

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA E INORGÁNICA
MÁSTER UNIVERSITARIO EN QUÍMICA Y DESARROLLO
SOSTENIBLE

**SINTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE ALCOHOLES
PROPARGÍLICOS. APLICACIÓN DE LACASAS Y
ALCOHOL DESHIDROGENASAS EN PROCESOS
DE DESRACEMIZACIÓN**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Sergio González Granda

2018

Máster Universitario en Química y Desarrollo Sostenible

Trabajo Fin de Máster

Curso 2017-2018

D. Sergio González Granda graduado en **Química**, ha realizado la Memoria titulada **“SINTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE ALCOHOLES PROPARGÍLICOS. APLICACIÓN DE LACASAS Y ALCOHOL DESHIDROGENASAS EN PROCESOS DE DESRACEMIZACIÓN”** bajo la tutela de D. **Vicente Gotor Fernández**, Profesor Titular de Química Orgánica del Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo, siendo D. Miguel Ferrero Fuertes el tutor académico.

Los tutores certifican que la citada Memoria ha sido realizada en el Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo bajo su dirección, autorizando su presentación para que sea calificada como *Trabajo Fin de Máster* del *Máster Universitario en Química y Desarrollo Sostenible* correspondiente al curso académico 2017-2018.

Oviedo, Julio de 2018

Fdo.: *Sergio González Granda*

Fdo.: *Vicente Gotor Fernández*

Fdo.: *Miguel Ferrero Fuertes*

Abreviaturas y acrónimos

Å	Ángstrom
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolidina)-6-sulfónico
AcOEt	Acetato de etilo
acac	Acetilacetato
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADH-A	Alcohol deshidrogenasa de <i>Rhodococcus ruber</i>
ADH-T	Alcohol deshidrogenasa de <i>Thermoanaerobium</i> species
atm	Atmósfera
c	Conversión
°C	Grados Celsius
CG	Cromatografía de gases
conv.	Conversión
CPCR	<i>Candida parapsilosis</i> carbonil reductasa
d	Doblete
dd	Doble doblete
ddd	Doble doblete de dobletes
D.I	Diámetro interno
dt	Doblete de tripletes
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC	Enzyme Commission (Comisión Enzimática)
Ecoli	<i>Escherichia coli</i>
ee	Exceso enantiomérico
equiv.	Equivalentes
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
ERED	Enereductasas

ESI	Ionización por electroespray
ESI⁺	Ionización por electroespray en modo positivo
EtOh	Etanol
FAD	Dinucleótido de adenina-flavina
g	Gramos
GDH	Glucosa deshidrogenasa
h	Horas
HAA	Ácido 3-hidroxiantranílico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LB-ADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Lactobacillus brevis</i>
LMS	Sistemas mediadores de lacasas
LTv	Lacasa de <i>Trametes versicolor</i>
m	Metros
<i>m</i>	Multiplete
M	Molar
MeCN	Acetonitrilo
mg	Miligramos
MHz	Megahertzios
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mmol	Milimoles

<i>m/z</i>	Relación masa/carga
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida-adenina
NADH	Dinucleótido de nicotinamida-adenina reducido
NADP⁺	Dinucleótido fosfato de nicotinamida-adenina
NADPH	Dinucleótido fosfato de nicotinamida-adenina reducido
NEt₃	Trietilamina
NHA	<i>N</i> -hidroxiacetanilida
nm	Nanometros
NPs	Nanoparticulas
ox	Oxidado
opba	Ligando oxamato
ⁱPr	<i>iso</i> -Propilo
ⁱPrOH	Alcohol isopropílico
Ph	Fenilo
Ras-ADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Ralstonia</i>
red	Reducido
rdto.	Rendimiento
R_f	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
s	Singulete
sa	Singulete ancho
salqu	Ligando de salen 2-quinosalinol
Su (o Sub)	Sustrato
Sy-ADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Sphingobium yanoikuyae</i>

<i>t</i>	Triplete
T	Temperatura
t.a	Temperatura ambiente
TBHP	<i>tert</i> -Butil hidropérido
TBME	<i>tert</i> -Butil metil éter
TEA	Trietanolamina
TEMPO	2,2,6,6-Tetrametilpiperidina-1-óxido
Tes-ADH	Alcohol deshidrogenasa de <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía de capa fina (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
TOF	<i>TurnOver Frequency</i>
TON	<i>TurnOver Number</i>
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U	Unidades enzimáticas
μL	Microlitros
v/v	Relación volumen/volumen

Índice

Introducción.....	1
1.1 Biocatálisis.....	4
1.1.1 Inicios y actualidad de la biocatálisis.....	5
1.1.2 Biocatálisis y Química Sostenible.....	7
1.2 Enzimas REDOX u Oxidorreductasas	10
1.2.1 Tipos de Oxidorreductasas.....	12
1.2.1.1 Alcohol deshidrogenasas (ADHs)	13
1.2.1.2 Oxigenasas	16
1.2.1.3 Oxidasas.....	17
1.2.1.4 Lacasas.....	18
Antecedentes.....	25
2.1 Oxidaciones de alcoholes propargílicos.....	27
2.2 Oxidación (enzimática) de alcoholes activados y aplicación en procesos secuenciales	30
2.3 Reducción estereoselectiva de propargil cetonas	32
Objetivos	35
Resultados y discusión.....	39
4.1 1-Fenilprop-2-in-1-ol y derivados: Síntesis y oxidación quimioenzimática frente a la oxidación química.....	41
4.1.1 Oxidación del 1-fenilprop-2-in-1-ol (1a).....	41
4.1.2 Síntesis de los alcoholes propargílicos no comerciales 1b-m	44

4.1.3 Oxidación enzimática de derivados de 1-fenilprop-2-in-1-ol empleando el sistema catalítico formados por la lacasa de <i>Trametes versicolor</i> y el TEMPO.....	46
4.1.4 Oxidación de derivados de 1-fenilprop-2-in-1-ol empleando el reactivo de Dess-Martin.....	48
4.2 1-Fenilprop-2-in-1-ona y derivados: Reducción enzimática estereoselectiva.....	49
4.2.1 Biorreducción de la 1-fenilprop-2-in-1-ona (2a).....	50
4.2.2 1-Fenilprop-2-in-1-ona y derivados: Reducción enzimática estereoselectiva empleando Ras-ADH y evo 1.1.200.....	52
4.3 Proceso secuencial. Desracemización del 1-fenilprop-2-in-1-ol (1a).....	55
4.3.1 Escalado para la desracemización secuencial del alcohol propargílico 1a	59
Conclusiones	61
Parte experimental.....	65
6.1 Disolventes y reactivos generales.....	67
6.2 Técnicas de purificación y análisis.....	67
6.2.1 Cromatografía en gel de sílice.....	67
6.2.2 Resonancia magnética nuclear (RMN).....	68

6.2.3 Cromatografía de gases.....	68
6.2.4 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	70
6.2.5 Espectroscopía de masas de alta resolución (EMAR).....	71
6.2.6 Espectroscopía de infrarrojo (IR).....	71
6.2.7 Puntos de fusión.....	71
6.3 Procedimiento experimental.....	72
6.3.1 Síntesis de los alcoholes propargílicos 1a-m	72
6.3.2 Biooxidación de los alcoholes propargílicos 1a-m empleando el sistema catalítico lacasa de <i>Trametes versicolor</i> /TEMPO.....	72
6.3.3 Oxidación química del alcohol propargílico 1a empleando MnO ₂	73
6.3.4 Oxidación química del alcohol propargílico 1a empleando el reactivo de Jones.....	73
6.3.5 Oxidación química del alcohol propargílico 1a empleando el reactivo de Dess-Martin.....	74
6.3.6 Bio-reducción de las propargilcetonas 2a-m empleando la Ras-ADH...	74
6.3.7 Bio-reducción de las propargilcetonas 2a-m empleando la ADH evo-1.1.200.....	75
6.3.8 Bio-reducción de la propargilcetona 2a empleando la ADH Sy-ADH, TES-ADH y ADH-T.....	75
6.3.9 Bio-reducción de la propargilcetona 2a empleando la LB-ADH.....	75

6.3.10 Biorreducción de la propargilcetona 2a empleando la ADH-A.....	76
6.3.11 Procedimiento secuencial para la desracemización del alcohol 1a empleando el sistema catalítico lacasa/TEMPO y Ras-ADH.....	76
6.3.12 Procedimiento secuencial para la desracemización del alcohol 1a empleando el sistema catalítico lacasa/TEMPO y evo 1.1.200.....	77
6.3.13 Procedimiento secuencial para la desracemización del alcohol 1a empleando el sistema catalítico lacasa/TEMPO y Ras-ADH a escala semipreparativa.....	78
6.3.14 Procedimiento secuencial para la desracemización del alcohol 1a empleando el sistema catalítico lacasa/TEMPO y evo 1.1.200 a escala semipreparativa.....	78
6.4 Caracterización estructural de los compuestos sintetizados.....	80
Apéndice de espectros de RMN.....	95

Introducción

Uno de los principales retos que se presenta hoy en día en la Química Orgánica es el desarrollo de métodos sintéticos generales, sostenibles y estereoselectivos. En este contexto, la catálisis juega un papel fundamental debido a la gran ventaja que supone el empleo de sustancias en cantidades subestequiométricas especialmente desde un punto de vista económico y medioambiental. Se estima que cerca del 85% de los productos químicos elaborados hoy en día se obtienen mediante procesos en los cuales se emplean procesos catalíticos.¹

Dentro de la catálisis se pueden distinguir tres grandes grupos como son la Metalocatálisis, la Organocatálisis y la Biocatálisis, en función de la utilización de metales o complejos metálicos, sustancias orgánicas o bien enzimas respectivamente como mediadores de los procesos químicos. Este trabajo se centrará en este último grupo, los procesos biocatalíticos, disciplina en la cual se emplean enzimas aislados o complejos enzimáticos como catalizadores para llevar a cabo procesos químicos.

En este *Trabajo Fin de Máster* se han tratado de aplicar dos tipos de enzimas pertenecientes a la familia de las oxidoreductasas (EC 1) para llevar a cabo un procedimiento de desracemización de alcoholes propargílicos. Por tanto, se han estudiado los dos procesos individuales de esta secuencia: oxidación de alcoholes propargílicos mediados por una lacasa, y la reducción selectiva de las correspondientes cetonas propargílicas empleando alcohol deshidrogenasas (ADHs) de diversa selectividad.

Esta introducción ha sido elaborada con la intención de presentar al lector una breve, pero concisa, idea acerca de las posibilidades que la Biocatálisis ofrece en procesos sintéticos en la actualidad, partiendo de su origen histórico hasta llegar al momento de su

¹J. Hagen, *Industrial Catalysis: A Practical Approach*, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim (Alemania) **2015**, cap. 17.

irrupción dentro de la síntesis orgánica y la Química Sostenible. Posteriormente se presentarán los tipos de enzimas que existen en función de los procesos que desempeñan, haciendo una especial mención a la familia de las oxidorreductasas, familia a la cual pertenecen tanto las lacasas como las ADHs, que son las enzimas empleadas en este *Trabajo Fin de Máster*.

1.1 Biocatálisis

Los biocatalizadores o enzimas son proteínas capaces de catalizar reacciones químicas convencionales sin consumirse en el proceso ni desplazar el equilibrio químico. El modo en el que interviene un biocatalizador es similar a un catalizador convencional, es decir, o bien rebaja la energía de activación del proceso global o es capaz de definir un camino de reacción alternativo en el que la suma de las energías de activación es inferior a la de la reacción sin catalizar.

Los biocatalizadores presentan una serie de ventajas con respecto a otros catalizadores como son la posibilidad de llevar a cabo sus procedimientos catalíticos en medios acuosos y en condiciones suaves de reacción, generalmente a presión y a temperatura ambiente, lo cual hace que los procesos biocatalíticos se encuentren en perfecta sintonía con la Química Verde.²

Actualmente la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular tiene clasificadas alrededor de 4000 enzimas, sin embargo, es una cantidad insignificante en comparación con el número de enzimas que se estima que están aún por descubrir. Actúan generalmente con una elevada especificidad, por ello históricamente se han clasificado

² (a) P. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 301-312; (b) J. M. Clark, *Nature Chem.* **2009**, 1, 12-13.

en seis grupos dependiendo de la reacción que catalizan, las cuales se detallan en la Tabla 1.³

Tabla 1. Clasificación de las enzimas en función de la reacción que catalizan.

