 mmol). Una vez concluido el proceso de adición, la mezcla se refluye durante 12 h. Pasado este tiempo, se deja enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente y se añade agua con precaución hasta comprobar la total destrucción del exceso de hidruro. A continuación, se añade una disolución acuosa de NaOH 4 N para capturar las sales de aluminio, observándose la formación de un sólido amarillo pálido. La mezcla resultante se filtra sobre celite[®], se lava con abundante THF, se seca sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra a presión reducida. Este crudo de reacción se purifica por columna cromatográfica [50% MeOH/CH₂Cl₂ para los compuestos **15a,b** o 2% NH₃ (disolución acuosa al 32%)/MeOH para los compuestos **15c-e**] para obtener la correspondiente amina **15a-e** (33-74% , Esquema 2-13).

¹³⁴ Para **14a,b**: ver referencia 100; para **14c,d**: S. Yan, Y. Gao, R. Xing, Y. Shen, Y. Liu, P. Wu, H. Wu, *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 6294-6299; para **14e**: N.-Y. Shih, A. T. Lupo, Jr., R. Aslanian, S. Orlando, J. J. Piwinski, M. J. Green, A. K. Ganguly, M. A. Clark, S. Tozzi, W. Kreutner, J. A. Hey, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1593-1599.

I.2.5.3.3. Procedimiento General para la Síntesis de las Amidas Racémicas **16a-e** y **17a-e**

Sobre una disolución de la amina racémica (\pm)-**15a-e** (0.33 mmol) en CH_2Cl_2 o THF seco (2.2 mL) se añade trietilamina (116 μL , 0.83 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La disolución resultante se enfría a 0 °C y se añade gota a gota cloruro de acetilo o de metoxiacetilo (0.83 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 5 horas, tiempo tras el cual no se detecta material de partida mediante análisis por TLC [50% MeOH/ CH_2Cl_2 para los compuestos **15a,b** o 2% NH_3 (disolución acuosa al 32%)/MeOH para los compuestos **15c-e**]. La mezcla de reacción se evapora bajo presión reducida y el crudo resultante se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (diferente eluyente en función del compuesto, ver datos experimentales dentro de este apartado), aislándose las correspondientes amidas (\pm)-**16a-e** o (\pm)-**17a-e**.

I.2.5.3.4. Procedimiento General para la Resolución Cinética de las Aminas Racémicas **15a-e** mediante Acilación Catalizada por la CAL-B

Sobre una suspensión de la correspondiente amina racémica **15a-e** (50 mg, 0.1 M) y el enzima (CAL-B, 50 mg) en THF seco, se añade metoxiacetato de etilo (5 equivalentes) bajo atmósfera de nitrógeno. La reacción se mantiene con agitación orbitalica (250 rpm) a 30 °C durante 3.5-24 h (ver Tabla 2-3 en página 140), siguiendo el transcurso de la reacción por HPLC hasta que la conversión alcanza aproximadamente el 50%. Entonces, se para la reacción filtrando el enzima y lavándolo con THF (5 x 1 mL). Se evapora el disolvente y los productos presentes en el residuo (la amina **15a-e** y la metoxiacetamida **17a-e** ópticamente activas) se separan empleando diferentes métodos dependiendo del sustrato. Los compuestos **17c-e** y **15c-e** se separan mediante cromatografía de columna (diferentes mezclas de MeOH/ CH_2Cl_2 y 2% NH_3 (disolución acuosa al 32%)/MeOH, respectivamente). Sin embargo, las mezclas formadas por **15a,b** y **17a,b** se tratan con una disolución acuosa de H_2SO_4 3 N (5 mL) y se extraen con diclorometano (3 x 5 mL). A continuación, la fase acuosa se trata con NaOH sólido a 0 °C hasta alcanzar un pH básico, y se extrae con diclorometano (5 x 5 mL). Ambas fases orgánicas se secan sobre Na_2SO_4 .

Parte experimental

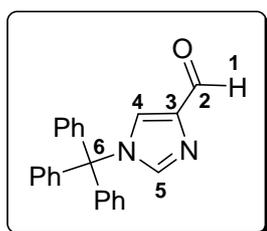
anhidro, se filtran y se concentran bajo presión reducida, obteniendo así las metoxiacetamidas **17a,b** y las aminas **15a,b** ópticamente activas. Los rendimientos con los que se obtuvieron cada una de ellas se encuentran recogidos en la Tabla 2-3. Para determinar el exceso enantiomérico de las aminas **15a-e**, se trataron con cloruro de acetilo, lo que permitió obtener las correspondientes acetamidas **16a-e** que se analizaron por HPLC.

I.2.5.3.5. Procedimiento General para la Resolución Cinética Dinámica (DKR) de las Aminas Racémicas 15a-c,e

Un matraz Schlenk, flambeado para garantizar la total ausencia de humedad, se carga con la correspondiente amina racémica **15a-c,e** (50 mg, 0.1 M) y el agitador magnético, se cierra y se somete a 3 ciclos de vacío y rellenado con nitrógeno, asegurando la completa retirada de aire. Entonces, manteniendo la atmósfera de nitrógeno, se añaden de forma secuencial el catalizador de Shvo (10 mol%), tolueno seco, CAL-B (12.5 mg para las aminas **15a-c** ó 50 mg para la amina **15e**), Na₂CO₃ (25 mg), 2,4-dimetilpentan-3-ol (0.5 equivalentes) y, finalmente, metoxiacetato de etilo (2 equivalentes). Se cierra el recipiente, sellándolo con teflón, y la mezcla de reacción se agita a 100 °C durante 24 h. A continuación se deja enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente, se filtra sobre celite® y se lava con metanol (5 x 2 mL). Se evapora el disolvente a presión reducida y el residuo se purifica por columna cromatográfica, obteniendo las correspondientes metoxiacetamidas **17a-c,e** (50-86%, 91-97% ee, Tabla 2-4 en página 145).

I.2.5.4. DATOS EXPERIMENTALES

1-(Trifenilmetil)-1H-imidazol-4-carbaldehído (13e)



Fórmula Molecular: C₂₃H₁₈N₂O

Aspecto físico: Sólido blanco

Peso molecular: 338.40 g/mol

R_f (50% AcOEt/Hexano): 0.48

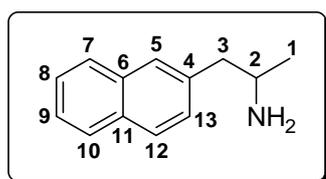
PF: 193-196 °C

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.08-7.15 (m, 6H, Ar), 7.34-7.39 (m, 9H, Ar), 7.54 (s, 1H, H₄), 7.61 (s, 1H, H₅), 9.88 (s, 1H, H₁)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 76.2 (C₆); 126.7 (C₄); 128.3, 128.4, 129.5 (15C, CH Ph); 140.5 (C₅); 140.7 (C₃); 141.4 (3C, C_{ipso} Ph); 186.4 (C₂)

HRMS (ESI⁺, m/z): Calculada para C₂₃H₁₈N₂NaO [(M+Na)⁺]: 361.1311; encontrada: 361.1319

1-(2-Naftil)propan-2-amina (15a)



Fórmula Molecular: C₁₃H₁₅N

Aspecto físico: Aceite amarillo pálido

Peso molecular: 185.26 g/mol

R_f (50% MeOH/CH₂Cl₂): 0.12

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.17 (d, 3H, J 6.1, H₁), 1.61 (sa, 2H, NH₂), 2.68 (dd, 1H, J 13.2 y 8.0, H₃), 2.88 (dd, 1H, J 13.2 y 5.4, H₃), 3.27 (h, 1H, J 6.1, H₂), 7.33 (d, 1H, J 7.8, H₁₃), 7.42-7.50 (m, 2H, H₈+H₉), 7.64 (s, 1H, H₅), 7.78-7.84 (m, 3H, H₇+H₁₀+H₁₂)

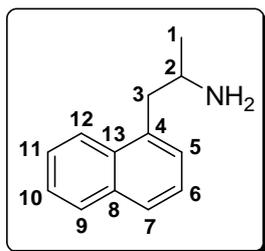
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 23.4 (C₁); 46.6 (C₃); 48.2 (C₂); 125.2, 125.8, 127.3, 127.5, 127.6, 127.9 (CH Ar); 132.0, 133.4, 137.1 (C Ar)

HRMS (ESI⁺, m/z): Calculada para C₁₃H₁₆N [(M+H)⁺]: 186.1277; encontrada: 186.1272

Rotación Específica: [α]_D²⁰ = +21.6 (c 0.8, CHCl₃), 91% ee (enantiómero S), por acilación enzimática

Parte experimental

1-(1-Naftil)propan-2-amina (15b)



Fórmula Molecular: C₁₃H₁₅N

Aspecto físico: Aceite amarillo

Peso molecular: 185.26 g/mol

R_f (50% MeOH/CH₂Cl₂): 0.17

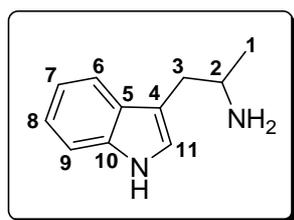
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.21 (d, 3H, *J* 6.4, H₁), 1.67 (sa, 2H, NH₂), 2.96 (dd, 1H, *J* 13.4 y 8.0, H₃), 3.22 (dd, 1H, *J* 13.4 y 5.2, H₃), 3.32-3.44 (m, 1H, H₂), 7.34-7.55 (m, 4H, H₅+H₆+H₁₀+H₁₁), 7.75 (d, 1H, *J* 7.8, H₇), 7.86 (dd, 1H, *J* 7.2 y 3.0, H₉), 8.05 (d, 1H, *J* 8.2, H₁₂)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 23.7 (C₁); 43.5 (C₃); 47.6 (C₂); 123.8, 125.3, 125.4, 125.7, 127.0, 127.2, 128.7 (CH Ar); 132.0, 133.9, 135.7 (C Ar)

HRMS (ESI⁺, *m/z*): Calculada para C₁₃H₁₆N [(M+H)⁺]: 186.1277; encontrada: 186.1272

Rotación Específica: [α]_D²⁰ = +59.7 (c 1.0, CHCl₃), 87% ee (enantiómero S), por acilación enzimática

1-(1*H*-Indol-3-il)propan-2-amina (15c)



Fórmula Molecular: C₁₁H₁₄N₂

Aspecto físico: Sólido amarillo pálido

PF: 86-90 °C

Peso molecular: 174.24 g/mol

R_f (2% NH₃ aq. 32%/MeOH): 0.10

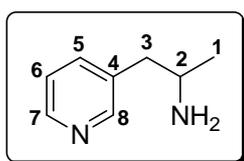
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.22 (d, 3H, *J* 6.4, H₁), 1.52 (sa, 2H, NH₂), 2.69 (ddd, 1H, *J* 14.3, 8.3 y 0.7, H₃), 2.93 (ddd, 1H, *J* 14.3, 5.0 y 1.0, H₃), 3.29-3.38 (m, 1H, H₂), 6.98 (da, 1H, *J* 1.0, H₁₁), 7.13-7.25 (m, 2H, H₇+H₈), 7.35 (ddd, 1H, *J* 7.9, 1.3 y 0.9, H₉), 7.66 (m, 1H, H₆), 8.91 (sa, 1H, NH)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 23.6 (C₁); 35.8 (C₃); 47.2 (C₂); 111.1 (C₇); 113.3 (C₄); 118.8, 119.0, 121.7, 122.5 (CH Ar); 127.6 (C₅); 136.3 (C₁₀)

HRMS (ESI⁺, *m/z*): Calculada para C₁₁H₁₅N₂ [(M+H)⁺]: 175.1230; encontrada: 175.1230

Rotación Específica: [α]_D²⁰ = +20.8 (c 1, MeOH), 99% ee (enantiómero S), por acilación enzimática

1-(3-Piridil)propan-2-amina (15d)



Fórmula Molecular: C₈H₁₂N₂

Aspecto físico: Aceite amarillo pálido

Peso molecular: 136.19 g/mol

R_f (1% NH₃ aq. 32%/MeOH): 0.12

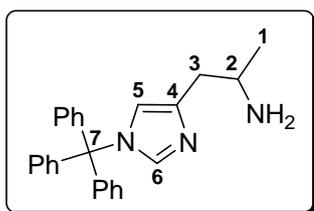
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.06 (d, 3H, *J* 6.4, H₁), 2.4 (sa, 2H, NH₂), 2.51 (dd, 1H, *J* 13.5 y 7.7, H₃), 2.62 (dd, 1H, *J* 13.5 y 5.7, H₃), 3.12 (h, 1H, *J* 6.2, H₂), 7.14-7.18 (m, 1H, H₆), 7.45 (d, 1H, *J* 7.9, H₅), 8.38-8.40 (m, 2H, H₇+H₈)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 23.0 (C₁); 43.1 (C₃); 48.0 (C₂); 123.1 (C₆); 134.6 (C₄); 136.5 (C₅); 147.5, 150.3 (C₆, C₈)

HRMS (ESI⁺, *m/z*): Calculada para C₈H₁₃N₂ [(M+H)⁺]: 137.1073; encontrada: 137.1068

Rotación Específica: [α]_D²⁰ = +8.0 (c 0.25, CHCl₃), 98% ee (enantiómero S), por acilación enzimática

1-[1-(Trifenilmetil)1*H*-imidazol-4-il]propan-2-amina (15e)



Fórmula Molecular: C₂₅H₂₅N₃

Aspecto físico: Semi-sólido amarillo pálido

Peso molecular: 367.49 g/mol

R_f (2% NH₃ aq. 32%/MeOH): 0.28

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.07 (d, 3H, *J* 6.3, H₁), 2.47 (dd, 1H, *J* 14.3 y 7.7, H₃), 2.61 (dd, 1H, *J* 14.3 y 5.5, H₃), 3.12 (sa, 2H, NH₂), 3.24 (h, 1H, *J* 6.4, H₂), 6.56 (m, 1H, H₅), 7.09-7.33 (m, 16H, 15 x CH Ph + H₆)

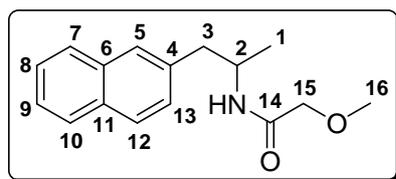
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 22.0 (C₁), 37.5 (C₃), 47.0 (C₂), 75.0 (C₇), 119.1 (C₅), 127.9 (9 x CH Ph), 129.6 (6 x CH Ph), 138.5 (C₆), 138.8 (C₄), 142.4 (3 x C Ph)

HRMS (ESI⁺, *m/z*): Calculada para C₂₅H₂₆N₃ [(M+H)⁺]: 368.2121; encontrada: 368.2117

Rotación Específica: [α]_D²⁰ = +6.3 (c 1.0, CHCl₃), 97% ee (enantiómero S), por acilación enzimática

Parte experimental

N-[1-(2-Naftil)propan-2-il]-2-metoxiacetamida (17a)



Fórmula Molecular: C₁₆H₁₉NO₂

Aspecto físico: Semi-sólido amarillo pálido

Peso molecular: 257.33 g/mol

R_f (70% AcOEt/hexano): 0.33

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.17 (d, 3H, *J* 6.6, H₁), 2.87 (dd, 1H, *J* 7.3 y 13.5, H₃), 3.03 (dd, 1H, *J* 6.1 y 13.5, H₃), 3.31 (s, 3H, H₁₆), sistema AB (δ_A = 3.80, δ_B = 3.86, |²*J*_{A,B}| = 15.1, 2H, H₁₅), 4.34-4.48 (m, 1H, H₂), 6.46 (da, 1H, *J* 7.7, NH), 7.34 (d, 1H, *J* 8.4, H₁₃), 7.37-7.52 (m, 2H, H₈+H₉), 7.63 (s, 1H, H₅), 7.70-7.90 (m, 3H, H₇+H₁₀+H₁₂)

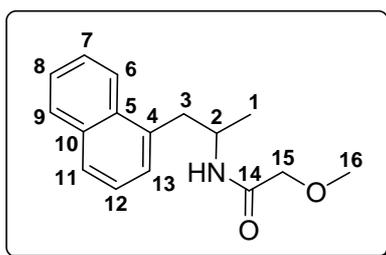
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 19.9 (C₁); 42.6 (C₃); 45.5 (C₂); 59.0 (C₁₆); 71.8 (C₁₅); 125.3, 125.9, 127.4, 127.5, 127.7, 127.70, 127.9 (CH Ar); 132.1, 133.4, 135.4 (C Ar); 168.7 (C₁₄)

HRMS (ESI⁺, *m/z*): Calculada para C₁₆H₁₉NNaO₂ [(M+Na)⁺]: 280.1308; encontrada: 280.1314; calculada para C₁₆H₂₀NO₂ [(M+H)⁺]: 258.1489; encontrada: 258.1477

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OJ-H	Eluyente: hexano/2-propanol (90:10)
Temperatura: 20 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (-)-(S): 22.7 min	t_R (+)-(R): 32.5 min

Rotación Específica: [α]_D²⁰ = +18.0 (c 1.0, CHCl₃), 98% ee (enantiómero R), por acilación enzimática

N-[1-(1-Naftil)propan-2-il]-2-metoxiacetamida (17b)



Fórmula Molecular: C₁₆H₁₉NO₂

Aspecto físico: Sólido amarillo pálido

Peso molecular: 257.33 g/mol

R_f (70% AcOEt/hexano): 0.34

PF: 73-76 °C

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.17 (d, 3H, *J* 6.6, H₁), 2.99 (dd, 1H, *J* 8.3 y 13.6, H₃), 3.33 (s, 3H, H₁₆), 3.54 (dd, 1H, *J* 5.5 y 13.6, H₃), sistema AB (δ_A = 3.83, δ_B = 3.89, |²J_{A,B}| = 15.1, 2H, H₁₅), 4.37-4.51 (m, 1H, H₂), 6.50 (da, 1H, *J* 7.0, NH), 7.27-7.60 (m, 4H, Ar), 7.75 (d, 1H, *J* 8.1, Ar), 7.85 (d, 1H, *J* 7.9, Ar), 8.31 (d, 1H, *J* 8.6, Ar)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 19.9 (C₁); 39.9 (C₃); 45.4 (C₂); 58.9 (C₁₆); 71.8 (C₁₅); 124.1, 125.1, 125.5, 126.0, 127.2, 127.4, 128.5 (CH Ar); 132.2, 133.8, 134.2 (C Ar); 169.0 (C₁₄)

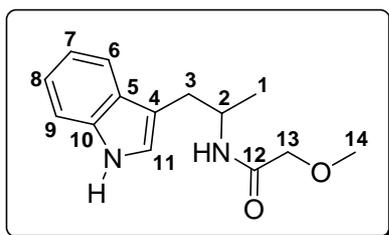
HRMS (ESI⁺, *m/z*): Calculada para C₁₆H₁₉NNaO₂ [(M+Na)⁺]: 280.1308; encontrada: 280.1319; calculada para C₁₆H₂₀NO₂ [(M+H)⁺]: 258.1489; encontrada: 258.1478

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OJ-H	Eluyente: hexano/2-propanol (95:5)
Temperatura: 40 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (-)-(R): 19.2 min	t_R (+)-(S): 23.7 min

Rotación Específica: [α]_D²⁰ = -30.7 (c 1.0, CHCl₃), 97% ee (enantiómero *R*), por acilación enzimática

Parte experimental

N-[1-(1*H*-Indol-3-il)propan-2-il]-2-metoxiacetamida (17c)



Fórmula Molecular: C₁₄H₁₈N₂O₂

Aspecto físico: Aceite marrón

Peso molecular: 246.30 g/mol

R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂): 0.58

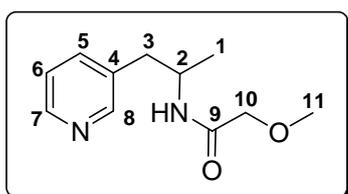
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.20 (d, 3H, *J* 6.6, H₁), parte AB de un sistema ABX (δ_A = 2.91, δ_B = 3.00, |²J_{A,B}| = 14.5, |³J_{A,X}| = 6.9, |³J_{B,X}| = 5.7, 2H, H₃), 3.29 (s, 3H, H₁₄), sistema MN (δ_M = 3.82, δ_N = 3.87, |²J_{M,N}| = 15.0, 2H, H₁₃), 4.41 (m, 1H, H₂), 6.52 (da, 1H, *J* 7.7, NH), 7.00 (d, 1H, *J* 2.4, H₁₁), 7.11 (dt, 1H, *J* 7.9 y 1.1, H₇ o H₈), 7.18 (dt, 1H, *J* 7.9 y 1.3, H₈ o H₇), 7.35 (da, 1H, *J* 7.9, H₉), 7.65 (da, 1H, *J* 7.9, H₆), 8.49 (sa, 1H, NH de indol)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 20.3 (C₁); 31.9 (C₃); 45.2 (C₂); 58.9 (C₁₄); 71.9 (C₁₃); 111.0 (CH Ar); 111.7 (C₄); 118.8, 119.2, 121.8, 122.6 (CH Ar); 127.8 (C₅); 136.2 (C₁₀); 168.8 (C₁₂)

HRMS (ESI⁺, *m/z*): Calculada para C₁₄H₁₈N₂NaO₂ [(M+Na)⁺]: 269.1260; encontrada: 269.1272; calculada para C₁₄H₁₉N₂O₂ [(M+H)⁺]: 247.1441; encontrada: 247.1442

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OJ-H	Eluyente: hexano/etanol (85:15)
Temperatura: 40 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (+)-(R): 17.9 min	t_R (-)-(S): 21.2 min

Rotación Específica: [α]_D²⁰ = +17.6 (c 1.0, CHCl₃), 98% ee (enantiómero R), por acilación enzimática

N-[1-(3-Piridil)propan-2il]-2-metoxiacetamida (17d)**Fórmula Molecular:** C₁₁H₁₆N₂O₂**Aspecto físico:** Aceite marrón**Peso molecular:** 208.26 g/mol**R_f** (20% MeOH/AcOEt): 0.43

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.13 (d, 3H, *J* 6.6, H₁), parte AB de un sistema ABX (δ_A = 2.73, δ_B = 2.82, |²J_{A,B}| = 13.7, |³J_{A,X}| = 7.0, |³J_{B,X}| = 6.3, 2H, H₃), 3.33 (s, 3H, H₁₁), sistema MN (δ_M = 3.77, δ_N = 3.81, |²J_{M,N}| = 15.1, 2H, H₁₀), 4.26 (m, 1H, H₂), 6.38 (da, 1H, *J* 6.8, NH), 7.21 (dd, 1H, *J* 4.6 y 7.7, H₆), 7.52 (d, 1H, *J* 7.7, H₅), 8.43 (sa, 2H, H₇+H₈)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 19.8 (C₁); 39.6 (C₃); 45.2 (C₂); 59.0 (C₁₁); 71.7 (C₁₀); 123.3 (C₆); 133.4 (C₄); 136.7 (C₅); 147.7, 150.2 (C₇,C₈); 168.7 (C₉)

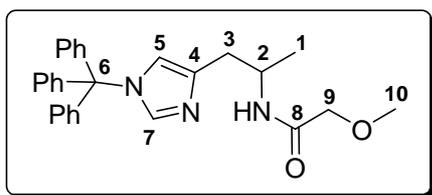
HRMS (ESI⁺, *m/z*): Calculada para C₁₁H₁₆N₂NaO₂ [(M+Na)⁺]: 231.1104; encontrada: 231.1103

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OJ-H	Eluyente: hexano/etanol (97:3)
Temperatura: 40 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (+)-(R): 25.6 min	t_R (-)-(S): 28.4 min

Rotación Específica: [α]_D²⁰ = +14.1 (c 1.0, CHCl₃), 85% ee (enantiómero *R*), por acilación enzimática

Parte experimental

***N*-[1-(1-Trifenilmetil-1*H*-imidazol-4-il)propan-2-il]-2-metoxiacetamida (17e)**



Fórmula Molecular: C₂₈H₂₉N₃O₂

Aspecto físico: Sólido blanco

Peso molecular: 439.55 g/mol

R_f (10% MeOH/AcOEt): 0.63

PF: 149-153 °C

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.12 (d, 3H, *J* 6.6, H₁), parte AB de un sistema ABX (δ_A = 2.78, δ_B = 2.66, |²*J*_{A,B}| = 14.6, |³*J*_{A,X}| = 5.9, |³*J*_{B,X}| = 5.2, 2H, H₃), 3.36 (s, 3H, H₁₀), sistema MN (δ_M = 3.78, δ_N = 3.85, |²*J*_{M,N}| = 15.0, 2H, H₉), 4.29 (m, 1H, H₂), 6.62 (s, 1H, H₅), 7.00-7.50 (m, 17H, 15 x CH Ph +H₇+NH)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 20.0 (C₁), 34.0 (C₃), 44.4 (C₂), 59.1 (C₁₀), 72.1 (C₉), 75.2 (C₆), 119.4 (C₅), 128.0 (9 x CH Ph), 129.6 (6 x CH Ph), 137.5 (C₄), 138.3 (C₇), 142.3 (3 x C Ph), 168.6 (C₈)

HRMS (ESI⁺, *m/z*): Calculada para C₂₈H₂₉N₃NaO₂ [(M+Na)⁺]: 462.2152; encontrada: 462.2154; calculada para C₂₈H₃₀N₃O₂ [(M+H)⁺]: 440.2333; encontrada: 440.2332

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OJ-H	Eluyente: hexano/etanol (95:5)
Temperatura: 40 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (-)-(S): 9.4 min	t_R (+)-(R): 14.0 min

Rotación Específica: [α]_D²⁰ = +15.0 (c 1.0, CHCl₃), 96% ee (enantiómero *R*), por acilación enzimática

PARTE II

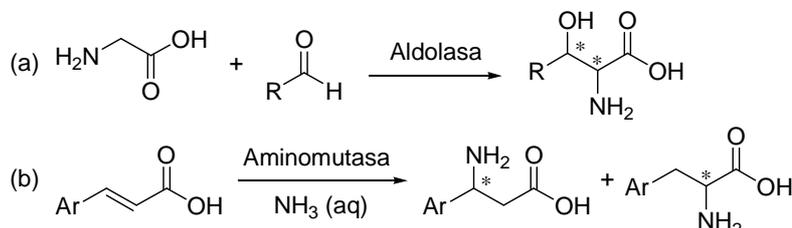
DERIVADOS DE AMINOÁCIDOS ÓPTICAMENTE ACTIVOS

Los aminoácidos ópticamente activos, como componentes fundamentales de las proteínas, están involucrados en una gran cantidad de procesos fisiológicos y forman parte de numerosos productos naturales, por lo que han sido objeto de otras tantas aplicaciones farmacéuticas. Sin embargo, la mayor desventaja de emplear aminoácidos naturales al construir péptidos bioactivos como fármacos radica en que pueden ser degradados por el metabolismo, disminuyendo así su biodisponibilidad dentro del organismo. Una de las estrategias adoptadas para superar este inconveniente consiste en preparar derivados de aminoácidos no-proteinogénicos, como ésteres, amidas o aminofosfonatos, que sirvan como intermedios en la preparación de péptidos que, de esta manera, podrían tener una mayor estabilidad. Además, muchas de estas nuevas moléculas pueden encontrar aplicación en otros campos como la catálisis asimétrica.

Así, a lo largo de la segunda parte de esta Tesis Doctoral se estudiará la síntesis y posterior resolución enzimática de este tipo de compuestos a través de diferentes aproximaciones con el fin de permitir el acceso a los mismos en forma enantiopura.

II.0.1. SÍNTESIS ENZIMÁTICA ASIMÉTRICA DE AMINOÁCIDOS Y DERIVADOS

Hasta la fecha no han sido muchas las aproximaciones enzimáticas descritas para la síntesis asimétrica de derivados de aminoácidos, encontrándose entre los enzimas más comúnmente empleados las liasas (EC 4), las isomerasas (EC 5) y las hidrolasas (EC 3).⁴⁴ Entre las liasas, las aldolasas (EC 4.1.2.13), enzimas que catalizan la formación de enlaces C-C a través de una reacción aldólica, y, en concreto las glicina aldolasas, han permitido la adición estereoselectiva de aminoácidos a aldehídos para formar β-hidroxi-α-aminoácidos con dos centros quirales (Esquema II-1, a).¹³⁵ Por otro lado, la fenilalanina aminomutasa es un enzima del grupo de las isomerasas, responsable de la adición de amoniaco a derivados del ácido cinámico para formar α- o β-fenilalaninas en forma enantiopura (Esquema II-1, b).¹³⁶



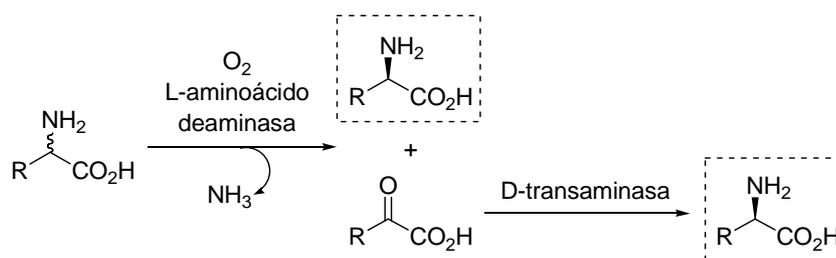
Esquema II-1. Síntesis estereoselectiva de aminoácidos empleando: (a) aldolasas en procesos de condensación aldólica; (b) adición de amoniaco a ácidos carboxílicos α,β-insaturados (b)

Una de las clases de enzimas de más reciente y exitosa aplicación en síntesis asimétrica son las aminotransferasas o transaminasas (EC 2.6), las cuales han catalizado la síntesis de aminas quirales, aunque también se han aplicado de un modo similar en la preparación de aminoácidos enantiopuros, empleando cetoácidos como productos de partida. Además, la combinación de dos de estos enzimas con diferente estereopreferencia

¹³⁵ a) M. L. Gutierrez, X. Garrabou, E. Agosta, S. Servi, T. Parella, J. Joglar, P. Clapés, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 4647-4656; b) K. Fesko, L. Giger, D. Hilvert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5987-5990.

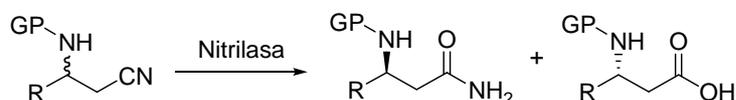
¹³⁶ a) B. Wu, W. Szymanski, P. Wietzes, S. de Wildeman, G. J. Poelarends, B. L. Feringa, D. B. Janssen, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 338-344; b) B. Wu, W. Szymanski, M. M. Heberling, B. L. Feringa, D. B. Janssen, *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 352-362.

permite la transformación de un aminoácido racémico en uno solo de sus enantiómeros (Esquema II-2).¹³⁷



Esquema II-2. Desracemización de un aminoácido mediante el empleo de dos transaminasas complementarias

Dentro de la clase de las hidrolasas, las nitrilasas (EC 3.5.5.1) permiten la formación de aminoamidas¹³⁸ y/o aminoácidos¹³⁹ ópticamente activos por hidrólisis del grupo ciano de precursores adecuados, como pueden ser los β -aminoalcanonitrilos (Esquema II-3).¹⁴⁰



Esquema II-3. Empleo de una nitrilasa para la biotransformación de aminonitrilos protegidos en β -aminoácidos

En este trabajo de investigación se han empleado principalmente lipasas (EC 3.1.1.3), pues resultan biocatalizadores muy útiles para la síntesis estereoselectiva de aminoácidos y derivados, ya que hacen uso de la bifuncionalidad que estos poseen, modificando sus centros reactivos de diversas maneras. Por un lado, la nucleofilia del grupo amino permite llevar a cabo resoluciones mediante procesos de acilación con ésteres no activados o de alcoxicarbonilación con diferentes carbonatos, mientras que a través de su carbono carbonílico electrófilo es posible modificarlos

¹³⁷ R. L. Hanson, B. L. Davis, S. L. Goldberg, R. M. Johnston, W. L. Parker, T. P. Tully, M. A. Montana, R. N. Patel, *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 1119-1129.

¹³⁸ C. Ewert, S. Lutz-Wahl, L. Fischer, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2573-2578.

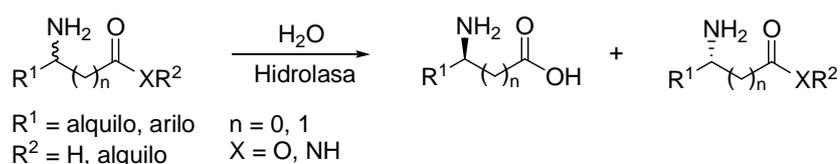
¹³⁹ H. H. Kinfe, V. Chhiba, J. Frederick, M. L. Bode, K. Mathiba, P. A. Steenkamp, D. Brady, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *59*, 231-236.

¹⁴⁰ D.-Y. Ma, D.-X. Wang, J. Pan, Z.-T. Huang, M.-X. Wang, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4087-4091.

Parte II

estereoselectivamente mediante reacciones de transesterificación con alcoholes, de aminólisis con diferentes aminas o de hidrólisis con agua.

Como ocurre con las aminas, compuestos tratados en la primera parte, las hidrolasas pueden catalizar una gran variedad de biotransformaciones para la producción de aminoácidos ópticamente activos, pero fundamentalmente se trata de hidrólisis de ésteres,¹⁴¹ amidas¹⁴² o lactamas,¹⁴³ a través de resoluciones cinéticas tradicionales (Esquema II-4). Un esquema similar podría ser planteado para la formación de amidas o ésteres por aminólisis o esterificación/transesterificación, respectivamente.



Esquema II-4. Hidrólisis enzimática de α - o β -aminoésteres o aminoamidas

Por otro lado, la especial acidez del hidrógeno del carbono contiguo al carbonílico en α -aminoácidos, permite su resolución cinética dinámica simplemente llevando a cabo los procesos en medios acuosos básicos¹⁴⁴ o mediante la reacción del grupo amino con cantidades catalíticas de un aldehído para lograr la racemización del sustrato.¹⁴⁵

¹⁴¹ a) L. Zhao, L. Zheng, G. Gao, F. Jia, S. Cão, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *54*, 7-12; b) T. Nuijens, J. A. W. Kruijtzter, C. Cusan, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, P. J. L. M. Quaedflieg, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2719-2721; c) G. Tasnádi, E. Forró, F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2072-2077.

¹⁴² a) N. W. Fadnavis, A. V. Devi, L. S. Jasti, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2363-2366; b) C. Simons, J. G. E. van Leeuwen, R. Stemmer, I. W. C. E. Arends, T. Maschmeyer, R. A. Sheldon, U. Hanefeld, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *54*, 67-71.

¹⁴³ E. Forró, F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1005-1009.

¹⁴⁴ T. A. Paál, A. Liljebblad, L. T. Kanerva, E. Forró, F. Fülöp, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5269-5276.

¹⁴⁵ D. A. Schichl, S. Enthaler, W. Holla, T. Riermeier, U. Kragl, M. Beller, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 3506-3512.

II.0.2. PREPARACIÓN DE DERIVADOS DE ÁCIDOS AMINOFOSFÓNICOS

Los α -aminofosfonatos son, probablemente, los más importantes sustitutos de los aminoácidos en los sistemas biológicos.¹⁴⁶ Además, un importante número de potentes antibióticos,¹⁴⁷ inhibidores enzimáticos¹⁴⁸ y agentes farmacológicos¹⁴⁹ pertenecen a esta clase de aminofosfonatos o a sus derivados peptídicos. Por este motivo, y considerando la enorme importancia que tienen los compuestos organofosforados en la naturaleza, es sorprendente que no se conociese ningún fosfonato natural hasta que en 1959 se lograra aislar el ácido (aminoetil)fosfónico del rumen de oveja.¹⁵⁰ Desde entonces, han sido numerosos los compuestos de este tipo que han sido aislados o sintetizados y, posteriormente, analizadas sus actividades biológicas.¹⁵¹ En particular, los fosfonatos poseedores de sustituyentes heteroatómicos en las posiciones α y β al átomo de fósforo han resultado mostrar mayor actividad, por lo que su preparación ha sido fuente de gran interés.¹⁵²

Para sintetizar estos compuestos, a lo largo de las últimas décadas se han desarrollado diferentes metodologías sintéticas, basadas en la adición de la función P-H a iminas y enaminas¹⁵³ o nitrilos,¹⁵⁴ reacciones de Arbuzov y Michaelis-Becker,¹⁵⁵ reagrupamientos de Curtius y Hofmann en

¹⁴⁶ a) P. P. Giannousi, P. A. Bartlett, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1603-1609; b) S. Hanessian, Y. L. Bennani, *Synthesis* **1994**, 1272-1274.

¹⁴⁷ F. R. Atherton, C. H. Hassal, R. W. Lambert, *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 29-40.

¹⁴⁸ a) B. Boduszek, J. Oleksyszyn, C.-M. Kam, J. Selzler, R. E. Smith, J. C. Powers, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3969-3976; b) M. Fonvielle, H. Therisod, M. Hemery, M. Therisod, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 410-413; c) J. Beck, S. Gharbi, A. Herteg-Fernea, L. Vercheval, C. Bebrone, P. Lassaux, A. Zervosen, J. Marchand-Brynaert, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 85-97.

¹⁴⁹ C. H. Hassal en *Antibiotics*, Ed. F. E. Hahn, Springer, Berlin (Alemania), **1983**, Vol. VI, 1-11.

¹⁵⁰ M. Horiguchi, M. Kandatsu, *Nature* **1959**, *184*, 901-902.

¹⁵¹ a) D. F. Wiemer, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 16609-16644; b) O. I. Kolodiazny, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3295-3340.

¹⁵² S. Sobhani, Z. Tashrifi, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 1429-1439.

¹⁵³ a) B. V. S. Reddy, A. S. Krishna, A. V. Ganesh, G. G. K. S. N. Kumar, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 1359-1362; b) S. A. Dake, D. S. Raut, D. R. Kharat, R. S. Mhaske, S. U. Deshmukh, R. P. Pawar, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2527-2532; c) P. M. Mumford, G. J. Tarver, M. Shipman, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3573-3575.

¹⁵⁴ R. Gancarz, J. S. Wieczorek, *Synthesis* **1977**, 625.

¹⁵⁵ D. Seyferth, R. S. Marmor, P. Hilbert, *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 1379-1386.

Parte II

fosfonoacetatos sustituidos¹⁵⁶ o alquilación de precursores electrofílicos como las bases de Schiff,¹⁵⁷ entre otros.¹⁵⁸

Teniendo en cuenta sus diferentes y atractivas aplicaciones, el desarrollo de rutas sintéticas estereoselectivas para la preparación de aminofosfonatos enantiopuros constituye un tema de investigación enormemente atractivo,¹⁵⁹ pudiendo emplear para ello productos de partida^{158b} o auxiliares¹⁶⁰ quirales o catalizadores asimétricos.¹⁶¹ Otra forma de obtener este tipo de compuestos en forma ópticamente activa es a través de resoluciones de mezclas racémicas. Para ello, se pueden contemplar tres diferentes alternativas: la cristalización selectiva de mezclas de sales diastereoméricas,¹⁶² la separación de enantiómeros mediante HPLC a escala preparativa con columnas de relleno quiral¹⁶³ o los procesos biocatalíticos, los cuales serán objeto de estudio en este trabajo.

Dadas las múltiples aplicaciones que ofrecen este tipo de compuestos tanto a nivel teórico como práctico, en el tercer capítulo se estudiarán dos aproximaciones diferentes para la resolución de una familia de β -aminoésteres y se dará aplicación práctica a uno de ellos, llevando a cabo la síntesis del fármaco (S)-Dapoxetina. Por otro lado, en los capítulos 4 y 5 se optimizarán las condiciones para la preparación estereoselectiva de aminoésteres y aminofosfonatos de naturaleza cíclica, respectivamente, a través de procesos de alcoxicarbonilación catalizados por lipasas.

¹⁵⁶ J. Barycki, P. Mastalers, *Tetrahedron Lett.* **1970**, *11*, 3147-3150.

¹⁵⁷ a) K. Manabe, S. Kobayashi, *Chem. Commun.* **2000**, 669-670; b) S. Chanderasekhar, S. J. Prakash, V. Jagadeshwar, C. Narsihmulu, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5561-5563.

¹⁵⁸ a) W. Han, A. R. Ofial, *Chem. Commun.* **2009**, 6023-6025; b) B. Das, C. R. Reddy, S. Nagendra, M. Lingaiah, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 3496-3498; c) S. M. Agawane, J. M. Nagakar, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 3499-3504.

¹⁵⁹ M. Ordóñez, H. Rojas-Cabrera, C. Cativiela, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 17-49.

¹⁶⁰ C. Déjugnat, G. Etemad-Moghadam, I. Rico-Lattes, *Chem. Commun.* **2003**, 1858-1859.

¹⁶¹ a) B. R. Sculimbrene, A. J. Morgan, S. J. Miller, *Chem. Commun.* **2003**, 1781-1785; b) T. Akiyama, H. Morita, J. Itoh, K. Fuchibe, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2583-2585; c) F. Fini, G. Micheletti, L. Bernardi, D. Pettersen, M. Fochi, A. Ricci, *Chem. Commun.* **2008**, 4345-4347; d) D. Uruguchi, T. Ito, T. Ooi, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3836-3837.

¹⁶² J. Wagner, R. A. Lerner, C. F. Barbas, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 901-916.

¹⁶³ a) Y. P. Auberson, P. Acklin, S. Bischoff, R. Moretti, S. Ofner, M. Schmutz, S. Veenstra, *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 249-254; b) M. Lämmerhofer, D. Hebenstreit, E. Gavioli, W. Lindner, A. Mucha, P. Kafarski, P. Wiczorek, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2557-2565.

CAPÍTULO 3

***Síntesis estereoselectiva de β -aminoácidos
mediante rutas quimioenzimáticas.***

***Aplicación en la síntesis de la
(S)-Dapoxetina***

ANTECEDENTES

La importancia de los β -aminoácidos ópticamente activos, así como la de sus derivados de naturaleza éster o amida, reside en sus múltiples aplicaciones tanto en química sintética, donde pueden actuar como precursores de auxiliares quirales y ligandos, como en química médica, sirviendo como productos de partida en el sector industrial farmacéutico.

Sin embargo, a pesar de estar presentes en la estructura de un gran número de productos naturales, su presencia en la naturaleza no es tan frecuente como la de los α -aminoácidos. Así, a lo largo de la historia se han descrito multitud de procedimientos para su síntesis, prestando especial atención a las metodologías asimétricas, bien empleando catalizadores o auxiliares quirales, o haciendo uso del enorme potencial de la Biocatálisis.

Por otro lado, y como es bien sabido, la preparación estereoselectiva de compuestos con aplicaciones terapéuticas es de extrema importancia debido a las diferentes propiedades farmacológicas y fisiológicas que normalmente presentan sus isómeros. En este sentido, se han desarrollado numerosos métodos, tanto biocatalíticos como no enzimáticos, con el objetivo de preparar productos farmacéuticos de forma asimétrica, bien a escala de laboratorio o industrial.

II.3.1.1. β -AMINOÁCIDOS Y SUS DERIVADOS

Los β -aminoácidos difieren estructuralmente de sus análogos α en la posición del grupo amino en la molécula, ya que en el caso de los primeros, éste se encuentra en una posición un carbono más alejada del grupo carboxilo (Figura 3-1).¹⁶⁴

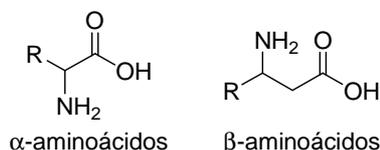


Figura 3-1. Estructura de los α - y los β -aminoácidos

II.3.1.1.1. IMPORTANCIA Y APLICACIONES

Los péptidos existentes en la naturaleza, basados en aminoácidos proteinogénicos, presentan numerosas limitaciones en cuanto a sus aplicaciones terapéuticas debido a su baja estabilidad, al ser rápidamente metabolizados en el cuerpo. Sin embargo, los enzimas proteolíticos de los mamíferos no son capaces de hidrolizar los enlaces peptídicos formados entre β -aminoácidos,¹⁶⁵ lo que confiere a estos compuestos unas propiedades biológicas y farmacológicas únicas, y una enorme aplicación como unidades estructurales (“building blocks”) para la síntesis de β -péptidos, fármacos¹⁶⁶ y productos naturales. Por ejemplo, se puede destacar la presencia de la estructura del ácido 3-amino-3-fenilpropiónico en un agente anticancerígeno como es el Taxol¹⁶⁷ o su importancia como precursor de moléculas biológicamente activas como el Maraviroc (UK-427, 857), un antagonista del receptor CCR-5 con aplicaciones en el tratamiento del SIDA (Figura 3-2).¹⁶⁸ Además, se ha encontrado que en su

¹⁶⁴ N. Sewald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5794-5795.

¹⁶⁵ D. Seebach, A. K. Beck, D. J. Bierbaum, *Chem. Biodiversity* **2004**, *1*, 1111-1239.

¹⁶⁶ D. L. Steer, R. A. Lew, P. Perlmutter, A. I. Smith, M. I. Aguilar, *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 811-822.

¹⁶⁷ M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325-2327.

¹⁶⁸ a) S. J. Haycock-Lewandowski, A. Wilder, J. Ahman, *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 1094-1103; b) J. Ahman, M. Birch, S. J. Haycock-Lewandowski, J. Long, A. Wilder, *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 1104-1113.

forma libre poseen también actividad neurológica y actúan como antagonistas de receptores e inhibidores enzimáticos.¹⁶⁹

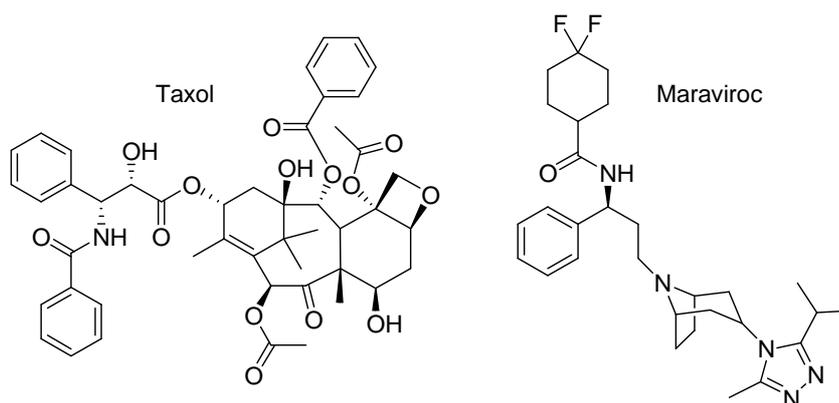


Figura 3-2. Estructura del Taxol y del Maraviroc

Debido a que su presencia en la naturaleza es baja, ha sido mucha la atención prestada a la preparación de este tipo de compuestos. Así, mientras que los aminoácidos proteinogénicos se obtienen de una forma sencilla aplicando sistemas enzimáticos presentes en la naturaleza, la preparación de sus análogos no naturales (α o β) se basa en procesos de síntesis asimétrica.

II.3.1.1.2. PREPARACIÓN ENANTIOSELECTIVA DE β -AMINOÉSTERES

La importancia de estos compuestos queda reflejada en la intensa actividad investigadora desarrollada en las últimas décadas en el campo de los β -aminoácidos y sus derivados. Así, se ha descrito la obtención de β -aminoácidos con una elevada pureza enantiomérica a través de muy diversas metodologías, como la reacción de homologación de Arndt-Eistert,¹⁷⁰ empleando catálisis básica con una amina quiral,¹⁷¹ procesos de hidrogenación asimétrica catalítica,¹⁷² o a través de métodos

¹⁶⁹ R. L. Wolin, A. Santillán Jr., T. Barclay, L. Tang, H. Venkatesan, S. Wilson, D. H. Lee, T. W. Lovenberg, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4493-4509.

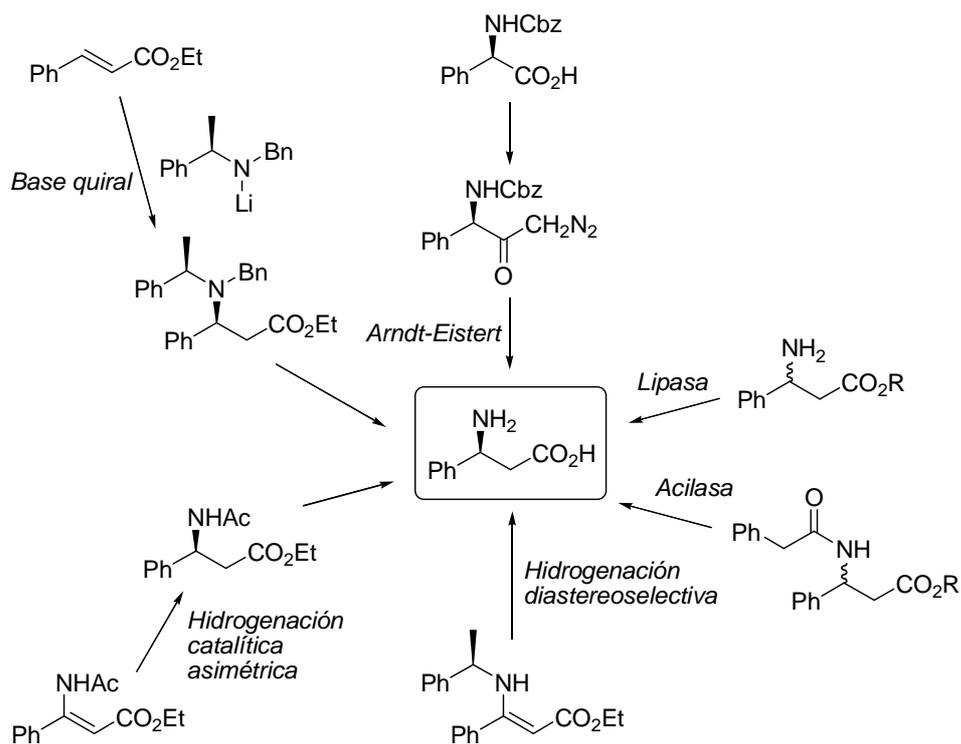
¹⁷⁰ D. Seebach, M. Overhand, F. N. M. Kühnle, B. Martinoni, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 913-941.

¹⁷¹ S. G. Davies, O. Ichihara, *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, *2*, 183-186.

¹⁷² J. I. Grayson, J. Roos, S. Osswald, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 1201-1206.

Antecedentes

enzimáticos.¹⁷³ En el esquema 3-1 se encuentran recogidas algunas rutas seleccionadas para la síntesis de la (S)- β -fenilalanina, el β -aminoácido aromático de mayor simplicidad.



Esquema 3-1. Resumen de rutas alternativas para la síntesis de la (S)- β -fenilalanina

II.3.1.1.2.1. Síntesis Química Asimétrica

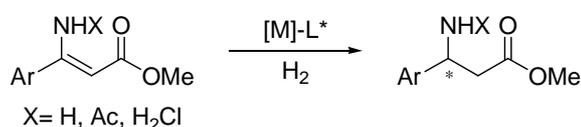
A pesar de la variedad de rutas existentes para la preparación estereoselectiva de β -aminoésteres, por su eficiencia y su economía atómica, la hidrogenación catalítica asimétrica ha sido la más comúnmente utilizada, pudiéndose aplicar bien a enaminas^{172,174} o a ésteres de oxima.¹⁷²

En el primero de los casos, encontrándose el grupo amino libre,^{174a} acetilado¹⁷² o en forma de clorhidrato,^{174b} la hidrogenación se lleva a cabo

¹⁷³ A. Liljeblad, L. T. Kanerva, *Tetrahedron* **2006**, 62, 5831-5854.

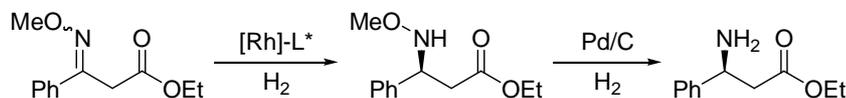
¹⁷⁴ a) Y. Hsiao, N. R. Rivera, T. Rosner, S. W. Krska, E. Njolito, F. Wang, Y. Sun, J. D. Armstrong, E. J. J. Grabowski, R. D. Tillyer, F. Spindler, C. Malan, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 9918-9919; b) G. Hou, W. Li, M. Ma, X. Zhang, X. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 12844-12846.

en presencia de un metal de transición (Rh o Ir) coordinado a diferentes ligandos orgánicos asimétricos (L*), generalmente derivados de fósforo, que son los que actúan como inductores quirales (Esquema 3-2). De esta forma se obtienen los correspondientes β-aminoésteres con altos rendimientos y excesos enantioméricos.



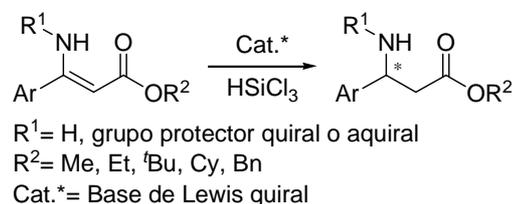
Esquema 3-2. Hidrogenación asimétrica de enaminas en presencia de un metal de transición (M) unido a un ligando quiral (L*)

La formación de derivados de β-aminoácidos mediante reducción de éteres de oxima transcurre de un modo similar,¹⁷² siendo necesaria una segunda hidrogenación, esta vez catalizada por paladio soportado sobre carbón, para romper el enlace O-N (Esquema 3-3).



Esquema 3-3. Hidrogenación asimétrica de un éter de oxima catalizada por un complejo de rodio quiral (L* = Josiphos PPF-PtBu₂) y posterior ruptura del enlace O-N

Recientemente se ha descrito una reducción alternativa de enaminas aprovechando la especial nucleofilia del hidruro en la molécula de triclorosilano.¹⁷⁵ En estos casos, son bases de Lewis de diferente naturaleza las que actúan como fuente de quiralidad (Esquema 3-4).



Esquema 3-4. Reducción estereoselectiva de enaminas con triclorosilano catalizada por bases de Lewis quirales

¹⁷⁵ a) A. Weickgenannt, M. Oestreich, *ChemCatChem* **2011**, 3, 1527-1529; b) X. Wu, Y. Li, C. Wang, L. Zhou, X. Lu, J. Sun, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 2846-2848; c) S. Guizzetti, M. Benaglia, M. Bonsignore, L. Raimondi, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 739-743.

Antecedentes

Finalmente, Reyes-Rangel y colaboradores han descrito una síntesis estereoselectiva de β -aminoácidos empleando como auxiliares quirales dos hexahidrobencoxazolidinonas enantiómeras (Figura 3-3), demostrando la posibilidad de obtener los productos con la configuración deseada en función del auxiliar empleado.¹⁷⁶

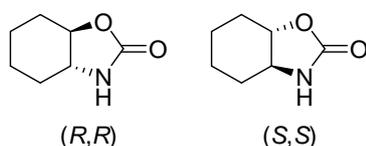


Figura 3-3. Estructura de las hexahidrobencoxazolidinonas de configuraciones opuestas

Sin embargo, muchos de estos procedimientos resultan tediosos y conducen a productos con un grado de enantioselectividad insuficiente para fines prácticos. Así, como alternativa a la catálisis asimétrica, se pueden emplear otras metodologías para la obtención de β -aminoésteres enantioméricamente puros basadas en la Biocatálisis.¹⁷³

II.3.1.1.2.2. Procesos Enzimáticos

Debido a la tendencia existente hacia el desarrollo de rutas de síntesis más sencillas y respetuosas con el medio ambiente, es posible encontrar en la bibliografía multitud de ejemplos donde se describe la síntesis asimétrica quimioenzimática de β -aminoésteres, ya sean cíclicos o acíclicos, aunque en esta revisión de antecedentes nos centraremos en aquellos que poseen la estructura 3-amino-3-arilpropionato (Figura 3-4), por ser los compuestos que guardan una relación más estrecha con los estudiados en este capítulo. La bifuncionalidad que poseen estos compuestos debido a sus grupos amino y éster hace que sean compuestos muy versátiles, permitiendo la modificación de sus grupos funcionales de diversas maneras.

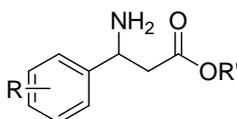


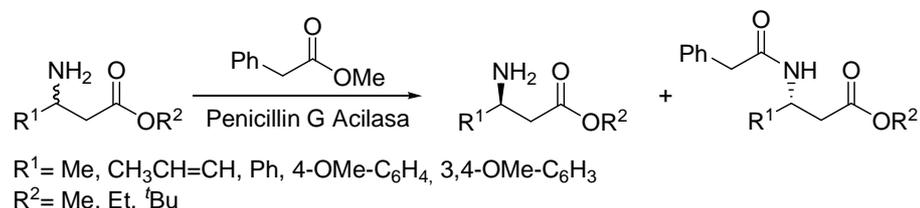
Figura 3-4. Estructura de 3-amino-3-arilpropionatos objeto de estudio en este capítulo

¹⁷⁶ G. Reyes-Rangel, E. Jiménez-González, J. L. Olivares-Romero, E. Juaristi, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, 19, 2839-2849.