Familia	Tipo de reacción
EC 1. Oxidorreductasas	Oxidación-Reducción, oxigenación de enlaces C-H, C-C, C=C
EC 2. Transferasas	Transferencia de grupos: acilo, amino, ceto, metilo...
EC 3. Hidrolasas	Hidrólisis y formación de ésteres, amidas, lactamas...
EC 4. Liasas	Adición-Eliminación de pequeñas moléculas en enlaces C=C, C=N, C=O
EC 5. Isomerasas	Isomerizaciones como epimerizaciones, racemizaciones...
EC 6. Ligasas	Formación-Ruptura de enlaces C-O, C-S, C-N, C-C...

Su descripción viene dada por un código numérico de cuatro dígitos (EC A.B.C.D), los cuales indican: (A) Tipo de reacción que catalizan dando lugar a los seis grandes grupos ya comentados, (B) Tipo de molécula que transfieren, (C) Naturaleza del cosustrato y (D) Número característico del enzima.

1.1.1 Inicios y Actualidad de la Biocatálisis

Históricamente los enzimas han sido empleadas desde hace miles de años, aunque entonces no se disponían de los conocimientos necesarios para explicar las transformaciones que eran capaces de llevar a cabo. Tanto en las civilizaciones antiguas de Egipto como de Mesopotamia ya se empleaban las enzimas para producir la fermentación alcohólica en la obtención del vino y la cerveza, por ello, se puede considerar la fermentación alcohólica como la primera biotransformación realizada por el hombre. A pesar de ello, no fue hasta siglo XIX cuando comenzaron a estudiarse las

³ K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry. A Textbook*, 6ª Ed., Springer, Berlin (Alemania), 2011.

biotransformaciones de manera rigurosa. En 1858, Louis Pasteur consiguió realizar la resolución cinética del ácido tartárico en presencia del hongo *Penicillium glaucum*.⁴ Sin embargo, la verdadera irrupción de la Biocatálisis en la síntesis orgánica es muy reciente, data del año 1985, cuando se descubre que las lipasas, enzimas pertenecientes a la familia de las hidrolasas, son capaces de realizar biotransformaciones en disolventes orgánicos.⁵ Este descubrimiento supuso una revolución total debido a que la posibilidad de poder trabajar en medios no acuosos lo que permite la mejor solubilidad de compuestos orgánicos hidrofóbicos, pudiendo realizar procesos de esterificación frente a los procesos de hidrólisis que ocurren en medios acuosos, es decir, se abrió la puerta a la posibilidad de utilizar las enzimas como unas herramientas muy útiles en síntesis orgánica.

Otra de las grandes razones por las que la Biocatálisis ha experimentado un gran auge en los últimos años es el desarrollo de otras ciencias como la Bioquímica, la Biología y en especial la Ingeniería Genética.⁶ Los avances en estos campos han permitido, entre otras cosas, modificar la cadena de aminoácidos por la que están formados los enzimas, siendo posible así modificar la estabilidad y selectividad natural de los biocatalizadores. Los importantes avances logrados en estas ramas del conocimiento han permitido superar el gran inconveniente, y a la vez gran ventaja, que muchos veían en la Biocatálisis, su elevada especificidad. La evolución dirigida ha permitido modificar los enzimas mediante la generación aleatoria de un conjunto extenso (librería) de enzimas mutantes que presentan modificaciones en uno o varios residuos de aminoácidos.⁷ El enzima que tras el primer ciclo de mutaciones haya mostrado mejores propiedades vuelve a ser sometido

⁴ L. Pasteur, *Ann. Chim. Phys.* **1848**, 24, 442-459.

⁵ A. Zaks, A. M. Klivanov, *Prod. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 3192-3196.

⁶ U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, 485, 185-194.

⁷ (a) M. T. Reetz, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2012**, pp. 119-190; (b) M. J. Dougherty, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2009**, 20, 486-491. (c) F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 4143-4148.

a un nuevo ciclo de mutagénesis y ensayo, repitiendo este proceso hasta obtener enzimas con las propiedades adecuadas para el proceso deseado.⁸ Todo ello hace posible que, entre otras cosas, los enzimas sean capaces de aceptar sustratos diferentes a los naturales y mostrar una mayor estabilidad tanto frente a la temperatura como frente al pH del medio, por ello su potencial en síntesis orgánica ha crecido exponencialmente en los últimos años.

Como ya se ha comentado, una de las características fundamentales que presentan los biocatalizadores es su elevada especificidad, sin embargo, en los últimos años se ha descubierto que un notable número de enzimas pueden exhibir un comportamiento distinto al que se esperaría de ellos, es lo que se conoce como “promiscuidad catalítica”.⁹ Debido a ello la Biocatálisis adquiere aún más interés debido a las amplias posibilidades sintéticas que ofrece. Así, las lipasas y proteasas, cuya función natural es la hidrólisis de ácidos grasos y de enlaces peptídicos, son capaces de catalizar reacciones de formación de enlace carbono-carbono como reacciones aldólicas,¹⁰ nitroaldólicas (tipo Henry)¹¹ o de Mannich¹², así como reacciones de formación de enlaces carbono-nitrógeno como las adiciones de tipo Michael.¹³

1.1.2 Biocatálisis y Química Sostenible:

La Química Sostenible o Química Verde se puede definir como la reducción del impacto medioambiental de los procesos químicos a cualquier escala de realización, y

⁸ M. T. Reetz, *Tetrahedron*, **2012**, 68, 7530-7548

⁹ (a) M. López-Iglesias, V. Gotor-Fernández, *Chem. Rec.* **2015**, 15, 743-759; (b) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2012**, pp 1695-1733; (c) M. S. Humble, P. Berglund, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3391-3401; (d) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 4504-4523; (e) K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, 25, 232-238; (f) R. J. Kazlauskas, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, 9, 195-201.

¹⁰ C. Li, Y.-J. Zhou, N. Wang, X.-W. Feng, K. Li, X. Q. Yu, *J. Biotechnol.* **2010**, 150, 539-545.

¹¹ J.-L. Wang, X. Li, H.-Y. Xie, B.-K. Liu, X. -F. Lin, *J. Biotechnol.* **2010**, 145, 240-243.

¹² 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.

¹³ O. Torre, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Commun.* **2004**, 1724-1725.

actualmente supone una premisa que cualquier procedimiento químico debe cumplir.¹⁴ Es por ello por lo que la Biocatálisis se está consolidando como una opción muy viable dentro de la síntesis orgánica, ya que cumple muchos de los 12 principios de la Química Verde:¹⁵

- Son altamente selectivas por lo que, en la mayoría de los casos, no son necesarios los grupos protectores o procesos de derivatización que en otros métodos sintéticos son indispensables. En este contexto, los biocatalizadores presentan tres tipos de selectividad intrínseca a su naturaleza biológica, es decir, no requieren de modificaciones para ser capaces de presentar selectividad como ocurre en otros tipos de catálisis. Los tres tipos de selectividades con los que puede actuar un biocatalizador son:
 1. **Quimioselectividad:** Capacidad de discernir entre grupos funcionales distintos que muestren una reactividad similar y estén presentes en un sustrato. Este tipo de selectividad es clave para evitar la utilización de grupos protectores.
 2. **Regioselectividad:** Capacidad de discernir entre grupos funcionales idénticos situados en distintas regiones del sustrato.
 3. **Estereoselectividad:** Capacidad de realizar la transformación deseada sobre solo uno de los esteroisómeros. En el caso de que el biocatalizador sea capaz de distinguir entre los enantiómeros de un compuesto, se le denomina enantioselectividad. Por otro lado, si es capaz de distinguir entre diastereoisómeros de un mismo compuesto, se le denomina diastereoselectividad.

¹⁴ P. J. Dunn, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1452-1461.

¹⁵ (a) H. C. Erythropel, J. B. Zimmerman, T. M. de Winter, L. Petitjean, F. Melnikov, C. H. Lam, A. W. Lounsbury, K. E. Mellor, N. Z. Janković, Q. Tu, L. N. Pincus, M. M. Falinski, W. Shi, P. Coish, D. L. Plata, P. T. Anastas, *Green Chem.* **2018**, *20*, 1929-1961; (b) R. A. Sheldon, *Green Chem.* **2017**, *19*, 18-43.

- Generalmente trabajan en condiciones suaves de reacción, atendiendo tanto al pH como a la presión/temperatura. Este hecho supone un bajo impacto energético en las transformaciones en las que se empleen biocatalizadores, con lo cual son potencialmente aplicables en procesos industriales en los que el consumo energético es un factor clave.
- Son sustancias biodegradables con una mínima toxicidad por lo que es posible su empleo en el sector farmacéutico en el cual a partir de una determinada etapa sintética el empleo de metales está prohibido para evitar la presencia de trazas del mismo en el fármaco final.
- Presentan unos elevados *TON* (TurnOver Number) y *TOF* (TurnOver Frequency). Entendiendo por *TON* al número de moles de reactivo que un mol de catalizador puede convertir en producto, y por *TOF* a la velocidad a la que se convierten un determinado número de moles de reactivo en producto, en presencia de un mol de catalizador.
- Son capaces de trabajar en medios acuosos y en líquidos iónicos,¹⁶ con lo que el uso de disolventes volátiles se puede reducir.

Quizás, actualmente, los dos aspectos más importantes en síntesis orgánica sean la funcionalización de enlaces C-H y la quiralidad. Este segundo aspecto es muy importante, sobre todo en la Química Médica y en la industria farmacéutica. La actividad de un determinado enantiómero no tiene porqué ser similar a la de su homólogo cuando se introducen en un entorno quiral como puede ser un organismo vivo. En este aspecto por todo el mundo es conocido el caso de la talidomida (Figura 1), el cual se suministró en forma de racemato a las pacientes embarazadas para curar sus nauseas, resultando ser

¹⁶ M. Erbedinger, A. J. Mesiano, A. J. Russell, *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*, 1129-1131.

el enantiómero *S* un agente teratogénico, responsable de diversas malformaciones presentes en los fetos de las pacientes, y el enantiómero *R*, el fármaco deseado.

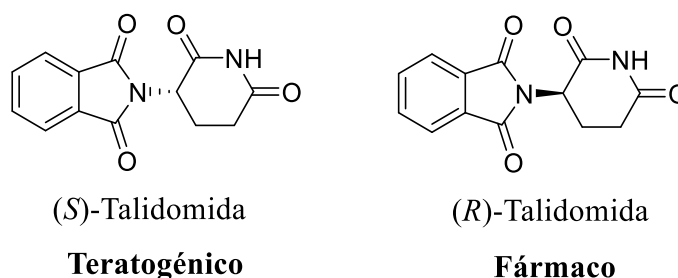


Figura 1. Enantiómeros de la Talidomida y su respuesta biológica.

1.2 Enzimas REDOX u Oxidorreductasas

Los enzimas pertenecientes a la familia de las oxidorreductasas (EC 1) son aquellas capaces de transferir electrones de una sustancia reductora a una oxidante. Una de las mayores ventajas de este tipo de enzimas, es que son capaces de generar productos ópticamente activos a partir tanto de mezclas racémicas como de sustratos proquirales, es decir, son una herramienta muy útil a la hora de inducir quiralidad en una molécula pudiendo hacerlo según la estrategia con un 100% de rendimiento teórico, evitando los problemas intrínsecos inherentes a las resoluciones cinéticas clásicas.

Actualmente cerca del 25% de las enzimas conocidas son de la familia de las oxidorreductasas y conforme a sus distintas actividades se pueden clasificar en tres grandes grupos: deshidrogenasas, oxigenasas y oxidas.¹⁷ Mientras que las deshidrogenasas son capaces de catalizar una reacción redox reversible y pueden ser utilizadas tanto como agente oxidante como agente reductor, las oxigenasas y las oxidasas

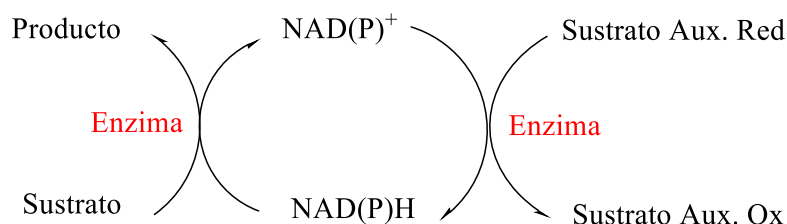
¹⁷ D. Gamnara, G. A. Seoane, P. Saenz-Méndez, P. Domínguez de María, *Redox Biocatalysis: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken (USA), 2013.

catalizan la reacción redox irreversible de oxidación. Esto es debido a que las oxigenasas y oxidasas son capaces de llevar a cabo la reacción, altamente exotérmica, de reducción del oxígeno molecular, que actúa como aceptor de electrones en la reacción redox.

Las enzimas pertenecientes a la familia de las oxidorreductasas requieren cofactores para su utilización. Normalmente el cofactor empleado es el NAD(P)H o el NAD(P)⁺, que actúa como donador o aceptor de electrones. Una de las principales limitaciones que tienen intrínsecamente asociadas este tipo de enzimas es la necesidad de disponer de estos cofactores en relación estequiométrica para poder llevar a cabo la biotransformación de manera adecuada. Este hecho hace que sea necesario disponer de un sistema de reciclaje del cofactor en el medio de reacción, debido fundamentalmente al elevado coste de los cofactores, ya que sería inviable económicamente utilizar cantidades estequiométricas de los mismos.¹⁸ Debido a ello se han desarrollado principalmente dos sistemas de reciclaje del cofactor:

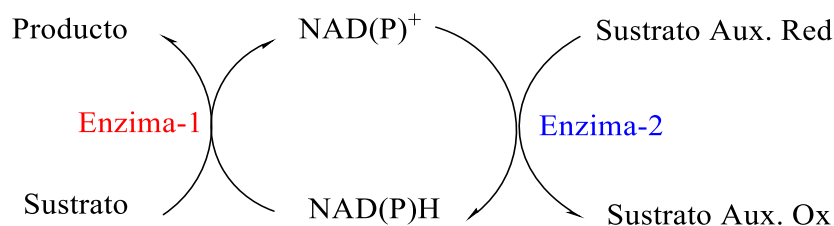
1. **Método del sustrato acoplado:** La regeneración del cofactor se lleva a cabo gracias a la reacción del cofactor reducido con un sustrato auxiliar catalizada por el enzima responsable de la transformación principal (Esquema 1). Este método está limitado fundamentalmente a las ADHs y aceptan fundamentalmente 2-propanol como sustrato auxiliar que se transforma en acetona, sencillamente eliminable del medio de reacción. El principal inconveniente que se encuentra en el uso de este sistema de regeneración es la pérdida de eficacia del enzima, debido a que su actividad debe dividirse en dos reacciones: la biotransformación deseada y la reacción asociada al reciclaje del cofactor.

¹⁸ En la casa comercial Sigma-Aldrich 1g de NADPH cuesta 693.00 € (Última consulta a su catálogo online 06/07/2018)



Esquema 1. Sistema de regeneración del cofactor basado en el sustrato acoplado.

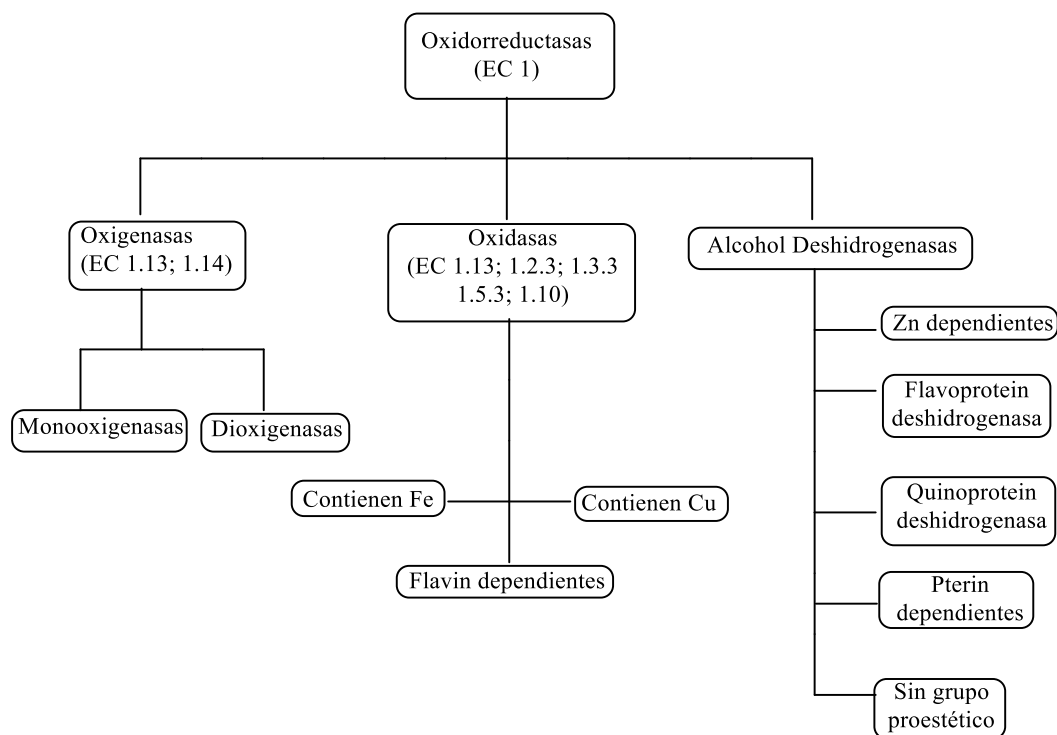
2. **Método del enzima acoplado:** La regeneración del cofactor se lleva a cabo gracias a la intervención de dos enzimas que catalizan dos reacciones redox paralelas (Esquema 2). El enzima-1 cataliza la reacción de conversión del sustrato en el producto deseado, mientras que el enzima-2 es responsable de la reacción de reciclaje del cofactor al oxidar un sustrato auxiliar.



Esquema 2. Sistema de regeneración del cofactor basado en el enzima acoplado.

1.2.1 Tipos de Oxidorreductasas

Como previamente se ha mencionado las enzimas de la familia de las oxidorreductasas se clasifican en tres grandes grupos: alcohol deshidrogenasas (ADHs), oxigenasas y oxidasas (Esquema 3).



Esquema 3. Clasificación simplificada de los distintos tipos de Oxidorreductasas.

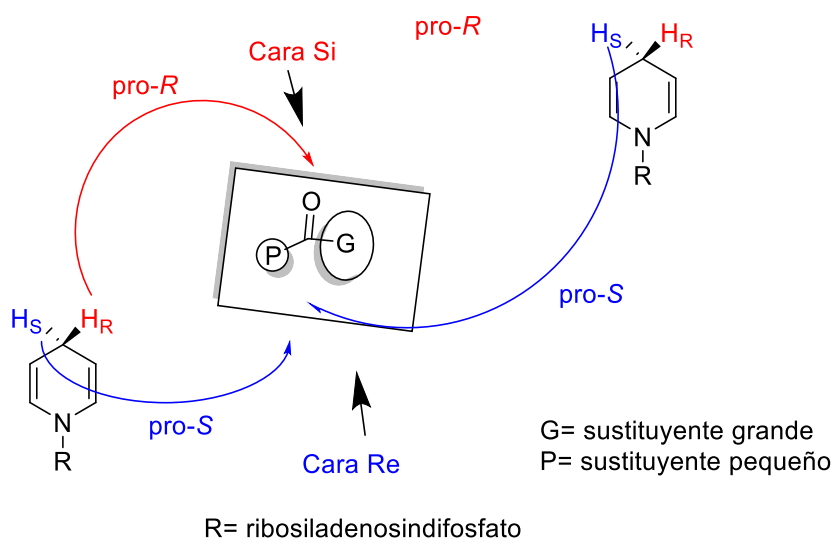
A continuación, se muestra un breve resumen de estos tres tipos de oxidorreductasas:

1.2.1.1 Alcohol deshidrogenasas (ADHs)

Este tipo de enzimas también son conocidas como cetoreductasas¹⁹ y son las más usadas de la familia de las oxidorreductasas. Catalizan la reacción reversible en la que un átomo de hidrógeno y dos electrones se transfieren del donador a la posición C-4 del cofactor, el NAD(P)⁺. La reacción inversa se basa en la transferencia de un átomo de hidrógeno y dos electrones desde la forma reducida del cofactor, el NAD(P)H, al grupo carbonilo, produciendo la reducción del sustrato.

¹⁹ F. Hollmann, K. Bühler, B. Bühler en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2012**, cap. 26.

La reducción de un grupo carbonilo catalizada por una ADH es un proceso enantioselectivo ya que el enzima es capaz de transferir un hidruro perteneciente a la forma reducida del cofactor, por una de las caras del enlace C=O proquiral (Esquema 4).



Esquema 4. Posibilidades estereoquímicas para la transferencia de hidruro en la reducción del carbonilo mediada por una alcohol-deshidrogenasa.

En base a estas posibilidades, en 1964, se estableció la llamada “regla de Prelog” la cual hace referencia a que, bajo un principio empírico, estos enzimas transfieren el hidruro por la cara *re* del carbonilo proquiral, generando preferentemente el alcohol de configuración *S* (siempre que el grupo de mayor tamaño unido al carbonilo presente también la prioridad siguiendo las reglas de nomenclatura de Cahn-Ingold-Prelog, CIP).²⁰

En base a esta regla ampliamente aceptada en el campo de la Biocatálisis, cuando el alcohol obtenido en un proceso biocatalítico en el cual se emplean ADHs de configuración *S*, se dice que la ADH sigue la “regla de Prelog”. En cambio, cuando la configuración absoluta del alcohol es *R* se dice que la ADH es “anti-Prelog”.

²⁰ V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **1964**, 9, 119-130.

Las ADHs que comúnmente se emplean en procedimientos sintéticos pertenecen fundamentalmente a dos familias, como son las ADHs de cadena media y las de cadena corta:

1. **ADHs de cadena media:** Poseen en su centro activo un ión Zn^{2+} tetracoordinado a dos residuos de cisteína y uno de histidina junto a una molécula de agua, la cual se sustituye por el ión alcóxido resultante de la reducción del grupo carbonilo y facilita la ruptura del enlace O-H del alcohol cuando es oxidado.²¹
2. **ADHs de cadena corta:** Este tipo de ADHs presenta un mecanismo de acción en el cual no intervienen metales, sin embargo, suelen estar presentes iones de Mg^{2+} que son capaces de estabilizar la estructura cuaternaria del enzima. Se ha demostrado que al privar al enzima de estos cationes Mg^{2+} se produce la inactivación de la misma, aunque la estructura cuaternaria del enzima se mantenga prácticamente inalterada.²² Este tipo de ADHs en lugar de emplear Zn^{2+} para activar el grupo carbonilo y favorecer la transferencia del hidruro utilizan un residuo de tirosina en forma ionizada.

El principal inconveniente de ambos tipos de deshidrogenasas es la necesidad de un cofactor de nicotinamida en el medio de reacción. Este cofactor es un agente de transferencia de electrones tanto en su forma reducida como oxidada (Figura 2).

²¹ P. A. Frey, A. D. Hegeman, *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Oxford University Press, Nueva York (USA), **2007**.

²² N. H. Schlieben, K. Niefind, J. Müller, B. Riebel, W. Hummel, D. Schomburg, *J. Mol. Biol.* **2005**, *349*, 801-813.

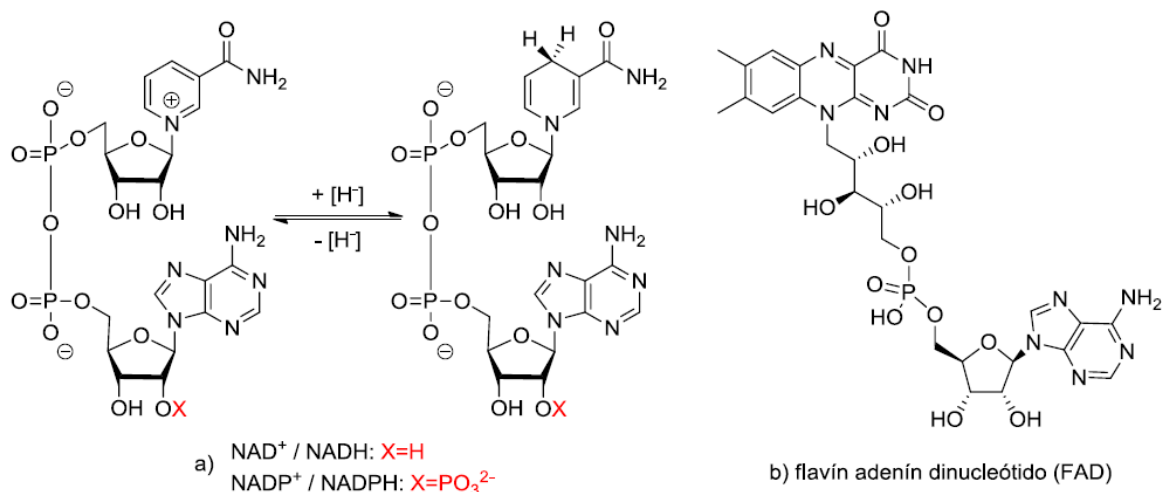


Figura 2. Estructura de alguno de los cofactores más empleados en procesos redox.