Las principales rutas quimioenzimáticas para la obtención de β -aminoácidos con elevada pureza óptica están basados en resoluciones cinéticas de β -aminoácidos racémicos o alguno de sus derivados. Pero también se conocen procesos de homologación de α -aminoácidos con aminomutatas, adiciones de Michael o aminaciones reductivas de cetonas con β -aminotransferasas.¹⁷³

II.3.1.1.2.2.1. Resoluciones mediante acilación del grupo amino

Con el fin de llevar a cabo la resolución de una serie de β -aminoésteres de interés, se ha descrito un proceso de acilación enantioselectiva con fenilacetato de metilo catalizado por la Penicillin G acilasa (ChiroCLETTM-EC).¹⁷⁷ Así, tras una optimización del método, se han logrado aislar los β -aminoésteres de configuración S con elevadas purzas enantioméricas (Esquema 3-5).



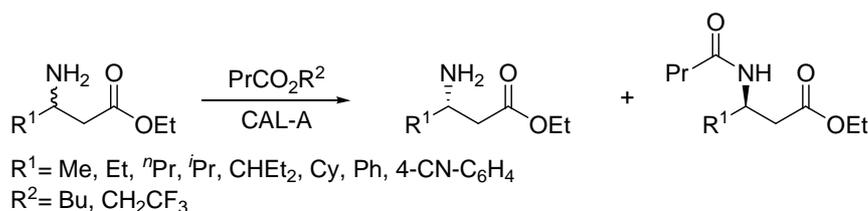
Esquema 3-5. Resolución cinética de β -aminoésteres mediante fenilacetilación mediada por Penicillin G acilasa

Posteriormente, Kanerva y colaboradores describieron la síntesis enantioselectiva de diferentes β -aminoésteres, tanto alifáticos como aromáticos, mediante un proceso de *N*-acilación con butanoato de butilo o de 2,2,2-trifluoroetilo catalizado por la lipasa de *Candida antarctica* de tipo A (CAL-A),¹⁷⁸ obteniendo buenas selectividades en todos los casos (Esquema 3-6).

¹⁷⁷ D. Roche, K. Prasad, O. Repic, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 3665-3668.

¹⁷⁸ a) S. Gedey, A. Liljeblad, L. Lázár, F. Fülöp, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 105-110; b) M. Solymár, L. T. Kanerva, F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1893-1897.

Antecedentes

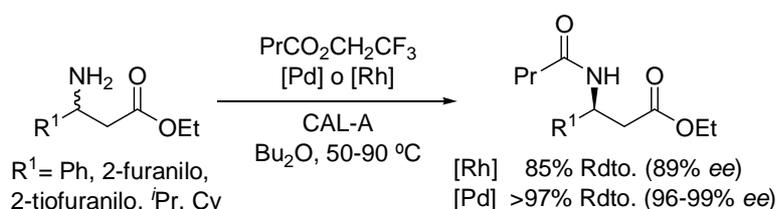


Esquema 3-6. Resolución de β -aminoésteres mediante acilación enantioselectiva catalizada por la CAL-A

Cabe destacar que, aunque los biocatalizadores empleados en los dos últimos trabajos referenciados presentan enantiopreferencias contrarias, las configuraciones *R* o *S* de los productos finales de las resoluciones enzimáticas dependerá de la prioridad del resto alquilo o arilo respecto al resto de sustituyentes unidos al carbono de la posición 3, según las reglas de Cahn-Ingold-Prelog, como ocurrirá también en algunos de los ejemplos que se mostrarán más adelante.

Más recientemente, el grupo del profesor Bäckvall ha descrito una resolución cinética dinámica (DKR) catalizada por la CAL-A del 3-amino-3-fenilpropanoato de etilo,¹⁷⁹ posteriormente extendida a otros sustratos con diferentes restos aromáticos y alifáticos en la posición 3. Para posibilitar la racemización del sustrato de partida, catalizada bien por un complejo de rutenio derivado del catalizador de Shvo (catálisis homogénea)^{179a} o por un nanocatalizador de paladio (catálisis heterogénea)^{179b} son necesarias temperaturas relativamente altas a las que el biocatalizador sufre una desactivación. Sin embargo, este inconveniente es resuelto eficazmente soportando la CAL-A sobre espuma mesocelular funcionalizada en presencia de sacarosa, lo que condujo a la obtención de los correspondientes amidoésteres de configuración *S* con elevados excesos enantioméricos y rendimientos (Esquema 3-7).

¹⁷⁹ a) M. Shakeri, K. Engström, A. G. Sandström, J.-E. Bäckvall, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 534-538; b) K. Engström, M. Shakeri, J.-E. Bäckvall, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 1827-1830.

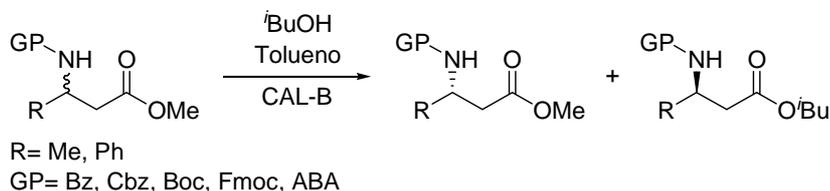


Esquema 3-7. DKR de β -aminoésteres mediante la combinación de la CAL-A soportada sobre un material mesoporoso y un catalizador metálico de paladio o rutenio para la racemización del sustrato remanente

II.3.1.1.2.2. Resoluciones mediante transesterificación o hidrólisis del grupo éster

La electrofilia del grupo carbonilo de los aminoésteres permite acometer su resolución enzimática haciéndolo reaccionar con diferentes nucleófilos en presencia de un biocatalizador. Por ejemplo, el empleo de alcoholes da lugar a reacciones de transesterificación, mientras que la presencia de agua conduce a procesos de hidrólisis.

Así, Flores-Sánchez y colaboradores han descrito la resolución de β -aminoésteres de metilo con su función amino protegida, mediante un proceso de transesterificación enantioespecífica con isobutanol catalizado por la CAL-B (Esquema 3-8).¹⁸⁰ A pesar de tener el centro estereogénico relativamente lejos del centro reactivo, en ambos casos se obtuvieron productos con excelentes enantiopurezas.



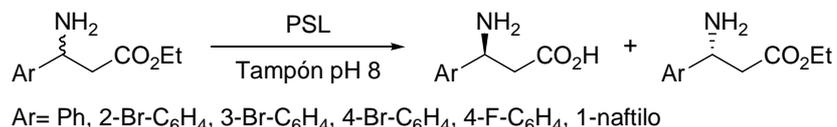
Esquema 3-8. Resolución cinética de aminoésteres protegidos mediante transesterificación con isobutanol catalizada por la CAL-B

En la bibliografía es posible encontrar procesos de hidrólisis enzimática empleando diferentes biocatalizadores (microorganismos o enzimas inmovilizados) y medios (acuosos, orgánicos, bifásicos, etc). A continuación se muestran ejemplos seleccionados de todos ellos.

¹⁸⁰ P. Flores-Sánchez, J. Escalante, E. Castillo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 629-634.

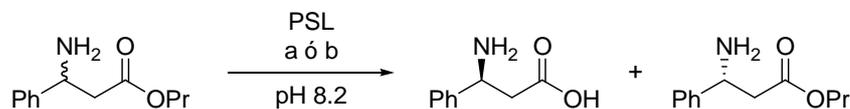
Antecedentes

El primer ejemplo descrito sobre la resolución de β -aminoésteres aromáticos mediante procesos hidrólisis usando una lipasa disponible comercialmente, sin necesidad de proteger el grupo amino, tiene lugar empleando una disolución tampón de pH 8 como agente hidrolítico y disolvente (Esquema 3-9).¹⁸¹ Además, se ha demostrado que el enzima empleado, la lipasa de *Pseudomonas cepacia*, hidroliza preferentemente el enantiómero S, teniendo el pH un efecto muy pronunciado en la selectividad del proceso.



Esquema 3-9. Resolución cinética de β -aminoésteres aromáticos mediante hidrólisis catalizada por la PSL en una disolución tampón de pH 8

Posteriormente se llevaron a cabo, por primera vez y de manera exitosa, reacciones de hidrólisis enzimática enantioselectivas tanto de α - como de β -aminoácidos en miniemulsiones que actúan como eficientes “nanoreactores” (Esquema 3-10).¹⁸² La eficacia, medida como el tiempo necesario para alcanzar una conversión próxima al 50%, se compara entre un proceso llevado a cabo en un medio bifásico de agua y TBME (a) y en una emulsión de agua, surfactante y hexadecano formada mediante ultrasonidos (b). Así, se encuentra que los procesos tienen lugar mucho más rápido cuando se emplean las segundas condiciones, permitiendo además reducir la carga de biocatalizador.



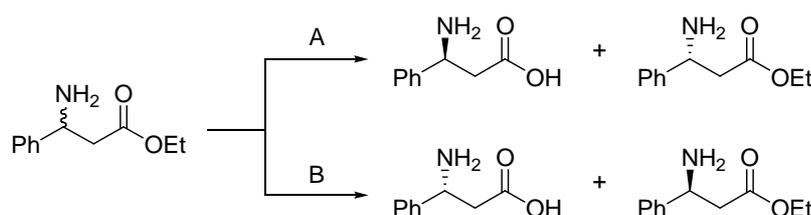
Esquema 3-10. Resolución cinética del éster propílico de la β -fenilalanina mediante hidrólisis catalizada por la PSL en: (a) un sistema bifásico de H₂O/TBME 1:1 en 15 h; (b) una miniemulsión de H₂O/surfactante/hexadecano 98:1:1 en 6 h

¹⁸¹ S. J. Faulconbridge, K. E. Holt, L. G. Sevillano, C. J. Lock, P. D. Tiffin, N. Tremayne, S. Winter, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2679-2681.

¹⁸² A. Gröger, O. May, H. Hüsken, S. Georgeon, K. Drauz, K. Landfester, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1645-1648.

Unas condiciones similares a las recogidas en el esquema 3-9.a fueron posteriormente escaladas con total éxito a 100 Kg (planta piloto) o 430 Kg (planta comercial) con fines industriales.¹⁷²

En 2006 se describió la producción microbiana del éster etílico de la β-fenilalanina mediante una hidrólisis estereoselectiva de dicho éster racémico,¹⁸³ obteniendo ambos enantiómeros mediante el empleo de microorganismos con enantioselectividad opuesta (Esquema 3-11). Así, *Sphingobacterium* sp. 238C5 es capaz de hidrolizar el enantiómero S del éster, mientras que *Arthrobacter* sp. 219D2 actúa de un modo complementario sobre el isómero R.

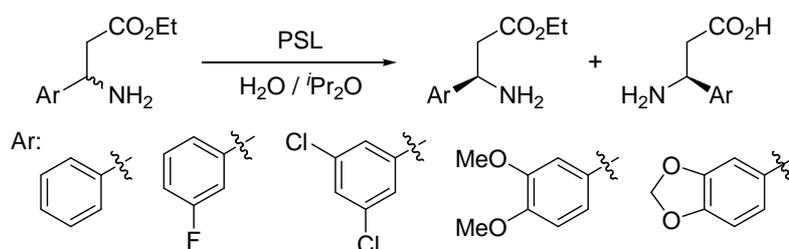


Esquema 3-11. Resolución cinética del éster etílico de la β-fenilalanina mediante hidrólisis microbiana catalizada por *Sphingobacterium* sp. 238C5 (A) o *Arthrobacter* sp. 219D2 (B)

En 2008, Tasnàdi y colaboradores describieron un método simple y eficiente para la síntesis de β-aminoácidos aromáticos de interés farmacológico con diferentes grupos arilo.^{141c} Así, mediante la hidrólisis de los correspondientes β-aminoésteres de etilo racémicos en un disolvente orgánico, empleando equivalentes de agua como agente hidrolítico y optimizando los parámetros de reacción (tipo y cantidad de enzima, temperatura, cantidad de agua y disolvente orgánico), se observó que la lipasa de *Pseudomonas cepacia* es capaz de hidrolizar con excelente selectividad el enantiómero S de los β-aminoésteres, logrando obtener de forma prácticamente enantiopura, y con elevados rendimientos, los correspondientes (R)-aminoésteres y (S)-aminoácidos (Esquema 3-12).

¹⁸³ J. Ogawa, J. Mano, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 70, 663-669.

Antecedentes



Esquema 3-12. Condiciones óptimas para la resolución cinética de β-aminoésteres aromáticos mediante hidrólisis enzimática: 30 mg/mL PSL, iPr₂O (0.05 M), 0.5 eq. H₂O y 45 °C

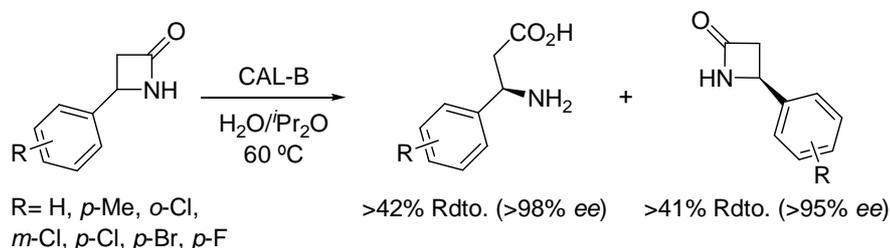
Aunque tradicionalmente se han venido empleando mezclas de disolventes orgánicos y agua como medios de reacción para las resoluciones cinéticas de aminoésteres mediante procesos de hidrólisis, el uso de disolventes orgánicos, particularmente cuando se emplean a gran escala, pueden provocar serios problemas ambientales. Por eso es necesario desarrollar nuevos medios de reacción más ecológicos y, además, capaces de mejorar la enantioselectividad de los procesos. Una posible solución a este problema son los líquidos iónicos (LIs), sales con bajos puntos de fusión (<100 °C) y sin presión de vapor, que actúan como disolventes idóneos para solubilizar compuestos polares sin inactivar los enzimas. Así, se ha demostrado que el líquido iónico [Bmim][BF₄] sirve como cosolvente en la resolución cinética de cuatro α- y β-aminoésteres racémicos mediante hidrólisis catalizada por enzimas, mejorando la enantioselectividad del proceso en comparación con los desarrollados en disolventes orgánicos convencionales o en disoluciones tampón.¹⁸⁴ Además, es posible obtener ambos enantiómeros, puesto que la proteasa Paparina y la lipasa CAL-B presentan una enantiopreferencia opuesta.

II.3.1.1.2.2.3. Otras transformaciones

Existen también otros modos de obtención de β-aminoésteres menos comunes, pero no por ello menos importantes. Uno de ellos es la apertura de β-lactamas 4-aryl-sustituidas mediante procesos de hidrólisis catalizados por lipasas. Así, se ha desarrollado un método simple y eficaz para la síntesis enzimática de β-aminoácidos sustituidos en la posición 3 con

¹⁸⁴ Y.-Y. Liu, W.-Y. Lou, M.-H. Zong, R. Xu, X. Hong, H. Wu, *Biocatal. Biotransf.* **2005**, *23*, 89-95.

grupos arilo mediante una apertura de anillo altamente enantioselectiva ($E > 200$) catalizada por la CAL-B (Esquema 3-13), tras la cual los (*R*)-aminoácidos formados y las (*S*)-lactamas remanentes se pueden separar con facilidad. Además, la apertura en medio ácido de estas lactamas da lugar al β -aminoácido de configuración contraria al formado en la hidrólisis enzimática inicial, permitiendo el acceso a ambos enantiómeros.¹⁸⁵



Esquema 3-13. Apertura enantioselectiva de β -lactamas catalizada por la CAL-B en i Pr₂O empleando 1 equivalente de H₂O

Recientemente, esta técnica ha sido extendida a otros medios de reacción, como son los fluidos supercríticos, los cuales permiten obtener los productos sin restos de disolvente tras la despresurización. Así, la lactama racémica 4-fenil-2-azetidina fue sometida a una apertura por ataque nucleofílico de agua catalizado por la CAL-B en dióxido de carbono supercrítico, obteniendo enantiopuros tanto el sustrato como el producto (>98% ee).¹⁸⁶

Otros biocatalizadores alternativos que pueden ser empleados para la síntesis de β -aminoésteres enantiopuros son las amonio liasas (enzimas que catalizan la adición reversible de amoníaco al ácido cinámico),¹⁸⁷ las aminomutasas (catalizan la interconversión de α - en β -aminoácidos)^{136b,187,188} y las transaminasas (catalizan la aminación reductiva de cetonas),¹⁸⁹ todas ellas permitiendo transformar potencialmente el sustrato en el producto con un rendimiento del 100%.

¹⁸⁵ E. Forró, T. Paál, G. Tasnádi, F. Fülöp, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 917-923.

¹⁸⁶ M. Utczás, E. Székely, G. Tasnádi, É. Monek, L. Vida, E. Forró, F. Fülöp, B. Simándi, *J. Supercrit. Fluids* **2011**, *55*, 1019-1022.

¹⁸⁷ N. J. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 234-240.

¹⁸⁸ B. J. V. Verkuil, W. Szymański, B. Wu, A. J. Minnaard, D. B. Janssen, J. G. de Vries, B. L. Feringa, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 901-903.

¹⁸⁹ H.-S. Bea, H.-J. Park, S.-H. Lee, H. Yun, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5894-5896.

Antecedentes

II.3.1.2. (S)-DAPOXETINA

La (S)-Dapoxetina [(S)-(+)-N,N-dimetil-1-fenil-3-(naftalen-1-iloxi)-propan-1-amina, **18**, Figura 3-5] es un potente inhibidor de la reabsorción de la serotonina utilizado para el tratamiento de una variedad de desórdenes tanto psiquiátricos como sexuales.¹⁹⁰ Por este motivo han aparecido en la bibliografía recientes investigaciones describiendo la preparación de este fármaco en su forma enantiopura, bien a través de procesos de síntesis química asimétrica o mediante métodos biocatalíticos.

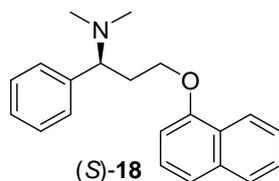


Figura 3-5. Estructura de la (S)-Dapoxetina

II.3.1.2.1. IMPORTANCIA Y APLICACIONES

Las dolencias relacionadas con el estrés han sufrido un importante y rápido crecimiento a lo largo de los años, debido al cada vez más acelerado ritmo de vida de la población. La depresión y la ansiedad, por ejemplo, son algunos de los desórdenes psiquiátricos que afectan a personas de cualquier género, edad o nacionalidad. Así, para su tratamiento, entre otros métodos, se emplean inhibidores selectivos de la reabsorción de la serotonina (Selective serotonin re-uptake inhibitors, SSRI),¹⁹¹ como pueden ser el Prozac¹⁹², el Paxil¹⁹³ o el Zoloft.¹⁹⁴

¹⁹⁰ Información general sobre la Dapoxetina: www.drugs.com y www.dapoxetine-online.biz.

¹⁹¹ a) S. H. Preskorn, R. Ross, C. Y. Stanga, Selective serotonin reuptake inhibitor, en *Antidepressants: past, present, and future*, Ed. S. H. Preskorn, R. Ross, C. Y. Stanga, J. P. Feighner, Springer-Verlag, Berlin (Alemania), **2004**, capítulo 3, 242-262; b) M. A. Katzman, *CNS Drug* **2009**, 23, 103-120.

¹⁹² D. T. Wong, K. W. Perry, F. P. Bymaster, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, 4, 764-774.

¹⁹³ I. M. Anderson, *J. Affective Disord.* **2000**, 58, 19-36.

¹⁹⁴ A. Cipriani, T. A. Furukawa, G. Salanti, J. R. Geddes, J. P. T. Higgins, R. Churchill, N. Watanabe, A. Nakagawa, I. M. Omori, H. McGuire, M. Tansella, C. Barbui, *Lancet* **2009**, 373, 746-758.

La (S)-Dapoxetina (**18**, Figura 3-5) es otro fármaco perteneciente a esta familia de SSRI con aplicaciones en el tratamiento de la depresión, la bulimia o la ansiedad. Además, recientemente, y tras numerosas pruebas y controles en más de 6000 pacientes, ha sido aceptado como el primer fármaco oral para el tratamiento de hombres entre 18 y 64 años con eyaculación precoz, un problema que afecta a alrededor del 25% de la población masculina y que suele ir acompañado de considerable ansiedad, frustración e impacto negativo tanto en los hombres afectados como en sus parejas, afectando considerablemente a su calidad de vida.¹⁹⁵ La Dapoxetina en su forma de clorhidrato es también un SSRI con un tiempo de vida corto, lo que reduce la acumulación del fármaco en el cuerpo y, por tanto, la probabilidad de reacciones adversas que éste pudiera causar.¹⁹⁶

II.3.1.2.2. SÍNTESIS ASIMÉTRICA

A pesar de que el enantiómero S de la Dapoxetina es 3.5 veces más potente que el R, son pocos los métodos descritos hasta la fecha para la síntesis enantioselectiva de este importante y potente fármaco. Entre ellos se pueden encontrar tanto aproximaciones químicas convencionales como quimioenzimáticas.

II.3.1.2.2.1. Métodos Químicos

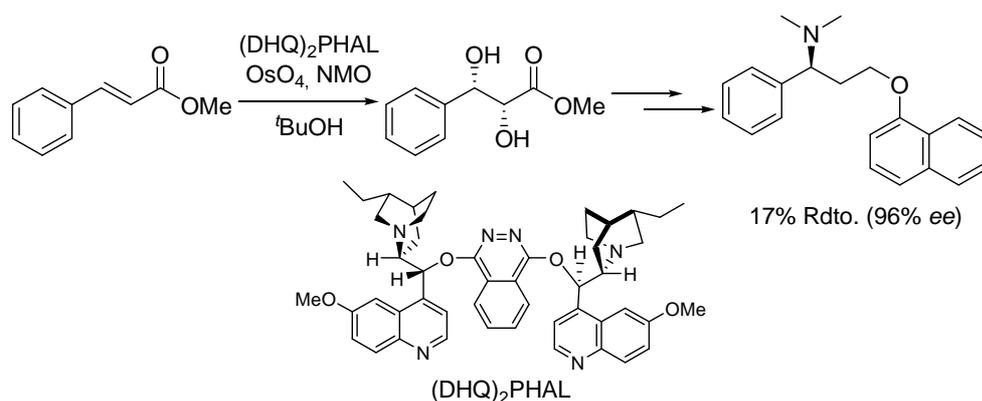
El primer método descrito para la síntesis total de la (S)-(+)-Dapoxetina parte del *trans*-cinamato de metilo y comprende 10 pasos. Para ello, inicialmente se lleva a cabo una dihidroxilación asimétrica de Sharpless sobre dicho éster empleando tetróxido de osmio y el ligando (DHQ)₂PHAL como fuente de inducción quiral (Esquema 3-14).¹⁹⁷

¹⁹⁵ a) S. M. Hoy, L. J. Scott, *Drugs* **2010**, *70*, 1433-1443; b) I. Moncada Iribarren, J. I. Martínez-Salamanca, *Therapy* **2010**, *7*, 691-702.

¹⁹⁶ K. Venkatesan, K. V. Srinivasan, *Arkivoc* **2008** (xvi), 302-310.

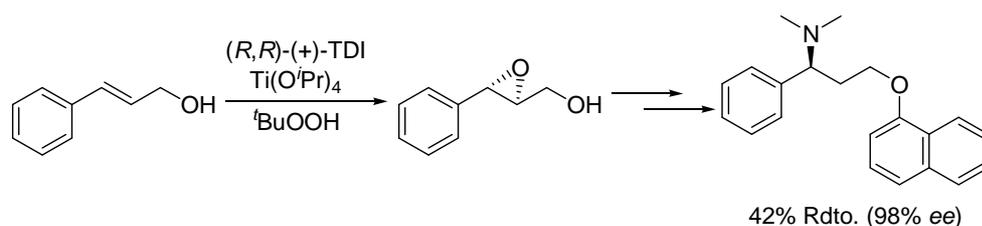
¹⁹⁷ S. A. Siddiqui, K. V. Srinivasan, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2099-2103.

Antecedentes



Esquema 3-14. Síntesis de la (*S*)-Dapoxetina partiendo de cinamato de metilo y basada en su dihidroxilación asimétrica de Sharpless

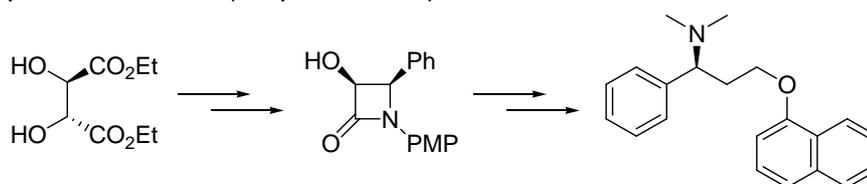
Una aproximación similar, de nuevo altamente selectiva, parte del alcohol *trans*-cinámico disponible comercialmente,¹⁹⁶ el cual se somete a un proceso de epoxidación de Sharpless empleando para ello un sistema catalítico compuesto por una mezcla de isopropóxido de titanio y un componente quiral, el (*R,R*)-(+)-tartrato de diisopropilo, e hidroperóxido de *tert*-butilo como agente dador de oxígeno (Esquema 3-15). En este caso, se obtiene la (*S*)-Dapoxetina con un rendimiento final del 42% y un exceso enantiomérico del 98%.



Esquema 3-15. Introducción de quiralidad mediante epoxidación asimétrica de Sharpless en la síntesis de la (*S*)-Dapoxetina partiendo de alcohol *trans*-cinámico

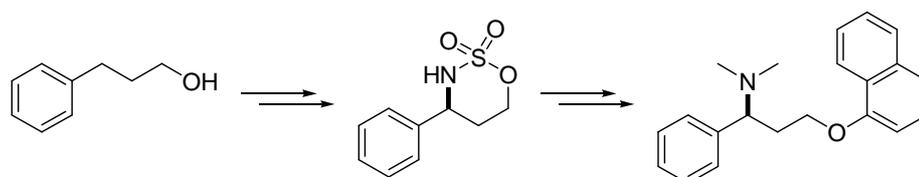
De nuevo con sólo un 17% de rendimiento, se ha publicado la síntesis del enantiómero *S* de la Dapoxetina, pero esta vez partiendo de *L*-tartrato de dietilo, con una quiralidad ya definida, en la que se llega a un intermedio en forma de β -lactama sustituida, la cual, tras un proceso de

apertura y una serie de transformaciones posteriores, da lugar al compuesto deseado (Esquema 3-16).¹⁹⁸



Esquema 3-16. Síntesis de la (S)-Dapoxetina partiendo de L-tartrato de dietilo

Finalmente, Kang y colaboradores han desarrollado una estrategia eficiente para la preparación de ambos enantiómeros de la Dapoxetina (33% y 34% de rendimiento global tras 5 pasos de reacción), empleando para ello 3-fenil-1-propanol como sustrato de partida.¹⁹⁹ La ruta sintética pasa a través de un sulfamato cíclico de 6 miembros que se prepara a través de una aminación asimétrica del enlace C-H de un sulfamato proquiral, catalizada por un complejo de rodio, $Rh_2(R\text{-nap})_4$ o $Rh_2(S\text{-nap})_4$. La síntesis continúa con una reacción de *N*-metilación, una sustitución nucleofílica con 1-naftol y otra metilación final, obteniendo así la (S)-(+)- o (R)-(-)-Dapoxetina, respectivamente (Esquema 3-17).



Esquema 3-17. Preparación estereoselectiva de la Dapoxetina a partir del 3-fenil-1-propanol, pudiendo acceder a ambos enantiómeros en función del catalizador empleado

II.3.1.2.2.2. Métodos Quimioenzimáticos

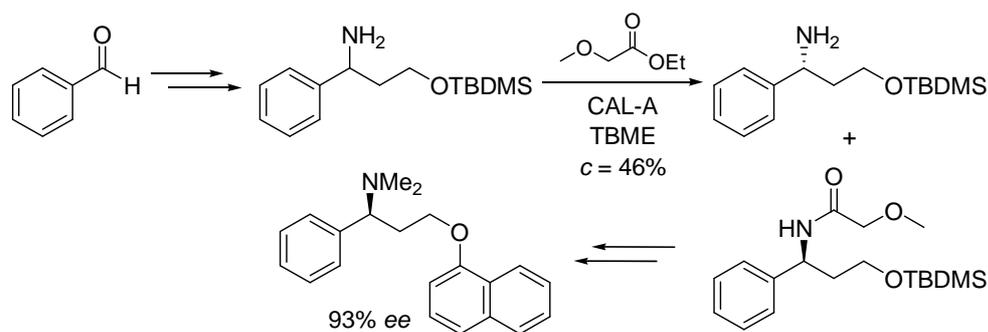
Como ya se ha mencionado, la Biocatálisis se considera una herramienta ideal para la preparación de compuestos enantioméricamente puros y ha sido ampliamente utilizada en la resolución de mezclas racémicas para la preparación de sustancias con interés farmacológico.^{4c}

¹⁹⁸ P. M. Chincholkar, A. S. Kale, V. K. Gumaste, A. R. A. S. Deshmukh, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2605-2609.

¹⁹⁹ S. Kang, H.-K. Lee, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 237-240.

Antecedentes

Un ejemplo de preparación de la (S)-Dapoxetina ha sido desarrollado en nuestro grupo de investigación a través de la resolución de 3-amino-3-fenilpropan-1-ol, para lo que fue necesaria la protección previa de su grupo hidroxilo como éter de silicio, una vez sintetizado el alcohol a partir de benzaldehído, ácido malónico y acetato de amonio.²⁰⁰ La lipasa de *Candida antarctica* de tipo A (CAL-A) catalizó la formación de la correspondiente amida, de configuración adecuada para actuar como precursor de la (S)-Dapoxetina, que se obtuvo finalmente con un 93% de exceso enantiomérico (Esquema 3-18).



Esquema 3-18. Síntesis de la (S)-Dapoxetina partiendo de benzaldehído, donde el paso estereoselectivo consiste en una acilación catalizada por la CAL-A del intermedio 1,3-aminoalcohol O-protegido

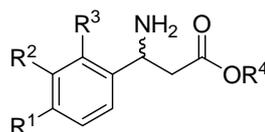
Una vez conocida su trascendencia y algunas de las metodologías existentes para su obtención, a lo largo del presente capítulo se describe el estudio y la optimización de un método enzimático para la producción de derivados de β -aminoácidos enantioméricamente puros pertenecientes a la familia de las β -fenilalaninas. Además, remarcando la importancia y el potencial de este procedimiento, uno de los compuestos se emplea como material de partida para la síntesis de la (S)-Dapoxetina.

²⁰⁰ O. Torre, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, 17, 860-866.

OBJETIVOS

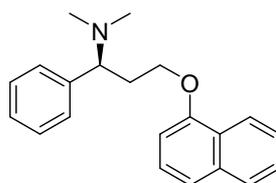
A lo largo de los antecedentes de este capítulo se ha mostrado la importancia de los β -aminoésteres debido a sus interesantes aplicaciones en química médica, pudiendo poseer actividad biológica por sí mismos, formando parte de péptidos de mayor tamaño o como valiosos precursores para la síntesis de productos farmacéuticos como la (S)-Dapoxetina. Por ello, los objetivos planteados en este apartado son:

1. Preparación química de una amplia familia de β -aminoácidos racémicos con diferentes patrones de sustitución en el anillo aromático, así como sus correspondientes ésteres de metilo.



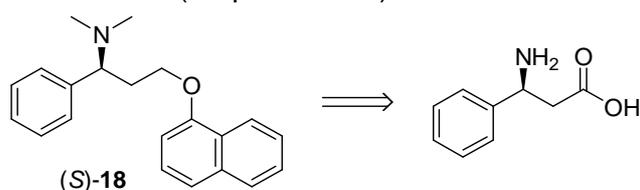
2. Estudio de procesos biocatalizados de acilación e hidrólisis para la resolución cinética de los β -aminoésteres y optimización de los diferentes parámetros que afectan a la catálisis enzimática.

3. Síntesis global de la (S)-Dapoxetina a partir de un precursor adecuado obtenido por métodos enzimáticos.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

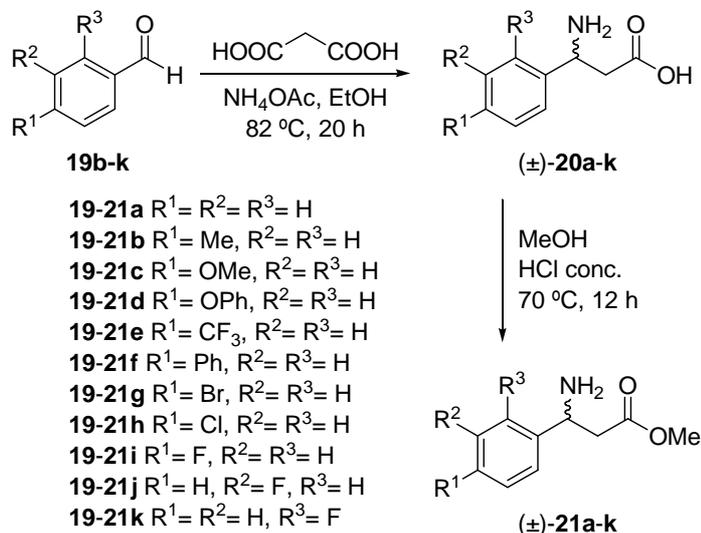
Una vez conocidas las posibles aplicaciones de los β -aminoésteres, así como la necesidad de desarrollar métodos que posibiliten su obtención de forma enantiopura, se decidió abordar la búsqueda de una ruta quimioenzimática adecuada que permitiera la síntesis enantioselectiva de una familia de β -aminoésteres aromáticos. Además, con el propósito de dar una aplicación a los compuestos obtenidos, se propuso la preparación de la (*S*)-Dapoxetina (**18**) a partir del precursor con estructura y configuración adecuadas (Esquema 3-19).



Esquema 3-19. Análisis retrosintético de la (*S*)-Dapoxetina. Posible síntesis partiendo del isómero *S* de la β -fenilalanina

II.3.3.1. SÍNTESIS DE β -AMINOÉSTERES RACÉMICOS Y SUS AMIDAS Y CARBAMATOS CORRESPONDIENTES

Siguiendo un procedimiento similar al descrito previamente por otros autores,^{141c,201} se procedió a la preparación de los β -aminoácidos racémicos **20b-k** partiendo de los correspondientes aldehídos **19b-k**, disponibles comercialmente (Esquema 3-20). Así, la reacción de los aldehídos con acetato de amonio y ácido malónico, empleando etanol como disolvente, permitió acceder a los aminoácidos **20b-k** tras 20 horas de reacción a reflujo y un proceso de purificación por recristalización de los sólidos blancos formados en mezclas de etanol y agua, con un rendimiento aislado comprendido entre el 40 y el 84% (Tabla 3-1). Cabe destacar que no se observó reacción cuando la naturaleza de R¹ tenía carácter electroatractor, como fue el caso de los grupos ciano y nitro.



Esquema 3-20. Síntesis química de los β -aminoácidos **20b-k** y los β -aminoésteres **21a-k** racémicos

²⁰¹ a) V. A. Soloshonok, N. A. Fokina, A. V. Rybakova, I. P. Shishkina, S. V. Galushko, A. E. Sorochinsky, V. P. Kukhar, M. V. Savchenko, V. K. Švedas, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, 6, 1601-1610; b) C. Y. K. Tan, D. F. Weaver, *Tetrahedron* **2002**, 58, 7449-7461; c) R. Jiang, H. Chen, S. Cheng, Y. Jin, Q. Wang, X. Sun, *Disi Junyi Daxue Xuebao* **2004**, 25, 688-690.

A continuación, los β -aminoácidos **20a-k** fueron sometidos a una esterificación de Fischer en metanol acidificado, obteniéndose los correspondientes β -aminoésteres (\pm)-**21a-k**, los cuales se purificaron mediante columna cromatográfica en gel de sílice. Estos compuestos se aislaron con rendimientos entre bajos y excelentes dependiendo del tipo y, fundamentalmente, de la posición del sustituyente presente en el anillo aromático (Tabla 3-1), siendo los derivados sustituidos en la posición *meta* y, especialmente *orto*, los que condujeron a procesos menos eficientes.

Tabla 3-1. Rendimientos aislados de los ácidos 3-amino-3-arylpropiónicos **20a-k** y ésteres de metilo **21a-k** racémicos

Entrada	R ¹	R ²	R ³	20a-k (%)	21a-k (%)
1	H	H	H	-- ^a	98
2	Me	H	H	54	95
3	OMe	H	H	70	75
4	OPh	H	H	40	78
5	CF ₃	H	H	44	79
6	Ph	H	H	84	60
7	Br	H	H	82	66
8	Cl	H	H	65	93
9	F	H	H	62	82
10	H	F	H	56	34
11	H	H	F	57	24

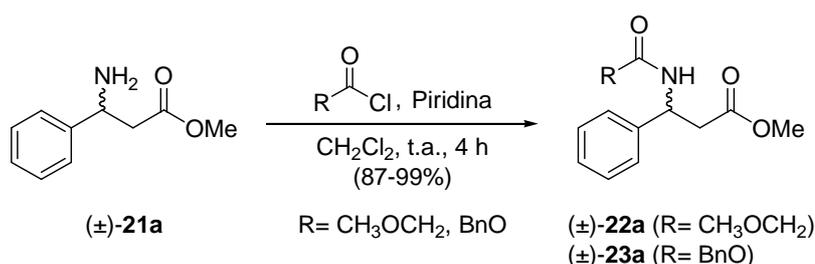
^a El compuesto **20a** está disponible comercialmente y su síntesis no se ha llevado a cabo, aunque está descrita en la bibliografía

Posteriormente, se intentaron desarrollar métodos analíticos para la separación de los enantiómeros de estos compuestos, si bien su elevado punto de ebullición o su elevada polaridad impidieron el correcto análisis mediante las técnicas de cromatografía gaseosa o cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), respectivamente. Por lo tanto, se llevó a cabo la preparación de los derivados protegidos en su grupo amino en forma de amida o carbamato, procesos de derivatización frecuentemente utilizados para el análisis de compuestos de alta polaridad o de difícil separación.

Resultados y Discusión

Como punto de partida para el estudio de resolución enzimática de los β -aminoésteres anteriormente presentados, se empleó **21a** como sustrato modelo, ya que su estructura se encuentra presente en toda la familia de aminoésteres y, además, es un adecuado precursor sintético de la (S)-Dapoxetina.

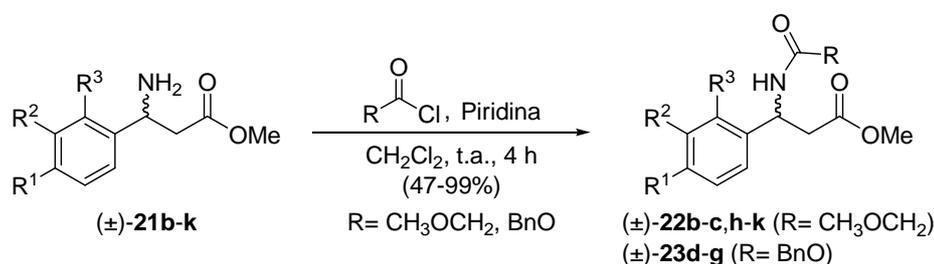
Así, puesto que se pretendía abordar su resolución mediante un proceso de acilación enzimática con metoxiacetato de etilo, agente de acilación frecuentemente utilizado en Biocatálisis para la resolución de aminas,^{55,56,200} se preparó el que sería el producto final de la reacción, es decir, el derivado metoxiacetilado (\pm)-**22a**. Además se decidió preparar el carbamato de bencilo (\pm)-**23a** que permitiera, tras una derivatización del aminoéster remanente en los procesos enzimáticos, la medida de sus excesos enantioméricos durante el transcurso de las biotransformaciones. Para ello, se hizo reaccionar el β -aminoéster (\pm)-**21a** con cloruro de metoxiacetilo (R= CH₃OCH₂) o cloroformiato de bencilo (R= BnO) en presencia de piridina y diclorometano seco (Esquema 3-21), obteniéndose tras purificación mediante columna cromatográfica en gel de sílice, la correspondiente amida (\pm)-**22a** y el carbamato (\pm)-**23a** con muy buenos rendimientos.



Esquema 3-21. Síntesis química de la metoxiacetamida **22a** y el carbamato de bencilo **23a** racémicos

Como se verá posteriormente, la resolución enzimática del resto de β -aminoésteres se llevó a cabo mediante procesos de hidrólisis catalizados por lipasas. Por tanto, en este caso sólo fue necesario sintetizar un derivado protegido en su grupo amino de cada uno de los sustratos. El criterio seguido para su elección fue, simplemente, la resolución obtenida en la separación de sus enantiómeros mediante la técnica de HPLC. Por

tanto, siguiendo un procedimiento similar al descrito anteriormente, se hicieron reaccionar los β -aminoésteres restantes (\pm)-**21b-k** con los correspondientes cloruros (Esquema 3-22), obteniéndose, de nuevo tras purificación mediante columna cromatográfica, las metoxiacetamidas (\pm)-**22b-c,h-k** y los carbamatos de bencilo (\pm)-**23d-g** con rendimientos entre moderados y excelentes.



Esquema 3-22. Síntesis química de las metoxiacetamidas **22b-c,h-k** y los carbamatos de bencilo **23d-g** racémicos

Con el fin de establecer un método robusto que permita la separación analítica de los dos enantiómeros de los compuestos (\pm)-**22b-c,h-k** y (\pm)-**23d-g**, y con ella el cálculo de los excesos enantioméricos de los productos de las reacciones enzimáticas, así como de los sustratos remanentes una vez derivatizados, se han analizado mediante HPLC en fase normal con columnas de relleno quiral. Las condiciones concretas de separación de cada uno y sus tiempos de retención, se encuentran recogidos en la parte experimental de este capítulo (Tabla 3-7 en página 228).

II.3.3.2. RESOLUCIÓN CINÉTICA DE LOS β -AMINOÉSTERES CATALIZADA POR LIPASAS

Una vez concluido el proceso de síntesis y separación analítica de enantiómeros, se emprendió el estudio de la resolución cinética enzimática de los β -aminoésteres. Primeramente se optimizaron las condiciones de resolución del sustrato modelo (\pm)-**21a** para, a continuación, aplicarlas a la preparación estereoselectiva de la serie completa de aminoésteres (\pm)-**21b-k**.

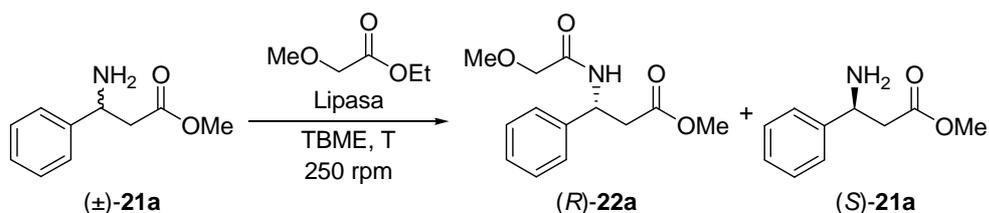
II.3.3.2.1. RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA POR ACILACIÓN

Como punto de partida, se planteó una resolución cinética del 3-amino-3-fenilpropanoato de metilo (**21a**) mediante acilación de su grupo amino empleando acetato de etilo como agente donador de acilo, *tert*-butilmetil éter (TBME) como disolvente y la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B) como biocatalizador. Sin embargo, tras 48 h de reacción no se detectó formación de la amida. Este resultado concuerda con las necesidades, en cuanto a estructura del sustrato se refiere, requeridas por este enzima, a saber:¹²⁸

a) el sustituyente de tamaño medio debe tener un tamaño inferior al de un *n*-propilo para mantener su actividad catalítica y su selectividad, y

b) la presencia de átomos electronegativos en este mismo sustituyente perjudica aún más esta enantioselectividad.

Por otro lado, es bien conocido que el empleo de metoxiacetatos de alquilo como agentes acilantes origina un notable incremento de la actividad catalítica de las lipasas en reacciones de aminólisis en comparación con otros donores de acilo.^{55,56,80} Por tanto, se decidió probar la eficacia con uno de ellos, el metoxiacetato de etilo (MacOEt), manteniendo constantes el resto de variables (Esquema 3-23). Sorprendentemente, tras 27 h de reacción, se aisló la amida (*R*)-**22a** con un alto exceso enantiomérico, aunque la conversión fue moderada (Tabla 3-2, entrada 1). De esta forma, se demostró el potencial real de este tipo de agentes acilantes, permitiendo acceder a un mayor número de sustratos enantioenriquecidos que se ajusten peor a los requisitos iniciales, como ocurre con el sustrato **21a**.



Esquema 3-23. Resolución cinética de (±)-**21a** mediante acilación catalizada por lipasas

Entonces, con el objetivo de explorar el alcance de esta transformación, se decidió estudiar también el comportamiento catalítico de otras lipasas, como son la de *Candida antarctica* de tipo A (CAL-A) y la de *Pseudomonas cepacia* (PSL), en dicho proceso de acilación. Fueron estas, en concreto, las seleccionadas, por las menores limitaciones estéricas de los huecos de sus centros activos.^{53,202} Así, se llevaron a cabo los procesos en idénticas condiciones, salvo por el biocatalizador, observando que, mientras que en presencia de la CAL-A no se advertía formación de la amida (entrada 2), la PSL-C I (entrada 3), al igual que la CAL-B, conducía al producto con enantioselectividades altas, pero conversiones moderadas.

Tabla 3-2. Resolución cinética enzimática de (±)-21a a través de procesos de acilación con metoxiacetato de etilo catalizados por lipasas, tras 27 h de reacción a 250 rpm

Entrada	Lipasa ^a	Disolvente ^b	MacOEt (eq.)	T (°C)	ee _S (%) ^c	ee _P (%) ^c	c (%) ^d	E ^e
1	CAL-B	TBME	5	30	38	98	28	120
2	CAL-A	TBME	5	30	--	--	--	--
3	PSL-C I	TBME	5	30	32	98	25	90
4	CAL-B	TBME	5	45	37	97	28	92
5	PSL-C I	TBME	5	45	32	97	25	90
6	CAL-B	MacOEt	86	30	1	9	8	1

^a Relación 1:1 en peso respecto al sustrato de partida. ^b Concentración de sustrato 0.1 M. ^c Determinados por HPLC. ^d $c = ee_S / (ee_S + ee_P)$. ^e $E = \ln[(1-c) \times (1-ee_P)] / \ln[(1-c) \times (1+ee_P)]$

Con el propósito de acelerar su cinética, se aumentó a 45 °C la temperatura de los procesos catalizados por las lipasas que habían mostrado actividad. Sin embargo, se observó que, además de que en ninguno de los casos se logra aumentar el grado de conversión, en el caso de la CAL-B (entrada 4), la enantioselectividad del proceso se ve claramente disminuida, quedando inalterada en el caso de la PSL-C I (entrada 5). De nuevo con el mismo fin, se decidió emplear el propio metoxiacetato de etilo como disolvente de la reacción, empleando CAL-B como biocatalizador y llevando a cabo el proceso a 30 °C, condiciones que mejores resultados habían ofrecido hasta este momento (entrada 6), pero

²⁰² A. Tafi, A. van Almsick, F. Corelli, M. Crusco, K. E. Laumen, M. P. Schneider, M. Botta, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 3659-3665.

Resultados y Discusión

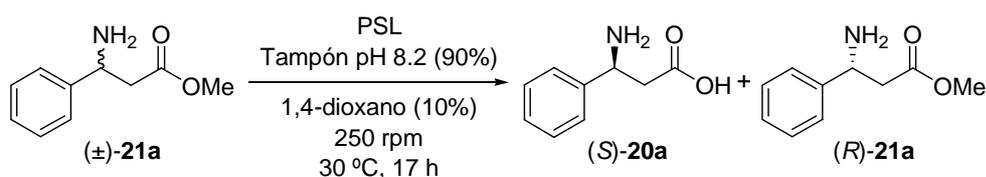
esto originó un pronunciado descenso en la velocidad de reacción y además el proceso transcurrió de modo no selectivo.

II.3.3.2.2. RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA POR HIDRÓLISIS

Teniendo en cuenta la bifuncionalidad de los aminoésteres y que los resultados obtenidos mediante acilación enzimática no eran del todo satisfactorios, se decidió cambiar el enfoque de la investigación hacia la resolución de los compuestos mediante la hidrólisis de sus funciones éster. Para ello, puesto que, como se ha visto en los antecedentes, la PSL había sido el biocatalizador más empleado a la hora de preparar β -aminoácidos ópticamente activos de estructura similar,^{141c,181,182} se seleccionó esta lipasa para comenzar con el estudio de los procesos hidrolíticos.

II.3.3.2.2.1. Optimización de Parámetros con el Sustrato Modelo 21a

Como primera aproximación, y basándonos en las condiciones empleadas en trabajos anteriores,^{181,182} se decidió llevar a cabo el proceso en una disolución tampón de pH 8.2, empleando un 10% de 1,4-dioxano como cosolvente para ayudar a la solubilidad inicial de los β -aminoésteres en agua (Esquema 3-24).



Esquema 3-24. Resolución cinética enzimática de (±)-21a mediante hidrólisis catalizada por diferentes preparados de PSL en mezclas de disolución tampón de pH 8.2 y 1,4-dioxano

Se realizaron ensayos con diferentes preparados comerciales de la lipasa de *Pseudomonas cepacia* que difieren en el soporte en que se encuentran inmovilizadas (PSL-C I ó PSL-C II: inmovilizadas sobre soporte cerámico; PSL-D: inmovilizada sobre diatomita), ya que este hecho puede influir de forma importante tanto en la actividad como en el grado de selectividad del enzima. Sin embargo, tras 17 horas de reacción en estas condiciones, se observó la formación del producto de hidrólisis del éster en grandes proporciones para todos los preparados, transcurriendo por tanto

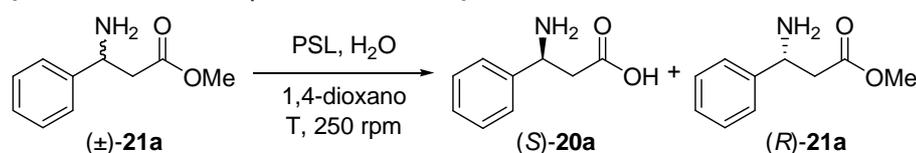
los procesos con escasa o nula selectividad (Tabla 3-3). Esto puede ser debido, en parte, a la formación del β-aminoácido sin participación del enzima, proceso que ocurre en cierta extensión en las mismas condiciones de reacción pero en ausencia de biocatalizador.

Tabla 3-3. Resolución cinética de (±)-21a a través de hidrólisis catalizada por la PSL en mezclas de disolución reguladora de pH 8.2 y 1,4-dioxano (90:10), a 30 °C y 250 rpm, tras 17 h de reacción

Entrada	Enzima ^a	ee _S (%) ^b	ee _P (%) ^b	c (%) ^c	E ^d
1	PSL-C I	>99	35	74	11
2	PSL-C II	>99	34	75	12
3	PSL-D	54	4	93	2

^a Relación 1:1 en peso respecto al sustrato de partida. ^b Determinados por HPLC.
^c $c = ee_S / (ee_S + ee_P)$. ^d $E = \ln[(1-c) \times (1-ee_P)] / \ln[(1-c) \times (1+ee_P)]$

Puesto que los resultados en medios mayoritariamente acuosos no eran buenos, se consideró la opción, también recogida en la bibliografía para ésteres de etilo con sustituyentes arilo,^{141c} de emplear disolventes orgánicos como medios de reacción y sólo 5 equivalentes de agua como agente hidrolítico (Esquema 3-25), lo que podría ayudar, también, a una mejor solubilidad del β-aminoéster objeto de estudio.



Esquema 3-25. Resolución cinética de (±)-21a mediante hidrólisis en 1,4-dioxano catalizada por diferentes preparados de la PSL, empleando 5 equivalentes de agua como agente hidrolítico

Inicialmente se escogió el 1,4-dioxano como disolvente, obteniéndose los resultados recogidos en la tabla 3-4. Cabe destacar que, en este caso, el proceso en ausencia de enzima no tenía lugar (entrada 1), algo totalmente imprescindible para que los productos aislados de la hidrólisis enzimática puedan obtenerse con altos valores de pureza óptica. Además, se observó una precipitación en el disolvente orgánico del aminoácido formado en el proceso enzimático, lo que facilitó enormemente la separación de los productos finales.

Resultados y Discusión

Cuando se analizaron los resultados obtenidos en las reacciones biocatalizadas durante 24 horas por los diferentes preparados de PSL, se comprobó que, aunque las conversiones no alcanzaban el 50%, los β -aminoácidos formados eran prácticamente enantiopuros. Los preparados que resultaron ser más efectivos fueron la PSL-C I (entrada 2) y la PSL-D (entrada 4), por su mayor actividad y capacidad de enantiodiscriminación, respectivamente.

Tabla 3-4. Resolución cinética del β -aminoéster (\pm)-**21a** a través de hidrólisis catalizada por la PSL en disolventes orgánicos a 30 °C y 250 rpm, empleando 5 equivalentes de agua como agente hidrolítico

Entrada	Enzima ^a	Disolvente	t (h)	ee _S (%) ^b	ee _P (%) ^b	c (%) ^c	E ^d
1	--	1,4-dioxano	24	--	--	--	--
2	PSL-C I	1,4-dioxano	24	58	98	37	198
3	PSL-C II	1,4-dioxano	24	31	97	24	92
4	PSL-D	1,4-dioxano	24	24	>99	19	>200
5	PSL-D	1,4-dioxano	102.5	72	99	42	>200
6	PSL-D	THF	102.5	51	99	34	>200
7	PSL-D	MeCN	102.5	59	99	37	>200

^a Relación 1:1 en peso respecto al sustrato de partida. ^b Determinados por HPLC.

^c $c = ee_S / (ee_S + ee_P)$. ^d $E = \ln[(1-c) \times (1-ee_P)] / \ln[(1-c) \times (1+ee_P)]$

Así, para continuar con la optimización de la resolución cinética enzimática mediante hidrólisis del β -aminoéster (\pm)-**21a**, se escogió la PSL-D por tratarse del catalizador más selectivo. El primer parámetro estudiado fue el efecto del disolvente. Para ello, se probaron, además de 1,4-dioxano (Tabla 3-4, entrada 5), tetrahidrofurano (THF, entrada 6) y acetonitrilo (MeCN, entrada 7). Tras 102.5 horas de reacción, se observó que la cinética de la reacción de hidrólisis en 1,4-dioxano era ligeramente superior que en el resto, manteniéndose una excelente enantioselectividad en todos los casos. Un análisis temporal del curso de las reacciones muestra que la actividad del enzima en dichos disolventes decrece en el sentido 1,4-dioxano > MeCN > THF (Figura 3-6).

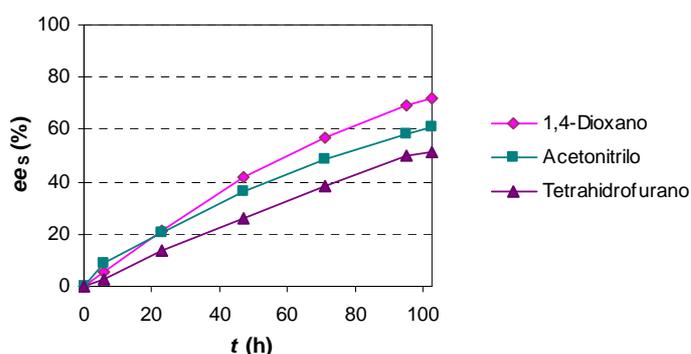


Figura 3-6. Evolución con el tiempo del exceso enantiomérico del aminoéster **21a** en su proceso de resolución por hidrólisis catalizadas por PSL-D y llevadas a cabo en diferentes disolventes orgánicos

Una vez que el 1,4-dioxano fue identificado como el mejor de los disolventes probados, se pasó a estudiar el efecto de la temperatura en la actividad y en la selectividad del enzima (Tabla 3-5).

Tabla 3-5. Resolución cinética del β-aminoéster (±)-**21a** mediante hidrólisis catalizada por PSL-D en 1,4-dioxano a 250 rpm, tras 102.5 h de reacción

Entrada	21a vs PSL-D ^a	T (°C)	H ₂ O (eq.)	ee _s (%) ^b	ee _p (%) ^b	c (%) ^c	E ^d
1	1:1	30	5	72	99	42	>200
2	1:1	45	5	79	>99	44	>200
3	1:1	60	5	69	>99	41	>200
4	1:1	30	10	70	>99	41	>200
5	1:2	30	5	89	98	48	>200
6	1:2	45	5	96	98	49	>200

^a Relación en peso del sustrato de partida respecto al enzima. ^b Determinados por HPLC.

^c $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$. ^d $E = \ln[(1-c) \times (1-ee_p)] / \ln[(1-c) \times (1+ee_p)]$

Así, manteniendo el resto de las variables constantes, se llevaron a cabo procesos de hidrólisis a 30 (entrada 1), 45 (entrada 2) y 60 °C (entrada 3), observando que un aumento de la temperatura de 30 a 45 °C provoca un aumento tanto de la conversión como de la estereoselectividad. Sin embargo, con un incremento mayor de la temperatura (60 °C, entrada 3), el enzima comienza a mostrar una ligera pérdida de actividad.