1.2.1.2 Oxigenasas

Este tipo de oxidorreductasas son tremendamente útiles en síntesis orgánica debido a que son capaces de catalizar gran número de reacciones como la hidroxilación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, epoxidación de alquenos y arenos, deshalogenaciones y reacciones de Baeyer-Villiger, con elevadas regio- y estereoselectividades.²³

Las oxigenasas utilizan el oxígeno molecular como fuente de oxígeno para realizar la inserción del mismo en compuestos orgánicos. Este tipo de oxidorreductasas se divide en monooxigenasas, si tras la incorporación de un átomo de oxígeno, el otro se convierte en agua en presencia de un donador de protones, siendo desprendida como subproducto de reacción, y en dioxigenasas, si se incorporan los dos átomos de una molécula de oxígeno (O_2) al sustrato.

El mecanismo de reacción de los monooxigenasas no es un mecanismo general ya que varía para cada subtipo de monooxigenasas, sin embargo, el modo de activación del

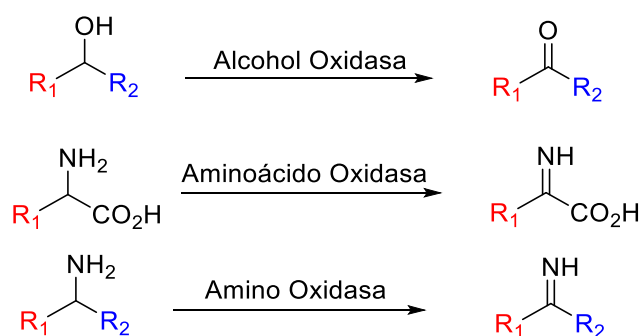
²³ (a) G. de Gonzalo, M. W. Fraaije, *ChemCatChem* **2013**, 5, 403-415; (b) G. de Gonzalo, M. D. Mihovilovic, M. W. Fraaije, *ChemBioChem* **2010**, 11, 2208-2231.

oxígeno es similar, necesitando un grupo prostético como agente reductor unido al enzima, que puede ser o un metal de transición como Fe o Cu, o un cofactor orgánico como pterinas o flavinas.

1.2.1.3 Oxidasas

Las oxidasas son un tipo de oxidorreductasas que se caracterizan por catalizar reacciones de oxidación usando oxígeno molecular como aceptor de electrones para ser reducido a peróxido de hidrógeno o agua, sin incorporar los átomos de oxígeno al sustrato. Este tipo de oxidorreductasas no requieren del uso de cofactores para su correcto funcionamiento por ello son muy interesantes desde el punto de vista sintético. Sin embargo, de forma general pueden aceptar un amplio número de metales o cofactores que funcionan como mediadores de transferencia de electrones desde el sustrato orgánico hasta el aceptor de electrones, es decir, el oxígeno molecular.

Comparadas con los otros dos tipos de oxidorreductasas, las oxidasas no son muy abundantes en la naturaleza.²⁴ La función general de las oxidasas es la oxidación de enlaces C-O y C-N, y se han clasificado en tres grandes grupos según el tipo de sustratos que son capaces de oxidar (Esquema 5):



Esquema 5. Clasificación de oxidasas en función de los sustratos en los que actúan.

²⁴ E. W. Hellemond, N. G. H. Leferink, D.P. H. M. Heuts, M. W. Fraaije, W. J. H. van Berkel, *Adv. Appl. Microbiol.* **2016**, *60*, 17-54.

De esta manera, las oxidasas se pueden dividir en aquellas que catalizan la oxidación de enlaces C-O (alcohol oxidasas), como por ejemplo las que actúan sobre alcoholes alifáticos, y en aquellas que son capaces de oxidar enlaces C-N (aminoácido o amino oxidasas). Dentro de este último subgrupo se encuentran tanto las aminoácido oxidasas, como por ejemplo las L- o las D-aminoácido oxidasas, como las monoamino oxidasas, que pueden dividirse a su vez en aquellas que son dependientes de Cu, las peroxidasas, las tirosinasas y las lacasas.

En este *Trabajo Fin de Máster* han sido empleadas las lacasas, por ello, a continuación, se ofrece al lector un resumen un poco más detallado acerca de este tipo de oxigenasas.

1.2.1.3.1 Lacasas

Las lacasas son consideradas un tipo de amino oxidasas dependientes de Cu (CAOs) y son capaces de llevar a cabo la reacción de oxidación de aminas y alcoholes gracias a la reducción de oxígeno molecular a agua. Se trata de glicoproteínas presentes en la naturaleza en plantas y hongos²⁵ aunque entorno al año 2000 han sido encontradas también en células procariotas.²⁶ Su función natural es diferente según el organismo en el que se encuentren, pero en todos ellos catalizan procesos de polimerización y despolimerización.

Son un tipo de oxidasas no dependientes de la flavina y que llevan a cabo reacciones de oxidación monoelectrónicas de sustratos activados, por lo general fenoles y aminas. Su principal aplicación industrial hasta el momento se centra en la industria textil y papelera.²⁷ La industria textil genera grandes volúmenes de aguas residuales, por

²⁵ K. J. Kramer, M. R. Kanost, T. L. Hopkins, H. Jiang, Y. C. Zhu, R. Xu, J. L. Kerwin, F. Turecek, *Tetrahedron* **2001**, 57, 385-392.

²⁶ H. Claus, *Arch. Microbiol.* **2003**, 179, 145-140.

²⁷ A. K. Siartz, J. D. Mikkelsen, A. S. Meyer, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2016**, 36, 70-86.

ello, las lacasas son capaces de catalizar la destrucción de tintes y otras sustancias contaminantes. En cuanto a la industria papelera, las lacasas se emplean para realizar la separación y degradación de la lignina presente en la madera.

En cuanto a las condiciones de reacción, es muy conocido que las lacasas funcionan con alta eficacia en medios acuosos, sin embargo, la baja solubilidad de muchos compuestos orgánicos en agua hace que sea necesario emplear un cosolvente orgánico miscible con el agua. Es necesario destacar que, mientras un gran número de biocatalizadores han conseguido ser inmovilizados con éxito en soportes sólidos, las lacasas inmovilizadas descritas hasta la actualidad muestran menores actividades, por ello, en este *Trabajo Fin de Máster*, se ha utilizado la lacasa comercial procedente del hongo *Trametes versicolor*.

El mecanismo redox tiene lugar gracias a la presencia de un clúster de cuatro átomos de Cu situado en el centro activo del enzima, los cuales hacen que las lacasas tengan un color azul característico, debido a la intensa absorción electrónica de los enlaces Cu-Cu (Figura 3). El clúster formado por los cuatro átomos de Cu se divide en tres regiones, la primera de ellas, T1, les confiere el color azul característico a estas enzimas y es donde tiene lugar la oxidación del sustrato. Las otras dos regiones, T2 y T3, son las responsables de la reducción del oxígeno molecular y de la liberación de agua.

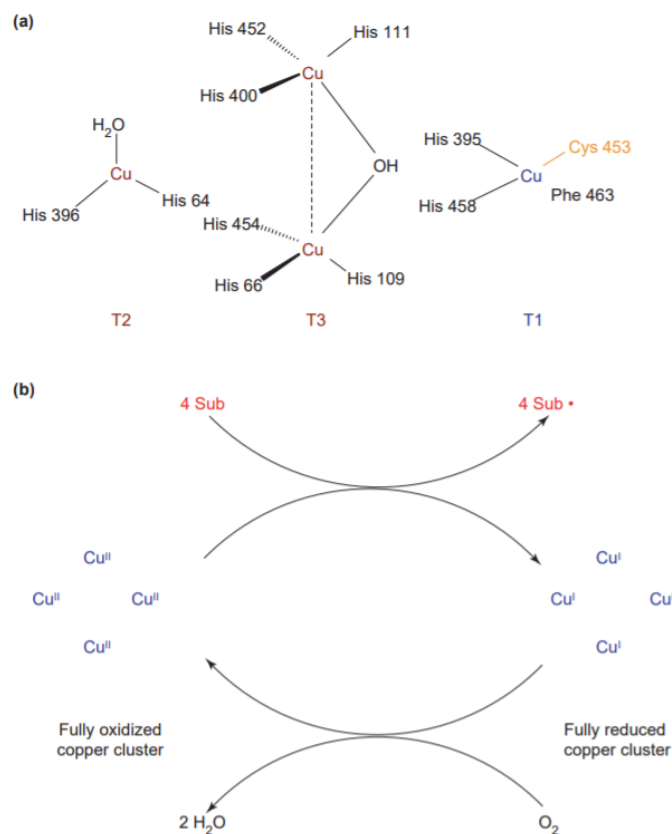


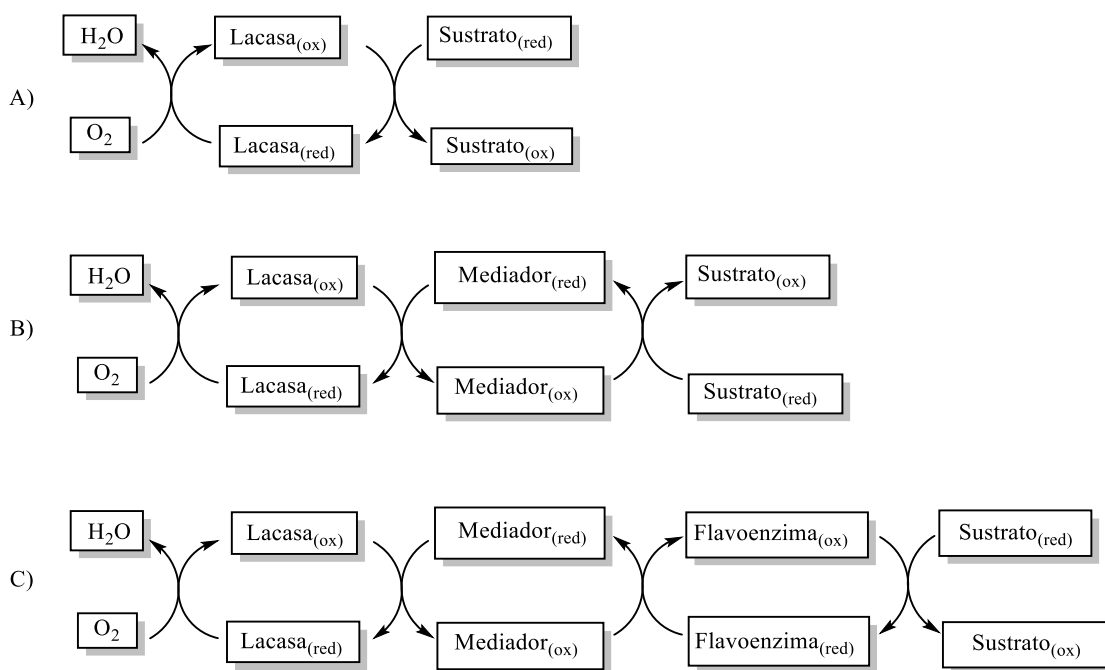
Figura 3. Estructura del centro activo y del ciclo catalítico de una lacasa: a) Modelo para el clúster catalítico de la lacasa *Trametes versicolor* formado por cuatro átomos de Cu; b) Representación esquemática del ciclo catalítico de una lacasa. Sub: sustrato, Sub•: radical del sustrato oxidado.²⁸

En el ciclo catalítico de estas enzimas (Figura 3b)²⁹ se generan dos moléculas de agua por cada molécula de oxígeno reducida, seguida de la simultánea oxidación de cuatro moléculas de sustrato a los correspondientes radicales. Estos intermedios radicalarios pueden combinarse para producir dímeros o polímeros, en el caso de que lo hagan de manera descontrolada.

A continuación, se muestran varios mecanismos propuestos para explicar la oxidación de sustratos empleando lacasas:

²⁸ S. Riva, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 219-226.

²⁹ H. Claus, *Micron* **2004**, *34*, 93-96.