Resultados y Discusión

También se examinó el efecto de la cantidad de agua presente en el proceso de hidrólisis, observando que no tiene apenas influencia (entradas 1 y 4 en Tabla 3-5), por lo que se decidió continuar empleando 5 equivalentes en los sucesivos análisis por la dificultad que conlleva su eliminación del medio de reacción, especialmente en caso de llevar a cabo el proceso a gran escala.

Por último, se estudió conjuntamente el efecto de la temperatura y la cantidad de enzima empleada respecto al sustrato de partida. Para ello, se compararon los resultados obtenidos al usar una cantidad de PSL-D igual en peso a la de aminoéster **21a** [entradas 1 (30 °C) y 2 (45 °C)] con los obtenidos al duplicar la cantidad de enzima [entradas 5 (30 °C) y 6 (45 °C)]. Aunque en todos los casos la hidrólisis transcurre con una excelente enantioselectividad, en la figura 3-7 se muestra un análisis temporal del curso de las reacciones, donde se puede apreciar claramente cómo las condiciones de la entrada 6 son las más favorables, puesto que permiten alcanzar valores más altos del exceso enantiomérico de sustrato en tiempos más cortos de reacción, lo que supone un grado de conversión mayor, y ya muy próximo al ideal del 50%.

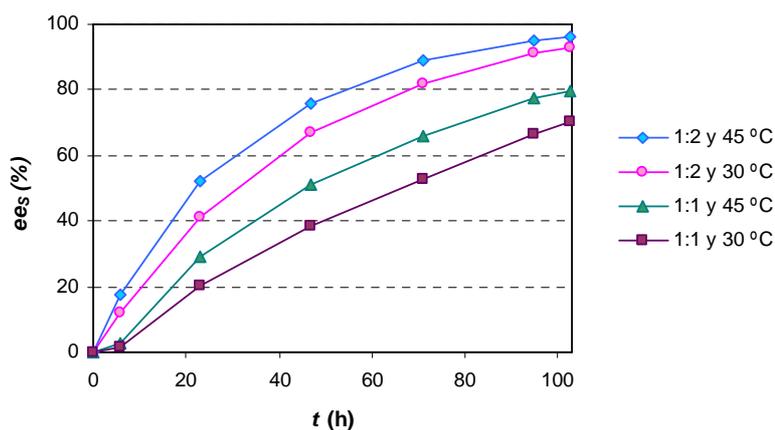


Figura 3-7. Evolución de la resolución cinética enzimática de (\pm)-**21a** con el tiempo en función de la cantidad de PSL-D empleada (1:1 ó 1:2) y de la temperatura (30 ó 45 °C)

De este modo, se llegó a la conclusión de que las condiciones más favorables para la resolución cinética enzimática del β -aminoéster modelo (\pm)-**21a** eran: empleo del doble de biocatalizador en peso respecto al sustrato de partida, 5 equivalentes de agua y 1,4-dioxano como disolvente, llevando a cabo el proceso a una temperatura de 45 °C.

Finalmente, se comprobó la eficacia, en estas mismas condiciones, de otro preparado de la PSL procedente de la compañía Amano Pharmaceuticals (PSL-C Amano), encontrándose de nuevo una excelente enantioselectividad en la hidrólisis de este sustrato y, además, una mayor reactividad (Tabla 3-6, entrada 3), por lo que serán ambos preparados de la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PSL-D, soportada sobre diatomita, y PSL-C, soportada sobre un material cerámico) los que se empleen en el estudio de toda la familia de aminoésteres.

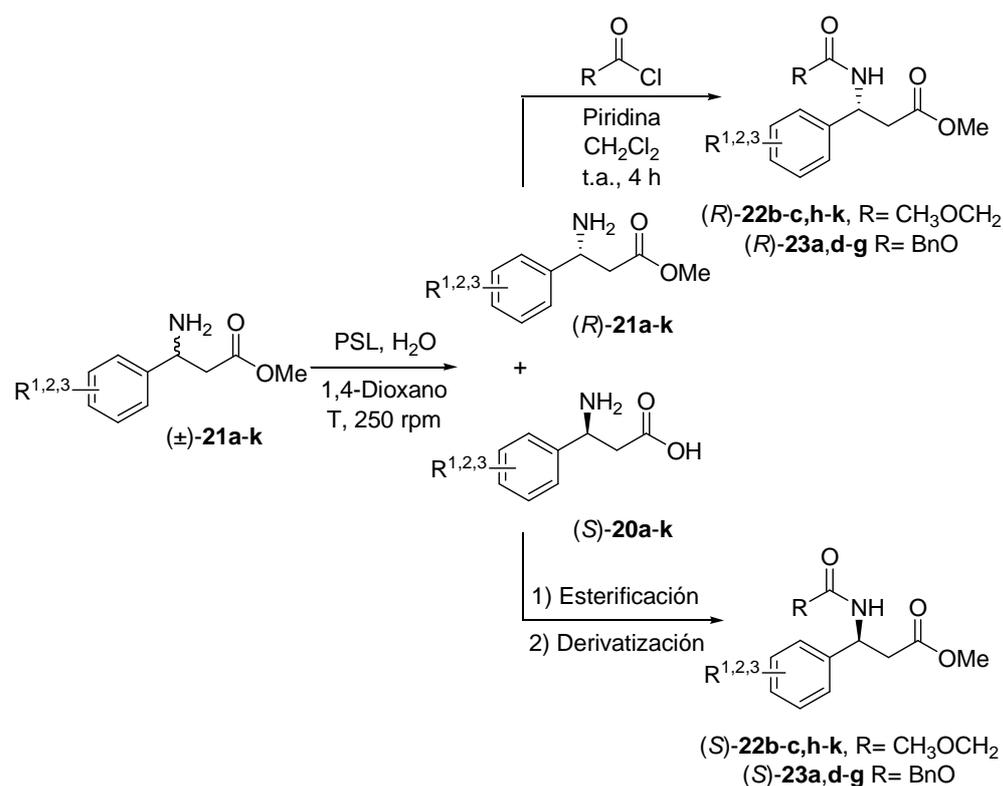
II.3.3.2.2. Extensión al Resto de β -aminoésteres

Una vez optimizadas las condiciones para la resolución del sustrato modelo, se extendió la metodología al resto de los β -aminoésteres presentados al inicio de este apartado (Esquema 3-26). Los mejores resultados obtenidos se encuentran recogidos en la Tabla 3-6.

Se comenzó el estudio con la hidrólisis de los compuestos **21a** y **21b** ($R^1 = H$ y Me , respectivamente) a 30 y 45 °C, observándose de nuevo reactividades superiores a 45 °C y en el caso de emplear la PSL-C de Amano (entradas 1-6). Además, la cinética del derivado metilado resultó ser más rápida que la del sustrato modelo. De esta forma, se obtuvieron los β -aminoésteres **21a** y **21b** enantiopuros.

A continuación, se estudió la resolución de sustratos con sustituyentes electrodonadores en el anillo aromático, como son el *para*-metoxi (**21c**) y el *para*-fenoxi (**21d**), obteniéndose de nuevo excelentes selectividades (entradas 7-10). Además, con este tipo de β -aminoésteres se observó un gran aumento de la reactividad de la lipasa, especialmente con el derivado *p*-fenoxi, que alcanzó conversiones próximas al 50% en tan solo 23 h.

Resultados y Discusión



Esquema 3-26. Resolución cinética de los β -aminoésteres **21a-k** mediante hidrólisis catalizada por la lipasa de *Pseudomonas cepacia* y transformaciones químicas para la medida de los excesos enantioméricos

Del mismo modo se hidrolizaron enantioselectivamente los β -aminoésteres sustituidos en su posición *para* con los grupos trifluorometilo (**21e**) y fenilo (**21f**), obteniéndose tiempos de reacción similares al sustrato modelo y aislando los correspondientes β -aminoácidos de forma prácticamente enantiopura (entradas 11-14).

También se comparó la influencia que los diferentes halógenos en posición *para* [$\text{R}^1 = \text{Br}$ (**21g**), Cl (**21h**) y F (**21i**)] ejercen sobre la selectividad y la velocidad del proceso. Así, se advirtió que, además de ser posible aislar tanto el aminoéster de partida como el producto hidrolizado con excelentes purezas enantioméricas, la cinética de los procesos es muy similar en los tres casos y mucho más rápida que la del sustrato de referencia **21a** (entradas 15-20).

Tabla 3-6. Resolución cinética enzimática de los β-aminoésteres **21a-k** usando 1,4-dioxano como disolvente y 5 equivalentes de H₂O como nucleófilo, a 45 °C

Entrada	Sustr.	PSL ^b	R ¹	R ²	R ³	t (h)	ee _S ^c (%)	ee _P ^c (%)	c (%) ^d	E ^e
1 ^a	21a	D	H	H	H	102.5	89	98	48	>200
2	21a	D	H	H	H	102.5	96	98	49	>200
3	21a	Amano	H	H	H	89	>99	97	51	>200
4 ^a	21b	D	Me	H	H	102.5	>99	98	50	>200
5	21b	D	Me	H	H	58	96	98	49	>200
6	21b	Amano	Me	H	H	58	99	98	50	>200
7	21c	D	OMe	H	H	51.5	>99	98	50	>200
8	21c	Amano	OMe	H	H	120	88	90	49	58
9	21d	D	OPh	H	H	23	94	99	49	>200
10	21d	Amano	OPh	H	H	23	98	97	50	>200
11	21e	D	CF ₃	H	H	95	99	98	50	>200
12	21e	Amano	CF ₃	H	H	64.5	>99	98	50	>200
13	21f	D	Ph	H	H	102.5	77	99	44	>200
14	21f	Amano	Ph	H	H	102.5	84	97	46	>200
15	21g	D	Br	H	H	32.5	>99	98	51	>200
16	21g	Amano	Br	H	H	39	99	96	51	>200
17	21h	D	Cl	H	H	30	99	>99	50	>200
18	21h	Amano	Cl	H	H	38.5	>99	96	51	>200
19	21i	D	F	H	H	71	99	97	51	>200
20	21i	Amano	F	H	H	31	99	98	50	>200
21	21j	D	H	F	H	102	95	97	49	>200
22	21j	Amano	H	F	H	74	99	98	50	>200
23	21k	D	H	H	F	102.5	74	>99	43	>200
24	21k	Amano	H	H	F	102.5	97	>99	49	>200

^a 30 °C. ^b Relación 1:2 en peso respecto al sustrato de partida. ^c Determinados por HPLC.

^d $c = ee_S / (ee_S + ee_P)$. ^e $E = \ln[(1-c) \times (1-ee_P)] / \ln[(1-c) \times (1+ee_P)]$

Finalmente, se analizó la influencia de la posición de los sustituyentes en el anillo aromático empleando β-aminoésteres fluorados en *para* (**21i**), *meta* (**21j**) y *orto* (**21k**), observando de nuevo que ambos preparados de la PSL eran catalizadores adecuados para la resolución

Resultados y Discusión

mediante hidrólisis de estos compuestos y que, a medida que el flúor se aleja del resto alquílico, los procesos transcurren más rápido (entradas 19-24).

Puesto que, como ya se ha comentado, tanto los aminoésteres como los aminoácidos son compuestos muy polares y no es posible su inyección directa en el HPLC de fase normal para el análisis de sus excesos enantioméricos, se diseñó una metodología para tener acceso a estos datos (ver parte experimental), consistente en una derivatización adecuada de ambos mediante una acilación del aminoéster y una esterificación y posterior acilación del aminoácido (Esquema 3-26).

II.3.3.3. DETERMINACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA DE LOS PRODUCTOS DE LA HIDRÓLISIS

Hasta este momento se sabe que ambos preparados de la PSL son capaces de hidrolizar, con una enantiodiscriminación excelente, el mismo enantiómero de cada uno de los aminoésteres **21a-k** estudiados por la coincidencia de los tiempos de retención de los picos en los análisis por HPLC pero, ¿cuál es el hidrolizado y cuál el que se mantiene inalterado?

La configuración *R* del sustrato remanente (+)-**21a** se asignó por comparación con el valor de su rotación óptica anteriormente descrita.²⁰³ Del mismo modo, la enantiopreferencia *S* de la PSL también se demostró por comparación de los valores de la rotación óptica de los compuestos **24**, **25** y **18** (Esquema 3-27) que se sintetizaron posteriormente partiendo del β-aminoácido procedente de la hidrólisis enzimática.²⁰⁰

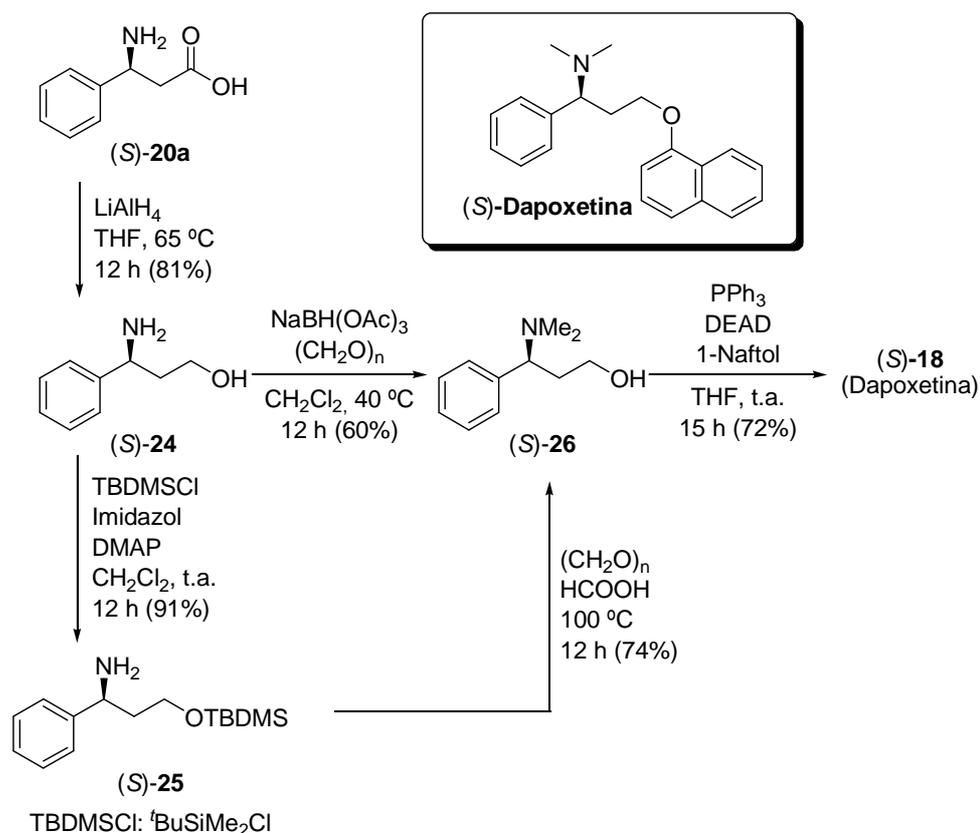
Para el resto de aminoésteres **21b-k**, con sustituciones en alguna de las posiciones del anillo aromático, también se ha supuesto que la PSL mantiene la tendencia de hidrolizar selectivamente el enantiómero *S* dando lugar a los correspondientes aminoácidos, por la similitud estructural existente con otros aminoésteres cuya hidrólisis con la lipasa de *Pseudomonas cepacia* había sido previamente estudiada.^{141c,181,204}

²⁰³ a) S. Hata, M. Iguchi, T. Iwasaka, K.-I. Yamada, K. Tomioka, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1721-1723; b) M. K. Tse, S. Bhor, M. Klawonn, G. Anilkumar, H. Jiao, C. Doebler, A. Spannenberg, W. Maegerlein, H. Hugl, M. Beller, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1855-1874.

²⁰⁴ G. Tasnádi, E. Forró, F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1771-1777.

II.3.3.4. SÍNTESIS TOTAL DE LA (S)-DAPOXETINA

Una vez sintetizada y resuelta la familia completa de β -aminoésteres, y asignada su configuración, se decidió dar una aplicación práctica a uno de ellos: el aminoácido **20a** procedente de la hidrólisis (S)-selectiva del sustrato modelo **21a**. Así, se empleó este compuesto (S)-**20a**, obtenido con un 98% de exceso enantiomérico, como precursor en la preparación de la (S)-Dapoxetina. Puesto que, anteriormente, nuestro grupo de investigación había descrito un procedimiento para acceder a este fármaco de gran interés industrial partiendo del 1,3-aminoalcohol **24** de configuración adecuada,²⁰⁰ se consideró oportuno proceder a través de una estrategia similar (Esquema 3-27).



Esquema 3-27. Síntesis química de la (S)-Dapoxetina desde el β -aminoácido (S)-**20a** obtenido mediante un proceso de hidrólisis enzimática

Resultados y Discusión

De esta forma, se comenzó la síntesis reduciendo químicamente el β -aminoácido (S)-**20a** con hidruro de litio y aluminio (LiAlH_4) en THF seco a 65 °C, lo que permitió acceder al aminoalcohol deseado (S)-**24** con un 81% de rendimiento. A continuación, en la ruta sintética descrita, el amino alcohol libre se hacía reaccionar con formaldehído y ácido fórmico a 100 °C con el fin de dimetilar el grupo amino. Sin embargo, cuando se intentó reproducir esta metodología, dependiendo de las condiciones de reacción empleadas, en algunos casos se observaba una condensación intramolecular entre la imina formada y el alcohol, lo que conllevaba un descenso en el rendimiento de (S)-**26** y problemas en su purificación. Por este motivo, se decidió buscar una ruta alternativa para la preparación de dicho compuesto (S)-**26**.

Así, con el propósito de evitar este ataque intramolecular, se protegió selectivamente el grupo hidroxilo del compuesto con cloruro de *tert*-butildimetilsililo (TBDMSCl) en presencia de 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina (DMAP) e imidazol como base a temperatura ambiente, obteniendo (S)-**25** con un 91% de rendimiento aislado. A continuación, se llevó a cabo la dimetilación del grupo amino en las condiciones ácidas anteriormente descritas, observándose, además, la ruptura *in situ* del éter de silicio y quedando libre de nuevo el grupo hidroxilo. Por otro lado, también se consiguió obtener el compuesto (S)-**26** en un solo paso de reacción, y en condiciones mucho más suaves, empleando triacetoxiborohidruro de sodio [$\text{NaBH}(\text{OAc})_3$] y formaldehído, en diclorometano a 40 °C. Finalmente, y como ya se había descrito previamente,²⁰⁰ se funcionalizó adecuadamente el grupo alcohol libre en las condiciones de Mitsunobu utilizando trifenilfosfina (PPh_3), azodicarboxilato de dietilo (DEAD) y 1-naftol, en THF seco como disolvente.

De esta manera, se ha conseguido diseñar un método que permite acceder, en condiciones suaves de reacción, a la (S)-Dapoxetina con un 98% de pureza óptica, logrando así superar el 93% de exceso enantiomérico obtenido previamente en nuestro grupo de investigación a través de la resolución de otro de sus posibles intermedios, así como optimizar algunos de los pasos sintéticos anteriormente descritos.

CONCLUSIONES

A lo largo de este capítulo se ha descrito la síntesis química de una amplia familia de β -aminoácidos y sus correspondientes ésteres de metilo racémicos, obteniéndose rendimientos entre moderados y excelentes dependiendo del tipo y la posición de los sustituyentes en el anillo aromático.

Aprovechando su bifuncionalidad, se han estudiado dos aproximaciones enzimáticas para la resolución cinética de los β -aminoésteres:

- Acilación del grupo amino: tanto la PSL como la CAL-B han proporcionado actividades y selectividades con utilidad sintética en el caso de emplear metoxiacetato de etilo como agente acilante. El resultado obtenido con la CAL-B posee un especial interés puesto que esta ha sido capaz de aceptar un nucleófilo cuyo sustituyente de tamaño mediano está formado por cinco átomos diferentes de hidrógeno, ampliando así el espacio que se creía disponible para los sustratos en el centro activo de la lipasa.

- Hidrólisis del grupo éster: ha sido el método elegido para la resolución de la familia de compuestos puesto que la PSL, a través de procesos hidrolíticos en 1,4-dioxano, ha permitido la obtención de los ácidos (S)-3-amino-3-arylpropanoicos y los correspondientes (R)-aminoésteres de metilo con enantioselectividades muy altas.

Por último, se ha preparado la (S)-Dapoxetina con un 98% ee y un 19% de rendimiento global a través de una ruta sintética de seis pasos, empleando como producto de partida el aminoácido enantioméricamente enriquecido obtenido en el proceso de hidrólisis enzimática.

PARTE EXPERIMENTAL

II.3.5.1. GENERAL

La lipasa tipo B de *Candida antarctica* (CAL-B, Novozyme 435, 7300 PLU/g) inmovilizada por adsorción sobre Lewatit E fue donada por Novozymes. La lipasa tipo A de *Candida antarctica* [CAL-A inmovilizada NZL-101-IMB, 12 U/g en un ensayo de transesterificación de laurato de etilo (50 mM) con 1-butanol (500 mM) a 30 °C en isooctano como disolvente] fue adquirida a Codexis. Las lipasas de *Pseudomonas cepacia* (PSL-C inmovilizadas sobre cerámica, tipo I: 1061 U/g, tipo II: 1195 U/g; PSL-D inmovilizada en diatomita, 744 U/g) se obtuvieron de Aldrich, mientras que la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (PSL-C tipo II, inmovilizada sobre cerámica, 1019 U/g) fue suministrada por Amano.

Todos los demás reactivos se adquirieron de Aldrich, Acros Organics, Panreac, Prolabo o Scharlau, sin ser necesarios tratamientos previos para su purificación.

Los disolventes empleados en los procesos sintéticos en atmósfera inerte fueron sometidos, previamente a su utilización, a un proceso de destilación sobre un desecante adecuado, almacenándose bajo atmósfera de nitrógeno, mientras que los disolventes orgánicos empleados en los procesos de hidrólisis fueron utilizados sin destilación previa. El TBME y el THF fueron secados sobre sodio empleando como indicador benzofenona, mientras que el diclorometano se secó con CaH_2 .

II.3.5.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

II.3.5.2.1. CROMATOGRAFÍA EN GEL DE SÍLICE

Para la cromatografía en capa fina se han utilizado cromatofolios de gel de sílice POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄ (0.25 mm de espesor), los cuales llevan incorporado un revelador ultravioleta, comercializados por Merck. Como revelador se utilizó una disolución acuosa formada por un 1% de KMnO₄, 5% de K₂CO₃ y un 5% de NaOH en 200 mL de agua. El revelador empleado en las reacciones con β-aminoácidos implicados fue una disolución de ninhidrina (0.3%) en etanol.

Para la cromatografía de columna se empleó gel de sílice 60 (230-240 Mesh) adquirida a Merck.

II.3.5.2.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

A continuación, se muestran las condiciones de separación y los tiempos de retención de los dos enantiómeros de cada uno de los sustratos estudiados (Tabla 3-7):

Tabla 3-7. Condiciones de separación en HPLC de los compuestos estudiados en este capítulo

Compuesto	Columna	T (°C)	Eluyente (Hexano:IPA)	Tiempo (min)
18	OJ-H	20	90:10	12.1 (S) y 18.1 (R)
22b	OD	20	90:10	16.1 (R) y 19.1 (S)
22c	OD	20	90:10	25.6 (R) y 28.9 (S)
22h	OD	37	90:10	13.2 (R) y 15.2 (S)
22i	IA	20	80:20	11.0 (R) y 16.0 (S)
22j	OD	20	90:10	18.6 (R) y 21.5 (S)
22k	OD	20	95:5	25.3 (R) y 28.9 (S)
23a	OD	20	90:10	23.7 (S) y 29.6 (R)
23d	OD	20	80:20	17.6 (R) y 20.4 (S)
23e	IA	20	85:15	18.7 (R) y 22.3 (S)
23f	IA	20	85:15	23.1 (R) y 28.8 (S)
23g	IA	20	85:15	22.3 (R) y 25.6 (S)

El seguimiento de las reacciones enzimáticas de acilación e hidrólisis, así como la medida del exceso enantiomérico de la (S)-Dapoxetina una vez sintetizada, se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100, con columnas quirales Chiralcel OD u OJ-H y Chiralpak IA (25 x 0.46 cm). La detección empleada es visible-ultravioleta a 210 y 215 nm. Como fase móvil se han empleado mezclas de hexano/isopropanol.

II.3.5.2.3. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (IR)

Los espectros de infrarrojo se registraron en un espectrómetro Perkin-Elmer Paragon 1000 FT-IR o Varian 1000 FT-IR, empleando pastillas de KBr (muestras sólidas) o en ventanas de NaCl (aceites). Las bandas de tensión se indican en valores de ν máxima y se expresan en cm^{-1} .

II.3.5.2.4. ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM)

Se utilizaron dos técnicas: ionización por electroespray (ESI^+) e ionización química a presión atmosférica (APCI^+) con un cromatógrafo HP 1100 acoplado a masas. Los valores en ambos casos se refieren a unidades de masa atómica (uma).

II.3.5.2.5. PUNTOS DE FUSIÓN (PF)

Se han llevado a cabo con un aparato Gallenkamp en tubos capilares abiertos y, por tanto, sus valores no están corregidos.

II.3.5.2.6. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y secuencia de pulsos DEPT han sido realizados con espectrómetros Bruker NAV-300 y DPX-300 (300.13 MHz para ^1H y 75.5 MHz para ^{13}C).

Los desplazamientos químicos se dan en valores de δ en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hertzios (Hz).

Parte experimental

Los calibrados se hicieron sobre la señal del CDCl_3 o CD_3OD (^{13}C , 76.95 ó 49.50 ppm), o del CHCl_3 o CH_3OH (^1H , 7.26 ó 3.35 ppm) residual.

II.3.5.2.7. ROTACIÓN ÓPTICA ESPECÍFICA

Se han medido con un polarímetro Perkin-Elmer 343 (unidades $10^{-1} \text{ cm}^2 \times \text{grado} \times \text{g}^{-1}$), empleando la lámpara de sodio (D).

II.3.5.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS

II.3.5.3.1. SÍNTESIS Y RESOLUCIÓN DE LA FAMILIA DE β -AMINOÉSTERES 21a-k

II.3.5.3.1.1. Procedimiento General para la Síntesis de β -Aminoácidos (20b-k)

El aldehído correspondiente **19b-k** (30.0 mmol), acetato de amonio (4.65 g, 60.3 mmol) y ácido malónico (3.15 g, 30.3 mmol) se refluyen en etanol (75 mL) durante 20 h. La mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente, y el sólido blanco formado se filtra y se lava con etanol (25 mL) y éter dietílico (25 mL). Este sólido se recristaliza en mezclas $\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$ de diferentes proporciones en función del sustrato, obteniendo el β -aminoácido correspondiente **20b-k** como cristales blancos.

Tanto la síntesis química como la caracterización espectroscópica de los β -aminoácidos se encuentran descritas en la literatura.²⁰⁵

II.3.5.3.1.2. Procedimiento General para la Esterificación de Aminoácidos. Síntesis de los β -Aminoésteres 21a-k

A una suspensión del correspondiente β -aminoácido **20a-k** (5.5 mmol) en metanol (91 mL) se le añade poco a poco HCl concentrado (1 mL) hasta la completa disolución del primero. La mezcla se refluxa durante 12 h, tras las cuales se enfría hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se elimina el disolvente bajo presión reducida y el crudo de reacción

²⁰⁵ Compuestos **2a-d**, **2f**, **2g** y **2i**: Ref. 201b. Además, **2a** está disponible comercialmente. Compuesto **2e**: Ref 201c. Compuestos **2h** y **2k**: Ref. 201a. Compuesto **2j**: Ref. 141c.

resultante se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (10% MeOH/CH₂Cl₂ ó 30% MeOH/AcOEt), obteniendo el β-aminoéster **21a-k** como un aceite amarillento o un sólido blanco, amarillo pálido o rosa pálido.

II.3.5.3.1.3. Procedimiento General para la Síntesis de las Metoxiacetamidas 22b-c,h-k

A una disolución bajo atmósfera de nitrógeno del correspondiente β-aminoéster **21b-c,h-k** (0.28 mmol) en diclorometano seco (1.9 mL) se le añade piridina (28 μL, 0.35 mmol) y la mezcla resultante se enfría a 0 °C. Se añade cuidadosamente cloruro de metoxiacetilo (64 μL, 0.70 mmol) y la disolución se agita a temperatura ambiente durante 4 h, tiempo tras el cual no se detecta material de partida mediante análisis por TLC (10% MeOH/CH₂Cl₂). Se elimina el disolvente bajo presión reducida y el crudo de reacción resultante se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (70% AcOEt/hexano), obteniendo la correspondiente metoxiacetamida **22b-c,h-k** como un sólido amarillo pálido.

II.3.5.3.1.4. Procedimiento General para la Síntesis de los Carbamatos de Bencilo 23a,d-g

A una disolución bajo atmósfera de nitrógeno del correspondiente β-aminoéster **21a,d-g** (0.28 mmol) en diclorometano seco (1.9 mL) se le añade piridina (25 μL, 0.31 mmol) y la mezcla resultante se enfría a 0 °C. Se añade cuidadosamente cloroformiato de bencilo (44 μL, 0.31 mmol) y la disolución se agita a temperatura ambiente durante 4 h, tiempo tras el cual no se detecta material de partida mediante análisis por TLC (10% MeOH/CH₂Cl₂ ó 30% MeOH/AcOEt). Se elimina el disolvente bajo presión reducida y el crudo de reacción resultante se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (70% AcOEt/hexano), obteniendo el correspondiente carbamato de bencilo **23a,d-g** como un sólido amarillo pálido.

II.3.5.3.1.5. Procedimiento para la Resolución Cinética del 3-Amino-3-fenilpropanoato de Metilo Racémico (21a) mediante Acilación Catalizada por Lipasas

A una suspensión bajo atmósfera de nitrógeno del aminoéster racémico **21a** (30 mg, 0.17 mmol) y el enzima (CAL-B, PSL-C I o CAL-A, 30 mg) en TBME seco (1.7 mL, 0.1 M), se añade metoxiacetato de etilo (99 μ L, 0.84 mmol). La reacción se coloca en un agitador orbital (250 rpm) a la temperatura deseada (30 ó 45 °C) durante 27 h (ver Tabla 3-2 en página 209). Entonces, la reacción se detiene filtrando el enzima, que se lava con diclorometano (5 x 1 mL). Se evaporan los disolventes a presión reducida y se obtiene un crudo que se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (gradiente de eluyentes: 10-30% MeOH/AcOEt). De esta forma se aislan la metoxiacetamida **22a** y el β -aminoéster **21a** ópticamente activos. Este último se transforma en la correspondiente metoxiacetamida, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, para llevar a cabo la medida de los excesos enantioméricos de ambos compuestos mediante HPLC.

II.3.5.3.1.6. Procedimiento General para la Hidrólisis Enzimática de los β -Aminoésteres Racémicos 21a-k

A una disolución del correspondiente β -aminoéster **21a-k** (0.28 mmol) en 1,4-dioxano (2.8 mL) se le añaden sucesivamente agua destilada (25 μ L, 1.40 mmol) y PSL (relación en peso 2:1 de enzima:sustrato). La mezcla resultante se agita a 30 ó 45 °C y 250 rpm (ver Tabla 3-6). Se hace un seguimiento del transcurso de la reacción mediante la medida de la evolución del exceso enantiomérico del β -aminoéster con el tiempo, empleando para ello la técnica de HPLC. El β -aminoácido precipitado en el medio de reacción se filtra con el enzima, mientras que el aminoéster permanece en disolución. Para aislar el último, el disolvente orgánico se evapora bajo presión reducida. Con el objetivo de medir los excesos enantioméricos:

a) el β -aminoéster se transforma en la metoxiacetamida (*R*)-**22b-c,h-k** o en el carbamato de bencilo (*R*)-**23a,d-g**;

b) el β -aminoácido se esterifica en las condiciones anteriormente descritas y se transforma en la correspondiente metoxiacetamida (S)-**22b-c,h-k** o carbamato de bencilo (S)-**23a,d-g**.

II.3.5.3.2. SÍNTESIS TOTAL DE LA (S)-DAPOXETINA

II.3.5.3.2.1. Síntesis del 3-Amino-3-fenilpropan-1-ol (**24**)

Sobre una disolución del β -aminoácido (\pm)-**20a** o (S)-**20a** (1.00 g, 6.05 mmol) en THF seco (21.6 mL) y a 0 °C se añade LiAlH_4 (460 mg, 12.11 mmol), poco a poco y bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se mantiene a reflujo y con agitación durante 12 h. Tras este periodo, se enfría de nuevo a 0 °C y se añade agua, gota a gota, para destruir el exceso de hidruro. Se extrae con AcOEt (4 x 20 mL), se combinan las fases orgánicas, se secan sobre Na_2SO_4 , se filtra y se evapora el disolvente bajo presión reducida. El crudo de reacción se purifica finalmente por cromatografía de columna en gel de sílice (100% MeOH), aislando 740 mg del β -aminoalcohol **24** como un sólido blanco (81%).

II.3.5.3.2.2. Síntesis del 3-Amino-O-*tert*-butildimetilsilil-3-fenilpropan-1-ol (**25**)

Sobre una disolución del aminoalcohol (\pm)-**24** ó (S)-(-)-**24** (200 mg, 1.32 mmol) en diclorometano seco (9.5 mL) se añade sucesivamente imidazol (225 mg, 3.31 mmol), DMAP (16 mg, 0.13 mmol) y TBDMSCI (399 mg, 2.65 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agita durante toda la noche a temperatura ambiente, comprobando tras este periodo la desaparición del sustrato de partida mediante análisis por TLC (100% MeOH). La reacción se para añadiendo una disolución acuosa saturada de NH_4Cl (10 mL) y se extrae con CH_2Cl_2 (8 x 10 mL). Se combinan las fases orgánicas, se secan sobre Na_2SO_4 , se filtra y se evapora el disolvente bajo presión reducida. El crudo de reacción se purifica finalmente por cromatografía de columna en gel de sílice (100% AcOEt), aislando 321 mg de **25** como un aceite amarillento (91%).

II.3.5.3.2.3. Síntesis del 3-(*N,N*-Dimetilamino)-3-fenilpropan-1-ol (26**)**

Procedimiento 1: Sobre una disolución del aminoalcohol (\pm)-**24** ó (*S*)-(-)-**24** (100 mg, 0.66 mmol) en diclorometano (8.3 mL) en un tubo sellado, se añade sucesivamente una disolución acuosa al 37% de formaldehído (149 μ L, 1.98 mmol), Na₂SO₄ para capturar el agua (15 mg, 0.11 mmol) y NaBH(OAc)₃ (561 mg, 2.65 mmol). La mezcla resultante se agita a 40 °C durante una noche, comprobando tras este periodo la desaparición del sustrato de partida mediante análisis por TLC (100% MeOH). La reacción se para añadiendo una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ hasta pH 8-9, y se extrae con CH₂Cl₂ (5 x 10 mL). Se combinan las fases orgánicas, se secan sobre Na₂SO₄, se filtra y se evapora el disolvente bajo presión reducida. El crudo de reacción se purifica finalmente por cromatografía de columna en gel de sílice (gradiente 50-60% MeOH/AcOEt), aislando 72 mg de **26** como un aceite amarillento (60%).

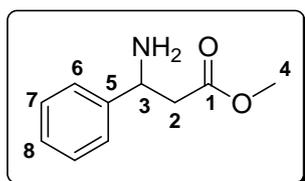
Procedimiento 2: Sobre una disolución de (\pm)-**25** ó (*S*)-(+)-**25** (150 mg, 0.56 mmol) en ácido fórmico (286 μ L, 7.46 mmol) se añade una disolución acuosa al 37% de formaldehído (559 μ L, 7.46 mmol) y la mezcla resultante se agita a reflujo durante 12 horas, tiempo tras el cual se evapora el disolvente bajo presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (gradiente 40-80% MeOH/AcOEt), aislando 74 mg de **25** como un aceite amarillento (74%).

II.3.5.3.2.4. Síntesis de la *N,N*-Dimetil-1-fenil-3-(naftalen-1-iloxi)propan-1-amina (Dapoxetina, **18)**

Sobre una disolución de (\pm)-**26** ó (*S*)-(+)-**26** (46 mg, 0.26 mmol) en THF seco (3.8 mL) se añade 1-naftol (75.9 mg, 0.53 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se enfría a 0 °C y se añaden sucesivamente trifenilfosfina (139.3 mg, 0.53 mmol) y DEAD (84.0 μ L, 0.53 mmol). Se deja que la disolución alcance temperatura ambiente y se mantiene agitando durante 15 h, tiempo tras el cual no se detecta material de partida mediante análisis por TLC (60% MeOH/AcOEt). Se evapora el disolvente bajo presión reducida y el crudo de reacción se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (100% AcOEt), aislando 57 mg de **18** como un aceite naranja (72%).

II.3.5.4. DATOS EXPERIMENTALES

3-Amino-3-fenilpropanoato de metilo (21a)



Fórmula Molecular: C₁₀H₁₃NO₂

Aspecto físico: Aceite amarillento

Peso molecular: 179.09 g/mol

R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂): 0.47

IR (NaCl): ν 764, 803, 847, 912, 1021, 1173, 1199, 1254, 1320, 1438, 1454, 1494, 1604, 1732, 2952, 3028, 3062, 3306, 3378 cm⁻¹

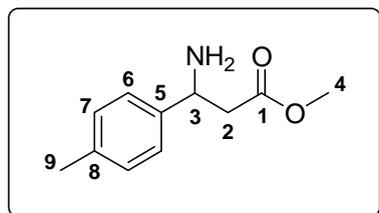
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.37-7.22 (m, 5H, Ar), 4.41 (t, 1H, , *J* 7.0, H₃), 3.67 (s, 3H, H₄), 2.67-2.64 (m, 2H, H₂), 1.79 (s, 2H, NH₂)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 172.3 (C₁), 144.5 (C₅), 128.5 (2C, C₇), 127.3 (C₈), 126.0 (2C, C₆), 52.5 (C₃), 51.5 (C₄), 43.8 (C₂)

EM (ESI⁺, *m/z*): 180 [(M+H)⁺, 100%], 163 [(M-NH₂)⁺, 8%]

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +27.7$ (c 1.0, CHCl₃), 99% ee (enantiómero *R*), por hidrólisis enzimática

3-Amino-3-(4-metilfenil)propanoato de metilo (21b)



Fórmula Molecular: C₁₁H₁₅NO₂

Aspecto físico: Aceite amarillento

Peso molecular: 193.11 g/mol

R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂): 0.45

IR (NaCl): ν 722, 818, 913, 1020, 1171, 1197, 1255, 1318, 1437, 1514, 1589, 1736, 2868, 2923, 2951, 3015, 3307, 3376 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.25 (d, 2H, *J* 7.9, H₇), 7.14 (d, 2H, *J* 7.9, H₆), 4.38 (t, 1H, *J* 6.8, H₃), 3.67 (s, 3H, H₄), 2.65 (d, 2H, *J* 6.8, H₂), 2.33 (s, 3H, H₉), 1.85 (s, 2H, NH₂)

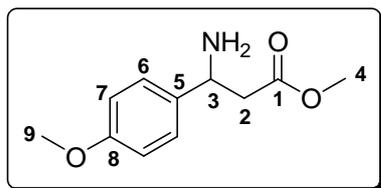
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 172.4 (C₁), 141.5 (C₅), 136.9 (C₈), 129.2 (2C, C₇), 125.9 (2C, C₆), 52.2 (C₃), 51.5 (C₄), 43.8 (C₂), 20.9 (C₉)

EM (APCI⁺, *m/z*): 194 [(M+H)⁺, 100%], 177 [(M-NH₂)⁺, 60%]; 135 [(M-CO₂Me)⁺, 7%]

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +21.8$ (c 1.0, CHCl₃), 99% ee (enantiómero *R*), por hidrólisis enzimática

Parte experimental

3-Amino-3-(4-metoxifenil)propanoato de metilo (21c)



Fórmula Molecular: C₁₁H₁₅NO₃

Aspecto físico: Aceite amarillento

Peso molecular: 209.11 g/mol

R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂): 0.30

IR (NaCl): ν 834, 1033, 1179, 1250, 1303, 1439, 1514, 1585, 1612, 1732, 2839, 2954, 3002, 3297, 3364 cm⁻¹

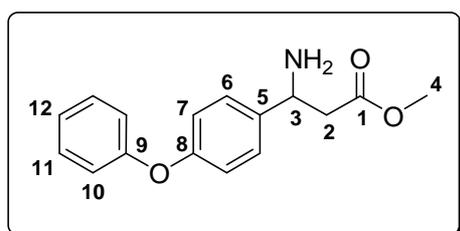
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.27 (d, 2H, *J* 8.7, H₆), 6.86 (d, 2H, *J* 8.7, H₇), 4.37 (t, 1H, *J* 6.8, H₃), 3.78 (s, 3H, H₉), 3.67 (s, 3H, H₄), 2.64 (d, 2H, *J* 6.8, H₂), 1.96 (sa, 2H, NH₂)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 172.4 (C₁), 158.8 (C₈), 136.6 (C₅), 127.2 (2C, C₆), 113.9 (2C, C₇), 55.2 (C₉), 52.9 (C₃), 51.5 (C₄), 43.9 (C₂)

EM (ESI⁺, *m/z*): 210 [(M+H)⁺, 40%], 193 [(M-NH₂)⁺, 100%]

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +11.9$ (c 1.0, CHCl₃), 88% ee (enantiómero *R*), por hidrólisis enzimática

3-Amino-3-(4-fenoxifenil)propanoato de metilo (21d)



Fórmula Molecular: C₁₆H₁₇NO₃

Aspecto físico: Sólido rosa pálido

Peso molecular: 271.12 g/mol

R_f (30% MeOH/AcOEt): 0.55

PF: 49-50 °C

IR (KBr): ν 746, 817, 856, 925, 1008, 1075, 1129, 1244, 1297, 1307, 1336, 1436, 1455, 1505, 1590, 1722, 2843, 2913, 2952, 3184, 3269, 3349 cm⁻¹

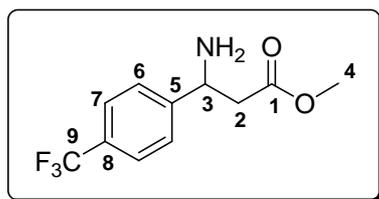
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.34-7.29 (m, 4H, 2H₆+2H₁₁), 7.09 (tt, 1H, *J* 7.4 y 1.0, H₁₂), 7.01-6.94 (m, 4H, 2H₇+2H₁₀), 4.41 (t, 1H, *J* 6.9, H₃), 3.68 (s, 3H, H₄), 2.65 (d, 2H, *J* 6.9, H₂); 1.81 (sa, 2H, NH₂)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 172.3 (C₁), 157.1 (C₉), 156.4 (C₈), 139.2 (C₅), 129.6 (2C, C₁₁), 127.4 (2C, C₆), 123.2 (C₁₂), 40.1 (C₂), 118.8, 118.7 (4C, 2C₇+2C₁₀), 51.9 (C₃), 51.6 (C₄), 43.9 (C₂)

EM (ESI⁺, *m/z*): 294 [(M+Na)⁺, 15%], 272 [(M+H)⁺, 10%], 256 [(M-NH₂+H)⁺, 20%], 255 [(M-NH₂)⁺, 100%], 213 [(M-CO₂Me+H)⁺, 20%]

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = -3.7$ (c 1.0, MeOH), 98% ee (enantiómero *R*), por hidrólisis enzimática

3-Amino-3-[4-(trifluorometil)fenil]propanoato de metilo (21e)



Fórmula Molecular: C₁₁H₁₂F₃NO₂

Aspecto físico: Sólido amarillo pálido

Peso molecular: 247.08 g/mol

R_f (30% MeOH/AcOEt): 0.63

PF: 25-27 °C

IR (KBr): ν 529, 604, 628, 707, 844, 912, 1017, 1068, 1120, 1167, 1327, 1421, 1439, 1620, 1736, 2956, 3005, 3313, 3383 cm⁻¹

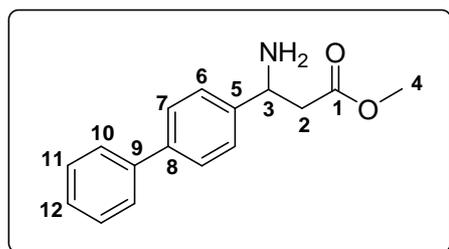
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.58 (d, 2H, *J* 8.2, H₇), 7.48 (d, 2H, *J* 8.2, H₆), 4.48 (t, 1H, *J* 6.8, H₃), 3.67 (s, 3H, H₄), 2.66 (d, 2H, *J* 6.8, H₂), 1.91 (s, 2H, NH₂)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 171.9 (C₁), 148.4 (C₅), 129.7 (c, *J* 129, C₈), 126.6 (2C, C₆), 124.0. (c, *J* 1080, C₉), 125.5 (c, 2C, *J* 15, C₇), 52.2 (C₃), 51.7 (C₄), 43.6 (C₂)

EM (APCI⁺, *m/z*): 248 [(M+H)⁺, 25%], 189 [(M-CO₂Me+H)⁺, 100%]

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +11.8$ (c 1.0, CHCl₃), >99% ee (enantiómero *R*), por hidrólisis enzimática

3-Amino-3-(4-bifenil)propanoato de metilo (21f)



Fórmula Molecular: C₁₆H₁₇NO₂

Aspecto físico: Sólido blanco

Peso molecular: 255.13 g/mol

R_f (30% MeOH/AcOEt): 0.48

PF: 70-71 °C

IR (KBr): ν 694, 731, 770, 832, 855, 892, 942, 1010, 1136, 1250, 1299, 1315, 1441, 1486, 1723, 2891, 2950, 2999, 3029, 3264, 3349 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.60-7.56 (m, 4H, H₇+H₁₀), 7.50-7.41 (m, 4H, H₆+H₁₁), 7.37-7.31 (m, 1H, H₁₂), 4.48 (t, 1H, *J* 6.9, H₃), 3.70 (s, 3H, H₄), 2.72 (d, 2H, *J* 6.9, H₂), 1.90 (s, 2H, NH₂)

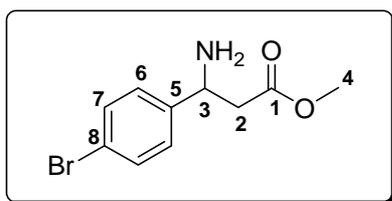
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 172.3 (C₁), 143.6 (C₅), 140.6, 140.3 (C₈+C₉), 128.7, 127.2, 127.1, 126.9, 126.5 (2C₆+2C₇+2C₁₀+2C₁₁+C₁₂), 52.2 (C₃), 51.5 (C₄), 43.8 (C₂)

EM (APCI⁺, *m/z*): 256 [(M+H)⁺, 10%], 239 [(M-NH₂)⁺, 15%], 197 [(M-CO₂Me+H)⁺, 100%]

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = -6.8$ (c 1.0, MeOH), 84% ee (enantiómero *R*), por hidrólisis enzimática

Parte experimental

3-Amino-3-(4-bromofenil)propanoato de metilo (21g)



Fórmula Molecular: C₁₀H₁₂BrNO₂

Aspecto físico: Sólido blanco

Peso molecular: 257.01 g/mol

R_f (30% MeOH/AcOEt): 0.48

PF: 41-43 °C

IR (KBr): ν 529, 733, 824, 892, 953, 1006, 1076, 1127, 1247, 1288, 1307, 1336, 1436, 1489, 1725, 2847, 2897, 2955, 2977, 3183, 3269, 3340 cm⁻¹

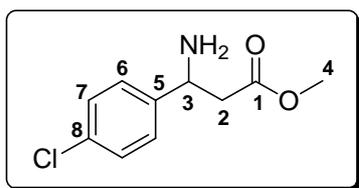
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.46-7.42 (m, 2H, H₇), 7.26-7.21 (m, 2H, H₆), 4.38 (t, 1H, *J* 6.8, H₃), 3.66 (s, 3H, H₄), 2.62 (d, 2H, *J* 6.8, H₂), 1.88 (s, 2H, NH₂)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 172.0 (C₁), 143.4 (C₅), 131.6 (2C, C₇), 127.9 (2C, C₆), 121.1 (C₈), 52.0 (C₃), 51.6 (C₄), 43.6 (C₂)

EM (APCI⁺, *m/z*): 258 [(M⁸¹Br-H)⁺, 10%], 256 [(M⁷⁹Br-H)⁺, 10%], 199 [(M⁸¹Br-H-CO₂Me)⁺, 97%], 197 [(M⁷⁹Br-H-CO₂Me)⁺, 100%]

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +23.1$ (c 1.0, CHCl₃), 99% ee (enantiómero *R*), por hidrólisis enzimática

3-Amino-3-(4-clorofenil)propanoato de metilo (21h)



Fórmula Molecular: C₁₀H₁₂ClNO₂

Aspecto físico: Aceite amarillento

Peso molecular: 213.06 g/mol

R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂): 0.50

IR (NaCl): ν 733, 830, 912, 1014, 1090, 1172, 1199, 1316, 1412, 1436, 1491, 1594, 1734, 2952, 2999, 3314, 3380 cm⁻¹

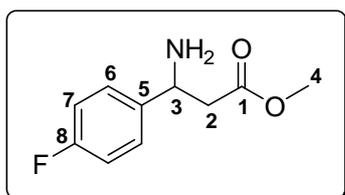
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.29 (s, 4H, Ar), 4.39 (t, 1H, *J* 6.9, H₃), 3.67 (s, 3H, H₄), 2.62 (d, 2H, *J* 6.9, H₂), 1.73 (s, 2H, NH₂)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 172.1 (C₁), 143.0 (C₅), 133.0 (C₈), 128.7 (2C, C₇), 127.5 (2C, C₆), 51.9 (C₃), 51.6 (C₄), 43.8 (C₂)

EM (ESI⁺, *m/z*): 238 [(M³⁷Cl+Na)⁺, 3%], 236 [(M³⁵Cl+Na)⁺, 10%], 216 [(M³⁷Cl+H)⁺, 33%], 214 [(M³⁵Cl+H)⁺, 100%], 199 [(M³⁷Cl-NH₂)⁺, 7%], 197 [(M³⁵Cl-NH₂)⁺, 20%]

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +17.8$ (c 1.0, CHCl₃), >99% ee (enantiómero *R*), por hidrólisis enzimática

3-Amino-3-(4-fluorofenil)propanoato de metilo (21i)



Fórmula Molecular: C₁₀H₁₂FNO₂

Aspecto físico: Aceite amarillento

Peso molecular: 197.09 g/mol

R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂): 0.53

IR (NaCl): ν 838, 1016, 1159, 1174, 1221, 1316, 1510, 1604, 1734, 2954, 3003, 3314, 3380 cm⁻¹

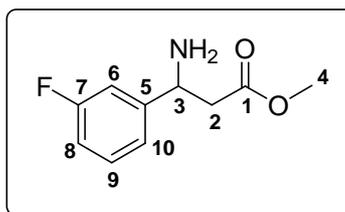
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.34-7.30 (m, 2H, H₆), 7.03-6.98 (m, 2H, H₇), 4.41 (t, 1H, *J* 6.8, H₃), 3.66 (s, 3H, H₄), 2.62 (d, 2H, *J* 6.8, H₂), 1.73 (s, 2H, NH₂)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 172.2 (C₁), 161.9 (d, *J* 975, C₈), 140.3 (d, *J* 13, C₅), 127.7 (d, 2C, *J* 31, C₆), 115.3 (d, 2C, *J* 85, C₇), 51.9 (C₃), 51.6 (C₄), 43.9 (C₂)

EM (ESI⁺, *m/z*): 220 [(M+Na)⁺, 10%], 198 [(M+H)⁺, 100%], 181 [(M-NH₂)⁺, 25%]

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +18.5$ (c 1.0, CHCl₃), 99% ee (enantiómero *R*), por hidrólisis enzimática

3-Amino-3-(3-fluorofenil)propanoato de metilo (21j)



Fórmula Molecular: C₁₀H₁₂FNO₂

Aspecto físico: Aceite amarillento

Peso molecular: 197.09 g/mol

R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂): 0.61

IR (NaCl): ν 783, 873, 1021, 1173, 1200, 1248, 1316, 1361, 1437, 1487, 1590, 1616, 1732, 2954, 3002, 3314, 3382 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.32-7.24 (m, 1H, H₉), 7.13-7.06 (m, 2H, H₆+H₁₀), 6.97-6.90 (m, 1H, H₈), 4.40 (dd, 1H, *J* 7.9 y 5.7, H₃), 3.67 (s, 3H, H₄), 2.64-2.62 (m, 2H, H₂), 1.75 (s, 2H, NH₂)

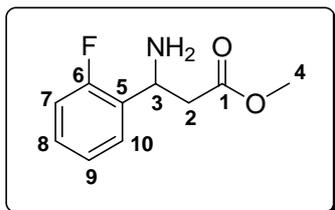
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 172.1 (C₁), 162.9 (d, *J* 978, C₇), 147.2 (d, *J* 26, C₅), 130.0 (d, *J* 33, C₉), 121.7 (d, *J* 11, C₁₀), 114.2 (d, *J* 85, C₈), 113.1 (d, *J* 87, C₆), 52.1 (d, *J* 7, C₃), 51.6 (C₄), 43.7 (C₂)

EM (ESI⁺, *m/z*): 220 [(M+Na)⁺, 15%], 198 [(M+H)⁺, 100%], 181 [(M-NH₂)⁺, 2%]

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +16.2$ (c 1.0, CHCl₃), 99% ee (enantiómero *R*), por hidrólisis enzimática

Parte experimental

3-Amino-3-(2-fluorofenil)propanoato de metilo (21k)



Fórmula Molecular: C₁₀H₁₂FNO₂

Aspecto físico: Aceite amarillento

Peso molecular: 197.09 g/mol

R_f (10% MeOH/CH₂Cl₂): 0.61

IR (NaCl): ν 760, 830, 919, 1020, 1104, 1175, 1199, 1218, 1318, 1357, 1438, 1454, 1489, 1585, 1736, 2954, 3314, 3382 cm⁻¹

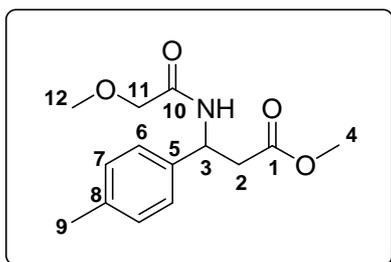
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.41 (dt, 1H, *J* 7.5 y 1.7, H₈), 7.25-7.19 (m, 1H, H₁₀), 7.12 (dt, 1H, *J* 7.5 y 1.1, H₉), 7.01 (ddd, 1H, *J* 10.7, 8.0 y 1.3, H₇), 4.65 (dd, 1H, *J* 8.5 y 5.0, H₃), 3.67 (s, 3H, H₄), 2.79-2.64 (m, 2H, H₂), 1.79 (s, 2H, NH₂)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 172.1 (C₁), 160.2 (d, *J* 978, C₆), 131.3 (d, *J* 52, C₅), 128.7 (d, *J* 35, C₁₀), 127.4 (d, *J* 20, C₈), 124.3 (d, *J* 13, C₉), 115.5 (d, *J* 87, C₇), 51.6 (C₄), 47.0 (d, *J* 9, C₃), 42.2 (d, *J* 7, C₂)

EM (APCI⁺, *m/z*): 198 [(M+H)⁺, 100%], 181 [(M-NH₂)⁺, 12%]

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +21.5$ (c 1.0, CHCl₃), 97% ee (enantiómero *R*), por hidrólisis enzimática

3-(4-Metilfenil)-3-(2-metoxiacetamido)propanoato de metilo (22b)



Fórmula Molecular: C₁₄H₁₉NO₄

Aspecto físico: Sólido amarillo pálido

Peso molecular: 265.13 g/mol

R_f (70% AcOEt/hexano): 0.38

PF: 49-50 °C

IR (KBr): ν 727, 781, 810, 825, 855, 864, 975, 991, 1009, 1064, 1111, 1160, 1200, 1259, 1343, 1369, 1433, 1451, 1536, 1651, 1722, 2829, 2853, 2924, 2995, 3298 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.35 (da, 1H, *J* 8.3, NH), 7.21-7.12 (m, 4H, Ar), 5.43 (dt, 1H, *J* 8.3 y 6.3, H₃), 3.90 (s, 1H, H₁₁), 3.91 (s, 1H, H₁₁), 3.62 (s, 3H, H₄), 3.41 (s, 3H, H₁₂), sistema AB ($\delta_A=2.94$, $\delta_B=2.83$, $|^2J_{A,B}|$ 15.6, $^3J_{HH}$ 6.3, 2H, H₂), 2.32 (s, 3H, H₉)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 171.2 (C₁), 168.7 (C₁₀), 137.3-137.2 (2C, C₅+C₈), 129.3 (2C, C₇), 126.1 (2C, C₆), 71.9 (C₁₁), 59.1 (C₁₂), 51.7 (C₄), 48.7 (C₃), 40.0 (C₂), 20.9 (C₉)

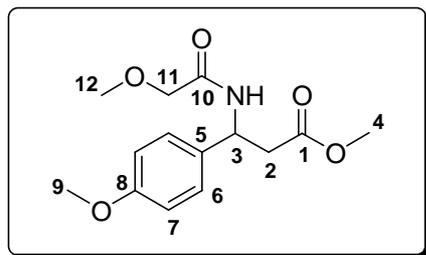
EM (ESI⁺, *m/z*): 288 [(M+Na)⁺, 100%], 135 [(M-COCH₂OCH₃-CO₂Me+2H)⁺, 50%]

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OD	Eluyente: hexano/2-propanol (90:10)
Temperatura: 20 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (-)-(R): 16.1 min	t_R (+)-(S): 19.1 min

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +49.9$ (c 1.0, CHCl₃), 99% ee (enantiómero R), por hidrólisis enzimática y posterior derivatización

Parte experimental

3-(2-Metoxi)acetamido-3-(4-metoxi)fenilpropanoato de metilo (22c)



Fórmula Molecular: C₁₄H₁₉NO₅

Aspecto físico: Sólido amarillo pálido

Peso molecular: 281.13 g/mol

R_f (70% AcOEt/hexano): 0.29

PF: 74-75 °C

IR (KBr): ν 730, 825, 846, 880, 924, 982, 1031, 1076, 1110, 1116, 1165, 1181, 1229, 1254, 1293, 1370, 1431, 1448, 1519, 1532, 1614, 1655, 1732, 2843, 2948, 2996, 3356 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.32 (da, 1H, *J* 8.4, NH), 7.23 (d, 2H, *J* 8.7, H₆), 6.86 (d, 2H, *J* 8.7, H₇), 5.41 (dt, 1H, *J* 8.4 y 6.2, H₃), 3.90 (s, 1H, H₁₁), 3.89 (s, 1H, H₁₁), 3.78 (s, 3H, H₉), 3.62 (s, 3H, H₄), 3.41 (s, 3H, H₁₂), sistema AB ($\delta_A=2.94$, $\delta_B=2.82$, 2H, $|^2J_{A,B}|$ 15.5, $^3J_{HH}$ 6.2, H₂)

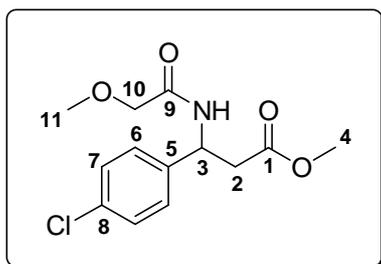
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 171.2 (C₁), 168.7 (C₁₀), 159.0 (C₈), 132.4 (C₅), 127.4 (2C, C₆), 114.0 (2C, C₇), 71.9 (C₁₁), 59.1 (C₁₂), 55.2 (C₉), 51.7 (C₄), 48.4 (C₃), 40.0 (C₂)

EM (ESI⁺, *m/z*): 304 [(M+Na)⁺, 85%], 151 [(M-COCH₂OCH₃-CO₂Me+2H)⁺, 100%]

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OD	Eluyente: hexano/2-propanol (90:10)
Temperatura: 20 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (+)-(R): 25.6 min	t_R (-)-(S): 28.9 min

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +61.7$ (c 1.0, CHCl₃), 88% ee (enantiómero R), por hidrólisis enzimática y posterior derivatización

3-(4-Cloro)fenil-3-(2-metoxi)acetamidopropanoato de metilo (22h)



Fórmula Molecular: C₁₃H₁₆ClNO₄

Aspecto físico: Sólido amarillo pálido

Peso molecular: 285.08 g/mol

R_f (70% AcOEt/hexano): 0.41

PF: 74-75 °C

IR (KBr): ν 723, 828, 876, 989, 1017, 1070, 1093, 1108, 1120, 1159, 1206, 1233, 1257, 1299, 1358, 1432, 1534, 1539, 1653, 1729, 2951, 3001, 3332 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.48 (da, 1H, *J* 8.4, NH_i), 7.31-7.22 (m, 4H, Ar), 5.43 (dt, 1H, *J* 8.4 y 6.1, H₃), 3.90 (s, 2H, H₁₀), 3.62 (s, 3H, H₁₁), 3.42 (s, 3H, H₄), sistema AB ($\delta_A=2.92$, $\delta_B=2.83$, 2H, $|^2J_{A,B}|$ 15.9, $^3J_{HH}$ 6.1, H₂)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 171.0 (C₁), 168.8 (C₉), 138.8 (C₅), 133.4 (C₈), 128.8 (2C, C₇), 127.7 (2C, C₆), 71.8 (C₁₀), 59.2 (C₁₁), 51.8 (C₄), 48.2 (C₃), 39.7 (C₂)

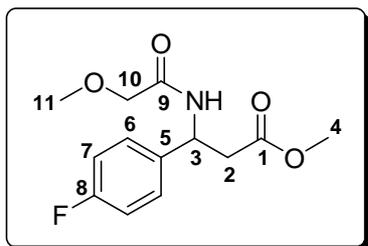
EM (ESI⁺, m/z): 310 [(M³⁷Cl+Na)⁺, 5%], 308 [(M³⁵Cl+Na)⁺, 15%], 288 [(M³⁷Cl+H)⁺, 33%], 286 [(M³⁵Cl+H)⁺, 100%]

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OD	Eluyente: hexano/2-propanol (90:10)
Temperatura: 37 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (+)-(R): 13.2 min	t_R (-)-(S): 15.2 min

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +57.1$ (c 1.0, CHCl₃), >99% ee (enantiómero R), por hidrólisis enzimática y posterior derivatización

Parte experimental

3-(4-Fluoro)fenil-3-(2-metoxi)acetamidopropanoato de metilo (22i)



Fórmula Molecular: C₁₃H₁₆FNO₄

Aspecto físico: Sólido amarillo pálido

Peso molecular: 269.11 g/mol

R_f (70% AcOEt/hexano): 0.26

PF: 70-71 °C

IR (KBr): ν 751, 838, 880, 920, 982, 1007, 1073, 1110, 1164, 1191, 1221, 1298, 1369, 1429, 1514, 1531, 1607, 1652, 1735, 2833, 2950, 2996, 3353 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.44 (d, 1H, *J* 8.1, NH), 7.30-7.25 (m, 2H, H₆), 7.04-6.98 (m, 2H, H₇), 5.44 (dt, 1H, *J* 8.1 y 6.1, H₃), 3.90 (s, 2H, H₁₀), 3.62 (s, 3H, H₁₁), 3.42 (s, 3H, H₄), sistema AB ($\delta_A=2.95$, $\delta_B=2.82$, 2H, $|^2J_{A,B}|$ 15.8, $^3J_{HH}$ 6.1, H₂)

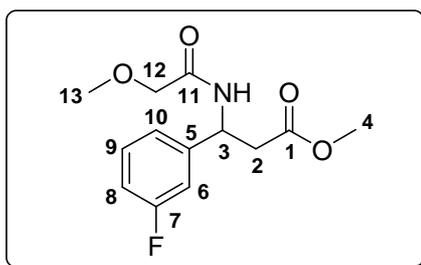
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 171.1 (C₁), 168.8 (C₉), 162.1 (d, *J* 980, C₈), 136.1 (d, *J* 13, C₅), 127.9 (d, 2C, *J* 33, C₆), 115.5 (d, 2C, *J* 85, C₇), 71.8 (C₁₀), 59.1 (C₁₁), 51.8 (C₄), 48.3 (C₃), 39.9 (C₂)

EM (ESI⁺, *m/z*): 292 [(M+Na)⁺, 15%], 270 [(M+H)⁺, 100%]

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralpak IA	Eluyente: hexano/2-propanol (80:20)
Temperatura: 20 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (+)-(R): 11.0 min	t_R (-)-(S): 16.0 min

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +36.3$ (c 1.0, CHCl₃), 99% ee (enantiómero R), por hidrólisis enzimática y posterior derivatización

3-(3-Fluoro)fenil-3-(2-metoxi)acetamidopropanoato de metilo (22j)



Fórmula Molecular: C₁₃H₁₆FNO₄

Aspecto físico: Sólido amarillo pálido

Peso molecular: 269.11 g/mol

R_f (70% AcOEt/hexano): 0.31

PF: 88-89 °C

IR (KBr): ν 705, 800, 851, 879, 904, 982, 1021, 1058, 1078, 1096, 1115, 1145, 1166, 1197, 1247, 1262, 1300, 1438, 1538, 1591, 1615, 1656, 1732, 2833, 2858, 2955, 2991, 3331 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.51 (da, 1H, *J* 8.5, NH), 7.33-7.25 (m, 1H, H₉), 7.10-6.92 (m, 3H, H₆+H₈+H₁₀), 5.46 (dt, 1H, *J* 8.5 y 6.0, H₃), 3.92 (s, 2H, H₁₂), 3.63 (s, 3H, H₄), 3.44 (s, 3H, H₁₃), sistema AB ($\delta_A=2.93$, $\delta_B=2.84$, 2H, $|^2J_{A,B}|$ 15.8, $^3J_{HH}$ 6.0, H₂)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 171.0 (d, *J* 7, C₁), 168.9 (C₁₁), 162.9 (d, *J* 980, C₇), 142.9 (d, *J* 26, C₅), 130.2 (d, *J* 33, C₉), 121.9 (d, *J* 11, C₁₀), 114.6 (d, *J* 85, C₆), 113.3 (d, *J* 87, C₈), 71.8 (C₁₂), 59.2 (C₁₃), 51.8 (C₄), 48.3 (d, *J* 7, C₃), 39.7 (C₂)

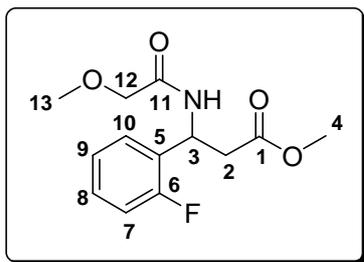
EM (ESI⁺, m/z): 292 [(M+Na)⁺, 10%], 270 [(M+H)⁺, 100%]

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OD	Eluyente: hexano/2-propanol (90:10)
Temperatura: 20 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (+)-(R): 18.6 min	t_R (-)-(S): 21.5 min

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +39.3$ (c 1.0, CHCl₃), 99% ee (enantiómero R), por hidrólisis enzimática y posterior derivatización

Parte experimental

3-(2-Fluoro)fenil-3-(2-metoxi)acetamidopropanoato de metilo (22k)



Fórmula Molecular: C₁₃H₁₆FNO₄

Aspecto físico: Sólido amarillo pálido

Peso molecular: 269.11 g/mol

R_f (70% AcOEt/hexano): 0.33

PF: 89-90 °C

IR (KBr): ν 768, 800, 912, 998, 1068, 1121, 1172, 1181, 1192, 1209, 1235, 1276, 1354, 1369, 1426, 1442, 1453, 1488, 1541, 1657, 1738, 2827, 2899, 2936, 2954, 3002, 3328 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.54 (da, 1H, *J* 8.7, NH), 7.35-7.21 (m, 2H, H₈+H₁₀), 7.12-7.00 (m, 2H, H₇+H₉), 5.65 (dt, 1H, *J* 8.7 y 6.3, H₃), 3.90 (s, 1H, H₁₂), 3.89 (s, 1H, H₁₂), 3.60 (s, 3H, H₄), 3.43 (s, 3H, H₁₃), sistema AB ($\delta_A=2.96$, $\delta_B=2.86$, 2H, $|^2J_{A,B}|$ 15.6, $^3J_{HH}$ 6.3, H₂)

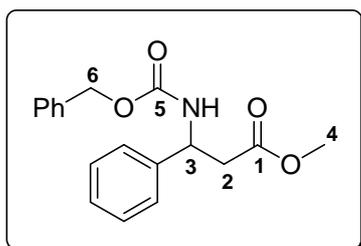
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 170.9 (C₁), 168.7 (C₁₁), 160.4 (d, *J* 975, C₆), 129.4 (d, *J* 33, C₁₀), 128.6 (d, *J* 17, C₈), 127.1 (d, *J* 52, C₅), 124.2 (d, *J* 13, C₉), 115.7 (d, *J* 85, C₇), 71.8 (C₁₂), 59.2 (C₁₃), 51.7 (C₄), 45.1 (C₃), 39.2 (C₂)

EM (ESI⁺, *m/z*): 292 [(M+Na)⁺, 5%], 270 [(M+H)⁺, 100%]

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OD	Eluyente: hexano/2-propanol (95:5)
Temperatura: 20 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (+)-(R): 25.3 min	t_R (-)-(S): 28.9 min

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +43.0$ (c 1.0, CHCl₃), 97% ee (enantiómero R), por hidrólisis enzimática y posterior derivatización

3-(*N*-Benciloxycarbonil)amino-3-fenilpropanoato de metilo (23a)



Fórmula Molecular: C₁₈H₁₉NO₄

Aspecto físico: Sólido amarillo pálido

Peso molecular: 313.13 g/mol

R_f (70% AcOEt/hexano): 0.74

PF: 66-67 °C

IR (KBr): ν 752, 914, 989, 1026, 1033, 1089, 1172, 1229, 1249, 1294, 1380, 1439, 1456, 1494, 1517, 1538, 1720, 2925, 2960, 3031, 3062, 3085, 3377 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.37-7.24 (m, 10H, Ar), 5.81 (sa, 1H, NH), 5.22-5.05 (m, 3H, H₃+H₆), 3.60 (s, 3H, H₄), 2.95-2.80 (m, 2H, H₂)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 171.1 (C₁), 155.5 (C₅), 140.7, 136.3 (2C, C_{ipso}), 128.6, 128.4, 128.0, 127.6, 126.0 (10C, Ar), 66.8 (C₆), 51.7, 51.5 (2C, C₃+C₄), 40.4 (C₂)

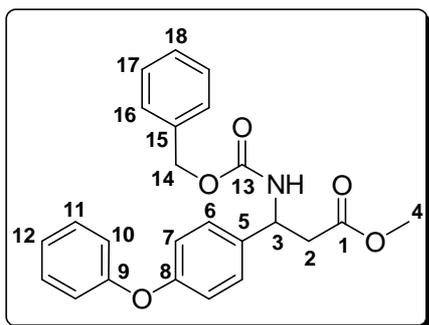
EM (APCI⁺, m/z): 314 [(M+H)⁺, 100%]

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OD	Eluyente: hexano/2-propanol (90:10)
Temperatura: 20 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (-)-(S): 23.7 min	t_R (+)-(R): 29.6 min

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +18.2$ (c 1.0, CHCl₃), ee>99% (enantiómero *R*), hidrólisis enzimática y posterior derivatización

Parte experimental

3-(*N*-Benciloxicarbonil)amino-3-(4-fenoxi)fenilpropanoato de metilo (23d)



Fórmula Molecular: C₂₄H₂₃NO₅

Aspecto físico: Sólido amarillo pálido

Peso molecular: 405.16 g/mol

R_f (70% AcOEt/hexano): 0.78

PF: 87-88 °C

IR (KBr): ν 751, 828, 1052, 1167, 1247, 1264, 1424, 1436, 1488, 1508, 1528, 1589, 1689, 1737, 2950, 3037, 3358 cm⁻¹

¹H-RMN (MeOD, 300.13 MHz): δ 7.39-7.34 (m, 9H, H₆+H₁₁+H₁₆+H₁₇+H₁₈), 7.13 (tt, 1H, *J* 7.4 y 1.0, H₁₂), 7.00-6.94 (m, 4H, H₇+H₁₀), 5.17-5.03 (m, 3H, H₃+H₁₄), 3.64 (s, 3H, H₄), 2.92-2.76 (m, 2H, H₂)

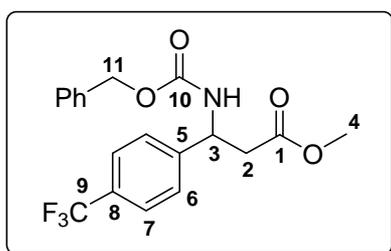
¹³C-RMN (MeOD, 75.5 MHz): δ 173.2 (C₁), 159.1, 158.6, 158.5 (C₈+C₉+C₁₃), 138.8, 138.5 (C₅+C₁₅), 131.4, 129.9, 129.5, 129.4 (8C, C₆+C₁₁+C₁₆+C₁₇), 129.3 (C₁₈), 125.0 (C₁₂), 120.4, 120.3 (4C, C₇+C₁₀), 68.0 (C₁₄), 53.3 (C₃), 52.7 (C₄), 42.5 (C₂)

EM (ESI⁺, *m/z*): 429 [(M+Na+H)⁺, 25%], 428 [(M+Na)⁺, 100%]

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OD	Eluyente: hexano/2-propanol (80:20)
Temperatura: 20 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (+)-(<i>R</i>): 17.6 min	t_R (-)-(<i>S</i>): 20.4 min

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +20.5$ (c 1.0, CHCl₃), 98% ee (enantiómero *R*), por hidrólisis enzimática y posterior derivatización

3-(*N*-Benciloxicarbonil)amino-3-(4-trifluorometil)fenilpropanoato de metilo (23e)



Fórmula Molecular: C₁₉H₁₈F₃NO₄

Aspecto físico: Sólido amarillo pálido

Peso molecular: 381.12 g/mol

R_f (70% AcOEt/hexano): 0.71

PF: 120-121 °C

IR (KBr): ν 758, 858, 1017, 1048, 1066, 1113, 1160, 1176, 1267, 1279, 1327, 1347, 1368, 1415, 1436, 1553, 1687, 1788, 1750, 2953, 3071, 3301 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.59 (d, 2H, *J* 7.6, H₇), 7.42 (d, 2H, *J* 7.6, H₆), 7.34 (sa, 5H, Ph), 5.92 (sa, 1H, NH), 5.22-5.05 (m, 3H, H₃+H₁₁), 3.61 (s, 3H, H₄), 2.89 (s, 1H, H₂), 2.87 (s, 1H, H₂)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 170.9 (C₁), 155.5 (C₁₀), 144.9 (C₅), 136.1 (C_{ipso} Ph), 128.5, 128.2, 128.1, 126.5 (10C, C₆+C₇+C₈+4C_{Ph}), 125.7 (c, J13, C₉), 67.0 (C₁₁), 51.9 (C₄), 51.2 (C₃), 40.0 (C₂)

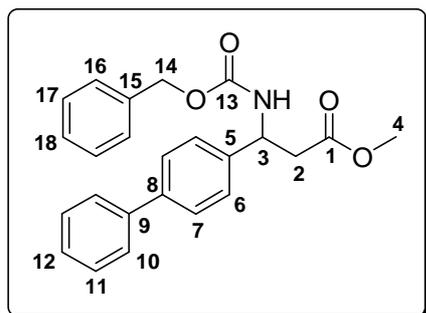
EM (ESI⁺, *m/z*): 405 [(M+Na+H)⁺, 22%], 404 [(M+Na)⁺, 100%]

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralpak IA	Eluyente: hexano/2-propanol (85:15)
Temperatura: 20 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (+)-(R): 18.7 min	t_R (-)-(S): 22.3 min

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +8.8$ (c 1.0, CHCl₃), ee>99% (enantiómero R), hidrólisis enzimática y posterior derivatización

Parte experimental

3-(*N*-Benciloxycarbonil)amino-3-(4-bifenil)propanoato de metilo (23f)



Fórmula Molecular: C₂₄H₂₃NO₄

Aspecto físico: Sólido amarillo pálido

Peso molecular: 389.16 g/mol

R_f (70% AcOEt/hexano): 0.69

PF: 154-155 °C

IR (KBr): ν 728, 755, 769, 853, 906, 977, 1012, 1022, 1071, 1132, 1163, 1233, 1257, 1280, 1298, 1437, 1450, 1487, 1518, 1690, 1735, 2949, 2998, 3031, 3069, 3380 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.59-7.7.55 (m, 4H, H₇+H₁₀), 7.46-7.35 (m, 10H, H₆+H₈+H₁₁+H₁₂+H₁₆+H₁₇), 5.84 (sa, 1H, NH), 5.27-5.20 (m, 1H, H₃), 5.13 (s, 1H, H₁₄), 5.12 (s, 1H, H₁₄), 3.63 (s, 3H, H₄), 2.99-2.84 (m, 2H, H₂)

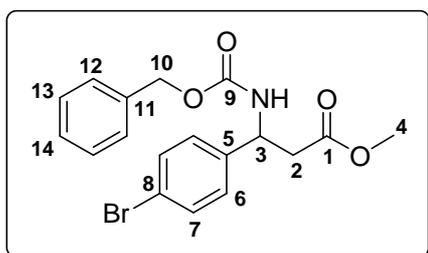
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 171.2 (C₁), 155.5 (C₁₃), 140.5, 139.7, 136.3, 128.7, 128.4, 128.0, 127.4, 127.3, 127.0, 126.5 (18C, Ar), 66.8 (C₁₄), 51.7 (C₄), 51.3 (C₃), 40.3 (C₂)

EM (ESI⁺, m/z): 413 [(M+H+Na)⁺, 25%], 412 [(M+Na)⁺, 100%]

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralpak IA	Eluyente: hexano/2-propanol (85:15)
Temperatura: 20 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (+)-(R): 23.1 min	t_R (-)-(S): 28.8 min

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +25.6$ (c 1.0, CHCl₃), 84% ee (enantiómero R), hidrólisis enzimática y posterior derivatización

**3-(*N*-Benciloxycarbonil)amino-3-(4-bromo)fenilpropanoato de metilo
(23g)**



Fórmula Molecular: C₁₈H₁₈BrNO₄

Aspecto físico: Sólido amarillo pálido

Peso molecular: 391.04 g/mol

R_f (70% AcOEt/hexano): 0.71

PF: 50-51 °C

IR (KBr): ν 756, 850, 915, 1009, 1048, 1070, 1173, 1232, 1266, 1345, 1363, 1437, 1489, 1550, 1689, 1710, 1748, 2954, 3029, 3064, 3088, 3301 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.45 (d, 2H, *J* 8.4, H₇), 7.33 (s, 5H, Ph), 7.17 (d, 2H, *J* 8.4, H₆), 5.83 (sa, 1H, NH), 5.14-5.04 (m, 3H, H₃+H₁₀), 3.61 (s, 3H, H₄), 2.91-2.77 (m, 2H, H₂)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 171.0 (C₁), 155.5 (C₉), 139.9 (C₅), 136.2 (C₁₁), 131.7 (2C, C₇), 128.4, 128.1, 128.0, 127.8 (7C, C₆+C₁₂+C₁₃+C₁₄), 121.5 (C₈), 66.9 (C₁₀), 51.8 (C₄), 51.1 (C₃), 40.1 (C₂)

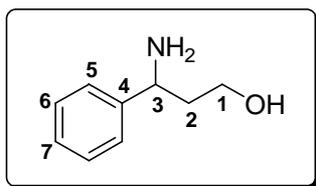
EM (ESI⁺, *m/z*): 417 [(M⁸¹Br+Na+H)⁺, 19%], 416 [(M⁸¹Br+Na)⁺, 92%], 415 [(M⁷⁹Br+Na+H)⁺, 20%], 414 [(M⁷⁹Br+Na)⁺, 100%]

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralpak IA	Eluyente: hexano/2-propanol (85:15)
Temperatura: 20 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (+)-(R): 22.3 min	t_R (-)-(S): 25.6 min

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +17.8$ (c 1.0, CHCl₃), 99% ee (enantiómero R), hidrólisis enzimática y posterior derivatización

Parte experimental

3-Amino-3-fenilpropan-1-ol (24)



Fórmula Molecular: C₉H₁₃NO

Aspecto físico: Sólido blanco

Peso molecular: 151.10 g/mol

R_f (100% MeOH): 0.17

PF: 68-69 °C

IR (KBr): ν 3347, 3280, 3130, 2940, 2922, 2846, 1600, 1493, 1457, 1430, 1371, 1154, 1081, 1062, 1050, 961, 762, 702 cm⁻¹

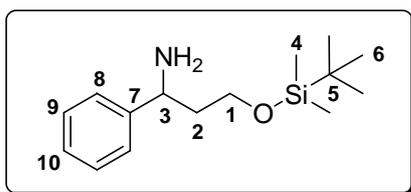
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.38-7.23 (m, 5H, Ar), 4.13 (dd, 1H, *J* 5.2 y 7.9, H₃), 3.87-3.75 (m, 2H, H₁), 2.72 (sa, 3H, NH₂ y OH), 1.98-1.82 (m, 2H, H₂)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 146.0 (C₄), 128.6 (2C, C₅), 127.1 (C₇), 125.6 (2C, C₆), 62.1 (C₁), 56.5 (C₃), 39.4 (C₂)

EM (ESI⁺, *m/z*): 285 [(2M-H₂O+H)⁺, 45%], 174 [(M+Na)⁺, 5%], 152 [(M+H)⁺, 100%]

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = -21.8$ (c 1.0, CHCl₃), 98% ee (enantiómero S)

3-Amino-O-*tert*-butildimetilsilil-3-fenilpropan-1-ol (25)



Fórmula Molecular: C₁₅H₂₇NOSi

Aspecto físico: Aceite amarillo

Peso molecular: 265.19 g/mol

R_f (20% MeOH/AcOEt): 0.31

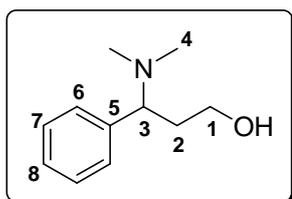
IR (NaCl): ν 775, 835, 938, 1099, 1256, 1360, 1388, 1454, 1463, 1472, 1492, 1602, 2856, 2928, 2954, 3027, 3062, 3297, 3377 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.35-7.20 (m, 5H, Ar), 4.10 (t, 1H, *J* 6.1, H₃), 3.73-3.56 (m, 2H, H₁), 1.91-1.84 + 1.76 (m + sa, 4H, H₂+NH₂), 0.90 (s, 9H, H₆), 0.04 (s, 3H, H₄), 0.03 (s, 3H, H₄)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 146.3 (C₇), 128.3, 126.3 (4C, C₈+C₉), 126.8 (C₁₀), 60.7 (C₁), 53.4 (C₃), 42.0 (C₂), 25.8 (3C, C₆), 18.2 (C₅), -5.5 (2C, C₄)

EM (ESI⁺, *m/z*): 266 [(M+H)⁺, 100%], 145 [(CH₂OTBDMS)⁺, 20%]

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +0.8$ (c 1.0, CHCl₃) ee 98% (enantiómero S)

3-(*N,N*-Dimetilamino)-3-fenilpropan-1-ol (26)**Fórmula Molecular:** C₁₁H₁₇NO**Aspecto físico:** Aceite amarillento**Peso molecular:** 179.13 g/mol**R_f** (60% MeOH/ AcOEt): 0.20

IR (NaCl): ν 704, 737, 772, 922, 1049, 1163, 1267, 1363, 1456, 1598, 2715, 2782, 2830, 2869, 2949, 3031, 3061, 3370 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.39-7.31 (m, 3H, Ar), 7.27-7.20 (m, 2H, Ar), 6.41 (sa, 1H, OH), 3.94 (dd, 1H, *J* 8.5 y 5.9, H₃), 3.80-3.73 (m, 1H, H₁), 3.70-3.60 (m, 1H, H₁), 2.47-2.34 (m, 1H, H₂), 2.29 (s, 6H, H₄), 1.89-1.80 (m, 1H, H₂)

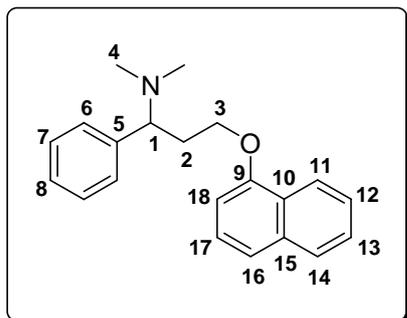
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 134.7 (C₅), 129.1 (2C, C₇), 128.2 (2C, C₆), 128.2 (C₈), 68.6 (C₃), 61.2 (C₁), 40.6 (C₄), 32.7 (C₂)

EM (ESI⁺, *m/z*): 202 [(M+Na)⁺, 5%], 180 [(M+H)⁺, 100%]

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +36.8$ (c 1.0, CHCl₃), 98% ee (enantiómero S)

Parte experimental

***N,N*-Dimetil-1-fenil-3-(naftalen-1-iloxi)propan-1-amina (Dapoxetina, 18)**



Fórmula Molecular: C₂₁H₂₃NO

Aspecto físico: Aceite naranja

Peso molecular: 305.18 g/mol

R_f (20% MeOH/AcOEt): 0.46

IR (NaCl): ν 770, 792, 1021, 1068, 1100, 1156, 1178, 1239, 1270, 1389, 1404, 1460, 1508, 1580, 1595, 1724, 2776, 2820, 2955, 3055 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): 8.28-8.23 (m, 1H, H₁₁), 7.81-7.78 (m, 1H, H₁₄), 7.51-7.47 (m, 2H, H₁₂+H₁₃), 7.34-7.26 (m, 7H, 2H₆+2H₇+H₈+H₁₆+H₁₇), 6.66 (d, 1H, *J* 7.6, H₁₈), 4.12-4.05 (m, 1H, H₃), 3.95-3.87 (m, 1H, H₃), 3.79 (dd, 1H, *J* 9.3 y 5.4, H₁), 2.71-2.60 (m, 1H, H₂), 2.36-2.24 (m, 1H, H₂), 2.27 (s, 6H, H₄)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): 154.5 (C₉), 139.4 (C₅), 134.4 (C₁₅), 128.5 (2C, C₇), 128.1 (2C, C₆), 127.3, 127.2, 126.2, 125.8, 125.6, 125.0 (C₈+C₁₀+C₁₂+C₁₃+C₁₄+C₁₇), 121.9 (C₁₁), 119.9 (C₁₆), 104.5 (C₁₈), 67.6 (C₁), 65.5 (C₃), 42.7 (2C, C₄), 32.9 (C₂)

EM (ESI⁺, *m/z*): 306 [(M+H)⁺, 100%], 261 [(M-NMe₂)⁺, 35%]

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OJ-H	Eluyente: hexano/2-propanol (90:10)
Temperatura: 20 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (+)-(S): 12.1 min	t_R (-)-(R): 18.1 min

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +71.4$ (c 1.0, CHCl₃), 98% ee (enantiómero S)

CAPÍTULO 4

***Síntesis estereoselectiva de α -aminoésteres
cíclicos mediante procesos de resolución
cinética***

ANTECEDENTES

De entre toda la familia de compuestos nitrogenados ópticamente activos, probablemente los derivados de prolina, ácido piperídico, alcaloides indólicos y penicilinas han recibido una mayor atención, debido a sus variadas aplicaciones tanto en organocatálisis asimétrica como en tratamientos terapéuticos. Sin duda, para llevar a cabo su preparación de un modo asimétrico, los procesos biocatalíticos han resultado ser herramientas de muy eficaces.²⁰⁶ Así, las hidrolasas han mostrado una gran selectividad en este tipo de procesos, ofreciendo atractivas ventajas al sector industrial.²⁰⁷ Así, además de ser catalizadores de bajo coste, fácil manipulación, estables y respetuosos con el medio ambiente, permiten llevar a cabo procesos químicos limpios, bajo condiciones de reacción suaves y con un elevado grado de selectividad.²⁰⁸

Por este motivo, y una vez seleccionados los derivados del ácido octahidroindol-2-carboxílico (Oic) como objeto de estudio, y los enzimas hidrolíticos como biocatalizadores para la preparación estereoselectiva de derivados de estos aminoácidos, se presentarán en esta sección:

1. La importancia y los métodos de síntesis y de separación de los derivados de Oic.
2. El empleo de hidrolasas en la síntesis asimétrica de α -aminoésteres cíclicos.

²⁰⁶ E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3998-4035.

²⁰⁷ U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in organic synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2005**.

²⁰⁸ V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Catal. B: Enzym* **2006**, *40*, 111-120.

II.4.1.1. L-OIC Y SUS DERIVADOS

Los péptidos biológicamente activos están involucrados en un gran número de procesos fisiológicos, actuando como hormonas, inhibidores enzimáticos, neurotransmisores, antibióticos, etc.,²⁰⁹ siendo, por tanto, de gran interés en química médica.²¹⁰ Una de las razones que ha impulsado la investigación de nuevos fármacos basados en péptidos es que presentan la ventaja de causar menos problemas relacionados con la toxicología y la seguridad, dos de los principales motivos causantes del rechazo de preparados no peptídicos. Sin embargo, la aplicación terapéutica de péptidos bioactivos se encuentra limitada, en algunos casos, por su baja biodisponibilidad oral, pobre distribución a través de las membranas fisiológicas, baja estabilidad metabólica o escasa especificidad frente a ciertos receptores. Para superar estas limitaciones, los perfiles farmacocinéticos de los péptidos se han modificado tanto con estrategias químicas de optimización, como a través de nuevas vías de administración. En lo que a nuestro trabajo concierne, nos centraremos en el primero de los casos.

Así, en la búsqueda de moléculas con rasgos farmacológicos más adecuados, la modificación racional de péptidos a través de la incorporación de α -aminoácidos no proteinogénicos especialmente diseñados para un objetivo concreto, es un área muy activa de investigación,²¹¹ ya que modificando su secuencia, y por tanto su estructura secundaria, es posible modificar sus propiedades, por ejemplo, a través de un aumento de su estabilidad y selectividad.

²⁰⁹ a) *Handbook of biologically active peptides*, Ed. A. J. Kastin, Academy Press, Elsevier, Londres (Reino Unido), **2006**; b) R. P. Hicks, J. B. Bhonsle, D. Venugopal, B. W. Koser, A. J. Magill, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3026-3036.

²¹⁰ a) *Peptides as drugs. Discovery and development*, Ed. B. Groner, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2009**; b) *Peptides and protein design for biopharmaceutical applications*, Ed. K. J. Jensen, Wiley, Chichester (Reino Unido), **2009**.

²¹¹ a) J. Rizo, L. M. Gierasch, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 387-418; b) V. J. Hruby, G. Li, C. Haskell-Luevano, M. Shenderovich, *Biopolymers (Pept. Sci.)* **1997**, *43*, 219-266; c) S. E. Gibson, N. Guillo, M. J. Tozer, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 585-615; d) S. M. Cowell, Y. S. Lee, J. P. Cain, V. J. Hruby, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2785-2798; e) S. Sagan, P. Karoyan, O. Lequin, G. Chassaing, S. Lavielle, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2799-2822.

En este campo, los derivados de prolina han atraído una especial atención.²¹² Así, debido a su naturaleza cíclica pueden dotar de unas propiedades conformacionales únicas a los péptidos, definiendo a la vez su comportamiento,²¹³ por ejemplo, estabilizando la molécula frente a enzimas proteolíticos, aumentando la lipofilia o favoreciendo las uniones con el receptor. Uno de los derivados de prolina más destacados en este contexto es el ácido octahidroindol-2-carboxílico (Oic), un α -aminoácido no codificado con estructura bicíclica capaz de introducir rigidez en la molécula y, al mismo tiempo, aumentar su lipofilia (Figura 4-1). Este último factor está relacionado con la velocidad de absorción del péptido y de su distribución a través de las membranas biológicas, y por tanto, relacionado con su bioactividad.²¹⁴ Además, al tratarse de un aminoácido no natural, aumenta la resistencia del péptido a ser degradado por enzimas proteolíticos.

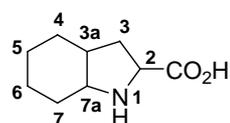


Figura 4-1. Estructura del ácido octahidroindol-2-carboxílico (Oic) y numeración tradicional de sus posiciones

Este aminoácido bicíclico está presente en el núcleo estructural de numerosos compuestos con aplicaciones en química médica como compuestos marinos con propiedades antitrombóticas;²¹⁵ en el dipéptido Perindopril, uno de los mejores medicamentos existentes en el mercado contra la hipertensión, y que también ha encontrado aplicación en la prevención de desórdenes cardiovasculares como las paradas

²¹² a) C. Cativiela, M. D. Díaz-de-Villegas, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 645-732; b) P. Karoyan, S. Sagan, O. Lequin, J. Quancard, S. Lavielle, G. Chassaing en *Targets in heterocyclic systems. Chemistry and properties*, Ed. O. A. Attanasi, D. Spinelli, Royal Society of Chemistry, Cambridge (Reino Unido), **2005**, capítulo 8, 216-273.

²¹³ a) M. W. MacArthur, J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 397-412; b) G. Vanhoof, F. Goossens, I. De Meester, D. Hendriks, S. Scharpé, *FASEB J.* **1995**, *9*, 736-744; c) B. K. Kay, M. P. Williamson, M. Sudol, *FASEB J.* **2000**, *14*, 231-241; d) H. Reiersen, A. R. Rees, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 679-684.

²¹⁴ a) H. van de Waterbeemd, H. Karajiannis, N. El Tayar, *Amino Acids* **1994**, *7*, 129-145; b) N. El Tayar, H. Karajiannis, H. van de Waterbeemd, *Amino Acids* **1995**, *8*, 125-139.

²¹⁵ a) S. Hanessian, M. Tremblay, J. F. W. Petersen, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6064-6071; b) S. Hanessian, J. R. del Valle, Y. Xue, N. J. Blomberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10491-10495; c) K. Ersmark, J. R. del Valle, S. Hanessian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1202-1223.

Antecedentes

cardíacas,²¹⁶ y en el S17092, un potente inhibidor de la prolil oligopeptidasa (POP), enzima involucrado en la degradación de neuropéptidos y relacionado con la sintomatología de enfermedades neurodegenerativas, en particular con la pérdida de memoria (Figura 4-2).²¹⁷

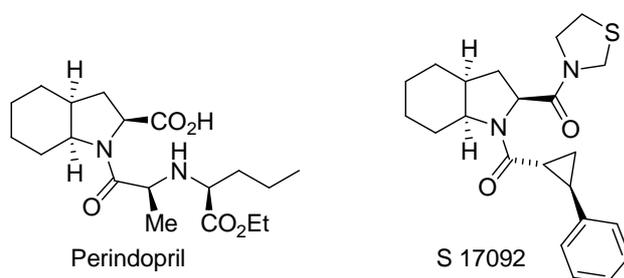


Figura 4-2. Estructura de dos derivados del Oic con propiedades farmacológicas relevantes

También es remarcable su incorporación en sistemas peptídicos mayores, como en los análogos de la hormona bradicinina. Estos antagonistas competitivos para el receptor B2 de dicha hormona, pueden presentar importantes efectos antiinflamatorios, antialérgicos y analgésicos, además de atractivas propiedades anti-cancerosas.²¹⁸

Pero, aparte del entorno médico, las posibles aplicaciones del Oic se extienden al campo de la organocatálisis. Aunque éste no ha sido aún muy estudiado, los derivados del Oic son capaces de inducir quiralidad en ciertas transformaciones químicas, actuando como ligandos o

²¹⁶ a) J. Menard, A. A. Patchett, *Adv. Protein Chem.* **2001**, *56*, 13-75; b) M. Hurst, B. Jarvis, *Drugs* **2001**, *61*, 867-896; c) PROGRESS Collaborative Group *Lancet* **2001**, *358*, 1033-1041; d) ASCOT Investigators *Lancet* **2005**, *366*, 895-906; e) K. Alfakih, A. S. Hall, *Expert Opin. Pharmacother.* **2006**, *7*, 63-71; f) M. P. Curran, P. L. McCormack, D. Simpson, *Drugs* **2006**, *66*, 235-255.

²¹⁷ a) P. Morain, P. Lestage, G. de Nanteuil, R. Jochemsen, J. L. Robin, D. Guez, P. A. Boyer, *CNS Drug Rev.* **2002**, *8*, 31-52; b) L. Polgár, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 349-362; c) J. S. Rosenblum, J. W. Kozarich, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 496-504; d) J. S. Schneider, M. Giardiniere, P. Morain, *Neuropsychopharmacology* **2002**, *26*, 176-182; e) G. Bellemère, H. Vaudry, P. Morain, S. Jégou, *J. Neuroendocrinol.* **2005**, *17*, 306-313; f) J. Gass, C. Khosla, *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 345-355; g) I. Brandt, S. Scharpé, A.-M. Lambeir, *Clin. Chim. Acta.* **2007**, *377*, 50-61; h) J. A. García-Horsman, P. T. Männistö, J. I. Venäläinen, *Neuropeptides* **2007**, *41*, 1-24; i) J. Lawandi, S. Gerber-Lemaire, L. Juillerat-Jeanneret, N. Moitessier, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3423-3438.

²¹⁸ a) S. Reissmann, D. Imhof, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2823-2844; b) J. M. Stewart, *Peptides* **2004**, *25*, 527-532.

Antecedentes

análogos con el carbono α cuaternario para aumentar tanto las restricciones conformacionales como la resistencia a la proteólisis.²²⁰

II.4.1.1.1. SÍNTESIS QUÍMICAS Y RESOLUCIONES NO ENZIMÁTICAS

Se han descrito varias síntesis del L-Oic tanto mediante procesos estereoselectivos²²¹ como de resolución,²²² pero todas ellas presentan problemas por utilizar productos de partida muy complejos, conllevar reacciones con bajo estereocontrol o transcurrir con rendimientos discretos.

Los procedimientos más comunes para la obtención de los isómeros del Oic fusionados con una disposición *cis* conllevan la hidrogenación de un doble enlace situado entre los dos carbonos cabeza de puente de precursores adecuados, como el indol, la indolina o derivados de enaminas bicíclicas (Figura 4-4).²²³ Además, existen otras estrategias sintéticas más complejas que, aún partiendo de sustratos con esta disposición relativa *cis* de los protones, pueden requerir modificaciones posteriores, como cierre de anillo, contracción o incorporación del ácido carboxílico en la posición α .

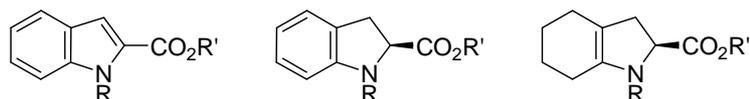


Figura 4-4. Diferentes tipos de precursores utilizados para la síntesis de los estereoisómeros del Oic fusionados en disposición *cis*

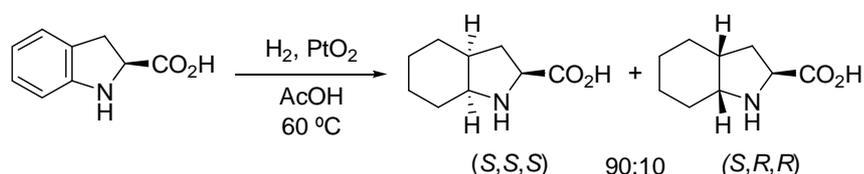
²²⁰ a) F. J. Sayago, M. I. Calaza, A. I. Jiménez, C. Cativiela, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2763-2766; b) F. J. Sayago, M. I. Calaza, A. I. Jiménez, C. Cativiela, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 84-91; c) F. J. Sayago, M. I. Calaza, A. I. Jiménez, C. Cativiela, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 5174-5180.

²²¹ a) S. G. Pyne, A. Javidan, B. W. Skelton, A. H. White, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 5157-5168; b) L. Belvisi, L. Colombo, M. Colombo, M. Di Giacomo, L. Manzoni, B. Vodopivec, C. Scolastico, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 6463-6473.

²²² a) M. Vincent, G. Remond, B. Portevin, B. Serkiz, M. Laubie, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 1677-1680; b) C. J. Blankley, J. S. Kaltenbronn, D. E. DeJohn, A. Werner, L. R. Bennett, G. Bobowski, U. Krolls, D. R. Johnson, W. M. Pearlman, M. L. Hoefle, A. D. Essenburg, D. M. Cohen, H. R. Kaplan, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 992-998; c) M. Kurokawa, T. Sugai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2004**, *77*, 1021-1025; d) N. Hirata, **2005**, U. S. Patent 0,106,690.

²²³ F. J. Sayago, P. Laborda, M. I. Calaza, A. I. Jiménez, C. Cativiela, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2011-2028 y las referencias allí contenidas.

Por ejemplo, el L-Oic enantioméricamente puro se puede obtener partiendo del ácido (S)-indolin-2-carboxílico, mediante un proceso de hidrogenación catalítica (Esquema 4-1). Esto es debido a que la hidrogenación tiene lugar preferentemente sobre la cara menos impedida de la molécula. La diferente solubilidad que presentan los dos productos de la hidrogenación facilita aislar el compuesto deseado (S,S,S)-Oic de forma mayoritaria tras un proceso de recristalización.^{220b}

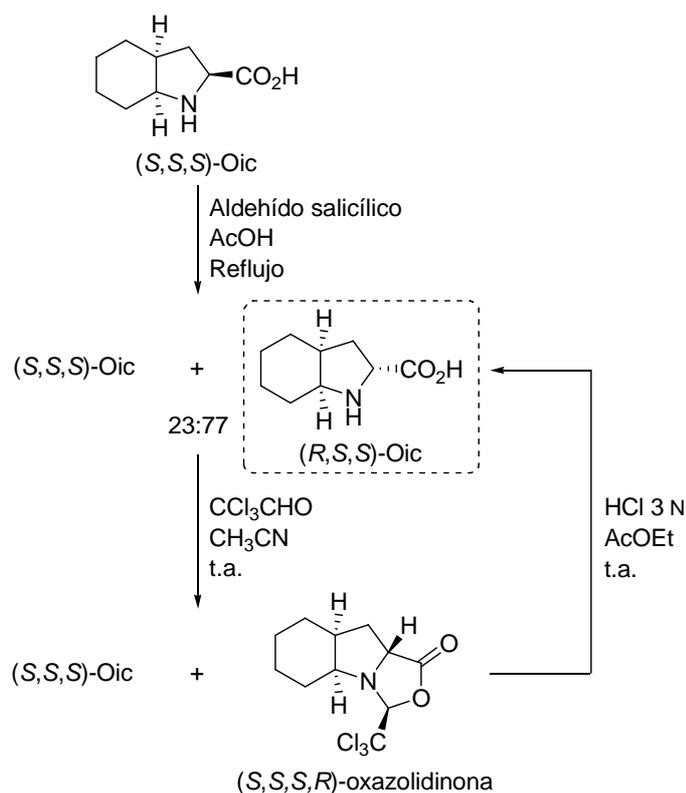


Esquema 4-1. Síntesis del (S,S,S)-Oic enantioméricamente puro

En este mismo trabajo, partiendo del L-Oic, Sayago y colaboradores han logrado obtener otro de los isómeros, el (R,S,S)-Oic, mediante un proceso de epimerización por reacción del isómero (S,S,S)-Oic con el aldehído salicílico y una posterior separación de los dos isómeros mediante la formación selectiva de una oxazolidinona (Esquema 4-2), mejorando así el rendimiento obtenido por Vincent y colaboradores, los cuales aislaban el compuesto (R,S,S)-Oic tras una serie de laboriosas cristalizaciones preferentes.²²⁴

²²⁴ M. Vincent, B. Marchand, G. Rémond, S. Jaguelin-Guinamant, G. Damien, B. Portevin, J.-Y. Baumal, J.-P. Volland, J.-P. Bouchet, P.-H. Lambert, B. Serkiz, W. Luitjen, M. Laubie, P. Schiavi, *Drug Des. Discovery* **1992**, 9, 11-28.

Antecedentes

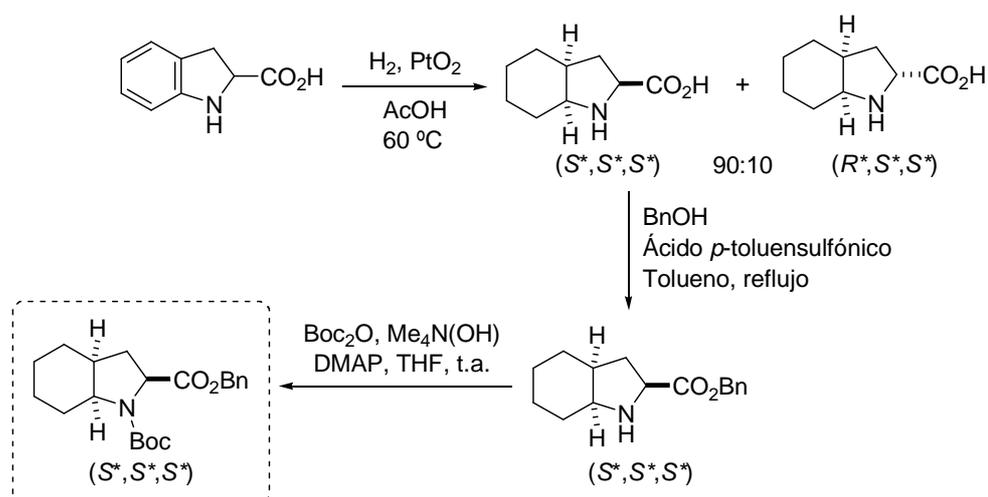


Esquema 4-2. Síntesis del aminoácido enantioméricamente puro (R,S,S)-Oic

Las resoluciones de mezclas racémicas pueden ser alternativas adecuadas a las síntesis asimétricas, sobre todo cuando se pretenden aislar ambos enantiómeros de un determinado compuesto. El método más efectivo encontrado hasta el momento para la síntesis del (*S*^{*},*S*^{*},*S*^{*})-Oic²²⁵ parte de la mezcla racémica del ácido indolín-2-carboxílico que, por hidrogenación catalítica, permite obtener mayoritariamente la mezcla de isómeros del Oic que poseen los dos hidrógenos cabeza de puente en disposición *cis* con el hidrógeno del carbono α (Esquema 4-3).²²⁶

²²⁵ A lo largo de este capítulo, el empleo de asteriscos (*) junto a los descriptores *R/S* indica la naturaleza racémica del compuesto, refiriéndose las configuraciones *R* o *S* únicamente a la disposición espacial relativa de los sustituyentes en los diferentes centros estereogénicos. En caso de no aparecer asteriscos, se trata de compuestos enantiopuros con la configuración indicada.

²²⁶ F. J. Sayago, A. I. Jiménez, C. Catiuela, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2358-2364.



Esquema 4-3. Síntesis del (S*,S*,S*)-Oic protegido, en forma racémica

Además, es posible llevar a cabo la protección de los grupos ácido y amino como éster de bencilo y carbamato de *tert*-butoxicarbonilo, respectivamente, con el fin de obtener un derivado adecuado para la resolución cromatográfica mediante HPLC quiral a escala preparativa. De un modo similar se ha logrado resolver la mezcla racémica de epímeros (R*,S*,S*),²²⁷ así como los análogos metilados en el carbono α .²²⁸

Otro método de resolución de mezclas racémicas es la cristalización de sales diastereoméricas. Aunque esta técnica requiere trabajar en una escala relativamente grande, y a menudo los rendimientos que ofrece son moderados, también ha sido aplicada a la separación de enantiómeros de diferentes derivados del Oic.²²⁹ Dada la doble funcionalidad de estos compuestos, se pueden formar sales diastereoméricas por reacción del grupo amino libre con un ácido quiral como el ácido L-tartárico o, de forma alternativa, con el grupo ácido carboxílico libre en presencia de una base enantiopura como la (S)- α -feniletilamina.

²²⁷ Estos resultados aún no han sido publicados.

²²⁸ F. J. Sayago, M. J. Pueyo, M. I. Calaza, A. I. Jiménez, C. Catiuela, *Chirality* **2011**, *23*, 507-513.

²²⁹ a) R. J. Doll, B. Neustadt, M. E. Smith, C. V. Magatti, E. H. Gold, PCT Int. Appl. WO 8701707, **1987**; b) A. Haider, S. Megevand, B. Nicollier, Y. Pannatier, Eur. Pat. Appl. EP 1864973, **2006**; c) R. B. Potluri, H. Venkata Subramanian, A. R. C. Mulakala, H. P. Kodali, PCT Int. Appl. WO 2006137082, **2006**.

Antecedentes

Para evitar estos problemas de rendimiento, muchas veces resulta conveniente recurrir a las resoluciones enzimáticas, por su gran versatilidad y la excelente efectividad que poseen los biocatalizadores en cuanto a discriminación enantiomérica. Por tratarse del tema central de esta Tesis Doctoral, se estudiarán de forma más detenida en el siguiente epígrafe, prestando especial atención a las diferentes posibilidades existentes para la resolución de aminoésteres de naturaleza cíclica.

II.4.1.1.2. APROXIMACIONES ENZIMÁTICAS PARA LA OBTENCIÓN DE α -AMINOÉSTERES CÍCLICOS ENANTIOENRIQUECIDOS

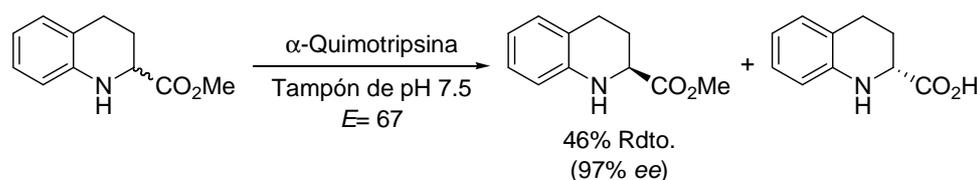
Debido a la bifuncionalidad de los derivados de aminoácidos, es posible aprovechar la capacidad que tienen los enzimas para llevar a cabo transformaciones quimio- y estereoselectivas. De esta forma, la modificación del grupo amino o el grupo carboxilo (normalmente en forma de éster) es posible simplemente mediante la selección adecuada de los parámetros de reacción. Sin embargo, a pesar del enorme potencial que tiene la Biocatálisis para la obtención de compuestos enantiopuros a partir de una mezcla racémica, hasta la fecha sólo se ha descrito un ejemplo de resolución enzimática de estructuras relacionadas con el Oic, por lo que esta revisión de antecedentes se ha ampliado a la producción de aminoésteres bicíclicos ópticamente activos a través de procesos enzimáticos catalizados por hidrolasas.

Aunque, como ya ha sido comentado anteriormente, los ésteres pueden experimentar reacciones de transesterificación, interesterificación, hidrólisis, aminólisis o amonólisis catalizadas por enzimas en función del nucleófilo empleado (alcoholes, ésteres, agua, aminas o amoniaco, respectivamente), con los derivados que nos conciernen solamente se han aplicado las tres primeras.

Cuando se trabaja con hidrolasas, las sustituciones nucleofílicas más comúnmente empleadas son las que implican agua, probablemente por ser la hidrólisis la función natural de esta clase de enzimas. Sin embargo, a pesar de su simplicidad y de que, generalmente, los procesos de hidrólisis transcurren con excelente selectividad, las dificultades para aislar los

ácidos carboxílicos ópticamente enriquecidos han provocado que este tipo de reacciones no sean siempre útiles desde un punto de vista sintético. Pese a ello, a continuación se muestran algunos ejemplos de hidrólisis enzimáticas llevadas a cabo con éxito.

Con el fin de sintetizar un potente antagonista del receptor NMDA derivado de una quinoxalinadiona tricíclica, se encuentra descrita la preparación del isómero (S)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-2-carboxilato de metilo con elevada pureza enantiomérica (97% ee) y rendimiento (46%), mediante la resolución de la mezcla racémica a través de una hidrólisis enantioselectiva (Esquema 4-4) catalizada por la α -quimotripsina.²³⁰



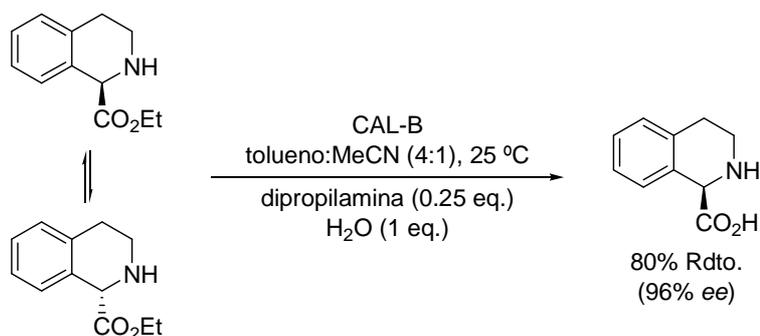
Esquema 4-4. Resolución cinética del 1,2,3,4-tetrahydroquinolin-2-carboxilato de metilo mediante hidrólisis enzimática

Posteriormente Kanerva y colaboradores describieron la resolución enzimática de una 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina, compuesto de estructura similar al comentado anteriormente. En este caso, la especial acidez del protón situado en una posición bencílica y, a la vez, en α a un grupo carbonilo, permitió llevar a cabo una resolución cinética dinámica (DKR).²³¹ Así, empleando un método de hidrólisis enzimática catalizada por CAL-B en el que la racemización del isómero S del aminoéster, menos reactivo, se favorecía en medio básico, se logró obtener el (R)-aminoácido con un 96% de ee y un rendimiento aislado del 80% (Esquema 4-5).

²³⁰ S. Katayama, N. Ae, R. Nagata, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, 9, 4295-4299.

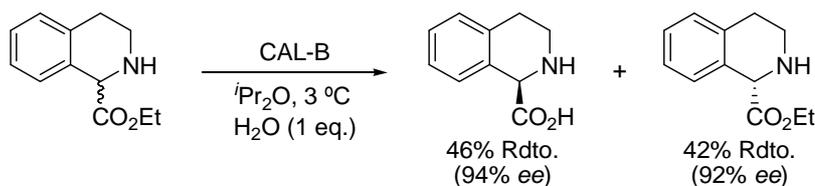
²³¹ T. A. Paál, E. Forró, A. Liljeblad, L.T. Kanerva, F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, 18, 1428-1433.