Esquema 6. Representación de los ciclos catalíticos de las lacasas.²⁸

Como se puede observar en el Esquema 6 existen tres ciclos catalíticos para este tipo de enzimas redox. El esquema 6A muestra el ejemplo más simple en el cual el sustrato, generalmente fenoles al ser sustancias activadas, es directamente oxidado para generar el radical correspondiente mediante la acción directa del clúster de cuatro átomos de Cu. Sin embargo, lo más habitual es que el sustrato empleado no sea apto para ser oxidado directamente por el enzima, debido fundamentalmente a que sustratos grandes no son capaces de difundir hasta el centro activo de la lacasa, región donde tiene lugar la oxidación, o que presenten un potencial redox demasiado alto para poder llevar a cabo la reacción redox.³⁰ Este problema en su origen ha supuesto una limitación para el uso de este tipo de enzimas en procesos sintéticos ya que la cantidad de sustratos que podían ser oxidados por acción de las lacasas era muy reducido. Sin embargo, esta limitación logró superarse mediante el uso de un “mediador químico” (*laccase-mediator-systems*), que son

³⁰ (a) S. Witayakran, A. J. Ragauskas, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 1187-1209; (b) M. Mogharabi, M. A. Faramarzi, *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356*, 897-927.

sustancias capaces de actuar como sustratos para la lacasa, siendo oxidados y generando los radicales correspondientes que posteriormente interactuaran con el sustrato de interés para oxidarlo (Esquema 6B). Es muy conocido que los sustratos naturales de estas enzimas son alcoholes de naturaleza fenólica, que presentan un potencial redox comprendido en el intervalo 0.5-1.0 V, de manera que se han empleado mediadores análogos a esta estructura para conseguir la oxidación de sustratos de una gran variedad estructural y que presenten potenciales redox elevados.

Mención aparte tienen los sistemas acoplados con lacasas, como se muestra en el Esquema 6C. Haltrich y colaboradores idearon este procedimiento, en el cual, el mediador oxida el cofactor flavina de una deshidrogenasa en un sistema enzimático acoplado para la regeneración *in situ* del FAD, y que es el encargado de realizar el proceso de oxidación deseado.³¹

Un mediador redox eficaz debe cumplir los siguientes requisitos:³²

- Ser un buen sustrato para la lacasa.
- Generar radicales estables, con una vida media larga para que sea posible su difusión hacia el sustrato.
- Presentar un elevado potencial redox para ser capaces de producir la oxidación del sustrato.
- Ser accesible comercialmente y a bajo precio.

El primer mediador fue descrito en el año 1990, y se trató del ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolidina)-6-sulfónico, comúnmente conocido como ABTS. Se ha podido comprobar que los mediadores más efectivos para la oxidación de la lignina son

³¹ (a) R. Ludwig, M. Ozga, M. Zamocky, C. Peterbauer, K. D. Kulbe, D. Haltrich, *Biocatal. Biotransform.* **2004**, 22, 97-104; (b) S. Aksu, I. W. C. E. Arends, F. Hollmann, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, 351, 1211- 1216.

³² P. Giardina, V. Faraco, C. Pezzella, A. Piscitelli, S. Vanhulle, G. Sannia, *Cell. Mol. Life Sci.* **2010**, 67, 369-385.

aquellos que presentan una estructura heterocíclica con grupos N-OH. A continuación, en la Figura 4, se muestra la estructura de varios mediadores muy utilizados en la actualidad, siendo en este *Trabajo Fin de Máster* el 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo, comúnmente conocido como TEMPO (f) aquel que se ha empleado como mediador:

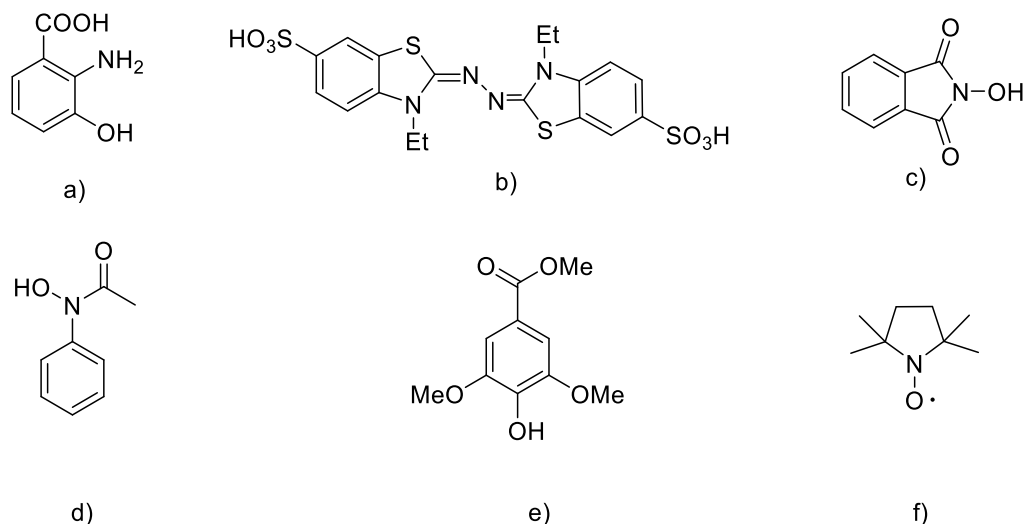


Figura 4. Estructura de alguno de los mediadores más empleados en la actualidad: a) ácido 3-hidroxiantranílico (HAA); b) 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolidina)-6-sulfónico (ABTS); c) N-hidroxifltalimida; d) N-hidroxiacetanilida (NHA); e) éster metílico del ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico (ácido siríngico); f) 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo (TEMPO).

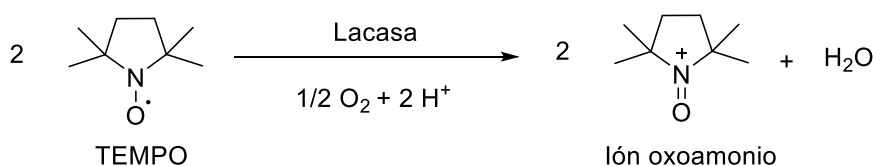
Gracias al uso de estos mediadores químicos se ha logrado realizar la oxidación de una gran variedad de sustratos como pueden ser los alcoholes bencílicos, alílicos, propargílicos y alifáticos a sus correspondientes aldehídos y cetonas, así como de aminas alílicas y alifáticas para generar las correspondientes iminas.

Como ya se ha comentado previamente, el mediador empleado en este *Trabajo Fin de Máster* ha sido el TEMPO, ya que es el mediador químico más efectivo para llevar a cabo este tipo de transformaciones.³³ El mecanismo propuesto para la oxidación de distintos sustratos mediante el sistema lacasa/TEMPO presenta una naturaleza iónica, y

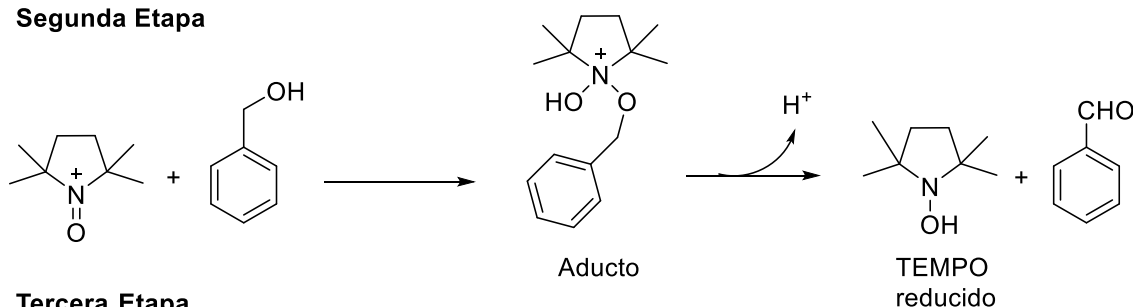
³³ H. P. Call, H. P. I. Mucke, *J. Biotechnol.* **1997**, 53, 163-202.

se ha representado en el Esquema 7 para la reacción de oxidación del alcohol bencílico a benzaldehído. Así, se puede observar que la verdadera especie oxidante es el ion oxoamonio, el cual es generado a partir del TEMPO mediante la oxidación enzimática catalizada por la lacasa.³⁴ A partir de esta oxidación inicial, se produce un ataque nucleófilo del par de electrones libre del alcohol al ion oxoamonio formando un aducto. La desprotonación del mismo en la posición α al enlace bencílico, ya sea intramolecularmente, gracias al N-O, o intermolecularmente gracias a la asistencia de una base, genera el benzaldehído de interés y la forma reducida del TEMPO. Para completar el proceso catalítico, el TEMPO reducido sufre una comproporción con el ion oxoamonio, regenerando el TEMPO.

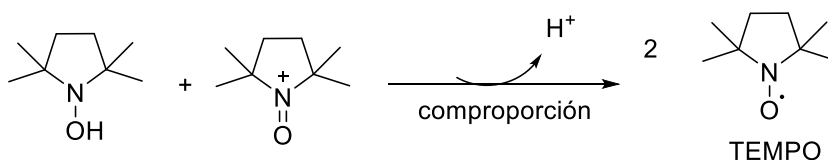
Primera Etapa



Segunda Etapa



Tercera Etapa



Esquema 7. Mecanismo de oxidación del alcohol bencílico empleando el sistema Lacasa/TEMPO.

³⁴ S. A. Tromp, I. Matijosytè, R. A. Sheldon, I. W. C. E. Arends, G. Mul, M. T. Kreutzer, J. A. Moulijn, S. de Vries, *ChemCatChem* **2010**, 2, 827-833.

Antecedentes

Los alcoholes propargílicos constituyen una familia de compuestos muy útiles en síntesis orgánica, de manera que en la bibliografía se han descrito ampliamente sus posibilidades como precursores sintéticos de diversos compuestos de interés como agentes con actividad antitumoral y nucleósidos,³⁵ heterociclos³⁶ o compuestos de naturaleza aromática,³⁷ entre otros. Es por ello, que en esta sección se abordarán ejemplos recientes sobre procesos redox que involucran la oxidación de alcoholes propargílicos y la reducción de cetonas propargílicas empleando métodos enzimáticos y no enzimáticos.

2.1 Oxidación de alcoholes propargílicos

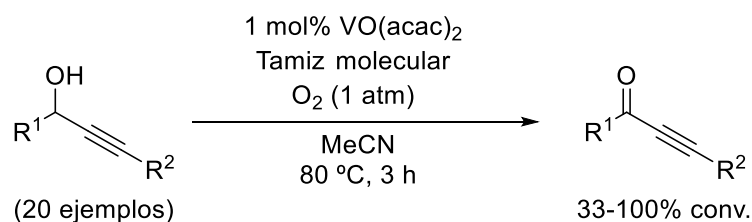
La oxidación de alcoholes propargílicos es un proceso sensible debido a que algunos de los agentes oxidantes convencionales empleados en síntesis orgánica pueden reaccionar con el triple enlace, por lo que es necesario el uso de metodologías sostenibles y condiciones suaves de reacción para llevar a cabo este proceso. A continuación, se describen una serie de ejemplos descritos en los últimos años en la bibliografía que emplean muy diversos catalizadores metálicos para llevar a cabo con éxito el desarrollo de metodologías oxidativas de alcoholes propargílicos. Así, Uemura y colaboradores han descrito la aplicación de complejos de oxovanadio en presencia de tamiz molecular de 3 Å y oxígeno molecular para la oxidación de alcoholes propargílicos con muy diversos sustituyentes ya fueran alifáticos o aromáticos (Esquema 8).³⁸ Esta metodología ofrece buenos resultados, con una carga de catalizador relativamente baja, para la oxidación de alcoholes propargílicos de naturaleza aromática, sin embargo, las conversiones son menores cuando los alcoholes son alifáticos.

³⁵ (a) N. G. Kundu, J. S. Mahanty, C. P. Spears, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1497-1502; (b) R. M. Adlington, J. E. Baldwin, G. J. Pritchard, K. C. Spencer, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 575-578.

³⁶ J.-C. Tseng, J.-H. Chen, T.-Y. Luh, *Synlett* **2006**, 1209-1212.

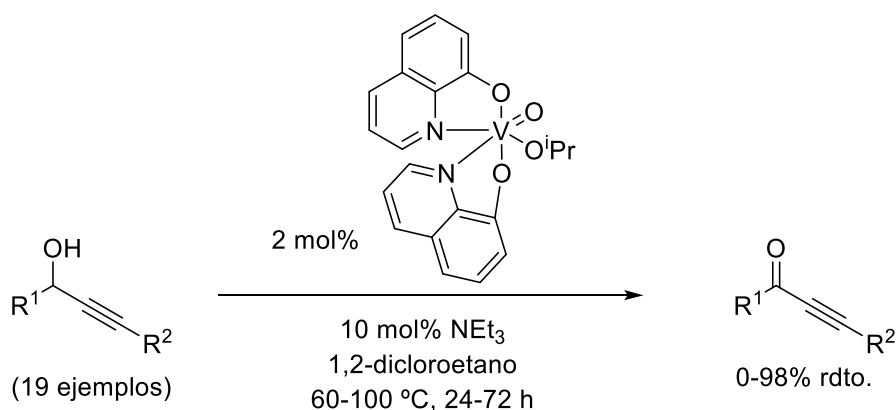
³⁷ X. Zhang, S. Sarkar, R. C. Larock, *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 236-243.