Antecedentes



Esquema 4-5. Resolución cinética dinámica del 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-1-carboxilato de etilo favorecida por la presencia de dipropilamina en el medio de reacción

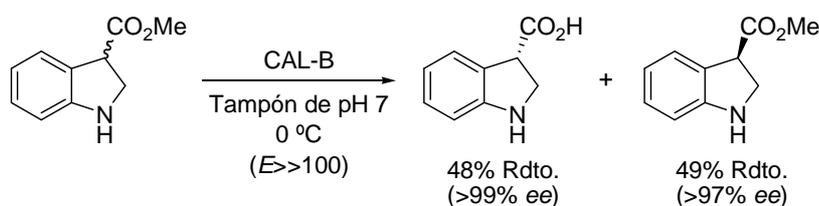
Para permitir el acceso también al isómero S del aminoéster, se describió la resolución cinética clásica de este compuesto mediante hidrólisis enzimática, suprimiendo los reactivos básicos y bajando la temperatura de la reacción a 3 °C, ya que incluso sin aditivos tenía lugar la racemización espontánea del sustrato remanente. La reactividad del enzima decrece claramente, pero se logra obtener el (*R*)-aminoácido con un rendimiento del 46% y un 94% ee, mientras que el aminoéster de configuración contraria se aisló con un rendimiento del 42% y un 92% ee (Esquema 4-6).



Esquema 4-6. Resolución cinética del 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-1-carboxilato de etilo mediante un proceso de hidrólisis a baja temperatura catalizado por la CAL-B

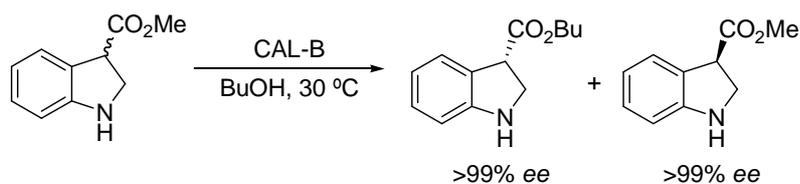
Una aproximación estructural más cercana a los compuestos estudiados en este capítulo son las indolinas. Así, el β-aminoéster indolin-3-carboxilato de metilo se ha resuelto recientemente de forma eficaz sometándolo a un proceso de hidrólisis catalizado por la CAL-B (Esquema 4-7), en unas condiciones de reacción muy suaves, en cortos tiempos de reacción (3-4 horas) y con una bajísima carga de catalizador (solamente una relación 1:500 peso enzima/peso sustrato).²³²

²³² J. Pietruzka, R. C. Simon, *ChemCatChem* **2010**, 2, 505-508.



Esquema 4-7. Resolución cinética del indolin-3-carboxilato de metilo mediante hidrólisis enzimática catalizada con la CAL-B

Además, en nuestro grupo de investigación se ha desarrollado un método alternativo de síntesis estereoselectiva de α - y β -aminoésteres cíclicos ópticamente activos a través de procesos de transesterificación e interesterificación catalizados por lipasas.²³³ En el caso del indolin-3-carboxilato de metilo se observaron excelentes enantioselectividades en su reacción de butanolisis catalizada por la CAL-B (Esquema 4-8), siendo el enantiómero *S* del aminoéster de metilo inicial, como se observó en el ejemplo anterior (Esquema 4-7), el que sufre la transformación. Sin embargo, la selectividad encontrada para el derivado sustituido en la posición 2 fue muy baja, tanto en el proceso de transesterificación ($E= 10$ con PSL-C), como en la interesterificación con butanoato de butilo ($E= 30$ con CAL-B).



Esquema 4-8. Resolución enzimática del indolin-3-carboxilato de metilo por reacción de transesterificación con butanol catalizada por la CAL-B

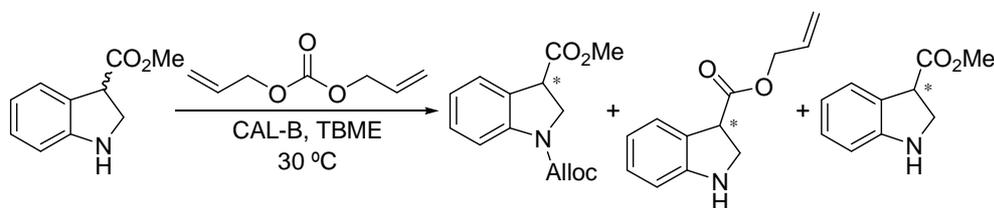
De una manera similar se hallaron bajas selectividades para los derivados de la 1,2,3,4-tetrahydroquinolina sustituidos en las posiciones 2 ó 3 cuando fueron sometidos a reacciones de transesterificación o interesterificación ($E < 40$).

²³³ S. Alatorre-Santamaría, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 2307-2313.

Antecedentes

Aunque ha sido mucho menos estudiada, la posibilidad de modificar directamente el nitrógeno situado en una posición interna del ciclo normalmente conduce a la preparación de compuestos nitrogenados con una excelente selectividad. En este caso, el enzima empleado suele ser la lipasa de *Candida antarctica* de tipo A (CAL-A) debido a su preferencia por actuar sobre posiciones más impedidas estéricamente.⁵³ Así, en la bibliografía se pueden encontrar varios ejemplos descritos para la producción de amidas o carbamatos quirales usando aminas bicíclicas racémicas como productos de partida.^{52a,52c,234} A continuación se muestran dos ejemplos descritos por Alatorre-Santamaría y colaboradores en los que se emplea la misma aproximación sintética para la producción de derivados de aminoácidos cíclicos ópticamente enriquecidos.

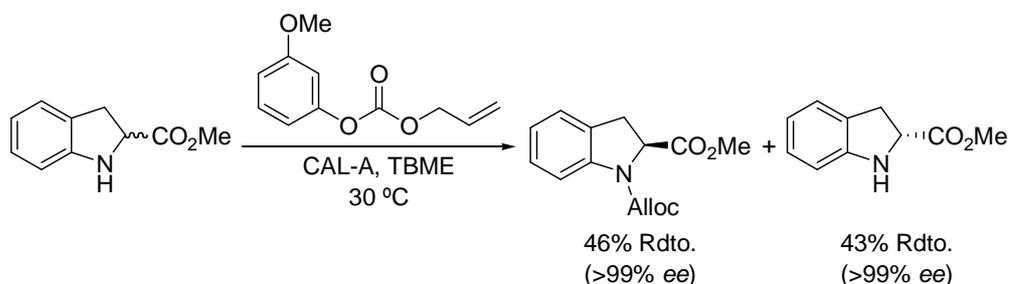
Haciendo uso de esta nueva metodología, se exploró la posibilidad de resolver el indolin-3-carboxilato de metilo empleando la CAL-A como biocatalizador y un carbonato como agente de alcoxicarbonilación.²³³ De esta manera, mientras que el carbonato mixto de 3-metoxifenilo y alilo presentó una nula reactividad, el carbonato de dialilo mostró una selectividad moderada (56% conversión, 71% ee_S, 56% ee_P) tras diez días de reacción. Empleando la CAL-B se observó una mayor selectividad hacia la formación del (S)-carbamato (Esquema 4-9). Sin embargo, la metodología tampoco resultó ser efectiva puesto que se producía como reacción secundaria la transesterificación del éster con el alcohol alílico proveniente de la hidrólisis del carbonato, lo que condujo a serios problemas de purificación.



Esquema 4-9. Intento de resolución del indolin-3-carboxilato de metilo a través de una alcoxicarbonilación catalizada por la CAL-B

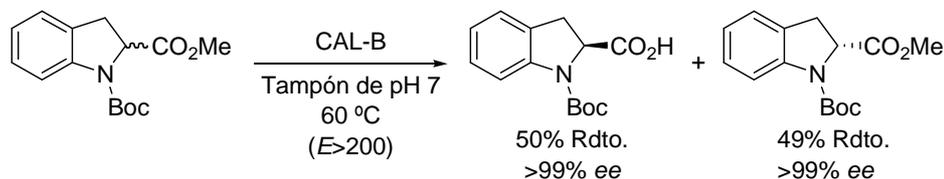
²³⁴ V. Gotor-Fernández, P. Fernández-Torres, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2558-2564.

A diferencia de los resultados observados con el derivado sustituido en la posición 3, se comprobó que era posible llevar a cabo de forma exitosa la resolución del indolin-2-carboxilato de metilo empleando la CAL-A como biocatalizador y el carbonato mixto de 3-metoxifenilo y alilo como agente de alcoxicarbonilación, aislando tanto el (*S*)-carbamato de alilo como el aminoéster remanente de configuración *R* en forma enantiopura y con elevados rendimientos (Esquema 4-10).²³⁵



Esquema 4-10. Resolución del indolin-2-carboxilato de metilo racémico mediante un proceso de alcoxicarbonilación catalizado por la CAL-A

Este mismo sustrato, pero protegido en su grupo amino por el resto *tert*-butoxicarbonilo (Boc), fue estudiado en 2004 por Kurokawa y colaboradores, los cuales mostraron su resolución enzimática empleando como catalizador una forma inmovilizada de la CAL-B (Chirazyme L-2) para la hidrólisis enantioselectiva del grupo éster con excelente enantioselectividad ($E > 200$) a 60 °C (Esquema 4-11), alcanzándose una conversión del 50% tras 30 horas de reacción, para dar tanto el (*S*)-aminoácido como el (*R*)-aminoéster en forma enantiopura, ambos *N*-protegidos con el grupo Boc.^{222d}



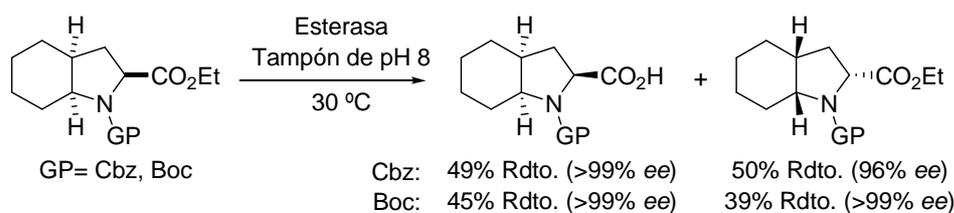
Esquema 4-11. Resolución cinética del *N*-Boc-indolin-2-carboxilato de metilo mediante hidrólisis enzimática catalizada con la CAL-B

²³⁵ S. Alatorre-Santamaría, M. Rodríguez-Mata, V. Gotor-Fernández, M. C. de Mattos, F. J. Sayago, A. I. Jiménez, C. Cativiela, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1714-1719.

Antecedentes

Esta diferencia de reactividad respecto al β -aminoéster libre (ver esquema 4-7) puede ser debida al importante aumento de los impedimentos estéricos en el entorno del grupo éster de las indolinas sustituidas en la posición 2.

Finalmente, por tratarse del único ejemplo descrito de resolución de derivados directos de la familia del Oic, cabe destacar la resolución enzimática del ácido octahidroindol-2-carboxílico *N*-protegido a través de un proceso de hidrólisis catalizado por una esterasa presente en la cepa *Chromobacterium* CS-YM-1.^{222e} Partiendo de una mezcla racémica del aminoéster de etilo *N*-protegido con Boc o Cbz y llevando a cabo el proceso en una disolución reguladora de pH 8 (Esquema 4-12), se lograron obtener los (*S,S,S*)-aminoácidos enantiopuros (>99% ee), así como los (*R,R,R*)-aminoésteres remanentes con elevados rendimientos y excesos enantioméricos (96% para el derivado protegido con Cbz y >99% para el análogo protegido con Boc). Cabe mencionar que la hidrólisis básica de estos aminoésteres permite acceder al ácido carboxílico de configuración opuesta al obtenido con la hidrólisis enzimática.

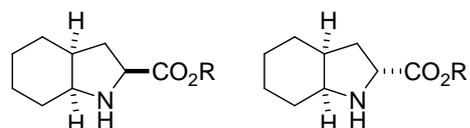


Esquema 4-12. Síntesis de derivados enantiopuros del Oic mediante un proceso de hidrólisis enzimática catalizada por una esterasa

OBJETIVOS

En la parte inicial de este capítulo se ha puesto de manifiesto la importancia de desarrollar un método adecuado para la obtención de derivados Oic ópticamente activos debido a sus posibles aplicaciones, tanto en la síntesis de compuestos biológicamente activos con aplicaciones médicas, como en catálisis asimétrica. Por ello, los objetivos planteados en este apartado son los siguientes:

1. Síntesis de α -aminoésteres derivados del Oic en forma racémica para, a continuación, llevar a cabo el estudio de su resolución empleando lipasas en procesos de alcoxicarbonilación enzimática.



2. Separación analítica de los enantiómeros, tanto de los sustratos como de los productos finales, mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).
3. Optimización de los procesos de resolución cinética analizando en detalle los distintos parámetros que afectan a la catálisis enzimática.
4. Determinación de la enantioselectividad mostrada por el enzima.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

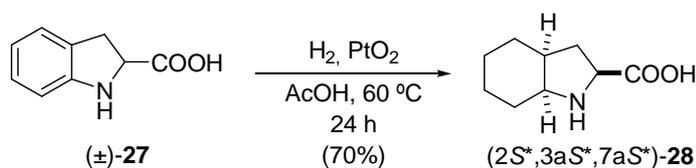
El trabajo recogido en este capítulo se encuadra dentro de una colaboración del grupo de investigación de Química Bioorgánica de la Universidad de Oviedo con el equipo del Profesor Carlos Cativiela de la Universidad de Zaragoza. Dada la experiencia de nuestro grupo de investigación en la resolución de derivados de indolina, tanto en forma de aminas secundarias,^{234b} como de aminoésteres cíclicos,^{233,235} se decidió centrar la atención del estudio en la resolución cinética catalizada por lipasas de derivados Oic a través de procesos de alcoxicarbonilación de su grupo amino. Esta investigación supondría una alternativa sintética a la hidrólisis enzimática a través del aminoéster que ya se encuentra descrita en la bibliografía.^{222e}

II.4.3.1. DERIVADOS DE CONFIGURACIÓN (2S*,3aS*,7aS*)

Inicialmente, se abordó el estudio de los derivados del Oic en los que los tres hidrógenos de los centros estereogénicos se encuentran en una disposición relativa *cis*.

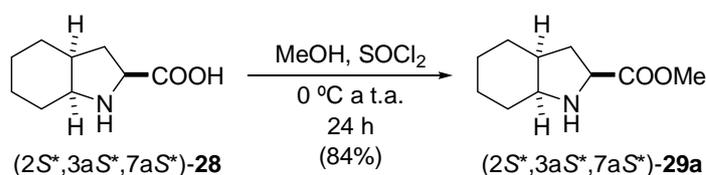
II.4.3.1.1. SÍNTESIS QUÍMICA DE LOS α -AMINOÉSTERES 29a-b Y SUS CORRESPONDIENTES CARBAMATOS RACÉMICOS 30a-b

Siguiendo el procedimiento descrito previamente,²²⁶ se llevó a cabo la preparación del ácido racémico octahidroindol-2-carboxílico (S^*,S^*,S^*)-**28** mediante una hidrogenación catalizada por óxido de platino del ácido indolin-2-carboxílico racémico **27**, a presión atmosférica y 60 °C, empleando ácido acético como disolvente (Esquema 4-13). Así, tras 24 h de reacción y un doble proceso de recristalización para purificar el producto y eliminar los isómeros no deseados, primero en etanol y a continuación en una mezcla de dioxano-agua, se obtuvo (S^*,S^*,S^*)-**28** en forma de sólido blanco y con un rendimiento aislado del 70%.



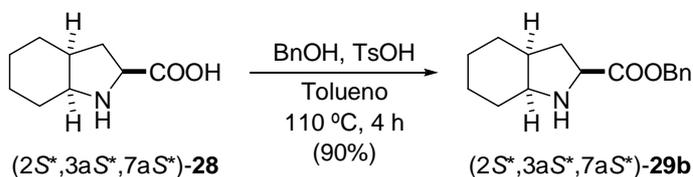
Esquema 4-13. Hidrogenación catalítica de (\pm)-**27** para la obtención de (\pm)-**28**

Con el fin de poder llevar a cabo una resolución cinética enzimática a través del grupo amino, se decidió proteger el grupo carboxilo en forma de éster. Esta transformación facilita, además, la solubilidad del compuesto en disolventes orgánicos, lo cual será necesario para el proceso de resolución propuesto. Para ello, se llevó a cabo la esterificación con metanol, proceso favorecido mediante la activación del ácido con cloruro de tionilo (SOCl_2) a 0 °C. Tras 24 h de agitación a temperatura ambiente se obtiene el aminoéster (S^*,S^*,S^*)-**29a** con un 84% de rendimiento tras purificación mediante columna cromatográfica en gel de sílice (Esquema 4-14).



Esquema 4-14. Esterificación de $(2S^*,3aS^*,7aS^*)\text{-28}$ con MeOH en presencia de SOCl_2

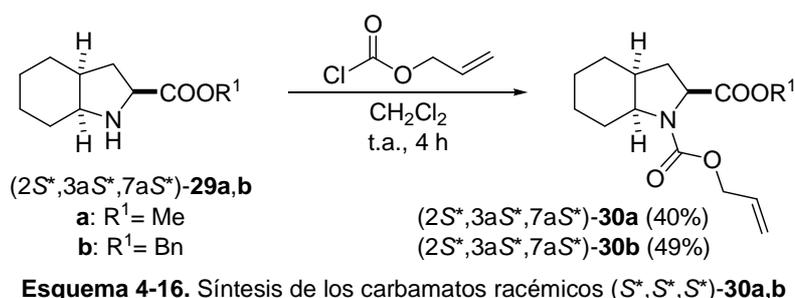
Como se verá más adelante, este derivado presenta muchos problemas a la hora de monitorizar las reacciones por HPLC al no presentar ningún grupo cromóforo, lo que dificulta el cálculo de los excesos enantioméricos. Debido a ello se decidió sintetizar también el aminoéster bencílico $(S^*,S^*,S^*)\text{-29b}$ (Esquema 4-15). En este caso, el proceso se llevó a cabo mediante la esterificación del ácido $(S^*,S^*,S^*)\text{-28}$ con alcohol bencílico y catálisis ácida, en un sistema Dean-Stark y a reflujo de tolueno, obteniéndose tras 4 h de reacción el α -aminoéster $(S^*,S^*,S^*)\text{-29b}$ con un rendimiento del 90%.



Esquema 4-15. Esterificación del ácido racémico $(S^*,S^*,S^*)\text{-28}$ con alcohol bencílico en presencia de ácido *p*-toluensulfónico

A continuación, estos α -aminoésteres $(S^*,S^*,S^*)\text{-29a,b}$ se utilizaron como materiales de partida para la síntesis de los correspondientes carbamatos, productos finales de la reacción enzimática de resolución. Dado que en la resolución enzimática de sustratos similares se habían obtenido buenos resultados empleando carbonatos de alilo,^{234b,235} se prepararon los carbamatos $(S^*,S^*,S^*)\text{-30a,b}$ (Esquema 4-16). Así, se hicieron reaccionar los aminoésteres racémicos $(S^*,S^*,S^*)\text{-29a}$ y $(S^*,S^*,S^*)\text{-29b}$ con cloroformiato de alilo en diclorometano seco, para obtener los correspondientes carbamatos racémicos con rendimientos moderados pero suficientes para poder desarrollar métodos analíticos de separación empleando la técnica de HPLC con columnas de relleno quiral.

Resultados y Discusión



Tanto los α -aminoésteres (*S*^{*},*S*^{*},*S*^{*})-**29a,b** como los carbamatos (*S*^{*},*S*^{*},*S*^{*})-**30a,b** se analizaron mediante HPLC con el fin de obtener un método adecuado para separar analíticamente sus dos enantiómeros, lo que permite calcular los excesos enantioméricos de los productos de partida y finales de las reacciones enzimáticas. A continuación se muestran los cromatogramas de los compuestos (*S*^{*},*S*^{*},*S*^{*})-**29a,b** y **30a,b** racémicos (Figura 4-5), encontrándose detalladas en la parte experimental al final de este capítulo las condiciones de su separación analítica.

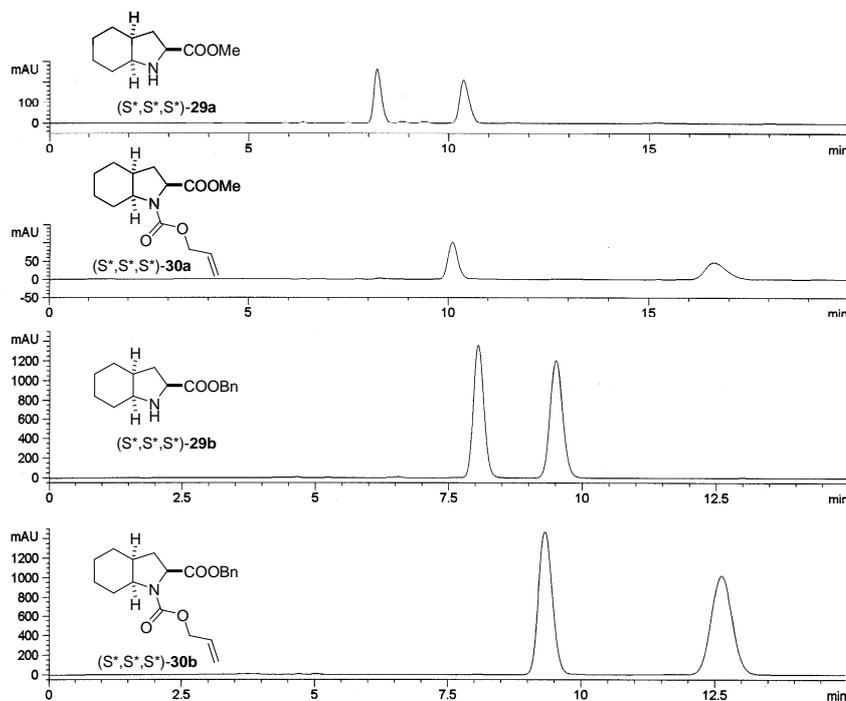
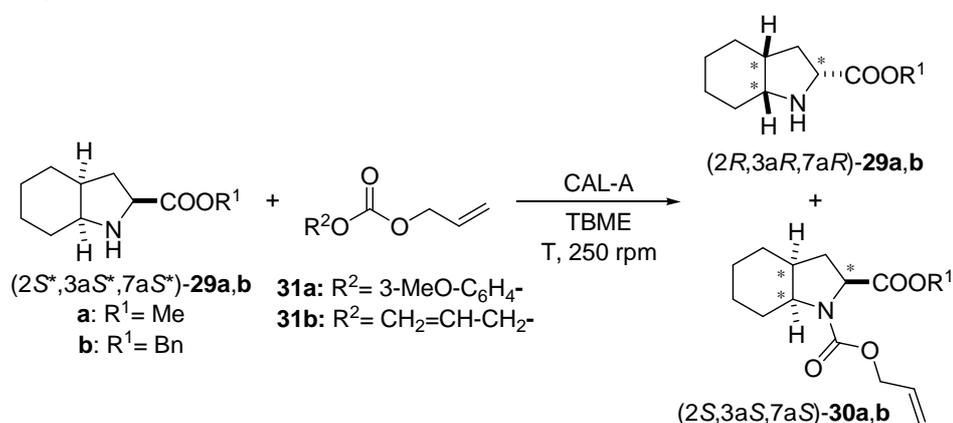


Figura 4-5. Cromatogramas de los compuestos **29a,b** y **30a,b** racémicos

II.4.3.1.2. RESOLUCIÓN CINÉTICA DE LOS α -AMINOÉSTERES MEDIANTE PROCESOS DE ALCOXICARBONILACIÓN ENZIMÁTICA

Se comenzó el estudio utilizando el aminoéster de metilo (S^* , S^* , S^*)-**29a** como reactivo modelo y empleando diferentes carbonatos como agentes de alcoxycarbonilación para la resolución cinética enzimática (Esquema 4-17).



Esquema 4-17. Resolución cinética catalizada por la CAL-A de los aminoésteres (\pm)-**29a-b**

Dada la excelente selectividad mostrada en los procesos de alcoxycarbonilación enzimática de aminas secundarias llevados a cabo previamente en nuestro grupo de investigación,^{234b,235} inicialmente se eligió la CAL-A como biocatalizador, y se consideraron el carbonato de dibencilo, el carbonato mixto de 3-metoxifenilo y alilo (**31a**) y el carbonato de dialilo (**31b**) como agentes de alcoxycarbonilación. De entre las posibles formas de CAL-A se escogió la que fabrica la multinacional norteamericana Codexis, pues es de las pocas que se comercializan aún hoy en día. Así, con el carbonato de dibencilo no se observó reacción ni a 30 ni a 45 °C, mientras que el mismo proceso con un carbonato más reactivo, como es el **31a**, condujo a la formación del carbamato racémico **30a** tras 23.5 h de reacción (Tabla 4-1, entrada 1).

Resultados y Discusión

Tabla 4-1. Resolución cinética catalizada por la CAL-A de los α -aminoésteres **29a,b**^a

Entrada	CAL-A	R ¹	R ²	t (h)	ee _P (%) ^b	ee _S (%) ^b	c (%) ^c	E ^d
1	Codexis	Me	3-MeO-C ₆ H ₄	23.5	----	----	100	----
2	Codexis	Me	CH ₂ CH=CH ₂	23	>99	25	20	>200
3 ^e	Codexis	Me	CH ₂ CH=CH ₂	48	>99	13	12	>200
4	Codexis	Bn	CH ₂ CH=CH ₂	57	88	>99	53	121
5	Biocatalytics	Bn	CH ₂ CH=CH ₂	72	98 (91)	>99 (90)	50	>200

^a Condiciones de la reacción enzimática: aminoéster **29a,b** racémico en relación 1:2 en peso respecto a la CAL-A, carbonato (2.5 equivalentes), TBME (0.07 M), 30 °C y 250 rpm.

^b Determinados por HPLC. Rendimiento aislado entre paréntesis. ^c $c = ee_S / (ee_S + ee_P)$.

^d $E = \ln[(1-c) \times (1-ee_P)] / \ln[(1-c) \times (1+ee_P)]$. ^e 45 °C.

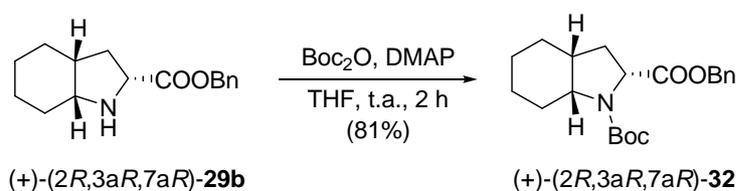
Entonces, se decidió probar con un carbonato menos reactivo y disponible comercialmente como es el carbonato de dialilo **31b**, el cual, en las mismas condiciones de reacción, permitió aislar **30a** con una excelente pureza enantiomérica, aunque únicamente se alcanzaron conversiones del 20% tras 23 h de agitación orbitalica a 30 °C (entrada 2). Con el fin de intentar elevar el grado de conversión a través de una aceleración del proceso, se elevó la temperatura a 45 °C. Sin embargo, esto condujo a una pérdida importante de la actividad del enzima debido, tal vez, a la baja termoestabilidad de esta lipasa, no superándose el 12% de conversión tras dos días de reacción (entrada 3).

En este punto, y dados los problemas que presentan los derivados metilados tanto de reactividad como de visibilidad en UV para seguir la reacción mediante HPLC, se decidió estudiar la resolución del α -aminoéster de bencilo (*S*^{*}, *S*^{*}, *S*^{*})-**29b**, el cual, además de poseer un grupo cromóforo que permite visualizarlo fácilmente en el espectro ultravioleta, está más impedido estéricamente, por lo que podría acomodarse mejor en un centro activo amplio como es el de la CAL-A.⁵³ Así, empleando las mismas condiciones de reacción que las utilizadas en la resolución enzimática de (*S*^{*}, *S*^{*}, *S*^{*})-**29a**, se obtuvo el aminoéster remanente (+)-(2*R*,3*aR*,7*aR*)-**29b** de forma enantiopura y el carbamato (-)-(2*S*,3*aS*,7*aS*)-**30b** con una pureza óptica del 88% (entrada 4). Se decidió entonces usar la CAL-A de la empresa Biocatalytics para comparar su eficacia y selectividad con la de Codexis, y se encontró que tras 72 h de reacción a

30 °C, la reacción alcanza una conversión del 50%, obteniéndose tanto el carbamato final como el aminoéster de partida prácticamente enantiopuros y con excelentes rendimientos una vez aislados ambos mediante cromatografía de columna en gel de sílice (entrada 5). Así, se pudo comprobar que la CAL-A de Codexis presenta una reactividad más alta (mayor grado de conversión en menos tiempo) que la de Biocatalytics, mientras que ésta última es más enantioselectiva. Un inconveniente de este proceso es que la CAL-A de Biocatalytics ha dejado de ser comercial, ya que esta empresa fue absorbida en 2007 por Codexis y la inmovilización actual del enzima es diferente, lo que afecta a su comportamiento, tanto en términos de reactividad como de selectividad.

II.4.3.1.3. DETERMINACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA DEL α -AMINOÉSTER (+)-(2*R*,3*aR*,7*aR*)-**29b** Y SU CARBAMATO (-)-(2*S*,3*aS*,7*aS*)-**30b**

Las configuraciones absolutas de los centros estereogénicos se asignaron llevando a cabo una transformación química sobre el aminoéster (+)-(2*R*,3*aR*,7*aR*)-**29b** enantioméricamente puro. Esta transformación permitió acceder a un compuesto descrito anteriormente en la bibliografía,²²⁶ del cual se conocía el dato de la rotación óptica específica. De este modo, el aminoéster enantiopuro (+)-(2*R*,3*aR*,7*aR*)-**29b** fue sometido a protección del grupo amino con el resto *tert*-butoxicarbonilo (Boc), empleando para ello el dicarbonato de di-*tert*-butilo en presencia de 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina (DMAP) y en THF como disolvente, obteniéndose (+)-(2*R*,3*aR*,7*aR*)-**32** con un elevado rendimiento tras 2 h de reacción a temperatura ambiente (Esquema 4-18).



Esquema 4-18. Derivatización del aminoéster enantiopuro (+)-(2*R*,3*aR*,7*aR*)-**29b** para la asignación de su estereoquímica

Resultados y Discusión

Se obtuvo un valor de rotación óptica $[\alpha]_D^{20} = +34.4$ ($c = 1.0$, CHCl_3) para el compuesto (+)-(2*R*,3*aR*,7*aR*)-**32**, cuyos signo y valor fueron comparados con los descritos anteriormente para este derivado $\{[\alpha]_D^{20} = +38.1$ ($c = 1.0$, CHCl_3) $\}$.²²⁶ Así, se pudo concluir que el aminoéster remanente del proceso enzimático (+)-**29b** tiene una configuración (2*R*,3*aR*,7*aR*) y por tanto, el carbamato (-)-**30b** posee la estereoquímica (2*S*,3*aS*,7*aS*).

Para confirmar este resultado se sintetizó el carbamato (2*S*^{*},3*aS*^{*},7*aS*^{*})-**32** partiendo del aminoéster racémico (2*S*^{*},3*aS*^{*},7*aS*^{*})-**29b** y se separaron sus enantiómeros mediante HPLC, obteniéndose tiempos de retención similares a los obtenidos por Cativiela y colaboradores, los cuales demostraron por difracción de rayos X que el primer pico (8.1 min) corresponde al enantiómero (2*R*,3*aR*,7*aR*), y el segundo (13.3 min) al (2*S*,3*aS*,7*aS*).²²⁶ Así, en nuestro caso, cuando se analizó el compuesto enantiopuro, se observó que el pico mayoritario aparecía a un tiempo de retención (8.1 min) que coincide con el del carbamato de configuración (2*R*,3*aR*,7*aR*), sin rastro alguno del enantiómero (2*S*,3*aS*,7*aS*). A continuación se muestran los cromatogramas tanto del carbamato racémico (2*S*^{*},3*aS*^{*},7*aS*^{*})-**32**, como en su forma ópticamente activa (+)-(2*R*,3*aR*,7*aR*)-**32**, este último obtenido tras derivatizar el sustrato remanente de la biotransformación (Figura 4-6).

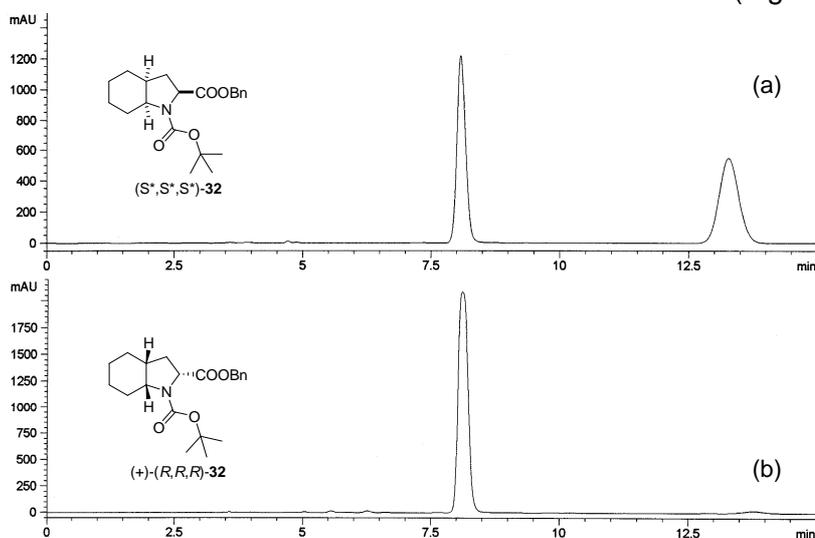


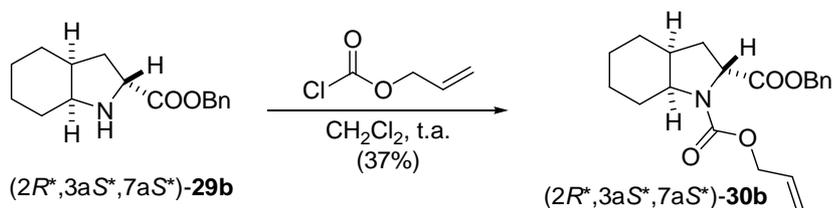
Figura 4-6. Cromatogramas del compuesto **32**: (a) racémico y (b) enantiopuro

II.4.3.2. DERIVADOS DE CONFIGURACIÓN ($2R^*$, $3aS^*$, $7aS^*$)

En vistas de los buenos resultados obtenidos en la resolución enzimática del derivado bencilado en la posición carbonílica del (S^* , S^* , S^*)-Oic, y dentro de la colaboración existente con el grupo del Profesor Catiuela, nos fue enviado su epímero (R^* , S^* , S^*)-**29** en forma racémica para tratar de llevar a cabo de forma análoga la separación de sus enantiómeros a través de una metodología enzimática.

II.4.3.2.1. SÍNTESIS QUÍMICA DEL CARBAMATO RACÉMICO

Antes de comenzar con los estudios enzimáticos, y puesto que ya disponíamos del α -aminoéster de bencilo (R^* , S^* , S^*)-**29b** sintetizado, se llevó a cabo su derivatización con cloroformiato de alilo en las condiciones anteriormente expuestas (Esquema 4-19) con el fin del obtener, de forma racémica, el que sería el producto final de la reacción enzimática, el carbamato (R^* , S^* , S^*)-**30b**.



Esquema 4-19. Síntesis del carbamato de alilo (R^* , S^* , S^*)-**30b**

En este punto surgieron los primeros problemas, puesto que en el proceso de derivatización se observó la epimerización parcial del compuesto, lo que llevó a un descenso importante en el rendimiento aislado del carbamato.

Una vez optimizadas las condiciones de separación por HPLC de (R^* , S^* , S^*)-**29b** y (R^* , S^* , S^*)-**30b**, productos de partida y final, respectivamente, de la reacción enzimática, se pudo comenzar el estudio de resolución.

II.4.3.2.2. RESOLUCIÓN CINÉTICA DEL α -AMINOÉSTER (R^* , S^* , S^*)-29b** MEDIANTE PROCESOS DE ALCOXICARBONILACIÓN ENZIMÁTICA**

Se comenzó la investigación empleando las condiciones que mejores resultados habían ofrecido con el aminoéster (S^* , S^* , S^*)-**29b**, es decir, CAL-A, TBME y carbonato de dialilo a 30 °C. Sin embargo, aunque se probaron diferentes preparados del enzima, procedentes de varias casas comerciales (Biocatalytics, Novozymes y Codexis), ninguno de ellos resultó ser efectivo, bien por problemas de selectividad, de reactividad o de formación de productos secundarios, presumiblemente de transesterificación con el alcohol alílico liberado de la hidrólisis del carbonato. También se pensó en la posibilidad de emplear otros biocatalizadores, pero ni la CAL-B ni la CRL (lipasa de *Candida rugosa*) mostraron actividad alguna.

Por este motivo, se concluyó que el derivado **29b** de configuración (R^* , S^* , S^*) no era susceptible de ser resuelto empleando esta metodología.

CONCLUSIONES

En este capítulo se describe la síntesis química de α -aminoésteres racémicos de la familia del Oic con rendimientos muy buenos, así como la preparación de sus correspondientes carbamatos de alilo.

Posteriormente se ha optimizado la separación analítica de las parejas de enantiómeros mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para la medición de excesos enantioméricos y conversiones de los procesos enzimáticos.

La lipasa de Candida antarctica tipo A ha catalizado con excelente enantioselectividad la resolución cinética del isómero de configuración (S,S*,S*) a través de un proceso de alcoxicarbonilación enzimática con carbonato de dialilo y TBME como disolvente, alcanzándose conversiones cercanas al 50% para el caso del aminoéster de bencilo.*

Se ha confirmado la estereoquímica de los productos de la reacción enzimática del α -aminoéster de bencilo mediante la N-Boc-protección del grupo amino libre del sustrato remanente en el proceso enzimático, y la posterior comparación del valor de la rotación óptica de este compuesto con el del producto enantiopuro previamente descrito en la bibliografía, habiéndose obtenido el (2S,3aS,7aS)-carbamato y el aminoéster remanente de configuración (2R,3aR,7aR).

Se llevaron a cabo intentos de resolución enzimática del epímero racémico de configuración (R,S*,S*), el cual mostró una menor reactividad y selectividad en procesos de alcoxicarbonilación enzimática catalizados con diferentes lipasas. Además, se observó la formación de productos secundarios en el medio de reacción y la epimerización del producto de partida, por lo que se concluyó que este isómero no es un buen sustrato para este tipo de resoluciones enzimáticas.*

PARTE EXPERIMENTAL

II.4.5.1. GENERAL

La lipasa de *Candida antarctica* tipo A fue adquirida de diferentes fuentes comerciales: CAL-A inmovilizada NZL-101 de Codexis (5.0 U/g usando 1-butanol y laurato de etilo) y CAL-A IMB-104 de Biocatalytics (2.6 U/mg usando tributirina).

Todos los demás reactivos se adquirieron a Aldrich y Fluka, sin ser necesarios tratamientos previos para su purificación.

Los disolventes empleados fueron sometidos previamente a un tratamiento de secado, almacenándose bajo atmósfera de nitrógeno. El TBME fue secado sobre sodio empleando como indicador benzofenona, mientras que el diclorometano y el MeOH fueron secados sobre hidruro cálcico.

II.4.5.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

II.4.5.2.1. CROMATOGRAFÍA EN GEL DE SÍLICE

Para la cromatografía en capa fina se han utilizado cromatofolios de gel de sílice POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄ (0.25 mm de espesor), los cuales llevan incorporado un revelador ultravioleta, comercializados por Merck. Como revelador se utilizó una disolución acuosa al 1% de KMnO₄, 5% de K₂CO₃ y 8 lentejas de NaOH en 200 mL de agua.

Para la cromatografía de columna se empleó gel de sílice 60 (230-240 Mesh) adquirida a Merck.

II.4.5.2.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

El seguimiento de las reacciones de alcoxicarbonilación enzimática, así como la separación analítica de los enantiómeros del compuesto (\pm)-**32**, se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100, empleando las columnas quirales Chiralcel OD y Chiralpak IA (25 x 0.46 cm) respectivamente. La detección empleada fue visible-ultravioleta a 210 y 215 nm, utilizando como fase móvil mezclas de hexano/isopropanol.

II.4.5.2.3. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (IR)

Se registraron los espectros en un espectrómetro Perkin-Elmer 1720-X FT empleando pastillas de KBr (muestras sólidas) o en ventanas de NaCl (aceites). Las bandas de tensión se indican en valores de ν máxima y se expresan en cm⁻¹.

II.4.5.2.4. ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM)

Se utilizaron las técnicas de APCI⁺ y ESI⁺ con un cromatógrafo HP 1100 acoplado a masas. Los valores en ambos casos se refieren a unidades de masa atómica (uma).

II.4.5.2.5. PUNTOS DE FUSIÓN (PF)

Se han llevado a cabo con un aparato Gallenkamp en tubos capilares abiertos y por tanto sus valores no están corregidos.

II.4.5.2.6. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y secuencia de pulsos DEPT han sido realizados con espectrómetros Bruker AC-300 y DPX-300 (300.13 MHz para ^1H y 75.5 MHz para ^{13}C), y Bruker AV-400 (400.13 MHz para ^1H y 100.6 MHz para ^{13}C). Con el Bruker AC-300 se han llevado además a cabo los siguientes experimentos bidimensionales:

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

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

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

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

Los desplazamientos químicos se dan en valores de (δ) en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento en Hertzios (Hz).

Los calibrados se hicieron sobre la señal del CDCl_3 (^{13}C , 76.95 ppm) o del CHCl_3 o H_2O (^1H , 7.26 ó 4.80 ppm) residual.

II.4.5.2.7. ROTACIÓN ÓPTICA ESPECÍFICA

Se han medido con un polarímetro Perkin-Elmer 241 (unidades $10^{-1} \text{ cm}^2 \times \text{grado} \times \text{g}^{-1}$), empleando la lámpara de sodio (D).

II.4.5.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS

II.4.5.3.1. Síntesis del Ácido (2S*,3aS*,7aS*)-Octahidroindol-2-carboxílico [(2S*,3aS*,7aS*)-28]²³⁶

Sobre una disolución del ácido indolin-2-carboxílico (**27**, 4.0 g, 24.54 mmol) en ácido acético (80 mL) se lleva a cabo una hidrogenación a presión atmosférica a 60 °C en presencia de PtO₂ (400 mg, 1.76 mmol). Tras 24 h de reacción, se filtra el catalizador y se lava con ácido acético. Se evapora el disolvente hasta sequedad y el residuo resultante se cristaliza primero en etanol y luego en una mezcla dioxano-agua, obteniéndose 2.90 g del aminoácido (2S*,3aS*,7aS*)-**28** puro en forma de sólido blanco (70%).

II.4.5.3.2. Síntesis del (2S*,3aS*,7aS*)-Octahidroindol-2-carboxilato de Metilo [(2S*,3aS*,7aS*)-29a]

Sobre una disolución del aminoácido (2S*,3aS*,7aS*)-**28** (1.32 g, 7.81 mmol) en metanol seco (20 mL) a 0 °C, se añade gota a gota SOCl₂ (1.18 mL, 16.18 mmol). La disolución resultante se agita a temperatura ambiente durante 24 h, tiempo tras el cual se evapora el disolvente bajo presión reducida hasta sequedad. El crudo resultante se suspende en 25 mL de una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ y se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 50 mL). Se juntan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄, se filtra la disolución y se evapora el disolvente en el rotavapor. El crudo resultante se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (gradiente de eluyentes 2-5% MeOH/CH₂Cl₂), obteniéndose 1.20 g de (2S*,3aS*,7aS*)-**29a** como un aceite amarillo (84%).

II.4.5.3.3. Síntesis del Carbamato (2S*,3aS*,7aS*)-N-Aliloxicarbonil-octahidroindol-2-carboxilato de Metilo [(2S*,3aS*,7aS*)-30a]

Sobre una disolución del aminoéster (2S*,3aS*,7aS*)-**29a** (25 mg, 0.14 mmol) en CH₂Cl₂ seco (0.91 mL) a 0 °C y bajo atmósfera de nitrógeno, se añade gota a gota cloroformiato de alilo (16.0 µL, 0.15 mmol). La

²³⁶ En el marco de la colaboración entre la Universidad de Oviedo y la de Zaragoza, este producto nos fue enviado y no ha sido necesaria su síntesis química.

mezcla se agita a temperatura ambiente durante 4 h, tiempo tras el cual no se detecta material de partida mediante análisis por TLC (5% MeOH/CH₂Cl₂). La mezcla de reacción se evapora en el rotavapor y el crudo resultante se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (20% AcOEt/Hexano), aislándose 16 mg de (2S*,3aS*,7aS*)-**30a** como un aceite amarillo pálido (40%).

II.4.5.3.4. Síntesis del (2S*,3aS*,7aS*)-Octahidroindol-2-carboxilato de Bencilo [(2S*,3aS*,7aS*)-**29b**]

Sobre una disolución del aminoácido (2S*,3aS*,7aS*)-**28** (1.00 g, 5.92 mmol) en tolueno (21 mL) se añade ácido *p*-toluensulfónico monohidratado (1.63 g, 8.59 mmol) y alcohol bencílico (2.30 mL, 22.21 mmol). La disolución resultante se calienta a reflujo durante 4 h utilizando un aparato Dean-Stark. Tras evaporar el disolvente en el rotavapor hasta sequedad, el residuo se tritura con diisopropil éter y el sólido blanco formado se recoge por filtración. Este sólido se trata con una disolución acuosa saturada de NaHCO₃ (25 mL) y se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 50 mL). Se combinan las fases orgánicas, se secan con Na₂SO₄, se filtra la disolución y se evapora el disolvente en el rotavapor. El crudo resultante se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (gradiente de eluyentes 2-10% MeOH/CH₂Cl₂), obteniéndose 1.38 g de (2S*,3aS*,7aS*)-**29b** como un aceite amarillo (90%).

II.4.5.3.5. Síntesis del Carbamato (2S*,3aS*,7aS*)-*N*-Aliloxicarbonil-octahidroindol-2-carboxilato de Bencilo [(2S*,3aS*,7aS*)-**30b**]

Sobre una disolución del aminoéster (2S*,3aS*,7aS*)-**29b** (40 mg, 0.15 mmol) en CH₂Cl₂ seco (1.0 mL) a 0 °C y bajo atmósfera de nitrógeno, se añade gota a gota cloroformiato de alilo (18.0 µL, 0.17 mmol). La mezcla se deja agitando a temperatura ambiente durante 4 h, tiempo tras el cual no se detecta material de partida mediante análisis por TLC (5% MeOH/CH₂Cl₂). La mezcla de reacción se evapora bajo presión reducida y el crudo resultante se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (20% AcOEt/Hexano), aislándose 26 mg de (2S*,3aS*,7aS*)-**30b** como un aceite amarillo pálido (49%).

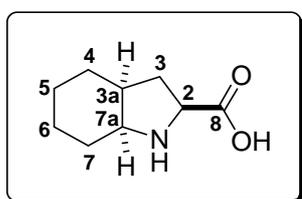
Parte experimental

II.4.5.3.6. Procedimiento General para la Resolución Cinética Enzimática de los Aminoésteres (2S*,3aS*,7aS*)-29a y (2S*,3aS*,7aS*)-29b por Alcoxycarbonilación

A una suspensión bajo atmósfera de nitrógeno del aminoéster racémico (2S*,3aS*,7aS*)-29a ó (2S*,3aS*,7aS*)-29b (30 mg) y CAL-A (60 mg, 1:2 en peso respecto al producto de partida) en TBME seco (0.07 M), se añade el carbonato de dialilo **31b** (2.5 equivalentes). La reacción se coloca en un agitador orbital (250 rpm) a la temperatura deseada (ver tabla 4-1 en página 286), y se sigue su curso por HPLC tomando alícuotas regularmente hasta observar una conversión próxima al 50%. Entonces, la reacción se detiene filtrando el enzima, que se lava con CH₂Cl₂ (3 x 5 mL). El filtrado se evapora en el rotavapor, obteniéndose un crudo que se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (gradiente de eluyentes: 10-100% AcOEt/Hexano). De esta forma se aislan el carbamato (2S,3aS,7aS)-**30a** ó **30b** y el aminoéster (2R,3aR,7aR)-**29a** ó **29b** ópticamente activos.

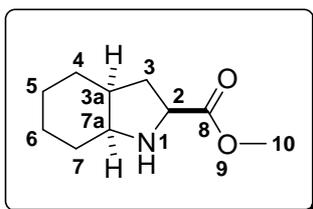
II.4.5.3.7. Preparación del Carbamato Racémico (2S*,3aS*,7aS*)- y Ópticamente Activo (2R,3aR,7aR)-N-(*terc*-Butoxicarbonil)octahidroindol-2-carboxilato de Bencilo (32)

Sobre una disolución de (2S*,3aS*,7aS*)-29b ó (2R,3aR,7aR)-29b (32 mg, 0.12 mmol) en THF (0.9 mL), se añade 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina (1.6 mg, 0.01 mmol) y dicarbonato de di-*terc*-butilo (43 µL, 0.19 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 h, tiempo tras el cual no se detecta material de partida mediante análisis por TLC (100% AcOEt). La mezcla de reacción se evapora en el rotavapor hasta sequedad y el residuo obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (20% AcOEt/Hexano), aislándose 36 mg de (2S*,3aS*,7aS*)-**32** ó (+)-(2R,3aR,7aR)-**32** como un sólido blanco (81%).

II.4.5.4. DATOS EXPERIMENTALES**Ácido (2*S*^{*},3*aS*^{*},7*aS*^{*})-octahidroindol-2-carboxílico (28)²³⁶****Fórmula empírica:** C₉H₁₅NO₂**Aspecto físico:** Sólido blanco**Peso molecular:** 169.22 g/mol**R_f** (100% MeOH): 0.28**PF:** 233-234 °C**IR** (KBr): ν 3600-3200, 1623 cm⁻¹**¹H-RMN** (D₂O, 400.13 MHz): δ 4.06 (m, 1H), 3.65 (m, 1H), 2.36-2.25 (m, 2H), 2.01-1.91 (m, 1H), 1.82-1.73 (m, 1H), 1.64-1.23 (m, 7H)**¹³C-RMN** (D₂O, 100.6 MHz): δ 175.4, 59.7, 59.3, 36.9, 32.4, 25.1, 24.4, 21.4, 20.9**HRMS** (ESI⁺, m/z) Calculada para C₉H₁₆NO₂ [(M+H)⁺]: 170.1176; encontrada: 170.1177

Parte experimental

(2S*,3aS*,7aS*)-Octahidroindol-2-carboxilato de metilo
[(2S*,3aS*,7aS*)-29a]



Fórmula empírica: C₁₀H₁₇NO₂

Aspecto físico: Aceite amarillo

Peso molecular: 183,25 g/mol

R_f (5% MeOH/CH₂Cl₂): 0.24

IR (NaCl): ν 3319, 3033, 2927, 2856, 1733, 1454, 1191, 750 cm⁻¹

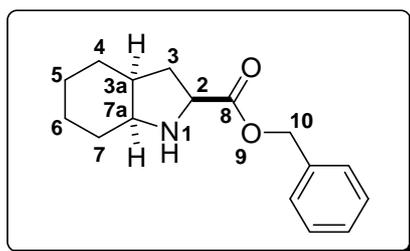
¹H-RMN ¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ 3.81 (dd, 1H, *J* 10.0 y 6.0, H₂), 3.74 (s, 3H, H₁₀), 3.09 (m, 1H, H_{7a}), 2.38 (sa, 1H, NH), 2.17 (ddd, 1H, *J* 12.8, 10.0 y 6.8, H₃), 2.03 (m, 1H, H_{3a}), 1.74-1.60 (m, 3H, H₃+2H₇), 1.52-1.30 (m, 3H, H₄+H₅+H₆), 1.30-1.15 (m, 3H, H₄+H₅+H₆)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 176.2 (C₈), 58.4 (C₂), 58.0 (C_{7a}), 52.0 (C₁₀), 37.9 (C_{3a}), 35.6 (C₃), 27.9 (C₇), 27.0 (C₄), 23.4 (C₅), 21.5 (C₆)

EM (APCI⁺, *m/z*): 184 [(M+H)⁺, 100%], 124 [(M-CO₂Me)⁺, 32%]

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OD	Eluyente: hexano/2-propanol (95:5)
Temperatura: 20 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R: 8.7 y 10.7 min	

(2S*,3aS*,7aS*)-Octahidroindol-2-carboxilato de bencilo
[(2S*,3aS*,7aS*)-29b y (2R,3aR,7aR)-29b]



Fórmula empírica: C₁₆H₂₁NO₂

Aspecto físico: Aceite amarillo

Peso Molecular: 259.34 g/mol

R_f (5% MeOH/CH₂Cl₂): 0.41

IR (NaCl): ν 3319, 3033, 2927, 2856, 1733, 1454, 1191, 750 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 400.13 MHz): δ 7.37-7.28 (m, 5H, Ph), 5.20 (s, 2H, H₁₀), 3.88 (dd, 1H, *J* 10.1 y 5.9, H₂), 3.03-3.12 (m, 1H, H_{7a}), 2.52 (sa, 1H, NH), 2.20 (ddd, 1H, *J* 12.8, 10.1 y 6.9, H₃), 2.07-1.95 (m, 1H, H_{3a}), 1.77-1.62 (m, 3H, H₃+2H₇), 1.52-1.40 (m, 3H, H₄+H₅+H₆), 1.40-1.30 (m, 1H, H₆), 1.18-1.28 (m, 2H, H₄+H₅)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 175.7 (C₈), 135.7 (C_{ipso}Ph), 128.5, 128.2, 128.1 (5C, Ph), 66.7 (C₁₀), 58.6 (C₂), 58.1 (C_{7a}), 37.9 (C_{3a}), 35.8 (C₃), 27.9 (C₇), 27.0 (C₄), 23.5 (C₅), 21.5 (C₆)

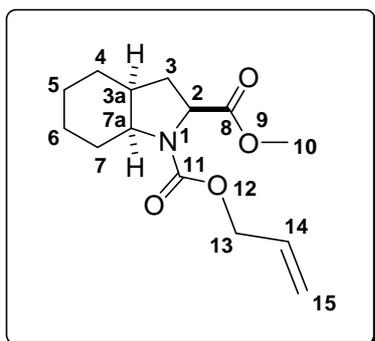
EM (APCI⁺, *m/z*): 260 [(M+H)⁺, 100%]

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OD	Eluyente: hexano/2-propanol (90:10)
Temperatura: 20 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (-)-(2S,3aS,7aS): 8.2 min	t_R (+)-(2R,3aR,7aR): 9.6 min

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +23.1$ (c = 1.0, CHCl₃), >99% ee [enantiómero (2R,3aR,7aR)], por alcoxicarbonilación enzimática

Parte experimental

(2S*,3aS*,7aS*)-N-Aliloxicarbonil-octahidroindol-2-carboxilato de metilo [(2S*,3aS*,7aS*)-30a]



Fórmula Molecular: C₁₄H₂₁NO₄

Aspecto físico: Aceite amarillo pálido

Peso Molecular: 267.32 g/mol

R_f (20% AcOEt/Hexano): 0.25

IR (NaCl): ν 2929, 2857, 1753, 1705, 1407, 1345, 1303, 1262, 1176, 1123, 1010 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 5.98-5.77 (m, 1H, H₁₁), 5.31-5.13 (m, 2H, H₁₅), 4.58-4.44 (m, 2H, H₁₃), 4.33-4.25 (m, 1H, H₂), 3.93-3.78 (m, 1H, H_{7a}), 3.73 (d, 3H, *J* 9.8, H₁₀), 2.34-2.29 (m, 1H, H_{3a}), 2.14-1.92 (m, 3H, 2H₃+H₇), 1.73-1.58 (m, 3H, 2H₄+H₅), 1.50-1.36 (m, 2H, H₆+H₇), 1.34-1.08 (m, 2H, H₅+H₆)

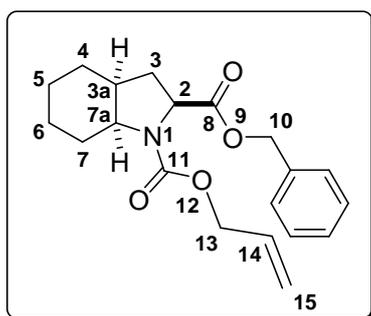
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ (las señales aparecen duplicadas por la presencia de rotámeros) 173.6, 173.4 (C₈), 154.4, 153.7 (C₁₁), 133.0, 132.7 (C₁₄), 117.1, 116.8 (C₁₅), 65.7, 65.5 (C₁₃), 59.0, 58.9 (C₂), 57.7, 57.3 (C_{7a}), 52.1, 52.0 (C₁₀), 37.0, 36.4 (C_{3a}), 32.5, 31.5 (C₃), 27.8, 27.2 (C₇), 25.7, 25.6 (C₄), 23.6, 23.5 (C₅), 20.4, 20.3 (C₆)

EM (APCI⁺, *m/z*): 268 [(M+H)⁺, 100%], 210 [(M-CO₂Me+2H)⁺, 10%], 182 [(M-CO₂CH₂CHCH₂)⁺, 31%], 124 [(M-CO₂CH₂CHCH₂-CO₂Me+H)⁺, 5%]

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OD	Eluyente: hexano/2-propanol (95:5)
Temperatura: 20 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R: (+)-9.6 y (-)-15.6 min	

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +30.4$ (c = 0.76, CHCl₃), >99% ee, por alcoxycarbonilación enzimática

(2S*,3aS*,7aS*)-N-Aliloxicarbonil-octahidroindol-2-carboxilato de bencilo [(2S*,3aS*,7aS*)-30b y (2S,3aS,7aS)-30b]



Fórmula Molecular: C₂₀H₂₅NO₄

Aspecto físico: Aceite amarillo pálido

Peso Molecular: 343.42 g/mol

R_f (20% AcOEt/Hexano): 0.29

IR (NaCl): ν 2929, 2857, 1750, 1703, 1407, 1347, 1303, 1262, 1172, 1124, 989 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.43-7.28 (m, 5H, Ph), 5.98-5.68 (m, 1H, H₁₄), 5.32-5.08 (m, 4H, H₁₀+H₁₃), 4.67-4.50 (m, 1H, H₁₅), 4.47-4.44 (m, 1H, H₁₅), 4.40-4.30 (m, 1H, H₂), 3.95-3.80 (m, 1H, H_{7a}), 2.32-2.23 (m, 1H, H_{3a}), 2.21-2.10 (m, 2H, H₃), 2.06-1.96 (m, 1H, H₇), 1.73-1.58 (m, 3H, H₅+2H₄), 1.50-1.38 (m, 2H, H₆+H₇), 1.32-1.14 (m, 2H, H₅+H₆)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ (la mayor parte de las señales aparecen duplicadas por la presencia de rotámeros) 173.0, 172.8 (C₈), 154.4, 153.7 (C₁₁), 135.8, 135.6 (C_{ipso} Ph), 133.0, 132.7 (C₁₄), 128.5, 128.4, 128.2, 128.0, 127.9 (5C, Ph), 117.1, 116.9 (C₁₅), 66.6 (C₁₄), 65.7, 65.6 (C₁₃), 59.1, 59.0 (C₂), 57.7, 57.3 (C_{7a}), 37.0, 36.4 (C_{3a}), 32.5, 31.4 (C₃), 27.8, 27.2 (C₇), 25.7, 25.6 (C₄), 23.6, 23.5 (C₅), 20.4, 20.3 (C₆).