³⁸ Y. Maeda, N. Kakiuchi, S. Matsumura, T. Nishimura, T. Kawamura, S. Uemura, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6718-6724.



Esquema 8. Oxidación de alcoholes propargílicos con un complejo de oxovanadio.

Hanson y colaboradores han descrito el uso del 8-quinolinato de vanadio, pero en este caso en presencia simplemente de aire como oxidante, para la oxidación de este tipo de alcoholes (Esquema 9).³⁹ Sin embargo, esta metodología no ofrece buenos resultados para alcoholes con sustituyentes tipo arilo en la posición α .

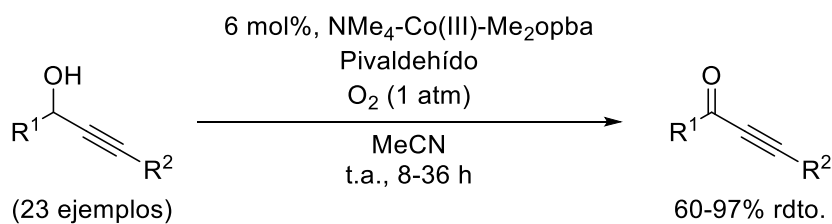


Esquema 9. Oxidación de alcoholes propargílicos en presencia de complejos de vanadio y aire como agente oxidante.

Pedro y colaboradores han descrito alternativamente una metodología general para la oxidación de alcoholes propargílicos empleando complejos de Co(III) en presencia de pivaldehído y O₂ (Esquema 10).⁴⁰

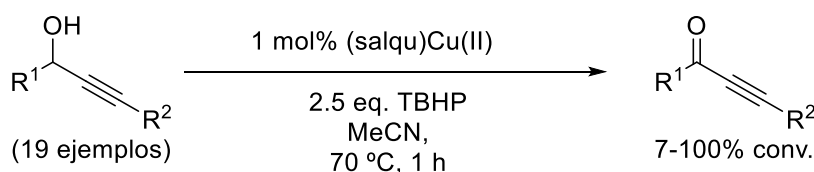
³⁹ S. K. Hanson, R. Wu, L. A. P. Silks, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1908-1911.

⁴⁰ G. Blay, L. Cardona, I. Fernández, J. R. Pedro, *Synthesis* **2007**, 3329-3332.



Esquema 10. Oxidación de alcoholes propargílicos con un complejo de cobalto.

Métodos oxidativos más recientes se basan en el empleo de complejos de cobre, así Weerasiri y Gorden han descrito el uso de complejos de Cu(II) con bajos niveles de carga (1 mol%) y en tiempos cortos de reacción (Esquema 11),⁴¹ sin embargo, la presencia de hidroperóxido de *tert*-butilo (TBHP) hace esta metodología bastante insegura, sobre todo si se pretende reproducir a escala industrial.

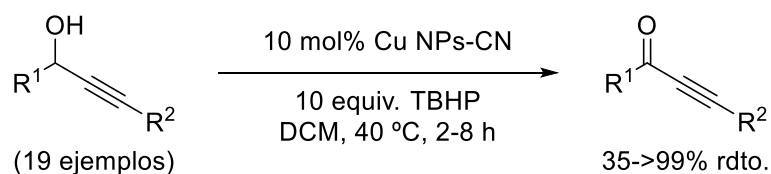


Esquema 11. Oxidación de alcoholes propargílicos mediada por complejos de cobre.

Yao y colaboradores han descrito el uso de nanopartículas de Cu soportadas sobre nitruros de carbono junto con TBHP para la oxidación de alcoholes propargílicos (Esquema 12),⁴² obteniendo buenos resultados para la oxidación de alcoholes en los que el triple enlace se encuentra en una posición interna, sin embargo, no se ha explorado la posibilidad de oxidar sustratos con triples enlaces en posición terminal. Satisfactoriamente, se ha descrito la reutilización de las nanopartículas de cobre en un ejemplo que tras 2 horas de reacción conduce a un proceso de oxidación eficiente con ligera pérdida de la actividad catalítica (92-99%).

⁴¹ K. C. Weerasiri, A. E. V. Gorden, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 1546-1550.

⁴² W. Lv, J. Tian, N. Deng, Y. Wang, X. Zhu, X. Yao, *Tetrahedron Lett.* **2015**, 56, 1312-1316.



Esquema 12. Oxidación de alcoholes propargílicos catalizada por nanopartículas de Cu.

2.2 Oxidación (enzimática) de alcoholes activados y aplicación en procesos secuenciales.

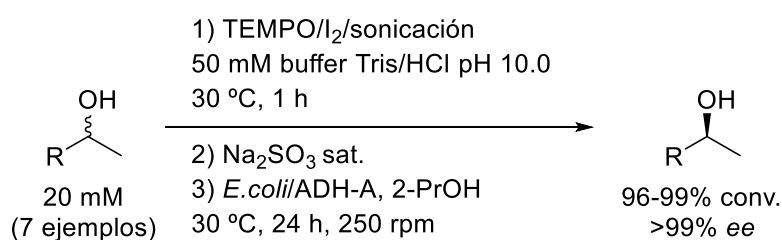
Hasta la fecha no se han descrito ejemplos sobre la oxidación enzimática de alcoholes propargílicos, sin embargo, sí que son muy conocidos los procesos de oxidación de sustratos activados, como por ejemplo alcoholes bencílicos y alílicos empleando el sistema lacasa/TEMPO. Es por ello, que a continuación, se describen brevemente algunos de los ejemplos más recientes en la oxidación de este tipo de sustratos desarrollados en nuestro grupo de investigación, y que han servido como inspiración para llevar a cabo el estudio de la oxidación de alcoholes propargílicos.

Pensando, en el objetivo final del trabajo como es la desracemización de alcoholes secundarios, este apartado se ha concebido no solo para resumir posibles estrategias para la oxidación de alcoholes activados, sino que a su vez incluye ejemplos en los que ha sido posible acoplar un segundo proceso enzimático con el fin de desarrollar procesos secuenciales que permitan acceder a productos ópticamente activos, a través de un proceso de oxidación no selectivo y un proceso enzimático que permita generar quiralidad en el producto final.

En 2015, nuestro grupo de investigación describió el uso de un sistema catalítico formado por yodo molecular (I_2), TEMPO y una ADH selectiva para la desracemización de 5 alcoholes secundarios bencílicos y 2 alifáticos (R = ciclohexilo y hexilo, Esquema 13).⁴³

⁴³ D. Méndez-Sánchez, J. Mangas-Sánchez, I. Lavandera, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *ChemCatChem*, **2015**, 7, 4016-4020.

Después de una exhaustiva optimización del proceso de oxidación, el yodo molecular en exceso es destruido por tratamiento con una disolución acuosa de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ transformándolo en yoduros inocuos y solubles en agua, compatibles con la ADH de *Rhodococcus ruber* (ADH-A). Está permitido acceder a los (*S*)-alcoholes con excelentes rendimientos. Alternativamente el uso de enzimas reductoras como la ADH de *Lactobacillus brevis* (LB-ADH) o la comercial evo-1.1.200 fueron compatibles con el sistema diseñado, permitiendo acceder en estos casos a los (*R*)-alcoholes con destacables conversiones entre el 91 y el 99%.

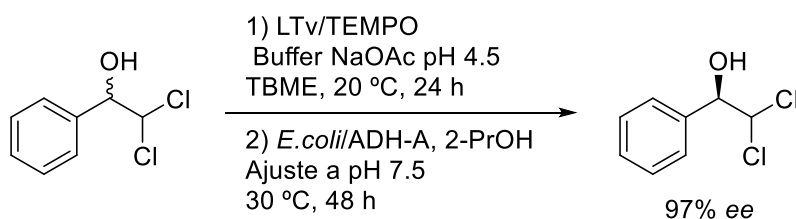


Esquema 13. Desracemización de alcoholes secundarios empleando el sistema I_2 /TEMPO y una ADH selectiva.

El empleo de dos sistemas enzimáticos actuando de manera concurrente ha adquirido gran atención en años recientes,⁴⁴ quedando ejemplificado en la desracemización de 2,2-dicloro-1-feniletan-1-ol mediante un proceso de oxidación enzimática catalizado por el sistema lacasa de *Trametes versicolor* (LTv)-TEMPO y una posterior bio-reducción mediada por la ADH-A que permitió obtener el correspondiente (*R*)-alcohol con una conversión cuantitativa y un 97% ee (Esquema 14).⁴⁵

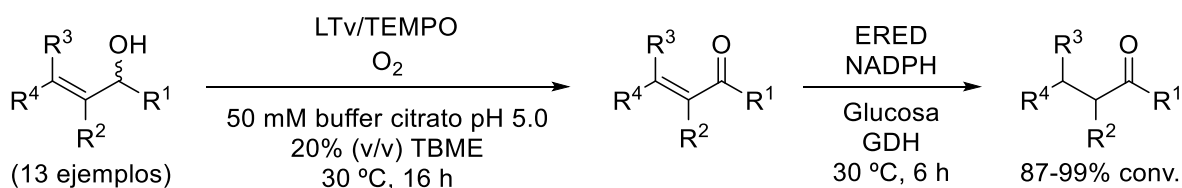
⁴⁴ J. H. Schrittwieser, S. Velikogne, M. Hall, W. Kroutil, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 270-348.

⁴⁵ K. Kędziora, A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Green Chem.* **2014**, *16*, 2448-2453.



Esquema 14. Desracemización de 2,2-dicloro-1-feniletan-1-ol empleando el sistema lacasa/TEMPO y una ADH selectiva.

Más recientemente nuestro grupo de investigación ha extendido el potencial de las lacasas a la oxidación de alcoholes alílicos secundarios empleando el sistema catalítico lacasa de *Trametes versicolor*/TEMPO (Esquema 15),⁴⁶ que además ha sido acoplado con éxito a una bio-reducción catalizada por una eno-reductasa (ERED), dando lugar a un proceso global de isomerización redox de alcoholes alílicos.



Esquema 15. Oxidación quimioenzimática de alcoholes secundarios alílicos y aplicación en un proceso secuencial para su isomerización redox.

2.3 Reducción estereoselectiva de propargil cetonas

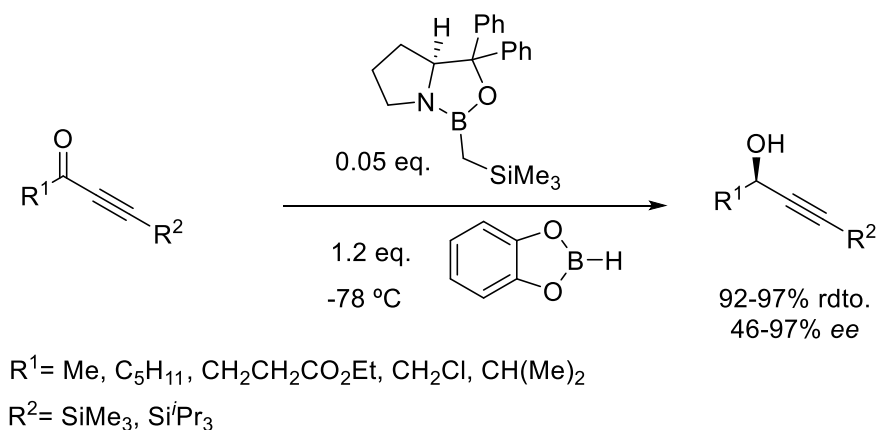
En la bibliografía se han descrito diversos ejemplos sobre la reducción de estos compuestos, pudiendo llevarse a cabo ya sea mediante métodos enzimáticos o no enzimáticos.

En cuanto a los métodos químicos puede destacarse la aproximación descrita por Corey y colaboradores para la reducción asimétrica de propargilcetonas empleando por primera vez cantidades catalíticas de una oxazaborolidina (Esquema 16).⁴⁷ Esta metodología permite alcanzar conversiones cuantitativas, además de elevados excesos enantioméricos para gran

⁴⁶ L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *ACS Catal.* **2018**, *8*, 2413-2419.

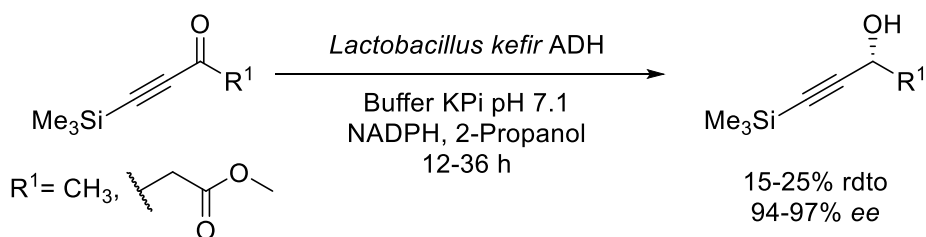
⁴⁷ C. J. Helal, P. A. Magriotis, E. J. Corey, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10938-10939.

variedad de sustratos. Sin embargo, en todos los casos solo se han considerado el uso de cadenas alifáticas en la posición α al carbonilo, no mostrando ningún ejemplo de triples enlaces terminales.