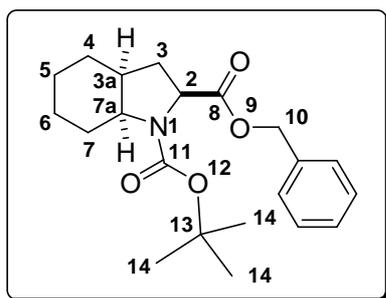
EM (APCI⁺, m/z): 366 [(M+Na+H)⁺, 70%], 344 [(M+2H)⁺, 100%]

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OD	Eluyente: hexano/2-propanol (90:10)
Temperatura: 20 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (-)-(2S,3aS,7aS): 9.1 min	t_R (+)-(2R,3aR,7aR): 12.1 min

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = -42.8$ (c = 1.0, CHCl₃), 98% ee [enantiómero (2S,3aS,7aS)], por alcoxycarbonilación enzimática

Parte experimental

***N*-(*terc*-Butoxicarbonil)octahidroindol-2-carboxilato de bencilo [(2*S*^{*},3*aS*^{*},7*aS*^{*})-32 y (2*R*,3*aR*,7*aR*)-32]**



Fórmula Molecular: C₂₁H₂₉NO₄

Aspecto físico: Sólido blanco

Peso Molecular: 359.46 g/mol

R_f (20% AcOEt/Hexano): 0.43

PF: 65-67 °C

IR (KBr): ν 2993, 2975, 2924, 2854, 1742, 1699, 1475, 1457, 1399, 1363, 1308, 1257, 1182, 1121, 968, 903, 760 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.35 (m, 5H, Ph), 5.32-5.09 (m, 2H, H₁₀), 4.37-4.23 (m, 1H, H₂), 3.90-3.74 (m, 1H, H_{7a}), 2.34-2.28 (m, 1H, H_{3a}), 2.18-2.08 (m, 2H, H₃), 2.05-1.95 (m, 1H, H₇), 1.74-1.59 (m, 3H, 2H₄+H₅), 1.50-1.27 (m, 11H, H₆+H₇+H₁₄), 1.25-1.09 (m, 2H, H₅+H₆)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ (la mayor parte de las señales aparecen duplicadas por la presencia de rotámeros) 173.4, 173.1 (C₈), 153.3 (C₁₁), 135.7 (C_{ipso} Ph), 128.6, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 127.9 (5C, Ph), 79.7, 79.5 (C₁₃), 66.6 (C₁₀), 59.4, 59.0 (C₂), 57.4, 57.1 (C_{7a}), 37.0, 36.4 (C_{3a}), 32.6, 31.6 (C₃); 28.5, 28.3 (3C₁₄), 27.9, 27.5 (C₇), 25.8 (C₄); 23.8, 23.7 (C₅), 20.6 (C₆)

EM (APCI⁺, m/z): 360 [(M+H)⁺, 100%], 304 {[M-C(CH₃)₃+H]⁺, 35%}, 260 {[M-CO₂C(CH₃)₃]⁺, 85%}

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OD	Eluyente: hexano/2-propanol (95:5)
Temperatura: 20 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (+)-(2 <i>R</i> ,3 <i>aR</i> ,7 <i>aR</i>): 8.1 min	t_R (-)-(2 <i>S</i> ,3 <i>aS</i> ,7 <i>aS</i>): 13.3 min

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +34.4$ (c = 1.0, CHCl₃), >99% ee [enantiómero (2*R*,3*aR*,7*aR*)], por alcoxicarbonilación enzimática

CAPÍTULO 5

***Síntesis química de α -aminofosfonatos
cíclicos y resolución cinética enzimática***

ANTECEDENTES

Los aminofosfonatos, considerados los homólogos fosforados de los aminoácidos, poseen una amplia variedad de propiedades y aplicaciones, que incluye desde la síntesis de compuestos orgánicos y polímeros a la biología y la bioquímica, lo que ha conducido a una intensa actividad investigadora durante décadas. Además, es bien sabido que la actividad biológica de los ácidos α -aminofosfónicos y sus derivados depende en gran medida de la configuración absoluta del carbono situado en la posición contigua al átomo de fósforo,²³⁷ por lo que resulta de especial interés el desarrollo de metodologías sintéticas asimétricas para su preparación.

Así, continuando con la metodología empleada a lo largo de esta memoria de investigación, nos hemos propuesto sintetizar una serie de α -aminofosfonatos cíclicos racémicos para luego estudiar su resolución cinética a través de procesos biocatalíticos que conduzcan a la obtención de los mismos en forma ópticamente activa.

De esta manera, se intentará acceder a los derivados de los ácidos α -aminofosfónicos enantiopuros de una manera complementaria a la que han desarrollado en el grupo del Profesor Carlos Cativiela, basada en la resolución de las mezclas racémicas empleando la técnica de HPLC en modo preparativo.

Cabe resaltar que los resultados aquí obtenidos se desarrollaron previamente en una estancia predoctoral de tres meses en la Universidad de Zaragoza para llevar a cabo la síntesis de los productos racémicos en colaboración con la doctoranda Alicia Arizpe, para luego abordar los estudios de resolución enzimática en la Universidad de Oviedo.

²³⁷ a) V. A. Solodenko, V. P. Kukhar, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *32*, 66-75; b) C. Stamper, B. Bennett, T. Edwards, R. C. Holz, D. Ringe, G. Petsko, *Biochemistry* **2001**, *40*, 7035-7046; c) M. Drag, M. Pawelczak, P. Kafarski, *Chirality* **2003**, *15*, S104-S107.

II.5.1.1. ESTRUCTURA Y APLICACIONES

Los ácidos α -aminofosfónicos y sus correspondientes α -aminofosfonatos (Figura 5-1) resultan de la sustitución isostérica del grupo funcional plano CO_2R por otro tetraédrico y más voluminoso, el PO_3R_2 . Este cambio no conlleva únicamente modificaciones en la estructura molecular del compuesto, sino que también se ven modificadas su acidez y otras propiedades.

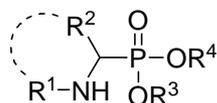


Figura 5-1. Estructura general de los α -aminofosfonatos cíclicos o lineales

Su despreciable toxicidad en mamíferos y el hecho de tener la capacidad de mimetizar de forma muy eficiente los ácidos carboxílicos, los convierte en antimetabolitos de gran importancia que compiten con los anteriores por el centro activo de enzimas y otros receptores.²³⁸ Aunque la importancia biológica de estos compuestos se descubrió hace más de 50 años, todavía hoy representan una prometedora y aún por descubrir fuente de potenciales fármacos. Actualmente, están atrayendo un enorme interés tanto en química orgánica, donde pueden encontrar aplicación como catalizadores quirales en síntesis asimétrica,²³⁹ como en el campo de la química médica, debido a la variedad de funciones que desarrollan, siendo especialmente atractivos en su forma enantiopura. Este tipo de moléculas, bien a nivel individual o formando parte de péptidos, presentan destacables perfiles biológicos, como puede ser su actuación como inhibidores enzimáticos,¹⁴⁸ antitumorales,²⁴⁰ agentes antibacterianos²⁴¹ o herbicidas,²⁴² entre otros.

²³⁸ P. Kafarski, B. Lejczak, *Curr. Med. Chem.: Anti-Canc. Agents* **2001**, *1*, 301-312.

²³⁹ a) H. Rao, Y. Jin, H. Fu, Y. Jiang, Y. Zhao, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 3636-3646; b) P. Dinér, M. Amedjkouh, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2091-2096.

²⁴⁰ G. Lavielle, P. Hautefaye, C. Schaeffer, J. A. Boutin, C. A. Cudennec, A. Pierré, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1998-2003.

²⁴¹ a) S. N. Osipov, O. I. Artyushin, A. F. Kolomiets, C. Bruneau, P. H. Dixneuf, *Synlett* **2000**, 1031-1033; b) J. D. Moore, K. T. Sprott, P. R. Hanson, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8123-8129; c) W. Liu, C. J. Rogers, A. J. Fisher, M. D. Toney, *Biochemistry* **2002**, *41*, 12320-12328; d) J. Grembecka, A. Mucha, T. Cierpicki, P. Kafarski, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2641-2655.

Por otro lado, los ácidos α -aminofosfónicos y sus monoésteres de alquilo también resultan interesantes en el campo de la hidrometalurgia, donde son empleados para la extracción de metales,²⁴³ y en el de la diagnosis médica, una vez complejados con lantánidos y actínidos.²⁴⁴

II.5.1.2. PREPARACIÓN DE AMINOFOSFONATOS CÍCLICOS

Los aminofosfonatos se consideran uno de los tipos de compuestos heterocíclicos de mayor importancia biológica.²⁴⁵ Además, la incorporación de compuestos cíclicos en posiciones concretas de cadenas peptídicas también juega un importante papel en el diseño de péptidos con una determinada conformación, técnica empleada para el desarrollo de nuevos fármacos.²⁴⁶

Por tratarse de la temática recogida en este capítulo, a continuación se muestran algunos ejemplos de metodologías sintéticas que permiten el acceso a aminofosfonatos cíclicos con tamaños de anillo de 5, 6 y 7 miembros.

II.5.1.2.1. SÍNTESIS DE DERIVADOS DE ÁCIDOS AMINOFOSFÓNICOS EN FORMA RACÉMICA

La síntesis más sencilla del fosfonato análogo a la prolina en forma racémica consiste en una adición de fosfito de dietilo a un derivado imínico de la 1-pirrolina en forma de trímero (Esquema 5-1),²⁴⁷ el cual se sintetiza previamente mediante una oxidación de la pirrolidina con peroxodisulfato catalizada por plata.²⁴⁸

²⁴² a) P. Wieczorek, B. Lejczak, M. Kaczanowska, P. Kafarski, *Pestic. Sci.* **1990**, *30*, 43-57; b) T. Wang, H. J. Huang, J. Luo, D. H. Yu, *Phosphorous, Sulfur, Silicon Relat. Elem.* **2012**, *187*, 135-141.

²⁴³ V. Jagodic, M. J. Herak, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1970**, *32*, 1323-1332.

²⁴⁴ R. Engel, *Chem. Rev.* **1977**, *77*, 349-367.

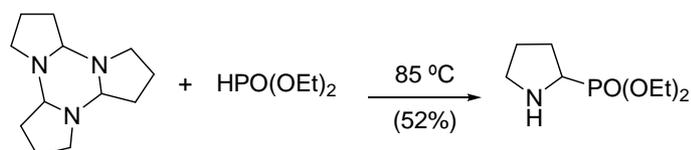
²⁴⁵ K. Moonen, I. Laureyn, C. V. Stevens, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 6177-6215.

²⁴⁶ S. M. Cowell, Y. S. Lee, J. P. Cain, V. Hruby, *J. Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2785-2798.

²⁴⁷ E. W. Petrillo, E. R. Spitzmiller, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *51*, 4929-4930.

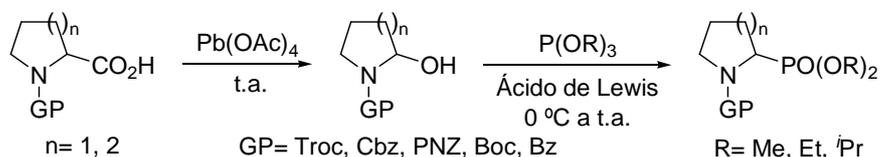
²⁴⁸ Y. Nomura, K. Ogawa, Y. Takeuchi, S. Tomoda, *Chem. Lett.* **1977**, 693-696.

Antecedentes



Esquema 5-1. Síntesis del (pirrolidin-2-il)fosfonato de dietilo por adición de un fosfito al trímero derivado de la 1-pirrolina

Otra síntesis simple y efectiva, aplicada a ciclos de 5 y 6 eslabones, consiste en la transformación química de α -aminoácidos cíclicos en los correspondientes α -aminofosfonatos.²⁴⁹ Para ello, inicialmente se lleva a cabo una descarboxilación oxidativa de los aminoácidos protegidos en su grupo amino, empleando para ello tetraacetato de plomo. A continuación, las 2-hidroxiaminas formadas se hacen reaccionar con fosfitos de trialquilo en presencia de ácidos de Lewis para dar lugar a los aminofosfonatos buscados con rendimientos moderados (Esquema 5-2).

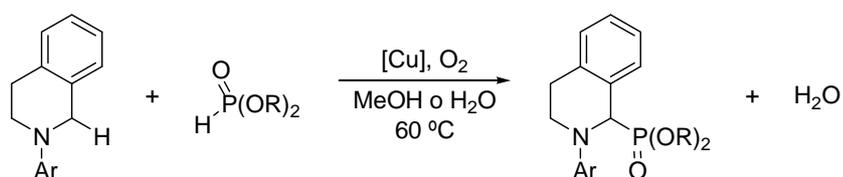


Esquema 5-2. Conversión de aminoácidos *N*-protegidos en aminofosfonatos por tratamiento con $\text{Pb}(\text{OAc})_4$ y posterior introducción de un fosfito en presencia de un ácido de Lewis

En los últimos años también se ha publicado la preparación de análogos fosforados de la prolina o del ácido piperídico con anillos fusionados, aromáticos o totalmente saturados. Así, en 2009 se describió una metodología para la introducción del grupo fosfonato en posiciones bencílicas de piperidinas protegidas y con anillos aromáticos fusionados, la cual consiste en una fosfonación catalizada por cobre de un enlace C-H con hibridación sp^3 adyacente a un átomo de nitrógeno (Esquema 5-3).²⁵⁰ En este acoplamiento cruzado, el oxígeno molecular actúa como oxidante final, permitiendo el acceso a α -aminofosfonatos con importancia biológica.

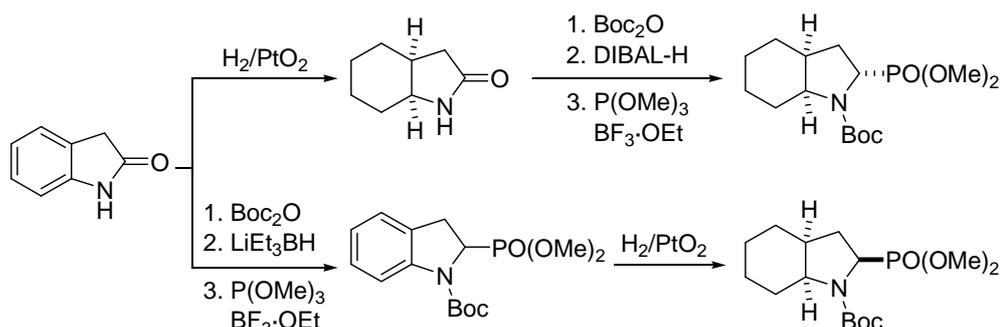
²⁴⁹ M. Kaname, H. Mashige, S. Yoshifuji, *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, 49, 531-536.

²⁵⁰ O. Baslé, C.-J. Li, *Chem. Commun.* **2009**, 4124-4126.



Esquema 5-3. Fosfonación aeróbica de *N*-ariltetrahidroisoquinolinas catalizada por diferentes sales de cobre (I)

Recientemente, el grupo del Profesor Cativiela ha descrito la síntesis racémica de dos estereoisómeros del ácido octahidroindol-2-fosónico, los cuales poseen una fusión *cis* entre los dos anillos, siendo la diferencia entre ambos la configuración del C_α al átomo de fósforo.²⁵¹ El procedimiento parte de un precursor común, la 2-indolinona, la cual se transforma en los compuestos deseados siguiendo dos rutas estereodivergentes que comprenden procesos de hidrogenación del anillo aromático, protección del grupo amino, reducción del carbonilo e introducción del grupo fosfonato mediante la adición nucleófila de un fosfito. Así, para acceder a cada uno de los isómeros, resulta clave la selección adecuada del orden de las modificaciones (Esquema 5-4). En ambos casos, los procesos transcurren con un estereocontrol total.



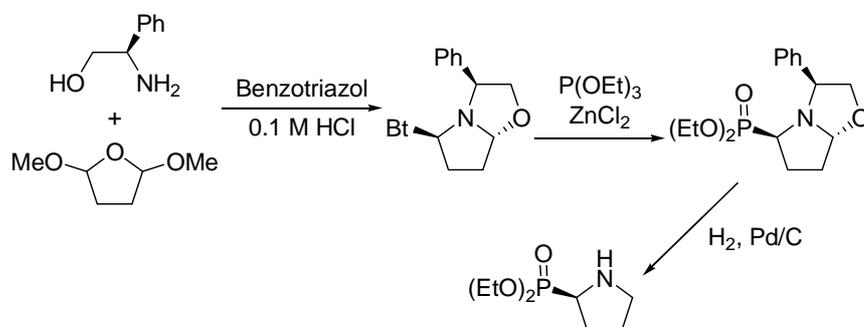
Esquema 5-4. Síntesis del (2*S*^{*},3*aS*^{*},7*aS*^{*})- y el (2*R*^{*},3*aS*^{*},7*aS*^{*})-octahidroindol-2-fosfonato de metilo mediante dos rutas estereodivergentes

También se han descrito multitud de ejemplos de síntesis asimétricas, algunas de las cuales se encuentran recogidas a continuación.

²⁵¹ A. Arizpe, F. J. Sayago, A. I. Jiménez, M. Ordóñez, C. Cativiela, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3074-3081.

II.5.1.2.2. SÍNTESIS DE ÁCIDOS AMINOFOSFÓNICOS Y DERIVADOS ÓPTICAMENTE ACTIVOS

En primer lugar, Katritzky y colaboradores han descrito la síntesis de un sintón quiral de la pirrolidina, el (3*S*,5*R*,7*aR*)-5-(benzotriazol-1-il)-3-fenil-[2,1-*b*]-oxazopirrolidina, a partir de 2,5-dimetoxitetrahydrofurano, benzotriazol y (*S*)-fenilglicinol, el cual puede reaccionar de forma asimétrica con diferentes nucleófilos para dar lugar a pirrolidinas 2-sustituidas.²⁵² En este caso, a través de una reacción de Michaelis-Arbuzov, se lleva a cabo la introducción de fosfito de dietilo en presencia de cloruro de zinc para obtener el correspondiente fosfonato. Finalmente, una hidrogenación catalizada por paladio conduce al aminofosfonato deseado (Esquema 5-5). Además, el tratamiento del intermedio bicíclico fosforado con butil-litio y yoduro de metilo, permite la formación de un centro cuaternario en posición α al átomo de fósforo con total diastereoselectividad.²⁵³



Esquema 5-5. Obtención del (*R*)-(pirrolidin-2-il)fosfonato de dietilo partiendo de un sustrato quiral

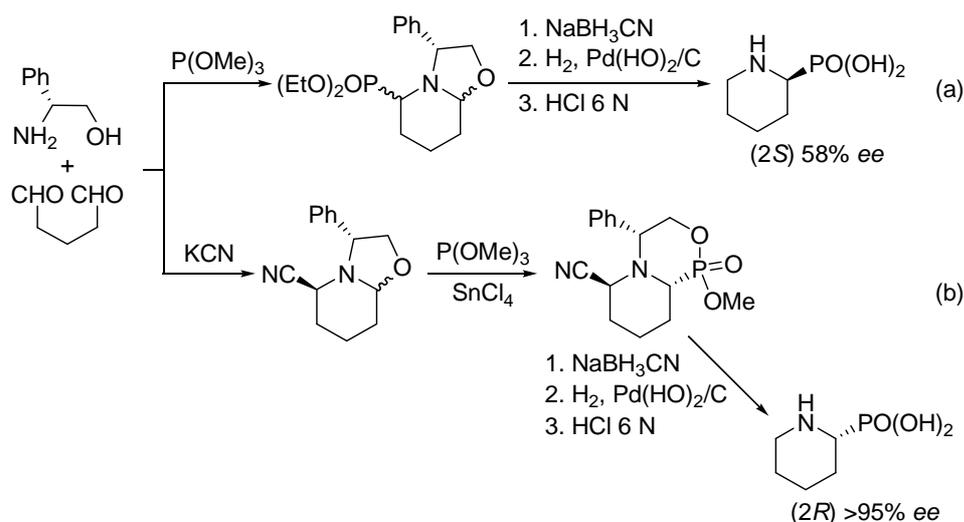
Otra forma de acceder al ácido α -aminofosfónico derivado de la prolina pasa a través de un intermedio piperidazínico, obtenido mediante un proceso “one-pot” en el que se combinan una reacción de hetero-Diels-Alder y una fosfonilación catalizada por un ácido de Lewis, el cual se transforma posteriormente en el compuesto deseado a través de una oxidación, una hidrólisis en medio ácido y una hidrogenación (Esquema 5-

²⁵² A. R. Katritzky, X.-L. Cui, B. Yang, P. J. Steel, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1979-1985.

²⁵³ M. Amedjikouh, K. Westerlund, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 5175-5177.

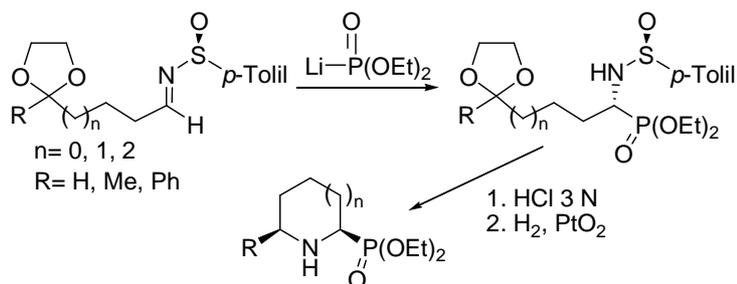
Antecedentes

tres pasos adicionales que dan lugar finalmente al ácido α -aminofosfónico de configuración *R* con excelente selectividad (Esquema 5-7, b).



Esquema 5-7. Estrategia estereodivergente para la obtención de ambos enantiómeros del ácido (piperidin-2-il)fosfónico partiendo de idénticos sustratos de partida

Finalmente, Davies y colaboradores describieron un modo de preparación de α -aminofosfonatos cíclicos enantioméricamente puros, aplicable a anillos de 5, 6 y 7 miembros, a través de la adición diastereoselectiva de fosfonatos metálicos a oxo-sulfiniminas enmascaradas, seguida de un proceso de hidrólisis-ciclación y posterior reducción (Esquema 5-8).²⁵⁷



Esquema 5-8. Empleo de oxo-sulfiniminas enmascaradas como productos de partida en la síntesis asimétrica de α -aminofosfonatos cíclicos

²⁵⁷ F. A. Davies, S. H. Lee, H. Xu, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 3774-3781.

II.5.1.3. RESOLUCIONES CINÉTICAS ENZIMÁTICAS PARA LA OBTENCIÓN DE AMINOFOSFONATOS QUIRALES

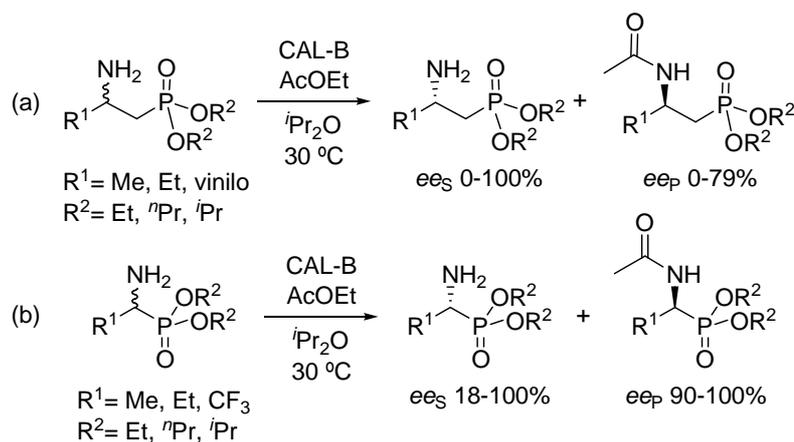
Aunque se conocen ejemplos de resolución enzimática de α -aminoésteres cíclicos análogos a los compuestos aquí estudiados,²⁵⁸ hasta la fecha no se ha descrito ningún proceso biocatalítico que permita acceder por separado a ambos enantiómeros de aminofosfonatos de naturaleza cíclica.

Además, llama la atención que en la bibliografía sólo se encuentre recogido un trabajo en el que se lleve a cabo una resolución enzimática de α - y β -aminofosfonatos de cadena abierta.²⁵⁹ En él, inicialmente, se optimizan las condiciones de reacción empleando para ello el 2-aminopropilfosfonato de diisopropilo, extendiéndolas a continuación a sustratos similares (Esquema 5-9, a). Así, se encuentra que la CAL-B resulta ser un catalizador adecuado para la acilación enantioselectiva del grupo amino, empleando acetato de etilo como agente acilante y éter diisopropílico como disolvente. Estos experimentos mostraron que la estereoselectividad presentaba una fuerte dependencia en función del resto alquilo conectado al carbono estereogénico, observándose un claro descenso en el valor de la misma al pasar de metilo a etilo y una ausencia total de reactividad cuando se trata del resto vinilo. Al tratar de aplicar esta metodología a los 1-aminoalquilfosfonatos, la naturaleza de los sustratos resultó ser aún más restrictiva, observándose únicamente buenos resultados para $R^1 = \text{Me}$ ($E > 200$), una cinética mucho más lenta al alargar la cadena en un átomo de carbono ($R^1 = \text{Et}$), aunque se seguía manteniendo una excelente selectividad, y una ausencia de reactividad con $R^1 = \text{CF}_3$ (Esquema 5-9, b).

²⁵⁸ A. Liljeblad, J. Lindborg, A. Kanerva, J. Katajisto, L. T. Kanerva, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2471-2474.

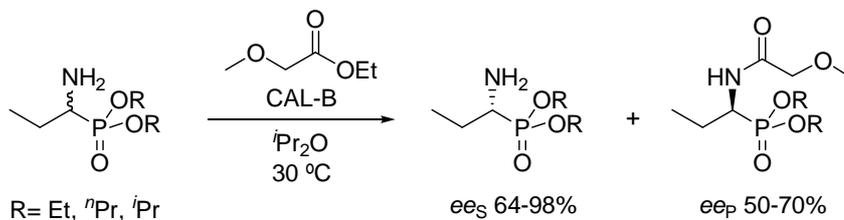
²⁵⁹ C. Yuan, C. Xu, Y. Zhang, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3499-3504.

Antecedentes



Esquema 5-9. Acetilación enantioselectiva de 2- (a) y 1-aminoalcanofosfonatos (b) catalizada por la CAL-B

Con el fin de solventar las limitaciones del segundo derivado ($R^1 = \text{Et}$), los autores emplearon el metoxiacetato de etilo como agente acilante por su mayor reactividad respecto al acetato de etilo (Esquema 5-10), pero la enantioselectividad del proceso sufrió un brusco descenso ($E = 6-17$).

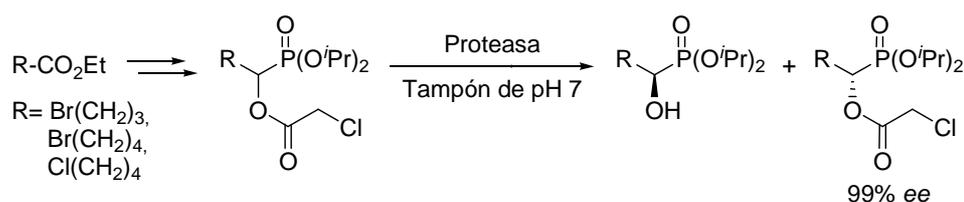


Esquema 5-10. Resolución cinética enzimática de 1-aminopropilfosfonatos empleando metoxiacetato de etilo como agente acilante y CAL-B como biocatalizador

Dada la variedad de propiedades biológicas que han resultado presentar este tipo de compuestos, han sido numerosos los intentos de acceder a ellos de forma ópticamente activa a través de la resolución enzimática de sus homólogos hidroxilados, bien a través de acilaciones de la función alcohol o mediante hidrólisis de sus acetatos, y una posterior transformación química que condujese a los aminofosfonatos deseados.²⁶⁰

²⁶⁰ a) Y.-F. Li, F. Hammerschmidt, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, 4, 109-120. b) T. Yokomatsu, M. Sato, S. Shibuya, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 2743-2754; c) F. Hammerschmidt, F. Wuggenig, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1998**, 141, 231-238; d) F. Hammerschmidt, F. Wuggenig, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, 10, 1709-1721; e) F.

Pero el que puede resultar de mayor interés por recoger la síntesis quimioenzimática de dos de los compuestos que se tratarán en este capítulo, la fosfoprolina y el ácido fosfopipecólico, es un trabajo publicado en 2011 por Wuggenig y colaboradores.²⁶¹ En él, se emplean (*S*)- ω -halo- α -hidroxifosfonatos como productos de partida para la preparación de los ácidos fosfónicos. Dichos hidroxifosfonatos, sintetizados a partir de ésteres disponibles comercialmente, fueron obtenidos con un 99% ee mediante una resolución cinética de los correspondientes cloroacetatos por hidrólisis catalizada por la proteasa Chirazyme[®] P-2 (Esquema 5-11). Para lograr este elevado grado de pureza óptica, se dejó que las conversiones alcanzasen valores superiores al 50%.



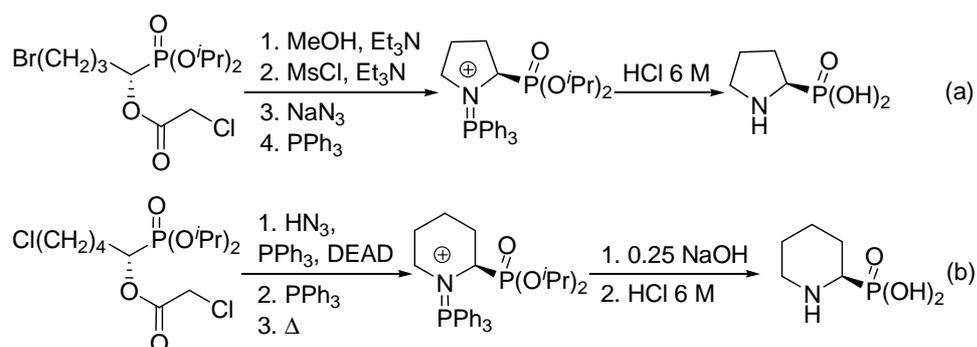
Esquema 5-11. Resolución de ω -halo- α -hidroxifosfonatos mediante hidrólisis *R*-selectiva de los correspondientes cloroacetatos catalizada por una proteasa

Haciendo uso de los haloacetatos remanentes enantiopuros, llevaron a cabo la preparación de los ácidos aminofosfónicos cíclicos correspondientes empleando procedimientos sintéticos sencillos adaptados a cada uno de los sustratos por la diferente reactividad mostrada (Esquema 5-12).

Hammerschmidt, W. Lindner, F. Wuggenig, E. Zarbl, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 2955-2964; f) A. Woschek, W. Lindner, F. Hammerschmidt, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 1287-1298.

²⁶¹ F. Wuggenig, A. Schweifer, K. Mereiter, F. Hammerschmidt, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 1870-1879.

Antecedentes



Esquema 5-12. Síntesis química asimétrica de: (a) fosfoprolina y (b) ácido fosfopípecólico, de configuración *R*

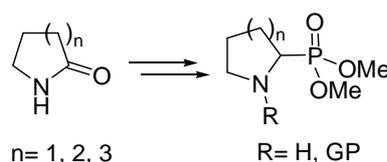
En resumen, a pesar de que se han estudiado resoluciones cinéticas de α - y β -hidroxi²⁶⁰⁻²⁶² y aminofosfonatos²⁵⁹ lineales tanto a través de procesos de hidrólisis como de acilación, no se conocen ejemplos sobre la resolución de aminofosfonatos cíclicos. Por eso, nos hemos propuesto tratar de desarrollar una metodología quimioenzimática que permita el acceso a α -aminofosfonatos cíclicos enantioenriquecidos a través de su resolución enzimática catalizada por hidrolasas.

²⁶² a) Y. Zhang, C. Yuan, Z. Li, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 2973-2978; b) O. Pàmies, J.-E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4815-4818; c) Y. Demizu, A. Moriyama, O. Onomura, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 5241-5244.

OBJETIVOS

Al inicio de este capítulo se han expuesto algunas de las potenciales aplicaciones que hacen de la obtención de α -aminofosfonatos cíclicos, tanto en su forma racémica como quiral, un tema de estudio de gran interés. Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito la preparación de este tipo de compuestos a través de aproximaciones quimioenzimáticas. Por ello, en este capítulo nos hemos planteado desarrollar:

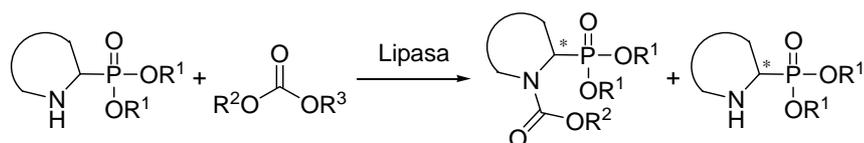
1. Una ruta sintética general, sencilla y eficaz para la síntesis de una familia de α -aminofosfonatos cíclicos, con tamaños de anillo de 5, 6 y 7 miembros, a partir de las correspondientes lactonas accesibles comercialmente.



2. Métodos analíticos adecuados que permitan la medida del exceso enantiomérico de los compuestos obtenidos en los procesos biocatalizados, teniendo en cuenta que los mismos carecen de grupos cromóforos para su detección mediante técnicas de luz visible-ultravioleta.
3. Un estudio detallado de los procesos de resolución cinética de los α -aminofosfonatos sintetizados, empleando hidrolasas como biocatalizadores, analizando exhaustivamente las distintas variables que influyen en la catálisis enzimática.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este proyecto, al igual que el recogido en el capítulo anterior, fue desarrollado en el marco de colaboración entre el grupo de investigación de Química Bioorgánica de la Universidad de Oviedo y el del Profesor Carlos Cativiela de la Universidad de Zaragoza, habiéndose llevado a cabo la parte sintética durante una estancia predoctoral de tres meses en dicha universidad. Posteriormente, se estudiaron diferentes alternativas para la resolución de los α -aminofosfonatos, empleando procesos de alcoxicarbonilación enzimática de su grupo amino con el fin de separar sus enantiómeros (Esquema 5-13).

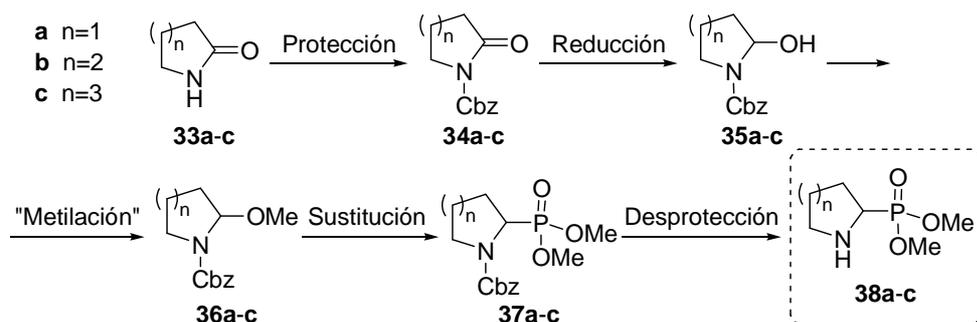


Esquema 5-13. Resolución cinética enzimática de α -aminofosfonatos cíclicos a través de un proceso de alcoxicarbonilación de su grupo amino

II.5.3.1. SÍNTESIS QUÍMICA DE DERIVADOS DE ÁCIDOS α -AMINOFOSFÓNICOS

Aunque inicialmente se intentó reproducir la metodología descrita para la síntesis de la fosfoprolina a través del trímero de naturaleza imínica,^{247,248} los rendimientos alcanzados fueron muy bajos, siendo además un proceso que carece de carácter general para su aplicación a los derivados cíclicos de diferentes tamaños de anillo, por lo que se decidió diseñar una ruta sintética alternativa, común a todos ellos.

La metodología empleada se ha representado en el Esquema 5-14. Así, la lactama de tamaño adecuado, comercialmente accesible, se somete a un proceso inicial de protección de su grupo amino. A continuación se reduce el carbonilo para obtener un hemiaminal lábil cuyo grupo hidroxilo se reemplaza por su análogo metilado, más favorecido a su vez para actuar como grupo saliente. Posteriormente se introduce el grupo fosfonato mediante una sustitución catalizada por un ácido de Lewis, donde el fosfito actúa como nucleófilo. Y, finalmente, se lleva a cabo la desprotección del grupo amino para la obtención del α -aminofosfonato en su forma libre.

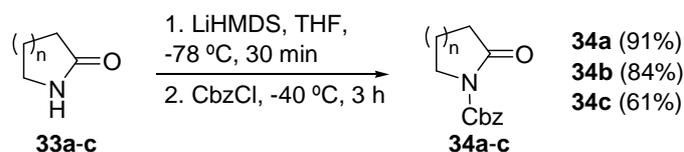


Esquema 5-14. Ruta sintética general para la preparación de α -aminofosfonatos cíclicos

Una vez descrito el procedimiento a seguir, se tratará cada uno de los pasos sintéticos por separado debido a la particular reactividad química mostrada por alguno de los sustratos.

II.5.3.1.1. SÍNTESIS DE LAS LACTAMAS N-PROTEGIDAS 34a-c

El primer paso de la ruta sintética consiste en la protección del grupo amino de las lactamas comerciales **33a-c**. En este tipo de compuestos, los electrones de la capa de valencia del nitrógeno se encuentran conjugados con el grupo carbonilo adyacente, reduciendo considerablemente la nucleofilia de dicho heteroátomo. Por este motivo, es necesaria su desprotonación previa a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$, empleando una base fuerte como el bis(trimetilsilil)amiduro de litio (LiHMDS), para permitir la posterior reacción con el cloroformiato de bencilo (Esquema 5-15).²⁶³ De esta forma, tras una extracción para la eliminación de sales y una purificación por columna cromatográfica, se obtuvieron las correspondientes lactamas protegidas **34a-c** con rendimientos entre el 61 y el 91%.



Esquema 5-15. N-Protección de lactamas con el grupo benciloxicarbonilo (Cbz)

El descenso observado en algunos de los rendimientos es debido, en parte, a la formación del enolato y posterior introducción del grupo Cbz en la posición en α al carbonilo a través de una condensación de Claisen.

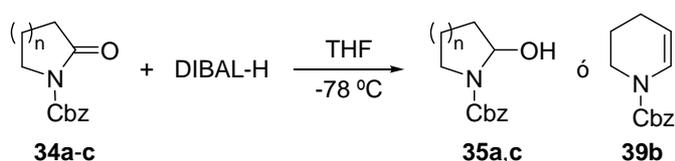
II.5.3.1.2. REDUCCIÓN DEL GRUPO CARBONILO. PREPARACIÓN DE LOS HEMIAMINALES 35a-c

Inicialmente, el procedimiento seleccionado para la obtención de los compuestos **35a-c** consistió en el empleo de un reductor suave, como es el hidruro de di-isobutilaluminio (DIBAL-H), para evitar la apertura del anillo y la consiguiente reducción de la función aldehído que daría lugar a ω -hidroxicarbamatos (Esquema 5-16).²⁶⁴

²⁶³ J. R. Medina, C. W. Blackledge, K. F. Erhard, J. M. Axten, W. H. Miller, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3946-3949.

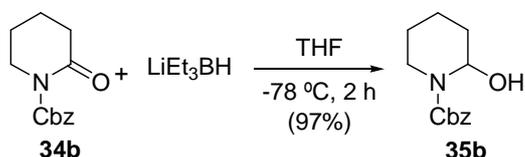
²⁶⁴ R. K. Dieter, R. R. Sharma, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4180-4184.

Resultados y Discusión



Esquema 5-16. Formación de hemiaminales *N*-protegidos por reducción de la función carbonilo de las lactamas con DIBAL-H. Problemas de eliminación con el sustrato **34b**

Esta metodología resultó efectiva en el caso de los compuestos cíclicos de 5 y 7 miembros, alcanzando rendimientos superiores al 90% en ambos casos, si bien es cierto que en el espectro de $^1\text{H-RMN}$ se observa una señal correspondiente al aldehído, lo que indica la presencia en disolución de la forma abierta en pequeña proporción. Sin embargo, para el derivado **34b** se observó la formación mayoritaria del compuesto **39b** procedente de la deshidratación del hemiaminal en las condiciones de reacción. Aunque la introducción de modificaciones en el trabajo de la reacción, una vez consumido el producto de partida, logró disminuir el porcentaje del producto de eliminación formado, el método continuó sin ser del todo satisfactorio. Por este motivo, se decidió cambiar de agente reductor y emplear, en este caso, trietilborohidruro de litio (LiEt_3BH , Superhidruro), por estar descrito que es un reactivo capaz de formar hemiaminales partiendo de lactamas.²⁶⁵ Así, la lactama protegida **34b** se hizo reaccionar con LiEt_3BH a baja temperatura para obtener, como único producto de la reacción y un rendimiento cuantitativo, el hemiaminal deseado **35b** (Esquema 5-17).

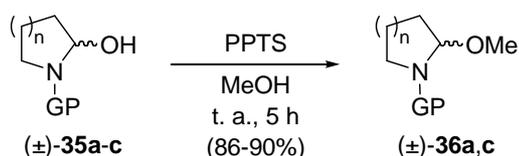


Esquema 5-17. Formación del hemiaminal **35b** a partir de la correspondiente lactama, empleando Superhidruro como agente reductor

²⁶⁵ a) Y. Takeuchi, S.-i. Tokuda, T. Takagi, M. Koike, H. Abe, T. Harayama, Y. Shibata, H.-s. Kim, Y. Wataya, *Heterocycles* **1999**, 51, 1869-1875; b) O. Okitsu, R. Suzuki, S. Kobayashi, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 809-823.

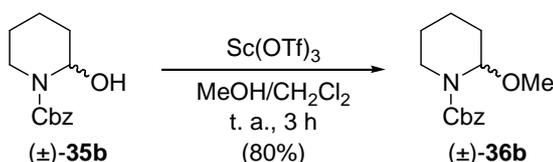
II.5.3.1.3. METILACIÓN FORMAL DEL GRUPO HIDROXILO PARA DAR LUGAR A LOS ÉTERES DE HEMIAMINAL 36a-c

Una vez logrado el acceso a los tres hemiaminales *N*-protegidos (**35a-c**), se llevó a cabo una transacetalización con metanol que posibilitase una metilación formal del grupo hidroxilo.²⁶³ De este modo, el tratamiento de los compuestos **35a-c** con *p*-toluensulfonato de piridinio (PPTS) condujo a la formación de los éteres de hemiaminal buscados **36a,c** con altos rendimientos (Esquema 5-18).



Esquema 5-18. Transacetalización de hemiaminales catalizada por PPTS

Sin embargo, como en el caso anterior, la metodología seleccionada no resultó ser efectiva para el sustrato **35b** debido, nuevamente, a problemas de eliminación y formación del alqueno **39b** derivados de la acidez del catalizador, siendo necesario un cambio en las condiciones de reacción para llevar a cabo este proceso. En este caso, el catalizador seleccionado para lograr la transacetalización en una mezcla de metanol y diclorometano fue el triflato de escandio (III), el cual actúa desempeñando la función de ácido de Lewis (Esquema 5-19).

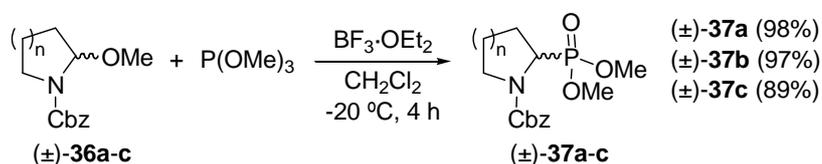


Esquema 5-19. Transacetalización del hemiaminal **35b** catalizada por Sc(OTf)₃

A pesar de que el compuesto **36b** se obtuvo como único producto de la reacción, su inestabilidad en sílica gel y CDCl₃²⁶⁴ impidió su correcta purificación y análisis, por lo que el siguiente paso se puso sobre el crudo de reacción.

II.5.3.1.4. PREPARACIÓN DE LOS α -AMINOFOSFONATOS PROTEGIDOS (\pm)-37a-c

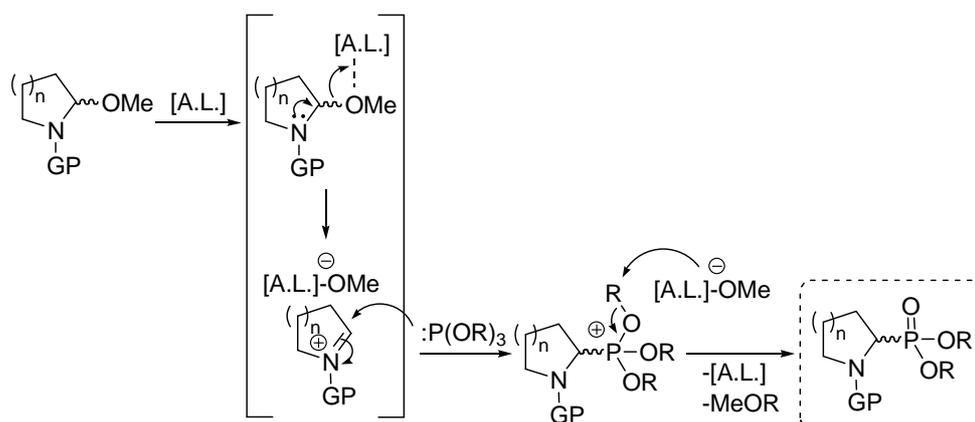
Como se pudo comprobar en la introducción a esta segunda parte y en los antecedentes del capítulo, la reacción de adición de fosfitos de trialquilo a derivados imínicos en presencia de un ácido de Lewis ha sido una de las metodologías empleadas desde hace décadas para obtener α -aminofosfonatos. De esta manera, siguiendo un procedimiento desarrollado por Shono y colaboradores,²⁶⁶ finalmente se llevó a cabo la formación del enlace P-C mediante la adición de fosfito de trimetilo a los α -metoxicarbamatos **36a-c** a baja temperatura y en presencia de trifluoruro de boro eterato ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$) ejerciendo la función de ácido de Lewis (Esquema 5-20). Así, tras purificación por columna cromatográfica, se obtuvieron los α -aminofosfonatos **37a-c** con rendimientos entre altos y excelentes.



Esquema 5-20. Reacción de formación de los α -aminofosfonatos **37a-c** por adición de fosfito de trimetilo a los éteres de hemiaminal **36a-c** sintetizados en el paso anterior, en presencia de trifluoruro de boro eterato

En el mecanismo propuesto para esta transformación, el tratamiento de los éteres de hemiaminal con un ácido de Lewis ($\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$, TiCl_4 , ZnCl_2 o SnCl_4) generaría sales de iminio que son atrapadas por los fosfitos para generar, tras una redistribución de los grupos alquilo, los α -aminofosfonatos (Esquema 5-21).

²⁶⁶ T. Shono, Y. Matsumura, K. Tsubata, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 3249-3252.



Esquema 5-21. Mecanismo propuesto para la formación de un α -aminofosfonato mediante la adición de un fosfito de trialquilo $[P(OR)_3]$ a un éter de hemiaminal, favorecido por el empleo como catalizador de un ácido de Lewis [A.L.]

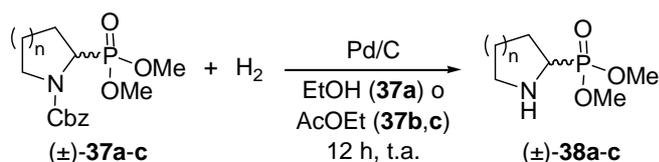
Por otro lado, y puesto que los aminofosfonatos libres no poseen ningún grupo cromóforo que permita su detección empleando una lámpara de luz visible-ultravioleta, los sustratos remanentes de las reacciones enzimáticas se derivatizaron con cloroformiato de bencilo para posibilitar su análisis mediante HPLC. Por este motivo, se optimizaron las condiciones de separación de ambos enantiómeros de los compuestos (\pm)-**37a-c** mediante dicha técnica cromatográfica empleando columnas de relleno quiral (ver parte experimental).

II.5.3.1.5. DESPROTECCIÓN DEL GRUPO AMINO PARA LA OBTENCIÓN DE LOS α -AMINOFOSFONATOS (\pm)-**38a-c**

Para eliminar el grupo protector (Cbz) y obtener los aminofosfonatos libres, susceptibles de ser resueltos a través de procesos que involucren su grupo amino, se empleó una hidrogenación catalizada por paladio soportado sobre carbón (Esquema 5-22). Esta metodología, muy limpia y eficaz, permite acceder a los productos de reacción con rendimientos cuantitativos tras una simple filtración del catalizador. Inicialmente, se llevaron a cabo las hidrogenaciones en acetato de etilo, pero se observó que, aunque los sustratos (\pm)-**37b,c** alcanzaban conversiones completas tras una noche de reacción, el derivado (\pm)-**37a** necesitaba dos días.

Resultados y Discusión

Entonces, se decidió emplear etanol como disolvente,²⁶⁷ observando que el proceso transcurriría a conversión completa tras 12 h.



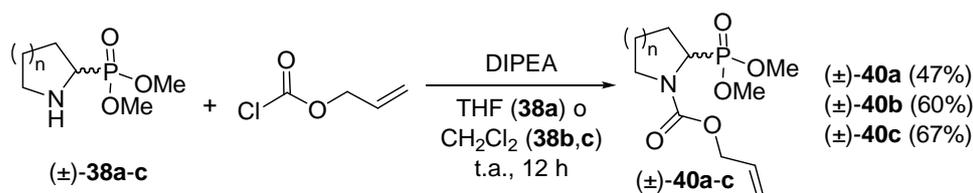
Esquema 5-22. Desprotección de los compuestos (±)-**37a-c** mediante una hidrogenación catalizada por paladio soportado sobre carbón

Debido a la inestabilidad del compuesto **38a**, incluso en disolventes de uso común como el diclorometano o empleados en la preparación de muestras de RMN (CDCl_3 y MeOD), fue necesario su empleo a la mayor brevedad posible, tanto para procesos de derivatización como de resolución enzimática.

II.5.3.1.6. SÍNTESIS DE LOS CARBAMATOS DE ALILO (±)-**40a-c** Y DESPROTECCIÓN PARA OBTENER LOS α -AMINOFOSFONATOS LIBRES (±)-**38a-c**

Por analogía con el capítulo anterior, y puesto que la resolución de aminas secundarias de este tipo con diferentes carbonatos de alilo habían ofrecido buenos resultados, se prepararon además los carbamatos de alilo de cada uno de los sustratos, empleando el procedimiento habitual: reacción con cloroformiato de alilo en presencia de una base voluminosa y no nucleófila, en este caso, la *N*-etil-diisopropilamina (Esquema 5-23). De esta forma se obtuvieron los carbamatos de alilo (±)-**40a-c** con rendimientos moderados tras purificación por cromatografía de columna en gel de sílice. Cabe destacar que en el caso del sustrato (±)-**38a** fue necesario emplear tetrahidrofurano como disolvente debido a la inestabilidad del aminofosfonato en diclorometano.

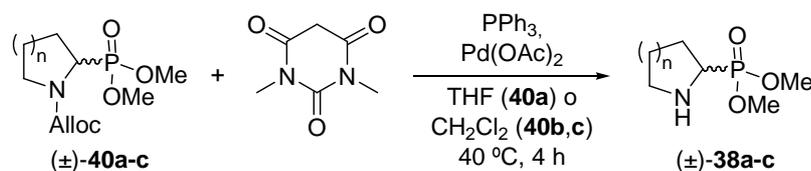
²⁶⁷ G. P. Zecchini, M. P. Paradisi, I. Torrini, G. Lucente, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1989**, *34*, 33-36.



Esquema 5-23. Preparación de carbamatos de alilo (±)-40a-c

Estos compuestos tampoco resultaron ser visibles con el detector VIS-UV del HPLC, por lo que, para poder analizar los excesos enantioméricos del producto final de la reacción enzimática, fue necesaria su desprotección y una posterior derivatización con un resto adecuado cromóforo.

La desprotección del grupo aliloxicarbonilo (Alloc) se llevó a cabo a través de una reacción de Tsuji-Trost, empleando ácido *N,N'*-dimetilbarbitúrico (DMBA) como nucleófilo, y trifetilfosfina y acetato de paladio (II) en cantidades catalíticas para la generación *in situ* del catalizador de Pd (0) necesario para la transformación (Esquema 5-24).²⁶⁸ De esta forma, se obtienen los α -aminofosfonatos libres **38a-c** con un rendimiento prácticamente cuantitativo. De nuevo, en el caso del derivado cíclico de cinco miembros, el disolvente seleccionado fue el THF en lugar del diclorometano por su inestabilidad en el último.



Esquema 5-24. Ruptura del carbamato de alilo a través de una reacción de Tsuji-Trost catalizada por un complejo de Pd (0)

²⁶⁸ E. Busto, V. Gotor-Fernández, J. Montejo-Bernardo, S. García-Granda, V. Gotor, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 8393-8401.

II.5.3.2. RESOLUCIÓN CINÉTICA ENZIMÁTICA MEDIANTE PROCESOS DE ALCOXICARBONILACIÓN DE LOS α -AMINOFOSFONATOS RACÉMICOS 38a-c

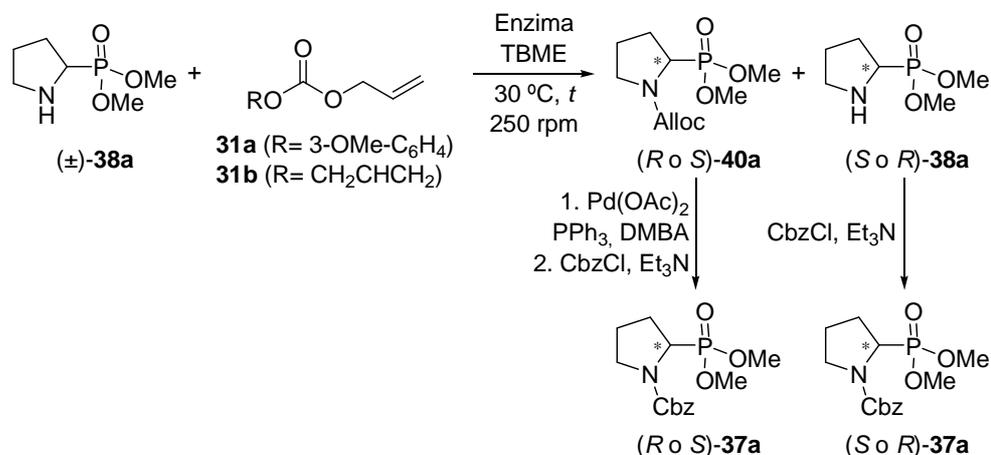
Una vez sintetizados los sustratos objeto de estudio (\pm)-**38a-c**, así como los que serán los productos finales de las reacciones enzimáticas, sus carbamatos de alilo (\pm)-**40a-c**, y los derivados protegidos con grupos cromóforos que permitan su visualización en el HPLC, los carbamatos de bencilo (\pm)-**37a-c**, se abordó la resolución enzimática de los α -aminofosfonatos cíclicos racémicos a través de procesos de alcoxycarbonilación catalizados por hidrolasas. Para ello, la metodología general a seguir será la que se muestra a continuación, pudiendo modificar alguna de las etapas si la naturaleza del sustrato u otros motivos así lo exigen:

1. Llevar a cabo el proceso enzimático, estudiando la influencia de:
 - el catalizador (cantidad y tipo, aunque la CAL-A es, en principio, la que ha mostrado ser más efectiva y selectiva a la hora de acilar el nitrógeno de un aminoéster homólogo de seis eslabones²⁵⁸),
 - el donador de acilo [carbonatos de distinta naturaleza y reactividad, introductores en principio del grupo aliloxycarbonilo (Alloc), u otros si fuese necesario],
 - el disolvente (siempre de tipo orgánico y en condiciones anhidras. Inicialmente se empleará TBME pero se pueden seleccionar otros en función de la solubilidad de los sustratos y del grado de optimización que sea necesario),
 - y la temperatura (comenzando por 30 °C y teniendo en cuenta que la CAL-A pierde su actividad por encima de los 35-40 °C).
2. Separar por columna cromatográfica el producto de partida (PP) y el producto final (PF) de la reacción enzimática.
3. Derivatizar con cloroformiato de bencilo los aminofosfonatos remanentes para poder medir el ee_s empleando la técnica de HPLC.

4. Eliminar el grupo Alloc del carbamato formado e introducir de nuevo el grupo Cbz para obtener, tras la inyección en el HPLC, la medida del *ee*_p.

II.5.3.2.1. RESOLUCIÓN DEL (PIRROLIDIN-2-IL)FOSFONATO DE DIMETILO (±)-38a

El estudio de resolución enzimática se comenzó con el aminofosfonato cíclico de menor tamaño, el derivado de prolina (±)-**38a**. En una primera prueba, se empleó el carbonato de dialilo (**31b**) como agente de alcoxycarbonilación y la CAL-A como biocatalizador en una relación 1:1 en peso respecto al sustrato de partida, llevando a cabo el proceso en TBME a 30 °C (Esquema 5-25). Sin embargo, tras tres días de reacción, no se observó conversión alguna.



Esquema 5-25. Resolución enzimática del aminofosfonato (±)-**38a** mediante procesos de alcoxycarbonilación con carbonatos de distinta naturaleza catalizados por diferentes enzimas (CAL-A, CAL-B, PSL IM o subtilisina)

Entonces, se decidió emplear un carbonato más reactivo, el carbonato mixto de alilo y 3-metoxifenilo (**31a**), estudiando el comportamiento de diferentes enzimas en las mismas condiciones de reacción (Esquema 5-25). En este caso, puesto que no se pueden separar PP y PF de la reacción enzimática debido a la inestabilidad del primero, se decidió modificar ligeramente la metodología inicial propuesta, derivatizando *in situ* el crudo de la reacción enzimática con cloroformiato de bencilo para separar a continuación por columna cromatográfica los

Resultados y Discusión

derivados **37a** y **40a** enantioenriquecidos. A continuación, se procedería de igual manera con el tratamiento de **40a**. Los resultados obtenidos de este conjunto de pruebas no resultaron ser del todo fiables debido a la dificultad existente a la hora de separar los dos carbamatos en la columna por tener un R_f muy similar. Además, en el caso de producirse contaminaciones de uno con el otro, los datos resultarían falseados. Por ello, las conclusiones que se extrajeron tras 92 h de reacción, sin datos numéricos, son las siguientes:

- la CAL-A cataliza la transformación estereoselectivamente, aunque con inducciones moderadas, por lo que esta reacción se repitió varias veces, deteniéndola tras diferentes periodos de tiempo. Los valores del ee_p son, en general, bajos (en torno al 20%), por lo que se podría estar produciendo una racemización parcial en el proceso de desprotección-protección, ya que los valores del ee_s obtenidos son $>90\%$ en todos los casos.

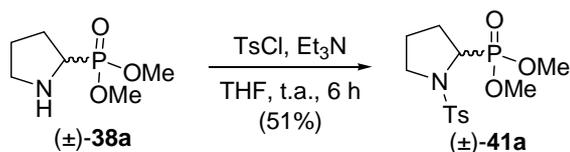
- tanto la CAL-B como la PSL IM: son capaces de promover la reacción en cierta extensión aunque, al encontrar valores para el ee_s próximos a 0, suponemos que lo hacen de forma no selectiva.

- la subtilisina no cataliza la reacción.

Para solucionar los problemas de la medida de los excesos enantioméricos se seleccionaron tres grupos protectores cromóforos con los que derivatizar el producto de partida: el fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc), el trifenilmetilo (tritulo, Tr) y el *p*-toluensulfonilo (tosilo, Ts). El objetivo en este momento era encontrar un derivado con tiempos de retención para sus enantiómeros que no coincidiesen con los de **37a** para evitar errores en el caso de producirse una contaminación en la separación por columna del PF y el PP derivatizado con el grupo Cbz.

En el primero de los casos, uno de los enantiómeros del derivado protegido con el grupo Fmoc resultó coincidir en el tiempo de retención en la columna de HPLC con otro del derivado **37a**, por lo que no resultó adecuado para el fin buscado. Por otro lado, el cloruro de tritilo presentó problemas de reactividad con el aminofosfonato libre **38a** y no fue posible el aislamiento del producto deseado. Finalmente, aunque con un

rendimiento moderado, se obtuvo el derivado tosilado (\pm)-**41a** tras el tratamiento de (\pm)-**38a** con cloruro de tosilo (TsCl) en las condiciones habituales (Esquema 5-26).



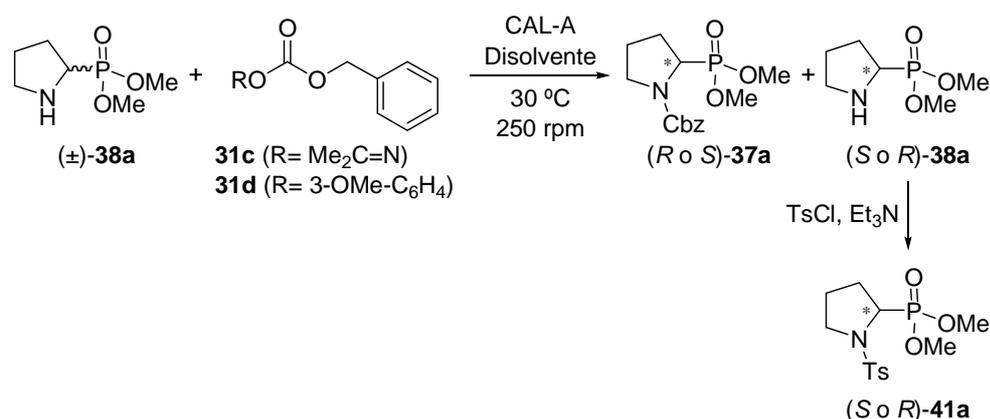
Esquema 5-26. Preparación del derivado tosilado del aminofosfonato (\pm)-**38a**

El compuesto **41a** resultó ser adecuado, puesto que ninguno de los picos correspondientes a los enantiómeros de ambos compuestos (**37a** y **41a**) coinciden en el tiempo de retención en las columnas de HPLC empleando las mismas condiciones (ver parte experimental).

Una vez solucionado el problema de la medición de los excesos enantioméricos, se repitió el proceso enzimático con el carbonato mixto **31a**, aunque duplicando esta vez la cantidad de la CAL-A para hacer la biotransformación más rápida. Así, tras solamente 14 h de reacción se obtuvieron valores para el ee_p y ee_s de 28 y >99%, respectivamente, lo que reafirmó la idea de la racemización del PF en el tratamiento previo al análisis de su exceso enantiomérico mediante HPLC (Esquema 5-24).

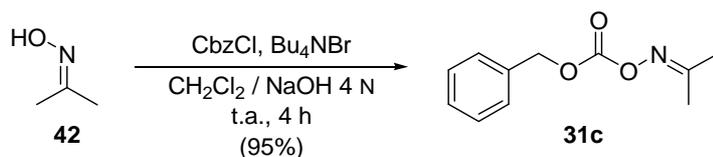
A la vista de los resultados, se consideró necesario un cambio en el planteamiento: emplear otros carbonatos mixtos que permitieran, *a priori*, la introducción directa del grupo Cbz al ser utilizados como agentes de alcoxicarbonilación en el proceso biocatalizado, y derivatizar el crudo con cloruro de tosilo para permitir la medida del ee_s (Esquema 5-27).

Resultados y Discusión



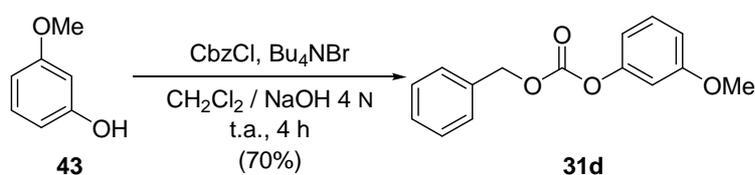
Esquema 5-27. Nuevo planteamiento para la resolución cinética enzimática catalizada por CAL-A del aminofosfonato **(±)-38a**, empleando los carbonatos de bencilo **31c,d** como agentes de alcoxicarbonilación y el cloruro de tosilo como reactivo de derivatización

Para ello, se diseñaron dos carbonatos de bencilo y se examinó su reactividad. El primero de ellos fue el carbonato mixto de bencilo y oxima **31c**, el cual se preparó haciendo reaccionar la acetoxima (**42**) con cloroforniato de bencilo (CbzCl) en una mezcla bifásica de hidróxido de sodio acuoso y diclorometano, en presencia de un catalizador de transferencia de fase (Esquema 5-28). Así, tras aislar mediante extracción y purificar a través de cromatografía en columna, se obtuvo el carbonato deseado con un rendimiento del 95%.



Esquema 5-28. Preparación del carbonato mixto de bencilo y acetoxima **31c**

También se preparó el carbonato mixto de bencilo y 3-metoxifenilo (**31d**), análogo al carbonato mixto de alilo y 3-metoxifenilo comúnmente empleado en la resolución cinética enzimática de aminas secundarias. Para su síntesis se emplearon las mismas condiciones que en el caso anterior, sustituyendo la acetoxima (**42**) por 3-metoxifenol (**43**) obteniendo el carbonato **31d** con un 70% de rendimiento (Esquema 5-29).



Esquema 5-29. Preparación del carbonato mixto de bencilo y 3-metoxifenilo **31d**

A continuación, se estudió la resolución cinética enzimática del aminofosfonato (\pm)-**38a** en las condiciones anteriormente descritas (Esquema 5-27), aunque empleando, esta vez, los carbonatos **31c** y **31d** (Tabla 5-1), tras 84 h de reacción. Por un lado, el carbonato de bencilo y oxima (**31c**) resultó ser muy reactivo, conduciendo a la transformación completa de **38a** en **37a** (entrada 1). De hecho, se comprobó que **31c** era capaz de reaccionar con el sustrato en ausencia de enzima, descartando así su aplicabilidad en los procesos de resolución. Sin embargo, el carbonato mixto de bencilo y 3-metoxifenilo (**31d**) permitió mejorar los resultados obtenidos hasta este momento, posibilitando la obtención del carbamato **37a** con un 82% de exceso enantiomérico y la recuperación del producto de partida con un ee_s del 94% (entrada 2).

A continuación, con el objetivo de optimizar las condiciones de reacción, se repitieron los procesos empleando diferentes disolventes, pero ninguno de ellos consiguió aumentar la enantioselectividad. En el caso del THF y el 1,4-dioxano (entradas 3 y 4) no se observó conversión, mientras que el tolueno y el éter dietílico (entradas 5 y 6) condujeron a conversiones más bajas y una pérdida importante de selectividad.

Tabla 5.1. Resolución cinética catalizada por la CAL-A del α -aminofosfonato (\pm)-**38a**^a

Entrada	Carbonato	Disolvente	t (h)	ee_p (%) ^b	ee_s (%) ^b	c (%) ^c	E^d
1	31c	TBME	84	0	--	100	--
2	31d	TBME	84	82	94	54	35
3	31d	THF	96	--	--	0	--
4	31d	1,4-Dioxano	96	--	--	0	--
5	31d	Tolueno	96	30	71	30	8
6	31d	Et ₂ O	96	13	29	31	2

^a Condiciones de la reacción enzimática: relación en peso CAL-A:aminofosfonato **38a** racémico 2:1, carbonato (2.5 equivalentes), disolvente (0.07 M), 30 °C y 250 rpm.

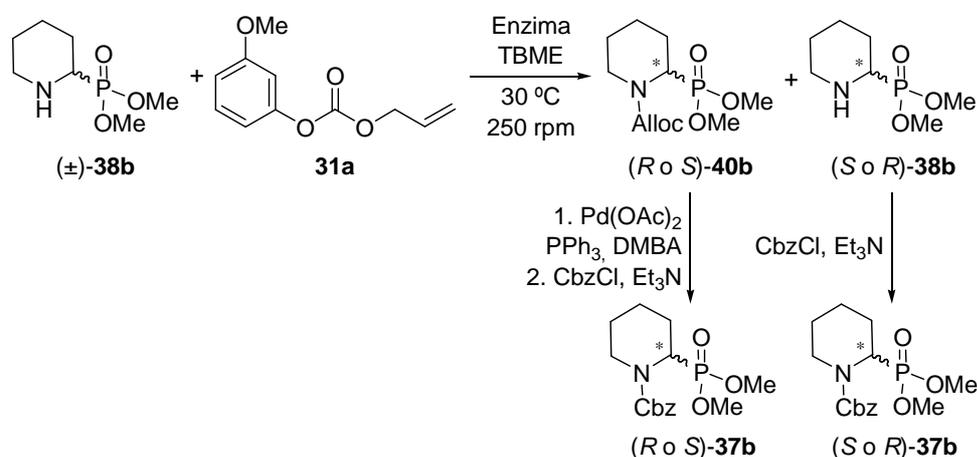
^b Determinados por HPLC. ^c $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$. ^d $E = \ln[(1-c) \times (1-ee_p)] / \ln[(1-c) \times (1+ee_p)]$.

Resultados y Discusión

Llegado este punto, y teniendo en cuenta que la técnica complementaria de HPLC a escala preparativa permite la separación de los enantiómeros de (\pm)-**37a** con una elevada eficacia, se puede considerar que el método de resolución consistente en la alcoxicarbonilación biocatalizada de esta mezcla racémica en concreto, no resulta adecuado desde el punto de vista de la síntesis asimétrica.

II.5.3.2.2. RESOLUCIÓN DEL (PIPERIDIN-2-IL)FOSFONATO DE DIMETILO (\pm)-**38b**

Una vez concluido el estudio del compuesto (\pm)-**38a**, se abordó la resolución enzimática del α -aminofosfonato cíclico de 6 miembros (\pm)-**38b**. En este caso fue posible aplicar la metodología inicialmente propuesta para la medida de los excesos enantioméricos de sustrato y producto, ya que el aminofosfonato libre es estable y puede aislarse del carbamato **40b** por columna cromatográfica (Esquema 5-30).



Esquema 5-30. Resolución enzimática del aminofosfonato (\pm)-**38b** mediante procesos de alcoxicarbonilación con el carbonato mixto de alilo y 3-metoxifenilo catalizados por diferentes lipasas (CAL-A, CAL-B y PSL IM)

Comenzamos la investigación haciendo un muestreo de las enzimas que habían mostrado actividad con el derivado **38a**, es decir, las lipasas de *Candida antarctica* de tipo A y B y la de *Pseudomonas cepacia* en una relación en peso 1:1 respecto al sustrato de partida, llevando a cabo los procesos en TBME, por ser el disolvente que mejores resultados había ofrecido en el caso anterior, y manteniendo constantes el resto de los

parámetros de la reacción (Tabla 5-2). Como era de esperar, únicamente la CAL-A resultó ser activa frente al sustrato (\pm)-**38b** (entradas 1-3), mostrando una gran selectividad, aunque la conversión sólo alcanzó el 17% tras 24 h de reacción. Además, el aislamiento del producto de la reacción en forma enantiopura fue un indicativo claro de que, en este caso, no se producía racemización durante el proceso de desprotección-protección del producto final de la reacción necesario para la medida de su exceso enantiomérico.

Tabla 5.2. Resolución cinética catalizada por lipasas del α -aminofosfonato (\pm)-**38b**, utilizando el carbonato **31a** como agente de alcoxicarbonilación y llevando a cabo los procesos en TBME a 30 °C y 250 rpm

Entrada	Lipasa ^a	t (h)	ee _P (%) ^b	ee _S (%) ^b	c (%) ^c	E ^d
1	CAL-A (1:1)	24	>99	21	17	>200
2	CAL-B (1:1)	112	--	--	0	--
3	PSL IM (1:1)	112	--	--	0	--
4	CAL-A (2:1)	24	>99	95	49	>200

^a Relación en peso enzima:sustrato entre paréntesis. ^b Determinados por HPLC.

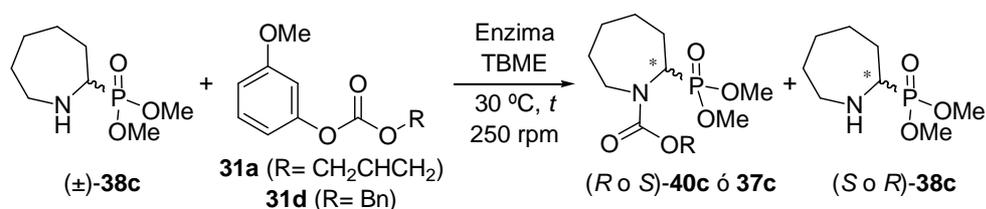
^c $c = ee_S / (ee_S + ee_P)$. ^d $E = \ln[(1-c) \times (1-ee_P)] / \ln[(1-c) \times (1+ee_P)]$.

Con el fin de acelerar el proceso, se intentó elevar la temperatura a 45 °C, pero debido a la escasa termoestabilidad de la CAL-A, se observó una importante pérdida de actividad del enzima y un notable descenso en la enantioselectividad (datos no mostrados en la tabla). Finalmente, se duplicó la cantidad de enzima (entrada 4), lo que permitió alcanzar una conversión del 49% tras 24 h, logrando aislar el producto enantiopuro y el sustrato con un 95% de exceso enantiomérico.

II.5.3.2.3. RESOLUCIÓN DEL (AZEPAN-2-IL)FOSFONATO DE DIMETILO (\pm)-**38c**

En vista de los excelentes resultados obtenidos con el fosfonato análogo al ácido pipercolico (\pm)-**38b**, se decidió abordar la resolución del compuesto (\pm)-**38c**, empleando como punto de partida idénticas condiciones a las utilizadas con el primero (Esquema 5-31).

Resultados y Discusión



Esquema 5-31. Resolución enzimática del aminofosfonato $(\pm)\text{-38c}$ mediante procesos de alcoxicarbonilación con los carbonatos mixtos **31a** o **31d**, catalizados por diferentes hidrolasas (CAL-A, CAL-B, PSL IM, subtilisina, PPL, AK, CRL y RM)

En esta primera prueba con el carbonato **31a**, el aminofosfonato $(\pm)\text{-38c}$ no resultó ser un sustrato adecuado para la CAL-A puesto que, tras 24 h de reacción, no se detectó la formación del carbamato de alilo. En este punto, se decidió hacer un estudio con otros biocatalizadores como CAL-B, PSL IM, subtilisina, PPL, AK, CRL y RM. Sin embargo, tras 64 h, en ninguna de las reacciones se formó el producto buscado $(\pm)\text{-40c}$. Este muestreo de ocho hidrolasas se repitió empleando el carbonato mixto de bencilo y 3-metoxifenilo (**31d**) como agente de alcoxicarbonilación, pero tampoco se observó reacción.

Por tanto, como en el caso del derivado $(\pm)\text{-38a}$, la resolución cinética enzimática no ha resultado ser un procedimiento adecuado para la preparación enantioselectiva de este compuesto.

CONCLUSIONES

En este capítulo se ha desarrollado una metodología sintética que permite acceder a α -aminofosfonatos cíclicos N-protegidos a través de procesos sencillos que transcurren con elevados rendimientos.

También se han descrito procedimientos simples y efectivos para la desprotección de los carbamatos, bien de bencilo o de alilo, que posibilitan la obtención de dichos α -aminofosfonatos en su forma libre.

Debido a la ausencia de grupos cromóforos tanto en los sustratos de partida como en los productos de las biotransformaciones, se ha puesto a punto un método, adecuado a cada uno de ellos, y consistente en reacciones de protección y desprotección, para la medida de sus excesos enantioméricos empleando la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Por primera vez, se ha abordado la resolución cinética enzimática de α -aminofosfonatos de naturaleza cíclica, encontrando resultados muy dispares en función del tamaño de anillo de dichos sustratos, los cuales se encuentran resumidos a continuación:

- La lipasa de Candida antarctica tipo A ha catalizado con excelente enantioselectividad, la resolución cinética del (piperidin-2-il)fosfonato de dimetilo mediante un proceso de alcoxicarbonilación enzimática con el carbonato mixto de alilo y 3-metoxifenilo en TBME, permitiendo la obtención del carbamato de alilo en forma enantiopura y el aminofosfonato remanente con un 95% de exceso enantiomérico tras 24 h.*
- Este mismo enzima ha mostrado una enantiopreferencia moderada en el proceso de resolución del (pirrolidin-2-il)fosfonato de dimetilo con el carbonato mixto de bencilo y 3-metoxifenilo en TBME.*
- Finalmente, el (azepan-2-il)fosfonato de dimetilo no ha resultado ser un sustrato adecuado para ninguna de las ocho hidrolasas empleadas.*

Estos resultados ponen de manifiesto la enorme influencia que tiene la estructura de los sustratos en su reconocimiento por parte del biocatalizador.

PARTE EXPERIMENTAL

II.5.5.1. GENERAL

La lipasa de *Candida antarctica* tipo A (CAL-A) inmovilizada NZL-101 fue adquirida de Codexis (5.0 U/g usando 1-butanol y laurato de etilo). La lipasa tipo B de *Candida antarctica* (CAL-B, Novozyme 435, 7300 PLU/g, inmovilizada sobre poliacrilamida) y la lipasa de *Rhizomuchor miehei* (Lipozyme RM IM, <15% en peso) fueron donadas por Novozymes (Dinamarca). La lipasa AK (22100 U/g), la de páncreas porcino (PPL) de tipo II (30-90 U/mg de proteína, empleando triacetina) y la de *Candida rugosa* (965 U/mg de sólido, empleando aceite de oliva) fueron adquiridas de Sigma-Aldrich. La lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada en tierra de diatomeas (PSL IM, 943 U/g) fue proporcionada por Amano Europe. La endo-proteasa de *Bacillus licheniformis* "Subtilisin Calsberg" llamada subtilisina (476 U/g), inmovilizada en forma de agregados enzimáticos entrecruzados (CLEA), fue suministrada por CLEA Technologies.

Todos los demás reactivos se adquirieron a Aldrich y Fluka, sin ser necesarios tratamientos previos para su purificación.

Los disolventes empleados en las reacciones en atmósfera inerte fueron sometidos previamente a un tratamiento de secado y desoxigenado mediante un sistema de purificación de disolventes MBraun. El TBME utilizado en las biotransformaciones fue secado sobre sodio empleando como indicador benzofenona, mientras que el diclorometano se secó sobre hidruro cálcico.

II.5.5.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

II.5.5.2.1. CROMATOGRAFÍA EN GEL DE SÍLICE

Para la cromatografía en capa fina se han utilizado cromatofolios de gel de sílice POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄ (0.25 mm de espesor), los cuales llevan incorporado un revelador ultravioleta, comercializados por Merck.

Como revelador se utilizó una disolución acuosa al 1% de KMnO₄, 5% de K₂CO₃ y 8 lentejas de NaOH en 200 mL de agua, o una disolución al 8% de ácido fosfomolibdico hidratado en etanol absoluto.

Para la cromatografía de columna se empleó gel de sílice 60 (230-240 Mesh) adquirida a Merck o 60 (0.04-0.063 mm) adquirida a Macherey-Nagel.

II.5.5.2.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

La separación analítica de los enantiómeros de los compuestos racémicos (±)-**37a-c** y (±)-**41a**, así como la medida de los excesos enantioméricos de los productos obtenidos en las resoluciones enzimáticas derivatizados adecuadamente, se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100, empleando la columna quiral Chiralcel OJ-H (25 x 0.46 cm). La detección empleada fue visible-ultravioleta a 210 y 215 nm, utilizando como fase móvil una mezcla de hexano/etanol 85:15. Las condiciones de separación y los tiempos de retención de los dos enantiómeros de cada uno de los sustratos estudiados se encuentran recogidos en sus correspondientes datos experimentales.

II.5.5.2.3. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (IR)

Se registraron los espectros en un espectrómetro Perkin-Elmer 1720-X FT o Nicolet Avatar 360 FT-IR empleando pastillas de KBr (muestras sólidas) o en ventanas de NaCl (aceites). Las bandas de tensión se indican en valores de ν máxima y se expresan en cm⁻¹.

II.5.5.2.4. ESPECTROMETRÍA DE MASAS (EM)

Se utilizó la técnica de ionización por electroespray (ESI⁺) con un cromatógrafo HP 1100 acoplado a masas. Los valores en ambos casos se refieren a unidades de masa atómica (uma).

II.5.5.2.5. PUNTOS DE FUSIÓN (PF)

Se han llevado a cabo con un aparato Gallenkamp en tubos capilares abiertos y por tanto sus valores no están corregidos.

II.5.5.2.6. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ¹H-RMN, ¹³C-RMN, DEPT, ³¹P-RMN, secuencia de pulsos APT y experimentos bidimensionales (detallados a continuación) han sido realizados con espectrómetros Bruker AV-400 (400.13 MHz para ¹H y 100.6 MHz para ¹³C), AC-300 o AV-300 (300.13 MHz para ¹H y 75.5 MHz para ¹³C).

Experimentos bidimensionales:

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

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

Correlaciones heteronucleares escalares (¹H-¹³C) a través de un enlace con una secuencia HMQC.

Los desplazamientos químicos se dan en valores de (δ) en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento en Hertzios (Hz).

Los calibrados se hicieron sobre la señal del CDCl₃ (¹³C, 76.95 ppm) o del CHCl₃ residual (¹H, 7.26 ppm).

II.5.5.2.7. ROTACIÓN ÓPTICA ESPECÍFICA

Se han medido con un polarímetro Perkin-Elmer 241 (unidades 10⁻¹ cm² x grado x g⁻¹), empleando la lámpara de sodio (D).

II.5.5.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS

II.5.5.3.1. Procedimiento General para la Protección de Lactamas con el Resto Benciloxicarbonilo. Síntesis de los Compuestos 34a-c

Sobre una disolución de la correspondiente lactama **33a-c** (2.94 mmol) en THF seco (11 mL) a -78 °C, se añade bis(trimetilsilil)amiduro de litio (LHMDS, 2.9 mL, 2.9 mmol, 1 M en THF) cuidadosamente, durante 15 minutos, bajo atmósfera de argón. Tras 30 minutos de agitación, se añade cloroformiato de bencilo (551 mg, 3.23 mmol). La disolución resultante se deja calentar hasta -40 °C y se agita durante 3 h. Para detener la reacción, se añade una disolución saturada de cloruro de amonio (15 mL) y se deja que la mezcla alcance la temperatura ambiente. Entonces se extrae con diclorometano (2 x 15 mL), se mezclan las fases orgánicas y se lavan con agua (20 mL) y una disolución saturada de cloruro de sodio (20 mL). Se seca la capa orgánica con sulfato de magnesio, se filtra y se concentra bajo presión reducida. El crudo de reacción resultante se purifica por columna cromatográfica (AcOEt/hexano 1:2) para obtener el producto deseado **34a-c** en forma de aceite amarillo pálido (61-91%).

II.5.5.3.2. Síntesis del 2-Hidroxipirrolidina- y 2-Hidroxiazepina-1-carboxilato de Bencilo (35a,c)

Sobre una disolución de 2-oxopirrolidina-1-carboxilato de bencilo o 2-oxoazepano-1-carboxilato de bencilo (**34a** ó **34c**, 0.91 mmol) en THF seco (5 mL) a -78 °C, se añade hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL-H, 1.36 mL, 1.36 mmol, 1 M en hexano) bajo atmósfera de argón. Tras agitar durante 2 h, se añade una disolución saturada de acetato de potasio (5 mL) y una mezcla de dietil éter y disolución saturada de cloruro de amonio (16 mL, 3:1). La mezcla resultante se mantiene durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación vigorosa hasta observar la formación de un gel blanco, el cual se filtra y se lava con abundante dietil éter. El filtrado se extrae de nuevo con dietil éter (2 x 20 mL) y las fases orgánicas combinadas se lavan con agua (20 mL) y una disolución saturada de cloruro de sodio (20 mL). Se seca la capa orgánica con sulfato de magnesio, se filtra y se concentra bajo presión reducida. El crudo de **35a,c**

obtenido se utiliza en el siguiente paso de reacción sin purificación adicional.

II.5.5.3.3. Síntesis del 2-Hidroxipiperidina-1-carboxilato de Bencilo (35b)

Sobre una disolución de 2-oxopiperidina-1-carboxilato de bencilo (**34b**, 967 mg, 4.15 mmol) en THF seco (7 mL) a -78 °C, se añade gota a gota trietilborohidruro de litio (6.6 mL, 6.64 mmol, 1 M en THF) bajo atmósfera de argón. Tras agitar durante 1 h, se saca del baño frío y se añade agua (1.6 mL). Cuando la mezcla alcance la temperatura ambiente, se añade una disolución saturada de bicarbonato de sodio (15 mL) y, a continuación y con precaución, una disolución acuosa al 35% de peróxido de hidrógeno (3 mL). Se agita la mezcla durante 1 h adicional y se extrae con acetato de etilo (3 x 15 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con agua (20 mL) y una disolución saturada de cloruro de sodio (20 mL). Se seca la capa orgánica con sulfato de magnesio, se filtra y se concentra bajo presión reducida. El crudo obtenido (**35b**) se utiliza en el siguiente paso de reacción sin purificación adicional (97% de rendimiento del crudo).

II.5.5.3.4. Síntesis del 2-Metoxipirrolidina- y 2-Metoxiazepano-1-carboxilato de Bencilo (36a,c)

Sobre una disolución de 2-hidroxipirrolidina- o 2-hidroxiazepano-1-carboxilato de bencilo (**35a** ó **35c**, 5.82 mmol) en metanol (15 mL) a temperatura ambiente, se añade *p*-toluensulfonato de piridinio (PPTS, 147 mg, 0.58 mmol). Se agita durante 4 h y se añade trietilamina (1.6 mL). El disolvente se evapora bajo presión reducida y el crudo de reacción se purifica por columna cromatográfica en gel de sílice (20% AcOEt/hexano) para obtener el producto deseado **36a,c** en forma de aceite incoloro (86-90%).

II.5.5.3.5. Síntesis del 2-Metoxipiperidina-1-carboxilato de Bencilo (36b)

Sobre una disolución de 2-hidroxipiperidina-1-carboxilato de bencilo (**35b**, 1.616 g, 6.87 mmol) en una mezcla de metanol/diclorometano (1:3, 13.5 mL), se añade triflato de escandio (68 mg, 0.14 mmol) y se agita durante 3 h a temperatura ambiente. Se añade una disolución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (15 mL) y el producto se extrae con diclorometano (2 x 15 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavan con una disolución acuosa saturada de cloruro de sodio (15 mL), se secan con sulfato de magnesio, se filtra y se evapora el disolvente bajo presión reducida. El crudo obtenido (**36b**) se utiliza en el siguiente paso de reacción sin purificación adicional para evitar riesgos de eliminación (80% de rendimiento del crudo).

II.5.5.3.6. Procedimiento General para la Síntesis de los Aminofosfonatos Protegidos Racémicos 37a-c

Sobre una disolución de **36a-c** (2.95 mmol) y fosfito de trimetilo (372 μ L, 3.16 mmol) en diclorometano seco (6 mL) a -20 °C, se añade gota a gota trifluoruro de boro eterato (374 μ L, 2.95 mmol) bajo atmósfera de argón y se deja alcanzar la temperatura ambiente. Tras 4 h de agitación, se añade agua (15 mL) y el producto se extrae con diclorometano (5 x 15 mL). Las fases orgánicas combinadas se secan con sulfato de magnesio, se filtra y se concentra bajo presión reducida. El crudo de reacción se purifica por columna cromatográfica en gel de sílice (5% isopropanol/diclorometano) para obtener el correspondiente α -aminofosfonato protegido (\pm)-**37a-c** en forma de aceite incoloro (89-98%).

II.5.5.3.7. Procedimiento General para la Hidrogenación de los Compuestos 37a-c. Síntesis de los α -Aminofosfonatos (\pm)-38a-c

Sobre una suspensión de **37a-c** (0.46 mmol) y paladio soportado sobre carbón (15% en peso respecto al sustrato de partida) en el correspondiente disolvente desoxigenado (etanol para **37a** o acetato de etilo para **37b,c**; 9 mL) a temperatura ambiente, se conecta un globo con hidrógeno. Tras dos ciclos de vacío-hidrógeno para eliminar los restos de

aire del sistema, la mezcla resultante en atmósfera de hidrógeno se agita hasta que no se detecta material de partida mediante análisis por TLC (100% AcOEt). Se filtra la mezcla de reacción sobre celita, y se lava con el disolvente en el que se lleva a cabo la hidrogenación (5 x 2 mL). Finalmente, se concentra a presión reducida para obtener el correspondiente α -aminofosfonato libre (\pm)-**38a-c** en forma de aceite incoloro o ligeramente verdoso, con rendimientos cuantitativos.

II.5.5.3.8. Procedimiento General para la Derivatización de α -Aminofosfonatos. Síntesis de los Carbamatos de Alilo (\pm)-40a-c

Sobre una disolución del aminofosfonato racémico **38a-c** (0.46 mmol) en THF (**38a**, 3 mL) o diclorometano seco (**38b,c**, 3 mL), se añade DIPEA (99 μ L, 0.57 mmol) bajo atmósfera de argón. La mezcla se enfría a 0 °C y se añade cloroformiato de alilo (121 μ L, 0.57 mmol) gota a gota. Se mantiene la agitación a temperatura ambiente durante una noche, tiempo tras el cual se observa la desaparición completa del producto de partida (40% MeOH/AcOEt). Entonces, se evapora el disolvente bajo presión reducida, obteniéndose un crudo de reacción que se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice (100% AcOEt) para obtener los carbamatos de alilo (\pm)-**40a-c** como aceites incoloros (47-67%).

II.5.5.3.9. Procedimiento General para la Desprotección de los Carbamatos de Alilo 40a,b para Obtener los α -Aminofosfonatos 38a,b

Sobre una disolución del correspondiente carbamato de alilo (0.11 mmol) en disolvente seco (1.4 mL; THF para **40a** o diclorometano para **40b**), se añaden consecutivamente acetato de paladio (3 mg, 0.01 mmol), trifenilfosfina (9 mg, 0.03 mmol) y ácido *N,N'*-dimetilbarbitúrico (DMBA, 48 mg, 0.29 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agita a 40 °C durante 5 h, y se evapora el disolvente bajo presión reducida para obtener un crudo de reacción que se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice (40% MeOH/AcOEt), en el caso del derivado cíclico de 6 miembros, para obtener el α -aminofosfonato **38b** en forma de aceite incoloro (97%). En el caso del derivado **38a**, por ser inestable, es necesaria su rápida protección con el resto Cbz sin previa purificación.

II.5.5.3.10. Protección de la Fosfoprolina 38a con el Resto Tosilo. Síntesis de la Sulfonamida Racémica 41a

Sobre una disolución del aminofosfonato **38a** (17 mg, 0.08 mmol) en THF seco (1 mL), se añade trietilamina (17 μ L, 0.12 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla se enfría a 0 °C y se añade poco a poco cloruro de tosilo (23 mg, 0.12 mmol). Se mantiene la agitación a temperatura ambiente durante 6 h hasta observar la desaparición completa del producto de partida (40% MeOH/AcOEt). Entonces, se evapora el disolvente bajo presión reducida, obteniéndose un crudo de reacción que se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice (100% AcOEt) para obtener el aminofosfonato protegido (\pm)-**41a** en forma de sólido blanco (51%).

II.5.5.3.11. Procedimiento General para la Resolución Cinética Enzimática de los Aminofosfonatos (\pm)-38a-c por Alcoxilación

A una suspensión bajo atmósfera de nitrógeno del aminofosfonato racémico (\pm)-**38a-c** (20-60 mg) y el enzima (lipasas CAL-A, CAL-B, PSL-IM, PPL, AK, CRL o RM; o la proteasa subtilisina, en una proporción igual o doble en peso respecto al sustrato de partida) en disolvente seco (TBME, THF, 1,4-dioxano, tolueno o dietiléter; 0.07 M), se añade el carbonato correspondiente **31a-d** (2.5 equivalentes; en caso de ser sólido, se introduce inicialmente con el sustrato). La reacción se coloca en un agitador orbital (250 rpm) a la temperatura deseada (30 ó 45 °C), y se sigue su curso por TLC (100% AcOEt) tomando alícuotas regularmente hasta observar una conversión próxima al 50%. Entonces, la reacción se detiene filtrando el enzima, que se lava con un disolvente adecuado (5 x 2 mL, THF para **38a** o CH₂Cl₂ para **38b,c**). El filtrado se evapora en el rotavapor, y el crudo de reacción se trata de forma diferente dependiendo del sustrato empleado.

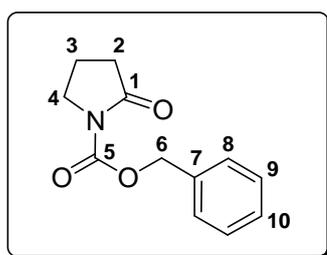
- sustrato **38a**: puesto que el producto final de la reacción enzimática se encuentra protegido con el resto Cbz, el crudo de reacción se derivatiza con cloruro de tosilo. A continuación, se separan por columna cromatográfica en gel de sílice ambos compuestos, y se inyectan en el HPLC para medir sus excesos enantioméricos, correspondiendo el

derivado tosilado enantioenriquecido [(*S* o *R*)-**41a**] al sustrato, y el protegido con Cbz [(*R* o *S*)-**37a**] al producto.

- sustratos **38b,c**: en este caso, al no ser el producto de partida inestable, el crudo de reacción se purifica por columna cromatográfica en gel de sílice (gradiente de eluyentes 0-40% MeOH/AcOEt) para obtener por separado el aminofosfonato enantioenriquecido (*S* o *R*)-**38b,c** y el carbamato (*R* o *S*)-**40b,c**. El primero se derivatiza con cloruro de benziloxycarbonilo en las condiciones habituales, se purifica por columna cromatográfica en gel de sílice (100% AcOEt) y el carbamato de bencilo (*S* o *R*)-**37b,c** se inyecta en el HPLC para obtener el valor de ee_s . El carbamato de alilo se desprotege en las condiciones anteriormente descritas y, sin purificación previa, se derivatiza con cloruro de benziloxycarbonilo, se purifica por columna cromatográfica en gel de sílice (100% AcOEt) y se inyecta en el HPLC para obtener el valor de ee_p .

II.5.5.4. DATOS EXPERIMENTALES

2-Oxopirrolidina-1-carboxilato de bencilo (34a)



Fórmula empírica: C₁₂H₁₃NO₃

Aspecto físico: Sólido blanco

Peso molecular: 219.24 g/mol

R_f (40% AcOEt/Hexano): 0.18

PF: 33-34 °C

IR (KBr): ν 699, 739, 773, 1040, 1175, 1241, 1301, 1369, 1383, 1457, 1499, 1716, 1752, 1789, 2897, 2964, 3033, 3064 cm⁻¹

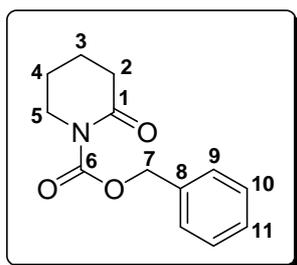
¹H-RMN (CDCl₃, 400.13 MHz): δ 2.03 (q, 2H, *J* 7.8, H₃), 2.53 (t, 2H, *J* 7.8, H₂), 3.81 (t, 2H, *J* 7.8, H₄), 5.27 (s, 2H, H₆), 7.32-7.43 (m, 5H, Ph)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 17.2 (C₃), 32.5 (C₂), 46.1 (C₄), 67.6 (C₆), 127.9 (C₈), 128.1 (C₁₀), 128.3 (C₉), 135.1 (C₇), 151.2 (C₅), 173.9 (C₁)

HRMS (ESI⁺, *m/z*) C₁₂H₁₃NNaO₃ [(M+Na)⁺]: calculada 242.0788, encontrada 242.0790

Parte experimental

2-Oxopiperidina-1-carboxilato de bencilo (34b)



Fórmula empírica: C₁₃H₁₅NO₃

Aspecto físico: Aceite amarillo pálido

Peso molecular: 233.26 g/mol

R_f (40% AcOEt/Hexano): 0.26

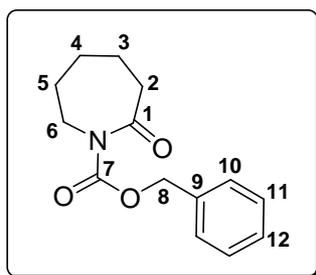
IR (NaCl): ν 698, 739, 778, 825, 908, 957, 985, 1056, 1143, 1248, 1281, 1296, 1378, 1456, 1498, 1607, 1714, 1773, 2880, 2953, 3033, 3064, 3364, 3465 cm⁻¹

¹H-RMN ¹H-NMR (CDCl₃, 400.13 MHz): δ 1.72-1.75 (m, 4H, H₃+H₄), 2.42-2.46 (m, 2H, H₂), 3.63-3.66 (m, 2H, H₅), 5.19 (s, 2H, H₇), 7.19-7.30 (m, 3H, Ph), 7.34-7.36 (m, 2H, Ph)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 20.3 (C₃), 22.5 (C₄), 34.7 (C₂), 46.5 (C₅), 68.3 (C₇), 127.9 (C₉), 128.1 (C₁₁), 128.4 (C₁₀), 135.3 (C₈), 154.0 (C₆), 171.1 (C₁)

HRMS (ESI⁺, m/z): Calculada para C₁₃H₁₅NNaO₃ [(M+Na)⁺]: 256.0944; encontrada: 256.0943

2-Oxoazepano-1-carboxilato de bencilo (34c)



Fórmula Molecular: C₁₄H₁₇NO₃

Aspecto físico: Aceite amarillo pálido

Peso Molecular: 247.29 g/mol

R_f (40% AcOEt/Hexano): 0.37

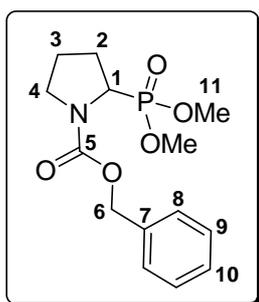
IR (NaCl): ν 698, 737, 775, 970, 1015, 1082, 1164, 1214, 1268, 1294, 1379, 1455, 1498, 1711, 1770, 2858, 2932, 3033, 3064 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 400.13 MHz): δ 1.66-1.71 (m, 6H, H₃+H₄+H₅), 2.59-2.62 (m, 2H, H₂), 3.76-3.78 (m, 2H, H₆), 5.21(s, 2H, H₈), 7.20-7.22 (m, 3H, Ph), 7.36-7.37 (m, 2H, Ph)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 23.4 (C₃); 28.5, 29.0 (C₄, C₅); 39.3 (C₂); 46.3 (C₆); 68.4 (C₈); 127.7 (C₁₀); 128.1 (C₁₂); 128.4 (C₁₁); 135.4 (C₉); 154.2 (C₇); 175.5 (C₁)

HRMS (ESI⁺, m/z): Calculada para C₁₄H₁₇NNaO₃ [(M+Na)⁺]: 270.1101; encontrada: 270.1098.

[N-(Benciloxycarbonil)pirrolidin-2-il]fosfonato de dimetilo (37a)



Fórmula empírica: C₁₄H₂₀NO₅P

Aspecto físico: Aceite incoloro

Peso Molecular: 313.29 g/mol

R_f (5% ⁱPrOH/CH₂Cl₂): 0.36

IR (NaCl): ν 699, 752, 770, 828, 1029, 1106, 1184, 1248, 1310, 1358, 1410, 1448, 1705, 2851, 2892, 2954, 3032 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 400.13 MHz): δ 1.85-1.91 (m, 1H, H₃), 2.01-2.31 (m, 3H, H₃+H₂), 3.46-3.78 (m, 8H, H₁₁+H₄), 4.28 (sa, 1H, H₁), 5.12 (s, 2H, H₆), 7.25-7.34 (m, 5H, Ph)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100.6 MHz): δ (algunas señales aparecen desdobladas por la presencia de rotámeros, marcado con un asterisco el minoritario) 23.2*, 24.2 (C₃); 26.6, 27.4* (C₂); 46.6, 46.8* (C₄); 52.2 (C₁₁); 52.7, 52.8* (C₁); 53.8 (C₁₁); 67.0, 67.3* (C₆); 127.7, 127.9, 128.1, 128.3 (5C, Ph); 136.4 (C₇); 154.9*, 155.0 (C₅)

³¹P-RMN (CDCl₃, 162.1 MHz): δ 27.3*, 27.7

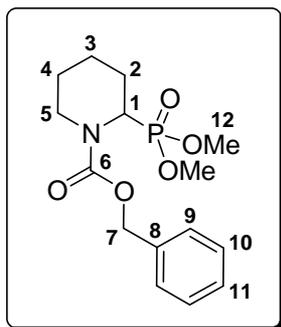
HRMS (ESI⁺, m/z): Calculada para C₁₄H₂₀NNaO₅P [(M+Na)⁺]: 336.0971; encontrada: 336.0987

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OJ-H	Eluyente: hexano/etanol (85:15)
Temperatura: 30 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (-): 9.5 min	t_R (+): 11.8 min

Rotación Específica: [α]_D²⁰ = -42.2 (c = 1.0, CHCl₃), 82% ee, por alcoxycarbonilación enzimática

Parte experimental

[N-(Benciloxicarbonil)piperidin-2-il]fosfonato de dimetilo (37b)



Fórmula Molecular: C₁₅H₂₂NO₅P

Aspecto físico: Aceite incoloro

Peso Molecular: 327.31 g/mol

R_f (10% PrOH/CH₂Cl₂): 0.33

IR (NaCl): ν 700, 769, 799, 828, 912, 1037, 1109, 1171, 1251, 1305, 1420, 1446, 1701, 2853, 2952, 3032, 3064 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 400.13 MHz): δ 1.36-1.38 (m, 1H, H₃), 1.63-1.66 (m, 3H, H₂+H₃+H₄), 1.76-1.94 (m, 1H, H₂), 2.03-2.05 (m, 1H, H₄), 3.18-3.31 (m, 1H, H₅), 3.67-3.78 (m, 6H, H₁₂), 4.08-4.15 (m, 1H, H₅), 4.59-4.77 (m, 1H, H₁), 5.14 (da, 2H, *J* 9.6, H₇), 7.27-7.35 (m, 5H, Ph)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100.6 MHz): δ (algunas señales aparecen desdobladas por la presencia de rotámeros) 20.2 (C₂); 24.5, 25.2 (C₃, C₄); 41.5, 41.7 (C₅); 46.7, 47.6, 48.3, 49.1 (d, *J* 151, C₁); 52.6, 52.7, 52.8 (C₁₂), 67.6 (C₇), 127.8, 128.1, 128.5 (C₉, C₁₀, C₁₁); 136.6 (C₈), 155.4 (C₆)

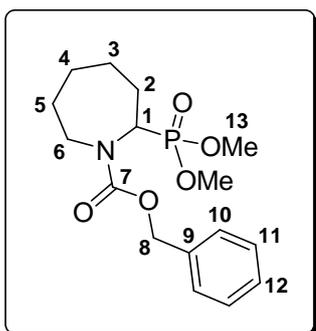
³¹P-RMN (CDCl₃, 162.1 MHz): δ 27.5*, 27.8

HRMS (ESI⁺, *m/z*): Calculada para C₁₅H₂₂NNaO₅P [(M+Na)⁺]: 350.1128; encontrada: 350.1141

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OJ-H	Eluyente: hexano/etanol (85:15)
Temperatura: 30 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (-): 7.8 min	t_R (+): 9.8 min

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = -88.2$ (*c* = 1.0, CHCl₃), >99% ee, por alcoxycarbonilación enzimática.

[N-(Benciloxicarbonil)azepan-2-il]fosfonato de dimetilo (37c)



Fórmula Molecular: C₁₆H₂₄NO₅P

Aspecto físico: Aceite incoloro

Peso Molecular: 341.34 g/mol

R_f (100% AcOEt): 0.20

IR (NaCl): ν 699, 756, 769, 826, 1028, 1096, 1170, 1203, 1249, 1263, 1278, 1303, 1368, 1414, 1455, 1476, 1693, 2852, 2930, 2953 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 400.13 MHz): δ 1.14-1.27 (m, 2H, H₄), 1.39-1.59 (m, 1H, H₅), 1.68-1.94 (m, 4H, H₂+H₃+H₅), 2.20-2.32 (m, 1H, H₂), 3.02-3.12 (m, 1H, H₆), 3.60-3.75 (m, 6H, H₁₃), 3.85-3.96 (m, 1H, H₈), 4.36-4.44, 4.52-4.61 (m, 1H, H₁), 5.10-5.22 (m, 2H, H₈), 7.28-7.39 (m, 5H, Ph)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100.6 MHz): δ (algunas señales aparecen desdobladas por la presencia de rotámeros, marcado con un asterisco el minoritario) 25.2, 25.3* (d, J 16, C₄); 27.9, 28.2, 28.3, 29.2, 29.4, 29.5 (C₂, C₃, C₅); 43.6, 43.9* (C₆); 51.2, 51.7* (d, J 155, C₁); 52.6-53.0 (m, C₁₃); 67.3, 67.4* (C₈); 127.7, 127.9, 128.0, 128.4 (C₁₀, C₁₁, C₁₂); 136.4*, 136.6 (C₉); 156.4, 156.5* (C₇)

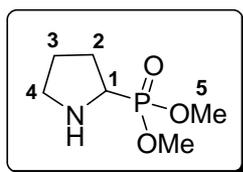
³¹P-RMN (CDCl₃, 162.1 MHz): δ 27.4*, 27.9

HRMS (ESI⁺, m/z): Calculada para C₁₆H₂₄NNaO₅P [(M+Na)⁺]: 364.1284; encontrada: 364.1283

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OJ-H	Eluyente: hexano/etanol (85:15)
Temperatura: 30 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R: 7.0 y 8.1 min	

Parte experimental

(Pirrolidin-2-il)fosfonato de dimetilo (38a)



Fórmula Molecular: C₆H₁₄NO₃P

Aspecto físico: Aceite incoloro

Peso Molecular: 179.15 g/mol

R_f (40% MeOH/AcOEt): 0.15

IR (NaCl): ν 822, 1031, 1184, 1237, 1457, 2851, 2955, 3315 cm⁻¹

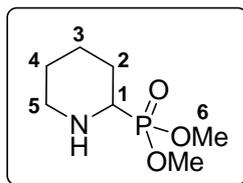
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.63-2.09 (m, 4H, H₂+H₃), 2.84-2.92 (m, 1H, H₄), 2.96-3.04 (m, 1H, H₄), 3.28-3.35 (m, 1H, H₁), 3.76 (d, 3H, *J* 10.4, H₅), 3.77 (d, 3H, *J* 10.4, H₅)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 25.9 (d, *J* 8, C₂), 26.6 (C₃), 47.5 (d, *J* 12, C₄), 52.8 (d, *J* 3, C₅), 52.9 (d, *J* 3, C₅), 53.5 (d, *J* 164, C₁)

³¹P-RMN (CDCl₃, 121.5 MHz): δ 31.0

HRMS (ESI⁺, *m/z*): Calculada para C₆H₁₄NNaO₃P [(M+Na)⁺]: 202.0604; encontrada: 202.0613. Calculada para C₆H₁₅NO₃P [(M+H)⁺]: 180.0784; encontrada: 180.0788

(Piperidin-2-il)fosfonato de dimetilo (38b)



Fórmula Molecular: C₇H₁₆NO₃P

Aspecto físico: Aceite incoloro

Peso Molecular: 193.18 g/mol

R_f (40% MeOH/AcOEt): 0.23

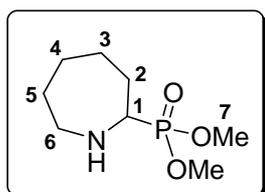
IR (NaCl): ν 777, 820, 896, 1029, 1247, 1456, 1624, 2537, 2786, 2854, 2942, 3453 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 400.13 MHz): δ 1.22-1.55 (m, 4H, H₂+H₃+H₄), 1.77-1.83 (m, 2H, H₂+H₃), 2.53 (ddt, 1H, *J* 11.8, 2.8 y 1.0, H₅), 2.93 (dt, 1H, *J* 12.0 y 2.5, H₁), 3.04-3.08 (m, 1H, H₅), 3.71 (d, 3H, *J* 10.8, H₆), 3.72 (d, 3H, *J* 10.8, H₆)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 24.1 (d, *J* 15, C₃), 25.5 (d, *J* 5, C₂), 25.9 (d, *J* 4, C₃), 47.0 (d, *J* 16, C₅), 52.8 (d, *J* 1, C₆), 52.9 (d, *J* 1, C₆), 53.4 (d, *c* 159, C₁)

³¹P-RMN (CDCl₃, 162.1 MHz): δ 28.7

(Azepan-2-il)fosfonato de dimetilo (38c)



Fórmula Molecular: C₈H₁₈NO₃P

Aspecto físico: Aceite verdoso

Peso Molecular: 207.21 g/mol

R_f (40% MeOH/AcOEt): 0.44

IR (NaCl): ν 565, 818, 1034, 1057, 1233, 1452, 1617, 1664, 2852, 2927, 3323, 3464 cm⁻¹

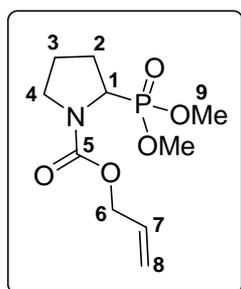
¹H-RMN (CDCl₃, 400.13 MHz): δ 1.38-1.53 (m, 3H, H₄+H₅), 1.55-1.67 (m, 3H, H₂+H₃+H₅), 1.75-1.83 (m, 1H, H₃), 1.97-2.06 (m, 1H, H₂), 2.25 (sa, 1H, NH), 2.66-2.73 (m, 1H, H₆), 2.93-3.04 (m, 2H, H₁+H₆), 3.70 (d, 3H, J 8.8, H₇), 3.73 (d, 3H, J 8.8, H₇)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 26.8 (d, J 17, C₃), 27.2 (C₄), 30.0 (C₂), 31.5 (C₅), 47.8 (d, J 15, C₆), 52.7 (d, J 7, C₇), 53.1 (d, J 7, C₇), 54.7 (d, J 156, C₁)

³¹P-RMN (CDCl₃, 162.1 MHz): δ 28.2

HRMS (ESI⁺, m/z): Calculada para C₈H₁₉NO₃P [(M+H)⁺]: 208.1097; encontrada: 208.1089

[N-(Aliloxicarbonil)pirrolidin-2-il]fosfonato de dimetilo (40a)



Fórmula empírica: C₁₀H₁₈NO₅P

Aspecto físico: Aceite incoloro

Peso Molecular: 263.23 g/mol

R_f (100% AcOEt): 0.13

IR (NaCl): ν 828, 1029, 1107, 1184, 1248, 1313, 1335, 1355, 1404, 1446, 1648, 1704, 2852, 2891, 2955 cm⁻¹

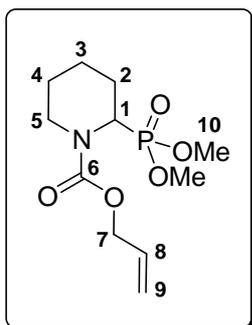
¹H-RMN (CDCl₃, 400.13 MHz): δ 1.85-1.89 (m, 1H, H₃), 1.98-2.22 (m, 3H, H₂+H₃), 3.42-3.54 (m, 2H, H₄), 3.70-3.75 (m, 6H, H₉), 4.24 (sa, 1H, H₁), 4.56 (d, 2H, J 4.4, H₆), 5.16 (d, 1H, J 10.4, H₈), 5.26 (d, 1H, J 16.8, H₈), 5.84-5.94 (m, 1H, H₇)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100.6 MHz): δ (algunas señales aparecen desdobladas por la presencia de rotámeros, marcado con un asterisco el minoritario) 23.2*, 24.3 (C₃); 26.6, 27.4* (C₂); 46.5, 46.7* (C₄); 52.1, 53.7 (C₉), 52.8, 52.9* (d, J 6.8, C₁), 66.0, 66.2* (C₆); 117.3, 117.7* (C₈); 132.7 (C₇); 154.9 (C₅)

³¹P-RMN (CDCl₃, 162.1 MHz): δ 27.3*, 27.7

HRMS (ESI⁺, m/z): Calculada para C₁₀H₁₈NNaO₅P [(M+Na)⁺]: 286.0815; encontrada: 286.0833.