Esquema 16. Reducción asimétrica de propargilcetonas empleando una oxazaborolidina.

En cuanto a la reducción enzimática de este tipo de compuestos, uno de los trabajos pioneros fue el propuesto por Wong y colaboradores,⁴⁸ en que se emplea la ADH de *Lactobacillus kefir* (LK-ADH) para obtener alcoholes propargílicos con buen exceso enantiomérico pero bajas conversiones (Esquema 17).

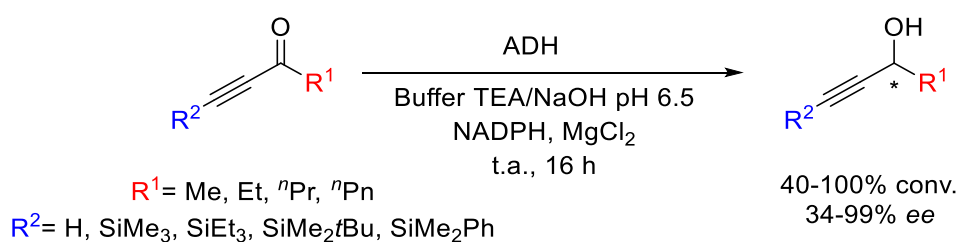


Esquema 17. Reducción de una propargilcetona empleando la ADH *Lactobacillus kefir*.

Años más tarde, Müller y colaboradores extendieron este estudio a propargilcetonas alifáticas estructuralmente similares a las de Corey, empleando dos ADHs de distinta preferencia, la *Lactobacillus brevis* (LBADH) y la *Candida parapsilosis* carbonil reductasa

⁴⁸ C. W. Bradshaw, W. Hummel, C.-H. Wong, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1532-1536.

(CPCR).⁴⁹ En general, los alcoholes propargílicos fueron obtenidos con altos excesos enantioméricos y conversiones cuantitativas (Esquema 18).



Esquema 18. Reducción estereoselectiva de propargilcetonas con ADHs.

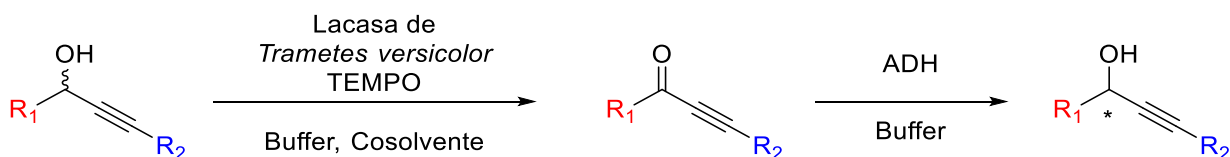
Como puede verse en esta sección de este *Trabajo Fin de Máster* existen diversas alternativas descritas para la oxidación de alcoholes propargílicos, así como la reducción asimétrica de propargilcetonas ya sea vía química o enzimática, sin embargo, no hay ejemplos descritos para llevar a cabo la desracemización de alcoholes propargílicos mediante un proceso secuencial que implique la actuación de dos tipos de biocatalizadores, el cual será el objetivo final de nuestro trabajo después de optimizar ambos procesos individuales por separado.

⁴⁹ T. Schubert, W. Hummel, M.-R. Kula, M. Müller, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 4181-4187.

Objetivos

Este *Trabajo Fin de Máster* ha sido planteado como continuación de la investigación que se desarrolla en el grupo de Química Bioorgánica de la Universidad de Oviedo en el desarrollo de procesos quimioenzimáticos redox, así como la posibilidad de diseñar procesos de manera concurrente. Por ello, los objetivos que nos hemos planteado en este Trabajo Fin de Master se representan en el Esquema 19 y son:

- Diseñar un método de síntesis general para la preparación de alcoholes y cetonas propargílicas que puedan ser empleados como sustratos adecuados en procesos de oxidación y reducción enzimática respectivamente.
- Estudiar el comportamiento de la lacasa de *Trametes versicolor* en combinación con el agente radicalario TEMPO, con el fin de obtener cetonas propargílicas en condiciones suaves de reacción y medio acuoso.
- Hacer un screening de alcohol deshidrogenasas y optimizar las condiciones de los procesos de bioreducción de cetonas propargílicas con el fin de desarrollar métodos de reducción asimétricos en medio acuoso, los cuales permitan obtener ambos enantiómeros de los correspondientes alcoholes.
- Evaluar la posibilidad de realizar un proceso secuencial para la desracemización de alcoholes propargílicos basado en la compatibilidad de las condiciones de reacción de los procesos de oxidación no selectiva y bioreducción asimétrica.



Esquema 19. *Objetivo de este Trabajo Fin de Máster.*

Resultados y discusión

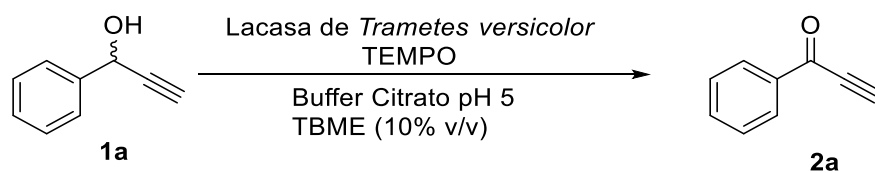
Como se ha comentado en los objetivos, en este *Trabajo Fin de Máster* se planea llevar a cabo un estudio sintético para la preparación de alcoholes propargílicos ópticamente activos. Así, se llevará a cabo la síntesis de una serie de alcoholes propargílicos, estudiando posteriormente su oxidación empleando bien métodos no enzimáticos o enzimáticos, para finalmente llevar a cabo la bio-reducción asimétrica de las cetonas intermedias obtenidas. En el caso de que ambos procesos pudieran ser ejecutados individualmente con buenas conversiones y selectividades, se estudiaría la posibilidad de desarrollar un proceso quimioenzimático de desracemización de alcoholes.

4.1 1-Fenilprop-2-in-1-ol y derivados: Síntesis y oxidación quimioenzimática frente a oxidación química

Para evaluar la oxidación química y quimioenzimática de alcoholes propargílicos se decidió comenzar esta investigación seleccionando como sustrato modelo el 1-fenilprop-2-in-1-ol (**1a**), debido a que se trata de un compuesto comercial y económico, para posteriormente extender el estudio de su oxidación a distintos alcoholes propargílicos, los cuales deberán ser sintetizados previamente.

4.1.1 Oxidación del 1-fenil-2-propin-1-ol (1a)

Debido a la experiencia de nuestro grupo de investigación en el desarrollo de procesos oxidativos con sustratos bencílicos⁴⁵ y alílicos⁴⁶ empleando el sistema catalítico formado por la lacasa de *Trametes versicolor* (LTv) y el TEMPO, se decidió estudiar la viabilidad de la oxidación quimioenzimática del alcohol propargílico **1a** en condiciones standard (Tabla 2), esto es, a una concentración de sustrato 50 mM, un 30 mol% de TEMPO, a 30 °C en una buffer de citrato pH 5 y usando un 10% de TBME como cosolvente para favorecer la solubilidad del producto de partida. De esta forma se alcanzó una conversión del 91% (entrada 1).

Tabla 2. Oxidación quimioenzimática del alcohol **1a** empleando el sistema LTv/TEMPO.

Entrada	[1a] (mM)	TEMPO (mol%)	T (°C)	t (h)	c (%) ^a
1	50	30	30	16	91
2	50	40	30	16	80
3	50	30	37	16	75
4	25	30	30	16	>99
5	50	30	30	48	>99

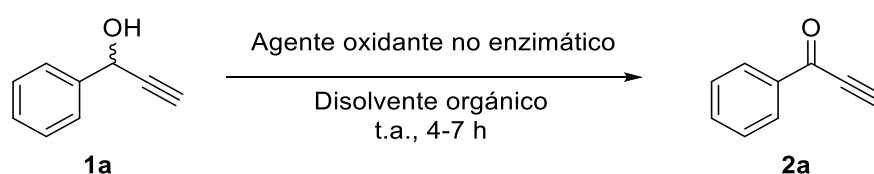
^a Conversión medida por cromatografía de gases.

Con el fin de optimizar las condiciones de reacción, se han evaluado distintos parámetros como la concentración de sustrato **1a**, la proporción de TEMPO, la temperatura y el tiempo de reacción. Así, un aumento en la concentración del agente radicalario no supuso una mejora de los resultados sino más bien una cierta inhibición de la actividad de la lacasa (80%, entrada 2). El aumento de la temperatura a 37 °C se tradujo también en un descenso de la conversión, posiblemente debido a la baja termoestabilidad de la enzima (75%, entrada 3). Sin embargo, al llevar a cabo la reacción a la mitad de concentración de sustrato (25 mM) se obtuvo en 16 horas una conversión cuantitativa (entrada 4), la cual se pudo alcanzar también si a una concentración de 50 mM de sustrato se prolongaba el tiempo de reacción hasta las 48 h (entrada 5). De ello, se pudo concluir y basándonos en el corto tiempo de reacción necesario para obtener una conversión cuantitativa, que las condiciones óptimas encontradas se recogen en la entrada 4 de la Tabla 2, es decir, cuando la reacción se lleva a cabo en una buffer citrato de pH 5.0, a 30 °C, durante 16 horas, con una carga de TEMPO del 30 mol% y una concentración de 25 mM del compuesto **1a**. Estos resultados ponen de manifiesto que el empleo del sistema catalítico lacasa/TEMPO supone una opción muy atractiva a la hora de llevar a cabo

la oxidación de alcoholes propargílicos debido a que se trata de un procedimiento catalítico y se logran obtener conversiones cuantitativas en la oxidación del sustrato **1a**.

Con el fin de evaluar los resultados obtenidos en el proceso quimioenzimático de oxidación del alcohol **1a**, se llevaron a cabo 3 ensayos con distintos agentes oxidantes químicos convencionales como se detalla en la Tabla 3. Estos implican el uso del dióxido de manganeso (MnO_2 , entrada 1), reactivo de Jones (entrada 2) y Dess-Martin (entrada 3).

Tabla 3. Oxidación del 1-fenilprop-2-in-1-ol (**1a**) mediante métodos no enzimáticos.



Entrada	Agente oxidante	Condiciones de reacción	Rendimiento (%) ^a
1	MnO_2	CH_2Cl_2 , 6 h	19
2	Reactivo de Jones	Acetona, 7 h	35
3	Dess-Martin	CH_2Cl_2 , 4 h	80

^a Rendimiento aislado tras columna cromatográfica

Empleando el MnO_2 como agente oxidante se alcanzó únicamente un rendimiento del 19% (entrada 1). Este bajo rendimiento es debido a la formación de múltiples subproductos que se han observado al seguir la reacción mediante TLC. Aunque estos no han sido caracterizados, la formación de muchos de estos subproductos puede ser debida a la reactividad del triple enlace presente en la molécula. En el caso del empleo de un reactivo de Cr(VI) como el de Jones (entrada 2), tras siete horas de reacción, tan solo se obtuvo un rendimiento del 35%. Al igual que en el caso anterior, también se observaron múltiples subproductos al seguir la reacción mediante TLC. Por último, el reactivo de yodo popularmente conocido como reactivo de Dess-Martin, condujo a la cetona **2a** tras cuatro horas de reacción con un rendimiento del 80% tras purificación mediante columna cromatográfica (entrada 3).

Estos resultados ponen de manifiesto la gran sensibilidad que presentan los alcoholes propargílicos para su oxidación, presentándose la oxidación quimioenzimática y la que emplea el reactivo de Dess-Martin, como estrategias adecuadas para obtener cetonas propargílicas. Debido a la posibilidad de trabajar en sistema acuoso que lo haría compatible con el sistema de bio-reducción se prestará especial atención a partir de ahora, al procedimiento quimioenzimático mediado por la lacasa para extender la metodología hacia la oxidación de otros alcoholes propargílicos.

4.1.2 Síntesis de los alcoholes propargílicos no comerciales 1b-n

A continuación, se decidió extender este proceso oxidativo a una gran variedad de alcoholes propargílicos e intentar demostrar así, la versatilidad del sistema lacasa/TEMPO. Los sustratos elegidos para este estudio han tratado de ser lo más diversos posibles y se muestran a continuación en la Figura 5.