[N-(Aliloxicarbonil)piperidin-2-il]fosfonato de dimetilo (40b)



Fórmula Molecular: C₁₁H₂₀NO₅P

Aspecto físico: Aceite incoloro

Peso Molecular: 277.25 g/mol

R_f (100% AcOEt): 0.25

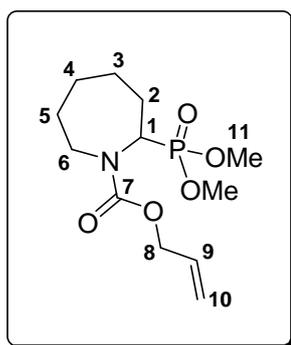
IR (NaCl): ν 771, 826, 914, 958, 1037, 1054, 1109, 1172, 1252, 1306, 1414, 1651, 1700, 2853, 2952 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 400.13 MHz): δ 1.22-1.37 (m, 1H, H₄), 1.58-1.67 (m, 2H, H₂+H₃), 1.70-1.89 (m, 2H, H₂+H₃), 1.96-2.04 (m, 1H, H₄), 3.07-3.26 (m, 1H, H₅), 3.68 (s, 3H, H₁₀), 3.70 (s, 3H, H₁₀), 4.02-4.10 (m, 1H, H₅), 4.55 (s, 2H, H₇), 4.67-4.71, 5.07-5.10 (m, 1H, H₁), 5.15 (dc, 1H, *J* 10.6 y 1.3, H₉), 5.24 (dd, 1H, *J* 17.2 y 1.0, H₉), 5.82-5.92 (1 H, m, H₈)

¹³C-RMN (CDCl₃, 100.6 MHz): δ 20.0 (C₂), 24.4, 25.0 (C₃, C₄), 41.3 (C₅), 47.2 (d, *J* 149, C₁), 52.5-52.7 (m, C₁₀), 66.3 (C₇), 117.3 (C₉), 132.7 (C₈), 155.1 (C₆)

³¹P-RMN (CDCl₃, 162.1 MHz): δ 27.6*, 27.9

HRMS (ESI⁺, *m/z*): Calculada para C₁₁H₂₁NO₅P [(M+H)⁺]: 278.1152; encontrada: 278.1122

[N-(Aliloxycarbonil)azepan-2-il]fosfonato de dimetilo (40c)**Fórmula Molecular:** C₁₂H₂₂NO₅P**Aspecto físico:** Aceite incoloro**Peso Molecular:** 291.28 g/mol**R_f** (100% AcOEt): 0.22**IR** (NaCl): ν 770, 827, 1030, 1172, 1204, 1229, 1249, 1278, 1304, 1410, 1476, 1698, 2854, 2931, 2952 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 400.13 MHz): δ 1.12-1.26 (m, 2H, H₄), 1.26-1.37 (m, 1H, H₅), 1.64-1.81 (m, 3H, H₃+H₅), 1.83-1.92 (m, 1H, H₂), 2.23 (h, 1H, *J* 7.8, H₂), 2.96-3.07 (m, 1H, H₆), 3.67-3.72 (m, 6H, H₁₁), 3.78-3.90 (m, 1H, H₆), 4.30-4.39, 4.46-4.55 (m, 1H, H₁), 4.58 (dt, 2H, *J* 5.3 y 1.5, H₈), 5.14-5.18 (m, 1H, H₁₀), 5.22-5.30 (m, 1H, H₁₀), 5.84-5.94 (m, 1H, H₉)

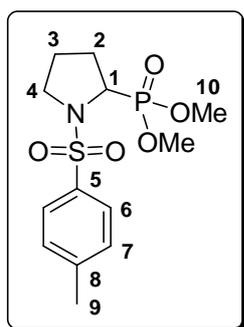
¹³C-RMN (CDCl₃, 100.6 MHz): δ (algunas señales aparecen desdobladas por la presencia de rotámeros, marcado con un asterisco el minoritario) 25.1, 25.3* (C₄); 27.9, 28.2, 28.3, 29.0, 29.3, 29.4* (C₂, C₃, C₅); 43.5, 43.7* (C₆); 51.0, 51.6* (d, *J* 155, C₁); 52.7-53.3 (m, C₁₁), 66.1, 66.2* (C₈), 117.1, 117.5* (C₁₀), 132.6*, 132.7 (C₉), 156.2, 156.3 (C₇)

³¹P-RMN (CDCl₃, 162.1 MHz): δ 27.4*, 28.0

HRMS (ESI⁺, m/z): Calculada para C₁₂H₂₂NNaO₅P [(M+Na)⁺]: 314.1128; encontrada: 314.1130

Parte experimental

[N-tosilpirrolidin-2-il]fosfonato de dimetilo (41a)



Fórmula empírica: C₁₃H₂₀NO₅PS

Aspecto físico: Sólido blanco

Peso Molecular: 333.34 g/mol

R_f (100% AcOEt): 0.23

PF: 119-120 °C

IR (KBr): ν 526, 552, 588, 618, 667, 709, 718, 776, 813, 831, 996, 1037, 1090, 1158, 1189, 1263, 1309, 1348, 1447, 1457, 1493, 1597, 2855, 2959, 2992 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 1.35-1.49 (m, 1H, H₃), 1.52-1.72 (m, 1H, H₃), 1.89-2.10 (m, 2H, H₂), 2.39 (s, 3H, H₉), 3.37 (t, 2H, *J* 6.4, H₄), 3.77 (d, 3H, *J* 10.5, H₁₀), 3.83 (d, 3H, *J* 10.5, H₁₀), 4.11 (dt, 1H, *J* 9.0 y 2.8, H₁), 7.28 (d, 2H, *J* 8.2, H₇), 7.69 (d, 2H, *J* 8.2, H₆)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 21.4 (C₉), 24.3 (C₂), 26.8 (C₃), 49.1 (C₄), 52.8 (d, *J* 28, C₁₀), 54.0 (d, *J* 23, C₁₀), 55.1 (d, *J* 680, C₁), 127.4 (C₇), 129.7 (C₆), 134.6 (C₈), 143.8 (C₅)

³¹P-RMN (CDCl₃, 121.5 MHz): δ 25.0

Condiciones de separación en HPLC (210, 215 nm)	
Columna: Chiralcel OJ-H	Eluyente: hexano/etanol (85:15)
Temperatura: 30 °C	Flujo: 0.8 mL/min
t_R (+): 18.0 min	t_R (-): 30.9 min

Rotación Específica: $[\alpha]_D^{20} = +76.7$ (c = 1.0, CHCl₃), 94% ee, por alcoxycarbonilación enzimática.

REFERENCIAS

1. a) J. M. Woodley, *Trends Biotechnol.* **2008**, *26*, 321-327; b) H.-P. Meyer, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 180-188.
2. K. Buchholz, V. Kasche, U. T. Bornscheuer, *Biocatalysts and enzyme technology*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2005**.
3. M. J. Hernáiz, A. R. Alcántara, J. I. García, J. V. Sinisterra, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 9422-9437.
4. a) J. Tao, J.-H. Xu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 43-50; b) I. Andrews, P. Dunn, J. Hayler, B. Hinkley, D. Hughes, B. Kaptein, K. Lorenz, S. Mathew, T. Rammeloo, L. Wang, A. Wells, T. D. White, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 22-30; c) C. M. Clouthier, J. N. Pelletier, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1585-1605.
5. a) S. L. Y. Tang, R. L. Smith, M. Poliakoff, *Green Chem.* **2005**, *7*, 761-762; b) N. Ran, L. Zhao, Z. Chen, J. Tao, *Green Chem.* **2008**, *10*, 361-372; c) P. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301-312; d) T. Hudlicky, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3995-3997.
6. R. Crossley, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 8155-8178.
7. B. Kasprzyk-Hordern, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4466-4503.
8. Aunque actualmente se sabe que el isómero "seguro" de la talidomida puede convertirse en su epímero teratogénico a pH fisiológico, se está volviendo a utilizar en algunos países con el apoyo de la Organización Mundial de la Salud (OMS), porque se ha confirmado su eficacia contra enfermedades como la lepra y en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, como el mieloma múltiple, aplicándose especialmente en casos en los que los tratamientos convencionales (quimio y radioterapia) no tienen éxito o no son viables.
9. K. K.-C. Liu, S. M. Sakya, C. J. O'Donell, A. C. Flick, J. Li, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 1136-1154.
10. J. Magano, J. R. Dunetz, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 2177-2150.
11. R. Wohlgemuth, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 713-724.
12. a) R. N. Patel, *ACS Catal.* **2011**, *1*, 1056-1074; b) J. Magano, J. R. Dunetz, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 2177-2250; c) S. D. Roughley, A. M. Jordan, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3451-3479.
13. W.-D. Fessner, N. J. Turner, M.-X. Wang, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2189-2190.
14. D. E. Roberston, U. T. Bornscheuer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 164-165.

Referencias

15. F. Beisson, A. Tiss, C. Riviere, R. Verger, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2000**, 133-153.
16. a) A. Zaks, A. M. Klivanov, *Science* **1984**, *224*, 1249-1251; b) G. Carrea, S. Riva, *Organic synthesis with enzymes in non-aqueous media*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2008**.
17. Revisiones bibliográficas: a) C. A. Tracewell, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 3-9; b) M. T. Reetz, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5767-5778; c) C. Jäckel, D. Hilvert, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 753-759; d) A. S. Bommarius, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 793-794; e) S. Lutz, *Science* **2010**, *329*, 285-287; f) M. B. Quin, C. Schmidt-Dannert, *ACS Catal.* **2011**, *1*, 1017-1021.
18. a) S. Sánchez, A. L. Demain, *Org. Process. Res. Dev.* **2011**, *15*, 224-230; b) S. Wenda, S. Illner, A. Mell, U. Kragl, *Green Chem.* **2011**, *13*, 3007-3047.
19. a) A. Straathof, S. Panke, A. Schmid, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 548-556; b) S. Panke, M. Held, M. Wubbolts, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 272-279; c) V. Gotor, S. Flitsch, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 185-186.
20. a) K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231-238; b) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504-4523; c) A. Babbie, N. Tokuriki, F. Hollfelder, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 200-207; d) Q. Wu, B.-K. Liu, X.-F. Lin, *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 1966-1988; e) M. S. Humble, P. Berglund, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3391-3401.
21. a) A. M. Klivanov, *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 141-144; b) A. M. Klivanov, *Nature* **2001**, *409*, 241-246; c) A. Ghanem, H. Y. Aboul-Enein, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3331-3351.
22. a) K. Faber, *Biotransformations in organic chemistry*, 5th Ed., Springer, New York (EEUU), **2004**; b) A. Ghanem, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1721-1754.
23. a) O. Miyawaki, K. Nakamura en *Enzyme reactions in supercritical fluids. Lipid Biotechnology*, Eds. T. M. Kuo, H. W. Gardner, Marcel Dekker Inc., New York (EEUU), **2002**, capítulo 34, 689-702; b) Kamat, G. Critchley, E. J. Beckman, A. J. Russell, *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *46*, 610-620; c) P. Lozano, T. de Diego, J. L. Iborra en *Immobilization of enzymes and cells*, Ed. J. M. Guisan, Humana Press Inc, Totowa (New Jersey, EEUU), **2006**, capítulo 24, 269-282; d) Z. J. Dijkstra, R. Merchant, J. T. F. Keurentjes, *J. Supercrit. Fluids* **2007**, *41*, 102-108.
24. a) R. A. Sheldon, R. M. Lau, M. J. Sorgedraeger, F. van Rantwijk, K. R. Sheldon, *Green Chem.* **2002**, *4*, 147-151; b) F. Rantwijk, R. Sheldon,

- Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2757-2785; c) P. Domínguez de María, Z. Maugeri, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 220-225; d) http://www.scitopics.com/Biocatalysis_in_ionic_liquids.html
25. P. Lozano, *Green Chem.* **2010**, *12*, 555-569.
26. a) D. N. Tran, K. J. Balkus Jr., *ACS Catal.* **2011**, *1*, 956-968; b) R. A. Sheldon, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 213-223.
27. a) V. Gotor, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2189-2197; b) C. Carboni-Oerlemans, P. Domínguez de María, B. Tuin, G. Bargeman, A. van der Meer, R. van Gemert, *J. Biotechnol.* **2006**, *126*, 140-151.
28. D. Ringe, G. A. Petsko, *Science* **2008**, *320*, 1428-1429.
29. T. Ema, *Curr. Org. Chem.* **2004**, *8*, 1009-1025.
30. a) R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665; b) K. Lemke, M. Lemke, F. Theil, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6268-6273.
31. Q. Jing, R. J. Kazlauskas, *Chirality* **2008**, *20*, 724-735.
32. a) C.-S. Chen, S.-H. Wu, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2812-2817; b) C.-S. Chen, C. J. Sih, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 695-707.
33. a) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 6032-6040; b) P. Berglund, S. Park, *Curr. Org. Chem.* **2005**, *9*, 325-336; c) O. Khersonsky, C. Roodveldt, D. S. Tawfik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 498-508.
34. a) A. C. Hill, *J. Chem. Soc.* **1898**, *73*, 634-658; b) J. H. Kastle, A. S. Loevenhart, *Am. Chem. J.* **1900**, *24*, 491-525; c) C. Neuberg, J. Hirsch, *Biochem. Z.* **1921**, *115*, 282-310; d) P. Rona, E. Chain, R. Ammon, *Biochem. Z.* **1931**, *247*, 113-145.
35. a) Y. A. Sonawane, S. B. Phadtare, B. N. Borse, A. R. Jagtap, G. S. Shankarling, *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1456-1459; b) T. He, K. Li, M.-Y. Wu, X.-W. Feng, N. Wang, H.-Y. Wang, C. Li, X.-Q. Yu, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *67*, 189-194; c) K. P. Dhake, P. J. Tambade, R. S. Singhal, B. M. Bhanage, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 4455-4458; d) S.-J. Chai, Y.-F. Lai, J.-C. Xu, H. Zheng, Q. Zhu, P.-F. Zhang, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 371-375; e) M. López-Iglesias, E. Busto, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2345-2353.
36. a) C. Branneby, P. Carlqvist, A. Magnusson, K. Hult, T. Brinck, P. Berglund, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 874-875; b) M. Svedendahl, P. Carlqvist, C. Branneby, O. Allnér, A. Frise, K. Hult, P. Berglund, T. Brinck, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2443-2451.

Referencias

37. W. B. Wu, N. Wang, J. M. Xu, Q. Wu, X. F. Lin, *Chem. Commun.* **2005**, 2348-2350.
38. R. J. Kazlauskas, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, 9, 195-201.
39. R. J. Fox, G. W. Huisman, *Trends Biotechnol.* **2008**, 26, 132-138.
40. a) G. A. Behrens, A. Hummel, S. K. Padhi, S. Schätzle, U. T. Bornscheuer, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 2191-2215; b) A. S. Bommarius, J. K. Blum, M. J. Abrahamson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, 15, 194-200.
41. a) M. T. Reetz, M. Puls, J. D. Carballeira, A. Vogel, K.-E. Jaeger, T. Eggert, W. Thiel, M. Boccola, N. Otte, *ChemBioChem* **2007**, 8, 106-112; b) K. Engström, J. Nyhlén, A. G. Sandström, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 7038-7042; c) T. Ema, S. Kamata, M. Takeda, Y. Nakano, T. Sakai, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5440-5442; d) P. B. Juhl, K. Doderer, F. Hollmann, O. Thum, J. Pleiss, *J. Biotechnol.* **2010**, 150, 474-480.
42. M. G. Hoesl, C. G. Acevedo-Rocha, S. Nehring, M. Royter, C. Wolschner, B. Wiltschi, N. Budisa, G. Antranikian, *ChemCatChem* **2011**, 3, 213-221.
43. B. M. Nestl, B. A. Nebel, B. Hauer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, 15, 187-193.
44. V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Curr. Opin. Drug. Discov. Dev.* **2009**, 12, 784-797.
45. M. Breuer, K. Ditrich, T. Habicher, B. Hauer, M. Keßeler, R. Stürmer, T. Zelinski, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 788-824.
46. a) M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2009**, 1, 42-51; b) N. J. Turner, M. D. Truppo, Biocatalytic routes to nonracemic amines en *Chiral amine synthesis: methods, developments and applications*, Ed. T. C Nugent, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2010**, capítulo 14, 431-459.
47. a) A. Zaks, A. M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, 82, 3192-3196; b) H. Kitaguchi, P. A. Fitzpatrick, J. E. Huber, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 3094-3095; c) A. M. Klivanov, *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 114-120; d) A. L. Guthman, E. Meyer, E. Kalerin, F. Polyak, J. Sterling, *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, 40, 760-767.
48. a) J. H. Lee, K. Han, M.-J. Kim, J. Park, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 999-1015; b) H. Pellissier, *Tetrahedron* **2011**, 67, 3769-3802.
49. K. Han, J. Park, M.-J. Kim, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 4302-4304.
50. N. Ríos-Lombardía, E. Busto, V. Gotor-Fenández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2011**, 76, 14, 5709-5718.

51. a) F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Tetrahedron* **2004**, *60*, 501-519; b) V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 797-812.
52. a) G. F. Breen, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1427-1430; b) A. J. Blacker, M. J. Stirling, M. I. Page, *Org. Process Res. Dev.* **2007**, *11*, 642-648; c) M. Stirling, J. Blacker, M. I. Page, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1247-1250.
53. P. Domínguez de María, C. Carboni-Oerlemans, B. Tuin, G. Bargeman, A. van der Meer, R. van Gemert, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2005**, *37*, 36-46.
54. a) X.-G. Li, M. Lähtie, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1857-1861; b) A. Liljeblad, P. Kallio, M. Vainio, J. Niemi, L. T. Kanerva, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 886-895.
55. a) M. A. J. Veld, K. Hult, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 5416-5421; b) H. Ismail, R. M. Lau, F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 1511-1516; c) A. N. Parvulescu, E. Van der Eycken, P. A. Jacobs, D. E. de Vos, *J. Catal.* **2008**, *255*, 206-212; d) A. N. Parvulescu, P. A. Jacobs, D. E. de Vos, *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 113-121.
56. M. Cammenberg, K. Hult, S. Park, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1745-1749.
57. K. Laumen, M. Kittlemann, O. Ghisalba, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *19-20*, 55-66.
58. a) Y. Pan, X. Xianghua, X. Wang, *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *140*, 902-912; b) M. R. Farlow, J. L. Cummings, *Am. J. Med.* **2007**, *120*, 388-397; c) G. Figiel, C. Sadowsky, *Curr. Med. Res. Opin.* **2008**, *24*, 157-166; d) J. Birks, J. Grimley Evans, V. Iakovidou, M. Tsolaki, F. E. Holt, *Cochrane Database Syst. Rev.* **2009**, *2*, CD001191; e) S. Gauthier, A. Juby, W. Dalziel, B. Rehel, R. Schecter, *Curr. Med. Res. Opin.* **2010**, *26*, 1149-1160.
59. M. Emre, *CNS Drugs* **2006**, *20*, 748-750.
60. R. J. Polinsky, *Clin. Ther.* **1998**, *20*, 634-647.
61. a) B. R. Williams, A. Nazarians, M. A. Gill, *Clin. Ther.* **2003**, *25*, 1634-1653; b) A. Enz, R. Amstutz, H. Boddeke, G. Gmelin, J. Malanowski, *Prog. Brain Res.* **1993**, *98*, 431-438.
62. M. L. Bolognesi, M. Bartolini, A. Cavalli, V. Andrisano, M. Rosini, A. Minarini, C. Melchiorre, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 5945-5952.
63. J. Mangas-Sánchez, M. Rodríguez-Mata, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5304-5310.

Referencias

64. a) Z-H. Wang, S. E. Horne, K. S. K. Murthy, *WO 2007/098573T*; b) J. Henar, A. Overeem, T. Lambertus, *WO 2008/037433 A1*.
65. A. A. Boezio, J. Pytkowicz, A. Côté, A. B. Charette, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14260-14261.
66. K. Han, C. Kim, J. Park, M.-J. Kim, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3105-3108.
67. K. Han, C. Kim, J. Park, M.-J. Kim, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 3536-3537.
68. M. Fuchs, D. Koszelewski, K. Tauber, W. Kroutil, K. Faber, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5500-5502.
69. A. Hietanen, T. Saloranta, S. Rosenberg, E. Laitinen, R. Leino, L. T. Kanerva, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 909-919.
70. J. W. Canary, C. S. Allen, J. M. Castagnetto, Y. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8484-8485.
71. a) K. Müller, C. Faeh, F. Diederich, *Science* **2007**, *317*, 1881-1886; b) K. L. Kirk, *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 305-321; c) S. Purser, P. R. Moore, S. Swallow, V. Gouverneur, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 320-330; d) W. K. Hagmann, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4359-4369; e) P. V. Ramachandran, *Future Med. Chem.* **2009**, *1*, 771-772.
72. R. Filler, R. Saha, *Future Med. Chem.* **2009**, *1*, 777-791.
73. G. Carrea, S. Riva, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2226-2254.
74. V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor, en *Targets in Heterocyclic Systems: Chemistry and Properties*, Ed. O. A. Attanasi, D. Spinelli, Società Chimica Italiana, Roma, **2008**, Vol. 12, capítulo 15, 414-437.
75. L. E. Iglesias, V. M. Sánchez, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, *8*, 2675-2677.
76. K. A. Skupinska, E. J. McEachern, I. R. Baird, R. T. Skerlj, G. J. Bridger, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3546-3551.
77. A. E. Sigmund, R. DiCosimo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2797-2799.
78. O. Torre, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1481-1488.
79. a) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3427-3435; b) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1007-1016.
80. K. Ditrach, *Synthesis* **2008**, *14*, 2283-2287.

81. J. B. Crawford, R. T. Skerlj, G. J. Bridger, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 669-671.
82. a) O. Mitsunobu, *Synthesis* **1981**, 1-28; b) T. Y. S. But, P. H. Toyi, *Chem. Asian J.* **2007**, *2*, 1340-1355.
83. Amina: H. B. Mereyala, S. R. Koduru, V. N. Cheemalapati, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 259-267; Amida: M. Hu, F.-L. Zhang, M.-H. Xie, *Lett. Org. Chem.* **2007**, *4*, 126-128.
84. Y. Kim, J. Park, M.-J. Kim, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 5581-5584.
85. D. Wang, L. Kuang, Z. Li, K. Ding, *Synlett* **2008**, 69-72.
86. R. J. Arvela, N. E. Leadbeater, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9122-9125.
87. T. Schareina, A. Zapf, A. Cotté, N. Müller, M. Beller, *Synthesis* **2008**, 3351-3355.
88. Y. Ren, W. Wang, S. Zhao, X. Tian, J. Wang, W. Yin, L. Cheng, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4595-4597.
89. En este capítulo, las purificaciones de todos los compuestos por cromatografía de columna se llevan a cabo con gel de sílice neutro por obtenerse mejores rendimientos al quedar menos retenidos los compuestos y evitar posibles descomposiciones originadas por el medio ligeramente ácido del gel de sílice común.
90. C.-H. Lee, E. K. Bayburt, S. DiDomenico Jr., I. Drizin, A. R. Gomtsyan, J. R. Koenig, R. J. Perner, R. G. Schmidt Jr., S. C. Turner, T. K. Jinkerson, G. Z. Zheng, **2005**, U. S. Patent, 0113576 A1.
91. J. González-Sabín, V. Gotor, F. Rebolledo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 1315-1320.
92. L. Dong, S. Aleem, C. A. Fink, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 5210-5212.
93. a) R. F. Borch, M. D. Bernstein, H. D. Durst, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2897-2904; b) C. F. Lane, *Synthesis* **1975**, 135-146.
94. Y. Hari, S. Matsugu, H. Inohara, Y. Hatanaka, M. Akabane, T. Imanishi, S. Obika, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4176-4180.
95. Se tomaron alícuotas de 20 μ L, se disolvieron en CH_2Cl_2 y se añadió una pequeña cantidad de K_2CO_3 y una gota de cloruro de acetilo. Se agitaron durante 15 min a 900 rpm a 25 $^\circ\text{C}$, se evaporó el disolvente, y se redisolvieron en un disolvente adecuado para su inyección directa en HPLC tras una filtración de la muestra.
96. R. A. Glennon, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1-12.

Referencias

97. S. H. Snyder, K. M. Tayler, *Science* **1970**, *168*, 1487-1489.
98. a) R. A. Glennon, R. Young, A. E. Hauck, J. D. McKenney, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1984**, *21*, 895-901; b) J. S. Partilla, A. G. Dempsey, A. S. Nagpal, B. E. Blough, M. H. Baumann, R. B. Rothman, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *319*, 237-246; c) M. A. Parker, D. M. Kurrasch, D. E. Nichols, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 4661-4669; d) P. S. Clifford, N. Hart, R. B. Rothman, B. E. Blough, G. R. Bratton, P. J. Wellman, *Life Sciences* **2011**, *88*, 586-589.
99. J. C. Verheijen, K. A. Wiig, S. Du, S. L. Connors, A. N. Martin, J. P. Ferreira, V. I. Slepnev, U. Kochendörfer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 3243-3246.
100. M. Vilches-Herrera, J. Miranda-Sepúlveda, M. Rebolledo-Fuentes, A. Fierro, S. Lühr, P. Iturriaga-Vasquez, B. K. Cassels, M. Reyes-Parada, *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 2452-2460.
101. a) D. E. Nichols, D. H. Lloyd, M. P. Johnson, A. J. Hoffman, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1406-1412; b) M. Dukat, C. Smith, K. Herrick-Davis, M. Teitler, R. A. Glennon, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2545-2552.
102. H. Harada, Y. Hirokawa, K. Suzuki, Y. Hiyama, M. Oue, H. Kawashima, N. Yoshida, Y. Furutani, S. Kato, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 1301-1305.
103. D. Robaa, C. Enzensperger, S. E. AbulAzm, M. M. Hefnawy, H. I. El-Subbagh, T. A. Wani, J. Lehmann, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7422-7426.
104. F. Soriano-Agatón, D. Lagoutte, E. Poupon, F. Roblot, A. Fournet, J.-C. Gantier, R. Hocquemiller, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1581-1587.
105. a) H. Stark, M. Krause, A. Rouleau, M. Garbarg, J.-C. Schwartz, W. Schunack, *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 191-198; b) K. Neuvonen, H. Neuvonen, F. Fülöp, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3495-3498; c) P. Igel, S. Dove, A. Buschauer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 7191-7199.
106. A. H. Lewin, G. M. Miller, B. Gilmour, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 7044-7048.
107. a) D. Koszelewski, D. Pressnitz, D. Clay, W. Kroutil, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4810-4812; b) D. Koszelewski, M. Göritzer, D. Clay, B. Seisser, W. Kroutil, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 73-77.
108. a) U. Hanefeld, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 2405-2415; b) A. Goswami, Z. Guo, W. L. Parker, R. N. Patel, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 1715-1719.
109. M. Paravidino, U. Hanefeld, *Green Chem.* **2011**, *13*, 2651-2657.

110. M. Nechab, N. Azzi, N. Vanthuyne, M. Bertrand, S. Gastaldi, G. Gil, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6918-6923.
111. F. Campos, M. P. Bosch, A. Guerrero, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 2705-2717.
112. L. Muñoz, A. M. Rodríguez, G. Rosell, M. P. Bosch, A. Guerrero, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 8171-8177.
113. M. Nechab, L. E. Blidi, N. Vanthuyne, S. Gastaldi, M. P. Bertrand, G. Gil, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3917-3920.
114. a) B. Martín-Matute, *Anales Química* **2006**, *102*, 46-52; b) B. Martín-Matute, J.-E. Bäckvall, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 226-232.
115. P. M. Dinh, J. A. Howarth, A. R. Hudnott, J. M. J. Williams, W. Harris, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7623-7626.
116. M. T. Reetz, K. Schimossek, *Chimia* **1996**, *50*, 668-669.
117. Y. Ahn, S.-B. Ko, M.-J. Kim, J. Park, *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 647-658.
118. O. Pàmies, A. H. Éll, J. S. M. Samec, N. Hermanns, J.-E. Bäckvall, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 4699-4702.
119. H. M. Jung, M. J. Koh, M. J. Kim, J. Park, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 409-411.
120. J. Paetzold, J.-E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17620-17621.
121. L. K. Thalén, D. Zhao, J.-B. Sortais, J. Paetzold, C. Hoben, J.-E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 3403-3410.
122. C. E. Hoben, L. Kanupp, J.-E. Bäckvall, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 977-979.
123. L. E. Blidi, M. Nechab, N. Vanthuyne, S. Gastaldi, M. P. Bertrand, G. Gil, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 2901-2903.
124. F. Poulhès, N. Vanthuyne, M. P. Bertrand, S. Gastaldi, G. Gil, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 7281-7286.
125. A. Foucaud, C. Razorilalana-Rabearivony, E. Loukakou, H. Person, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3639-3644.
126. N. Milhazes, R. Calheiros, M. P. M. Marques, J. Garrido, M. N. D. S. Cordeiro, C. Rodrigues, S. Quinteira, C. Novais, L. Peixe, F. Borges, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 4078-4088.
127. J. Wang, H. Li, B. Lou, L. Zu, H. Guo, W. Wang, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4321-4332.

Referencias

128. D. Rotticci, F. Hæffner, C. Orrenius, T. Norin and K. Hult, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1998**, *5*, 267-272.
129. Ejemplos recientes de DKR de alcoholes secundarios usando enzimas y complejos metálicos: a) J. Deska, C. P. Ochoa, J.-E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 4447-4451; b) Q. Chen, C. Yuan, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 3707-3716; c) E. V. Johnston, K. Bogár, J.-E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 4596-4599.
130. L. H. Andrade, A. V. Silva, E. C. Pedrozo, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4331-4334.
131. Y. K. Choi, Y. Kim, K. Han, J. Park, M.-J. Kim, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 9543-9545.
132. N. Menashe, Y. Shvo, *Organometallics* **1991**, *10*, 3885-3991.
133. B. L. Conley, M. K. Pennington-Boggio, E. Boz, T. J. Williams, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2294-2312.
134. Para **14a,b**: ver referencia 100; para **14c,d**: S. Yan, Y. Gao, R. Xing, Y. Shen, Y. Liu, P. Wu, H. Wu, *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 6294-6299; para **14e**: N.-Y. Shih, A. T. Lupo, Jr., R. Aslanian, S. Orlando, J. J. Piwinski, M. J. Green, A. K. Ganguly, M. A. Clark, S. Tozzi, W. Kreutner, J. A. Hey, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 1593-1599.
135. a) M. L. Gutierrez, X. Garrabou, E. Agosta, S. Servi, T. Parella, J. Joglar, P. Clapés, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 4647-4656; b) K. Fesko, L. Giger, D. Hilvert, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5987-5990.
136. a) B. Wu, W. Szymanski, P. Wietzes, S. de Wildeman, G. J. Poelarends, B. L. Feringa, D. B. Janssen, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 338-344; b) B. Wu, W. Szymanski, M. M. Heberling, B. L. Feringa, D. B. Janssen, *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 352-362.
137. R. L. Hanson, B. L. Davis, S. L. Goldberg, R. M. Johnston, W. L. Parker, T. P. Tully, M. A. Montana, R. N. Patel, *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 1119-1129.
138. C. Ewert, S. Lutz-Wahl, L. Fischer, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2573-2578.
139. H. H. Kinfe, V. Chhiba, J. Frederick, M. L. Bode, K. Mathiba, P. A. Steenkamp, D. Brady, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2009**, *59*, 231-236.
140. D.-Y. Ma, D.-X. Wang, J. Pan, Z.-T. Huang, M.-X. Wang, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4087-4091.
141. a) L. Zhao, L. Zheng, G. Gao, F. Jia, S. Cão, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *54*, 7-12; b) T. Nuijens, J. A. W. Kruijtzter, C. Cusan, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, P. J. L. M. Quaedflieg, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2719-

- 2721; c) G. Tasnádi, E. Forró, F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2072-2077.
142. a) N. W. Fadnavis, A. V. Devi, L. S. Jasti, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2363-2366; b) C. Simons, J. G. E. van Leeuwen, R. Stemmer, I. W. C. E. Arends, T. Maschmeyer, R. A. Sheldon, U. Hanefeld, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *54*, 67-71.
143. E. Forró, F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1005-1009.
144. T. A. Paál, A. Liljeblad, L. T. Kanerva, E. Forró, F. Fülöp, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5269-5276.
145. D. A. Schichl, S. Enthaler, W. Holla, T. Riermeier, U. Kragl, M. Beller, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 3506-3512.
146. a) P. P. Giannousi, P. A. Bartlett, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1603-1609; b) S. Hanessian, Y. L. Bennani, *Synthesis* **1994**, 1272-1274.
147. F. R. Atherton, C. H. Hassal, R. W. Lambert, *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 29-40.
148. a) B. Boduszek, J. Oleksyszyn, C.-M. Kam, J. Selzler, R. E. Smith, J. C. Powers, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3969-3976; b) M. Fonvielle, H. Therisod, M. Hemery, M. Therisod, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 410-413; c) J. Beck, S. Gharbi, A. Herteg-Fernea, L. Vercheval, C. Bebrone, P. Lassaux, A. Zervosen, J. Marchand-Brynaert, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 85-97.
149. C. H. Hassal en *Antibiotics*, Ed. F. E. Hahn, Springer, Berlin (Alemania), **1983**, Vol. VI, 1-11.
150. M. Horiguchi, M. Kandatsu, *Nature* **1959**, *184*, 901-902.
151. a) D. F. Wiemer, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 16609-16644; b) O. I. Kolodiazhnyi, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3295-3340.
152. S. Sobhani, Z. Tashrifi, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 1429-1439.
153. a) B. V. S. Reddy, A. S. Krishna, A. V. Ganesh, G. G. K. S. N. Kumar, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 1359-1362; b) S. A. Dake, D. S. Raut, D. R. Kharat, R. S. Mhaske, S. U. Deshmukh, R. P. Pawar, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2527-2532; c) P. M. Mumford, G. J. Tarver, M. Shipman, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3573-3575.
154. R. Gancarz, J. S. Wieczorek, *Synthesis* **1977**, 625.
155. D. Seyferth, R. S. Marmor, P. Hilbert, *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 1379-1386.
156. J. Barycki, P. Mastalers, *Tetrahedron Lett.* **1970**, *11*, 3147-3150.

Referencias

157. a) K. Manabe, S. Kobayashi, *Chem. Commun.* **2000**, 669-670; b) S. Chanderasekhar, S. J. Prakash, V. Jagadeshwar, C. Narsihmulu, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 5561-5563.
158. a) W. Han, A. R. Ofial, *Chem. Commun.* **2009**, 6023-6025; b) B. Das, C. R. Reddy, S. Nagendra, M. Lingaiah, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 3496-3498; c) S. M. Agawane, J. M. Nagakar, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 3499-3504.
159. M. Ordóñez, H. Rojas-Cabrera, C. Cativiela, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 17-49.
160. C. Déjugnat, G. Etemad-Moghadam, I. Rico-Lattes, *Chem. Commun.* **2003**, 1858-1859.
161. a) B. R. Sculimbrene, A. J. Morgan, S. J. Miller, *Chem. Commun.* **2003**, 1781-1785; b) T. Akiyama, H. Morita, J. Itoh, K. Fuchibe, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 2583-2585; c) F. Fini, G. Micheletti, L. Bernardi, D. Pettersen, M. Fochi, A. Ricci, *Chem. Commun.* **2008**, 4345-4347; d) D. Uraguchi, T. Ito, T. Ooi, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3836-3837.
162. J. Wagner, R. A. Lerner, C. F. Barbas, *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 901-916.
163. a) Y. P. Auberson, P. Acklin, S. Bischoff, R. Moretti, S. Ofner, M. Schmutz, S. Veenstra, *J. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 249-254; b) M. Lämmerhofer, D. Hebenstreit, E. Gavioli, W. Lindner, A. Mucha, P. Kafarski, P. Wiczorek, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2557-2565.
164. N. Sewald, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 5794-5795.
165. D. Seebach, A. K. Beck, D. J. Bierbaum, *Chem. Biodiversity* **2004**, *1*, 1111-1239.
166. D. L. Steer, R. A. Lew, P. Perlmutter, A. I. Smith, M. I. Aguilar, *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 811-822.
167. M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325-2327.
168. a) S. J. Haycock-Lewandowski, A. Wilder, J. Ahman, *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 1094-1103; b) J. Ahman, M. Birch, S. J. Haycock-Lewandowski, J. Long, A. Wilder, *Org. Process Res. Dev.* **2008**, *12*, 1104-1113.
169. R. L. Wolin, A. Santillán Jr., T. Barclay, L. Tang, H. Venkatesan, S. Wilson, D. H. Lee, T. W. Lovenberg, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4493-4509.
170. D. Seebach, M. Overhand, F. N. M. Kühnle, B. Martinoni, L. Oberer, U. Hommel, H. Widmer, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 913-941.

171. S. G. Davies, O. Ichihara, *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, *2*, 183-186.
172. J. I. Grayson, J. Roos, S. Osswald, *Org. Process Res. Dev.* **2011**, *15*, 1201-1206.
173. A. Liljeblad, L. T. Kanerva, *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5831-5854.
174. a) Y. Hsiao, N. R. Rivera, T. Rosner, S. W. Krska, E. Njolito, F. Wang, Y. Sun, J. D. Armstrong, E. J. J. Grabowski, R. D. Tillyer, F. Spindler, C. Malan, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9918-9919; b) G. Hou, W. Li, M. Ma, X. Zhang, X. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12844-12846.
175. a) A. Weickgenannt, M. Oestreich, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 1527-1529; b) X. Wu, Y. Li, C. Wang, L. Zhou, X. Lu, J. Sun, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 2846-2848; c) S. Guizzetti, M. Benaglia, M. Bonsignore, L. Raimondi, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 739-743.
176. G. Reyes-Rangel, E. Jiménez-González, J. L. Olivares-Romero, E. Juaristi, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2839-2849.
177. D. Roche, K. Prasad, O. Repic, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 3665-3668.
178. a) S. Gedey, A. Liljeblad, L. Lázár, F. Fülöp, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 105-110; b) M. Solymár, L. T. Kanerva, F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 1893-1897.
179. a) M. Shakeri, K. Engström, A. G. Sandström, J.-E. Bäckvall, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 534-538; b) K. Engström, M. Shakeri, J.-E. Bäckvall, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 1827-1830.
180. P. Flores-Sánchez, J. Escalante, E. Castillo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 629-634.
181. S. J. Faulconbridge, K. E. Holt, L. G. Sevillano, C. J. Lock, P. D. Tiffin, N. Tremayne, S. Winter, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2679-2681.
182. A. Gröger, O. May, H. Hüsken, S. Georgeon, K. Drauz, K. Landfester, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1645-1648.
183. J. Ogawa, J. Mano, S. Shimizu, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *70*, 663-669.
184. Y.-Y. Liu, W.-Y. Lou, M.-H. Zong, R. Xu, X. Hong, H. Wu, *Biocatal. Biotransf.* **2005**, *23*, 89-95.
185. E. Forró, T. Paál, G. Tasnádi, F. Fülöp, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 917-923.
186. M. Utczás, E. Székely, G. Tasnádi, É. Monek, L. Vida, E. Forró, F. Fülöp, B. Simándi, *J. Supercrit. Fluids* **2011**, *55*, 1019-1022.
187. N. J. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 234-240.

Referencias

188. B. J. V. Verkuijl, W. Szymański, B. Wu, A. J. Minnaard, D. B. Janssen, J. G. de Vries, B. L. Feringa, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 901-903.
189. H.-S. Bea, H.-J. Park, S.-H. Lee, H. Yun, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5894-5896.
190. Información general sobre la Dapoxetina: www.drugs.com y www.dapoxetine-online.biz.
191. a) S. H. Preskorn, R. Ross, C. Y. Stanga, Selective serotonin reuptake inhibitor, en *Antidepressants: past, present, and future*, Ed. S. H. Preskorn, R. Ross, C. Y. Stanga, J. P. Feighner, Springer-Verlag, Berlin (Alemania), **2004**, capítulo 3, 242-262; b) M. A. Katzman, *CNS Drug* **2009**, *23*, 103-120.
192. D. T. Wong, K. W. Perry, F. P. Bymaster, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2005**, *4*, 764-774.
193. I. M. Anderson, *J. Affective Disord.* **2000**, *58*, 19-36.
194. A. Cipriani, T. A. Furukawa, G. Salanti, J. R. Geddes, J. P. T. Higgins, R. Churchill, N. Watanabe, A. Nakagawa, I. M. Omori, H. McGuire, M. Tansella, C. Barbui, *Lancet* **2009**, *373*, 746-758.
195. a) S. M. Hoy, L. J. Scott, *Drugs* **2010**, *70*, 1433-1443; b) I. Moncada Iribarren, J. I. Martínez-Salamanca, *Therapy* **2010**, *7*, 691-702.
196. K. Venkatesan, K. V. Srinivasan, *Arkivoc* **2008** (xvi), 302-310.
197. S. A. Siddiqui, K. V. Srinivasan, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2099-2103.
198. P. M. Chincholkar, A. S. Kale, V. K. Gumaste, A. R. A. S. Deshmukh, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 2605-2609.
199. S. Kang, H.-K. Lee, *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 237-240.
200. O. Torre, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 860-866.
201. a) V. A. Soloshonok, N. A. Fokina, A. V. Rybakova, I. P. Shishkina, S. V. Galushko, A. E. Sorochinsky, V. P. Kukhar, M. V. Savchenko, V. K. Švedas, *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1601-1610; b) C. Y. K. Tan, D. F. Weaver, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7449-7461; c) R. Jiang, H. Chen, S. Cheng, Y. Jin, Q. Wang, X. Sun, *Disi Junyi Daxue Xuebao* **2004**, *25*, 688-690.
202. A. Tafi, A. van Almsick, F. Corelli, M. Crusco, K. E. Laumen, M. P. Schneider, M. Botta, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3659-3665.
203. a) S. Hata, M. Iguchi, T. Iwasaka, K.-I. Yamada, K. Tomioka, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 1721-1723; b) M. K. Tse, S. Bhor, M. Klawonn, G. Anilkumar,

- H. Jiao, C. Doebler, A. Spannenberg, W. Maegerlein, H. Hugl, M. Beller, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 1855-1874.
204. G. Tasnádi, E. Forró, F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1771-1777.
205. Compuestos **2a-d**, **2f**, **2g** y **2i**: Ref. 201b. Además, **2a** está disponible comercialmente. Compuesto **2e**: Ref 201c. Compuestos **2h** y **2k**: Ref. 201a. Compuesto **2j**: Ref. 141c.
206. E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3998-4035.
207. U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in organic synthesis*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2005**.
208. V. Gotor-Fernández, R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Catal. B: Enzym* **2006**, *40*, 111-120.
209. a) *Handbook of biologically active peptides*, Ed. A. J. Kastin, Academy Press, Elsevier, Londres (Reino Unido), **2006**; b) R. P. Hicks, J. B. Bhonsle, D. Venugopal, B. W. Koser, A. J. Magill, *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 3026-3036.
210. a) *Peptides as drugs. Discovery and development*, Ed. B. Groner, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2009**; b) *Peptides and protein design for biopharmaceutical applications*, Ed. K. J. Jensen, Wiley, Chichester (Reino Unido), **2009**.
211. a) J. Rizo, L. M. Gierasch, *Annu. Rev. Biochem.* **1992**, *61*, 387-418; b) V. J. Hruby, G. Li, C. Haskell-Luevano, M. Shenderovich, *Biopolymers (Pept. Sci.)* **1997**, *43*, 219-266; c) S. E. Gibson, N. Guillo, M. J. Tozer, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 585-615; d) S. M. Cowell, Y. S. Lee, J. P. Cain, V. J. Hruby, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2785-2798; e) S. Sagan, P. Karoyan, O. Lequin, G. Chassaing, S. Lavielle, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2799-2822.
212. a) C. Cativiela, M. D. Díaz-de-Villegas, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 645-732; b) P. Karoyan, S. Sagan, O. Lequin, J. Quancard, S. Lavielle, G. Chassaing en *Targets in heterocyclic systems. Chemistry and properties*, Ed. O. A. Attanasi, D. Spinelli, Royal Society of Chemistry, Cambridge (Reino Unido), **2005**, capítulo 8, 216-273.
213. a) M. W. MacArthur, J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 397-412; b) G. Vanhoof, F. Goossens, I. De Meester, D. Hendriks, S. Scharpé, *FASEB J.* **1995**, *9*, 736-744; c) B. K. Kay, M. P. Williamson, M. Sudol, *FASEB J.* **2000**, *14*, 231-241; d) H. Reiersen, A. R. Rees, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 679-684.

Referencias

214. a) H. van de Waterbeemd, H. Karajiannis, N. El Tayar, *Amino Acids* **1994**, *7*, 129-145; b) N. El Tayar, H. Karajiannis, H. van de Waterbeemd, *Amino Acids* **1995**, *8*, 125-139.
215. a) S. Hanessian, M. Tremblay, J. F. W. Petersen, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6064-6071; b) S. Hanessian, J. R. del Valle, Y. Xue, N. J. Blomberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10491-10495; c) K. Ersmark, J. R. del Valle, S. Hanessian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1202-1223.
216. a) J. Menard, A. A. Patchett, *Adv. Protein Chem.* **2001**, *56*, 13-75; b) M. Hurst, B. Jarvis, *Drugs* **2001**, *61*, 867-896; c) PROGRESS Collaborative Group *Lancet* **2001**, *358*, 1033-1041; d) ASCOT Investigators *Lancet* **2005**, *366*, 895-906; e) K. Alfakih, A. S. Hall, *Expert Opin. Pharmacother.* **2006**, *7*, 63-71; f) M. P. Curran, P. L. McCormack, D. Simpson, *Drugs* **2006**, *66*, 235-255.
217. a) P. Morain, P. Lestage, G. de Nanteuil, R. Jochemsen, J. L. Robin, D. Guez, P. A. Boyer, *CNS Drug Rev.* **2002**, *8*, 31-52; b) L. Polgár, *Cell. Mol. Life Sci.* **2002**, *59*, 349-362; c) J. S. Rosenblum, J. W. Kozarich, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 496-504; d) J. S. Schneider, M. Giardiniere, P. Morain, *Neuropsychopharmacology* **2002**, *26*, 176-182; e) G. Bellemère, H. Vaudry, P. Morain, S. Jégou, *J. Neuroendocrinol.* **2005**, *17*, 306-313; f) J. Gass, C. Khosla, *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 345-355; g) I. Brandt, S. Scharpé, A.-M. Lambeir, *Clin. Chim. Acta.* **2007**, *377*, 50-61; h) J. A. García-Horsman, P. T. Männistö, J. I. Venäläinen, *Neuropeptides* **2007**, *41*, 1-24; i) J. Lawandi, S. Gerber-Lemaire, L. Juillerat-Jeanneret, N. Moitessier, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3423-3438.
218. a) S. Reissmann, D. Imhof, *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2823-2844; b) J. M. Stewart, *Peptides* **2004**, *25*, 527-532.
219. a) P. I. Dalko, L. Moisan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5138-5175; b) A. Berkessel, H. Gröger, *Asymmetric organocatalysis*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2005**; c) X. Tang, B. Liégault, J.-L. Renaud, C. Bruneau, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2187-2190; d) *Enantioselective organocatalysis: Reactions and experimental procedures*; Ed. P. I. Dalko, Wiley-VCH: Weinheim (Alemania), **2007**; e) B. Liégault, X. Tang, C. Bruneau, J.-L. Renaud, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 934-940; f) R.-S. Luo, J. Weng, H.-B. Ai, G. Lu, A. S. C. Chan, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 2449-2459; g) Y.-Y. Wu, Z. Chai, X.-Y. Liu, G. Zhao, S.-W. Wang, *Eur. J. Org. Chem.* **2009**, 904-911; h) D. Roca-López, P. Merino, F. J. Sayago, C. Cativiela, R. P. Herrera, *Synlett* **2011**, 249-253.
220. a) F. J. Sayago, M. I. Calaza, A. I. Jiménez, C. Cativiela, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2763-2766; b) F. J. Sayago, M. I. Calaza, A. I. Jiménez, C. Cativiela, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 84-91; c) F. J.

Sayago, M. I. Calaza, A. I. Jiménez, C. Cativiela, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 5174-5180.

221. a) S. G. Pyne, A. Javidan, B. W. Skelton, A. H. White, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 5157-5168; b) L. Belvisi, L. Colombo, M. Colombo, M. Di Giacomo, L. Manzoni, B. Vodopivec, C. Scolastico, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 6463-6473.

222. a) M. Vincent, G. Remond, B. Portevin, B. Serkiz, M. Laubie, *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 1677-1680; b) C. J. Blankley, J. S. Kaltenbronn, D. E. DeJohn, A. Werner, L. R. Bennett, G. Bobowski, U. Krolls, D. R. Johnson, W. M. Pearlman, M. L. Hoefle, A. D. Essenburg, D. M. Cohen, H. R. Kaplan, *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 992-998; c) M. Kurokawa, T. Sugai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2004**, *77*, 1021-1025; d) N. Hirata, **2005**, U. S. Patent 0,106,690.

223. F. J. Sayago, P. Laborda, M. I. Calaza, A. I. Jiménez, C. Cativiela, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2011-2028 y las referencias allí contenidas.

224. M. Vincent, B. Marchand, G. Rémond, S. Jaguelin-Guinamant, G. Damien, B. Portevin, J.-Y. Baumal, J.-P. Volland, J.-P. Bouchet, P.-H. Lambert, B. Serkiz, W. Luitjen, M. Laubie, P. Schiavi, *Drug Des. Discovery* **1992**, *9*, 11-28.

225. A lo largo de este capítulo, el empleo de asteriscos (*) junto a los descriptores *R/S* indica la naturaleza racémica del compuesto, refiriéndose las configuraciones *R* o *S* únicamente a la disposición espacial relativa de los sustituyentes en los diferentes centros estereogénicos. En caso de no aparecer asteriscos, se trata de compuestos enantiopuros con la configuración indicada.

226. F. J. Sayago, A. I. Jiménez, C. Cativiela, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2358-2364.

227. Estos resultados aún no han sido publicados.

228. F. J. Sayago, M. J. Pueyo, M. I. Calaza, A. I. Jiménez, C. Cativiela, *Chirality* **2011**, *23*, 507-513.

229. a) R. J. Doll, B. Neustadt, M. E. Smith, C. V. Magatti, E. H. Gold, PCT Int. Appl. WO 8701707, **1987**; b) A. Haider, S. Megevand, B. Nicollier, Y. Pannatier, Eur. Pat. Appl. EP 1864973, **2006**; c) R. B. Potluri, H. Venkata Subramanian, A. R. C. Mulakala, H. P. Kodali, PCT Int. Appl. WO 2006137082, **2006**.

230. S. Katayama, N. Ae, R. Nagata, *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 4295-4299.

231. T. A. Paál, E. Forró, A. Liljeblad, L.T. Kanerva, F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 1428-1433.

Referencias

232. J. Pietruzska, R. C. Simon, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 505-508.
233. S. Alatorre-Santamaría, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 2307-2313.
234. V. Gotor-Fernández, P. Fernández-Torres, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2558-2564.
235. S. Alatorre-Santamaría, M. Rodríguez-Mata, V. Gotor-Fernández, M. C. de Mattos, F. J. Sayago, A. I. Jiménez, C. Cativiela, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1714-1719.
236. En el marco de la colaboración entre la Universidad de Oviedo y la de Zaragoza, este producto nos fue enviado y no ha sido necesaria su síntesis química.
237. a) V. A. Solodenko, V. P. Kukhar, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *32*, 66-75; b) C. Stamper, B. Bennett, T. Edwards, R. C. Holz, D. Ringe, G. Petsko, *Biochemistry* **2001**, *40*, 7035-7046; c) M. Drag, M. Pawelczak, P. Kafarski, *Chirality* **2003**, *15*, S104-S107.
238. P. Kafarski, B. Lejczak, *Curr. Med. Chem.: Anti-Canc. Agents* **2001**, *1*, 301-312.
239. a) H. Rao, Y. Jin, H. Fu, Y. Jiang, Y. Zhao, *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 3636-3646; b) P. Dinér, M. Amedjkouh, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2091-2096.
240. G. Lavielle, P. Hautefaye, C. Schaeffer, J. A. Boutin, C. A. Cudennec, A. Pierré, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1998-2003.
241. a) S. N. Osipov, O. I. Artyushin, A. F. Kolomiets, C. Bruneau, P. H. Dixneuf, *Synlett* **2000**, 1031-1033; b) J. D. Moore, K. T. Sprott, P. R. Hanson, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 8123-8129; c) W. Liu, C. J. Rogers, A. J. Fisher, M. D. Toney, *Biochemistry* **2002**, *41*, 12320-12328; d) J. Grembecka, A. Mucha, T. Cierpicki, P. Kafarski, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2641-2655.
242. a) P. Wieczorek, B. Lejczak, M. Kaczanowska, P. Kafarski, *Pestic. Sci.* **1990**, *30*, 43-57; b) T. Wang, H. J. Huang, J. Luo, D. H. Yu, *Phosphorous, Sulfur, Silicon Relat. Elem.* **2012**, *187*, 135-141.
243. V. Jagodic, M. J. Herak, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1970**, *32*, 1323-1332.
244. R. Engel, *Chem. Rev.* **1977**, *77*, 349-367.
245. K. Moonen, I. Laureyn, C. V. Stevens, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 6177-6215.
246. S. M. Cowell, Y. S. Lee, J. P. Cain, V. Hruby, *J. Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 2785-2798.

247. E. W. Petrillo, E. R. Spitzmiller, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *51*, 4929-4930.
248. Y. Nomura, K. Ogawa, Y. Takeuchi, S. Tomoda, *Chem. Lett.* **1977**, 693-696.
249. M. Kaname, H. Mashige, S. Yoshifuji, *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 531-536.
250. O. Baslé, C.-J. Li, *Chem. Commun.* **2009**, 4124-4126.
251. A. Arizpe, F. J. Sayago, A. I. Jiménez, M. Ordóñez, C. Cativiela, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3074-3081.
252. A. R. Katritzky, X.-L. Cui, B. Yang, P. J. Steel, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1979-1985.
253. M. Amedjikouh, K. Westerlund, *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 5175-5177.
254. M. Kaname, Y. Arakawa, S. Yoshifuji, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 2713-2716.
255. a) F. A. Davis, Y. Wu, H. Xu, J. Zhang, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 4523-4525; b) H. A. Dondas, Y. Durust, R. Grigg, M. J. Slater, M. A. B. Sarker, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10667-10682; c) A. Boto, J. A. Gallardo, R. Hernández, C. J. Saavedra, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7807-7811; d) F. A. Davis, H. Xu, Y. Wu, J. Zhang, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2273-2276; e) S. Hanessian, C. Gauchet, G. Charron, J. Marin, P. Nakache, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2760-2778; f) C. Chevrier, D. Le Nouën, A. Defoin, C. Tarnus, *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2384-2392; g) D. G. Piotrowska, I. E. Glowacka, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 1351-1363.
256. C. Maury, Q. Wang, T. Gharbaoui, M. Chiadmi, A. Tomas, J. Royer, H.-P. Husson, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 3627-3636.
257. F. A. Davies, S. H. Lee, H. Xu, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3774-3781.
258. A. Liljeblad, J. Lindborg, A. Kanerva, J. Katajisto, L. T. Kanerva, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 2471-2474.
259. C. Yuan, C. Xu, Y. Zhang, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3499-3504.
260. a) Y.-F. Li, F. Hammerschmidt, *Tetrahedron: Asymmetry* **1993**, *4*, 109-120. b) T. Yokomatsu, M. Sato, S. Shibuya, *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, *7*, 2743-2754; c) F. Hammerschmidt, F. Wuggenig, *Phosphorus Sulfur Silicon Relat. Elem.* **1998**, *141*, 231-238; d) F. Hammerschmidt, F. Wuggenig, *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 1709-1721; e) F. Hammerschmidt, W. Lindner, F. Wuggenig, E. Zarbl, *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 2955-2964; f) A. Woschek, W. Lindner, F. Hammerschmidt, *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 1287-1298.

Referencias

261. F. Wuggenig, A. Schweifer, K. Mereiter, F. Hammerschmidt, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 1870-1879.
262. a) Y. Zhang, C. Yuan, Z. Li, *Tetrahedron* **2002**, *58*, 2973-2978; b) O. Pàmies, J.-E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4815-4818; c) Y. Demizu, A. Moriyama, O. Onomura, *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 5241-5244.
263. J. R. Medina, C. W. Blackledge, K. F. Erhard, J. M. Axten, W. H. Miller, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3946-3949.
264. R. K. Dieter, R. R. Sharma, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 4180-4184.
265. a) Y. Takeuchi, S.-i. Tokuda, T. Takagi, M. Koike, H. Abe, T. Harayama, Y. Shibata, H.-s. Kim, Y. Wataya, *Heterocycles* **1999**, *51*, 1869-1875; b) O. Okitsu, R. Suzuki, S. Kobayashi, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 809-823.
266. T. Shono, Y. Matsumura, K. Tsubata, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3249-3252.
267. G. P. Zecchini, M. P. Paradisi, I. Torrini, G. Lucente, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1989**, *34*, 33-36.
268. E. Busto, V. Gotor-Fernández, J. Montejo-Bernardo, S. García-Granda, V. Gotor, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 8393-8401.