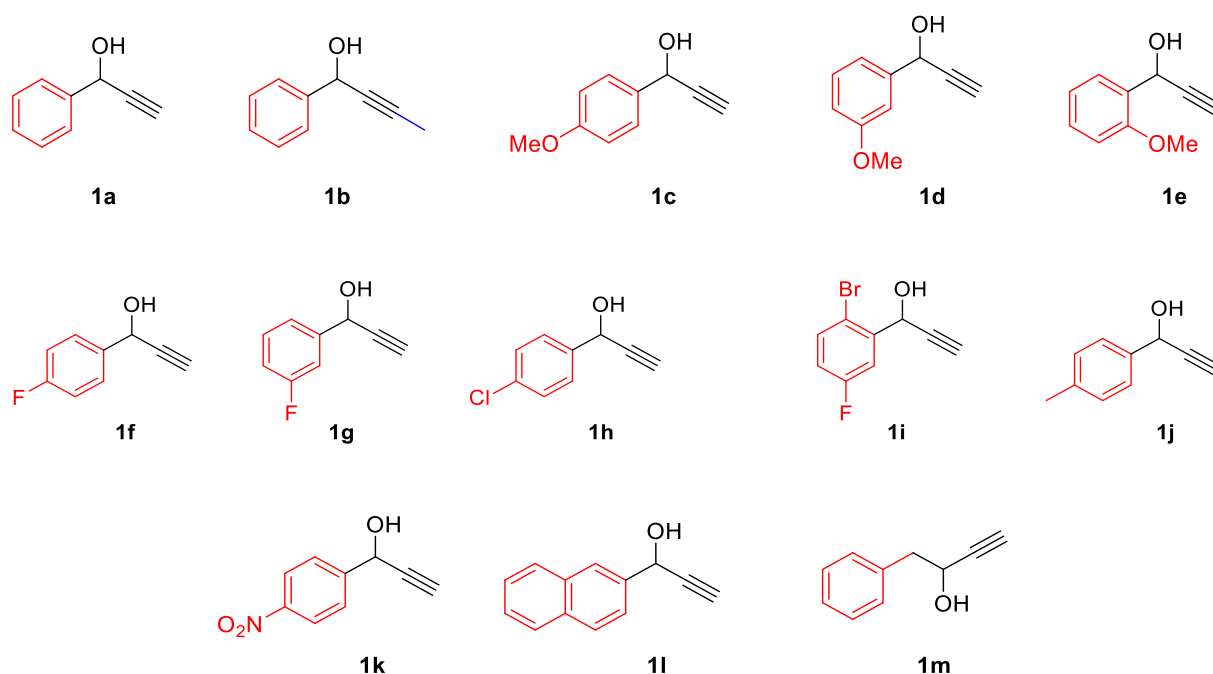
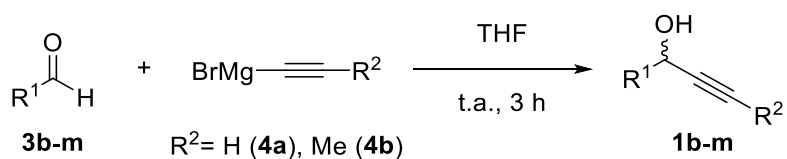


Figura 5. Alcoholes propargílicos sintetizados y sobre los que se estudiará su reacción de oxidación quimioenzimática.

Este conjunto está constituido en su mayoría por alcoholes bencílicos (**1a-l**) en los que se ha tratado de variar la naturaleza de los mismos, tanto desde el punto de vista electrónico como desde la influencia que ejerce la posición de los sustituyentes en el anillo. Para ello, se han empleado tanto anillos aromáticos ricos en densidad electrónica como pobres, anillos más voluminosos como es el caso del compuesto **1l** y anillos disustituidos como el **1i**. Además, se decidió incluir el compuesto **1m** en la lista de sustratos debido a que es un compuesto muy interesante desde el punto de vista que permite estudiar la variación de la conversión cuando el alcohol propargílico no se encuentra doblemente activado, es decir, no se encuentra en una posición bencílica. También se ha estudiado como afecta a la conversión la posición del triple enlace en la molécula, por ello, se ha incluido en el listado de productos el compuesto **1b**, el cual, a diferencia del resto, presenta un grupo metilo en lugar de un hidrógeno acetilénico.

Los alcoholes propargílicos **1b-m** no son comerciales por lo que fue necesaria realizar su síntesis para posteriormente estudiar el proceso de oxidación enzimática mediante el sistema catalítico lacasa de *Trametes versicolor*/TEMPO. La estrategia sintética elegida para la síntesis de los alcoholes **1b-m** consistió en hacer reaccionar los correspondientes aldehídos **3b-m** con una disolución de bromuro de etinilmagnesio (**4a**, 1.1 equiv.) o bromuro de 1-propinilmagnesio (**4b**, 1.1 equiv.) bajo atmósfera de argón (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados obtenidos para la síntesis de los alcoholes propargílicos **1b-m**.

Entrada	Reactivos	Alcohol	Purificación ^a	Rendimiento (%)
1	Benzaldehído/ 4b	1b	No	95
2	4-Metoxibenzaldehído/ 4a	1c	Si	82
3	3-Metoxibenzaldehído/ 4a	1d	Si	85
4	2-Metoxibenzaldehído/ 4a	1e	No	90
5	4-Fluorobenzaldehído/ 4a	1f	No	92
6	3-Fluorobenzaldehído/ 4a	1g	No	90
7	4-Clorobenzaldehído/ 4a	1h	No	94
7	2-Bromo,5-fluorobenzaldehído/ 4a	1i	Si	78
9	4-Metilbenzaldehído/ 4a	1j	No	92
10	4-Nitrobenzaldehído/ 4a	1k	Si	68
11	2-Naftaldehído/ 4a	1l	No	87
12	Fenilacetaldehído/ 4a	1m	Si	53

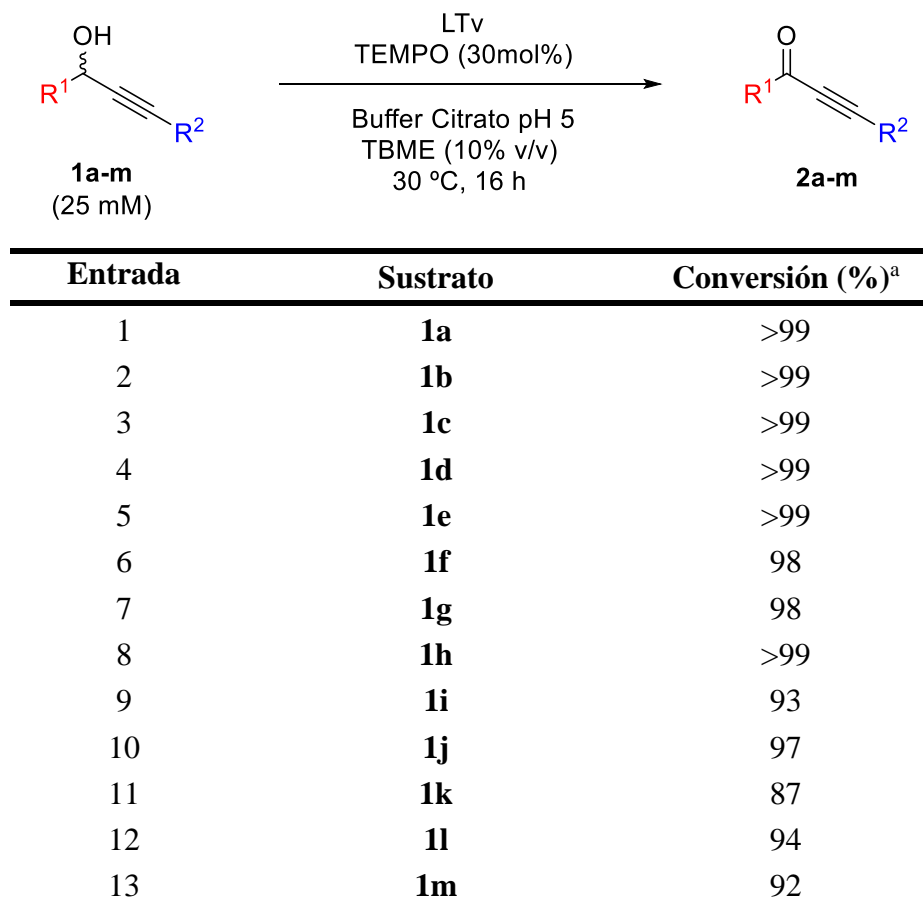
^a Para estas reacciones se comenzó empleando un reactivo de Grignard que condujo a la necesidad de purificar algunos de los productos finales, hecho que no fue necesario cuando se adquirió posteriormente uno nuevo.

4.1.3 Oxidación enzimática de derivados de 1-fenilprop-2-in-1-ol empleando el sistema catalítico formado por la lacasa *Trametes versicolor* y el TEMPO

Como se ha mostrado en el apartado 4.1.1, al realizar la oxidación quimioenzimática del alcohol propargílico **1a** se ha alcanzado una conversión completa empleando el sistema lacasa/TEMPO, por lo que empleando las condiciones óptimas previamente optimizadas

(entrada 4, Tabla 2), se muestran a continuación en la Tabla 5 los resultados alcanzados al extender la metodología a otros 12 alcoholes propargílicos, y como puede observarse las conversiones obtenidas en todos los casos fueron superiores al 86%.

Tabla 5. Oxidación de los alcoholes **1a-m** empleando el sistema catalítico LTV/TEMPO.



^a Conversiones medidas mediante CG.

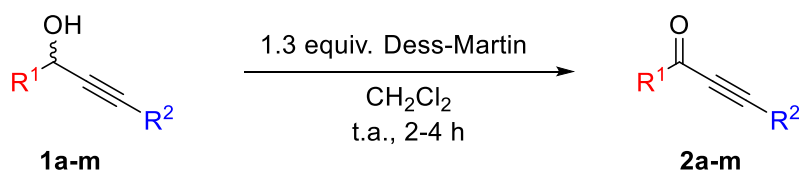
Dentro de los compuestos aromáticos puede observarse que no hay diferencia en tener el triple enlace en posición interna o externa, ya que para el sustrato **1b** también se obtuvo una conversión cuantitativa (entrada 2). La posición de los sustituyentes en el anillo no tiene una especial influencia en la conversión, obteniéndose de forma cuantitativa las cetonas **2c-e** monosustituídas con el grupo metoxi (entradas 3, 4 y 5) o con un 98% las cetonas monofluoradas **2f** y **2g** (entradas 6 y 7). Evaluando la naturaleza electrónica de los sistemas aromáticos es necesario destacar que cuando se emplean sustratos monosustituídos como por ejemplo sustituidos todos ellos en posición *para* (**1c,f,h,j** entradas 3, 6, 8 y 10) las conversiones son

similares (97->99%), mientras que para disustituídos con sustituyentes de marcada naturaleza electronegativa (bromo y flúor, **1i**, entrada 9), la conversión decae hasta el 93%. En el caso de anillos aromáticos muy pobres en densidad electrónica, como es el caso de **1k** (entrada 11) monosustituído en *para* con un grupo que retira densidad de carga como es el nitro, la conversión decae hasta el 87%.

En base a los resultados obtenidos y expuestos en la Tabla 5 se puede concluir que la oxidación enzimática de alcoholes propargílicos, empleando el sistema catalítico lacasa de *Trametes versicolor*/TEMPO ofrece unos resultados excelentes para sustratos de naturaleza aromática. Además, la conversión no se ve muy afectada por la naturaleza electrónica del anillo aromático, si bien cuando se emplean anillos fuertemente desactivados o disustituídos, la conversión decae levemente. Tampoco se observa una gran influencia en la conversión la posición de los sustituyentes en el anillo aromático, obteniéndose conversiones cuantitativas independientemente de la posición que ocupen los sustituyentes. Además, esta metodología, permite llevar a cabo con éxito la oxidación de alcoholes propargílicos, tanto cuando el triple enlace es terminal, como cuando se encuentra en una posición interna.

4.1.4. Oxidación de derivados de 1-fenilprop-2-in-1-ol empleando el reactivo de Dess-Martin

A modo de comparación con respecto a la oxidación quimioenzimática de los alcoholes propargílicos **1a-m**, se decidió emplear como agente oxidante el reactivo de Dess-Martin para obtener de una manera alternativa las cetonas propargílicas **2a-m**. Los resultados obtenidos para la síntesis de estos compuestos se muestran a continuación en la Tabla 6:

Tabla 6. Resultados obtenidos para síntesis de las propargilcetonas **2a-m** empleando el reactivo de Dess-Martin.

Entrada	Alcohol	Rdto. Dess-Martin (%) ^a	Conversión lacasa/TEMPO (%) ^b
1	1a	86 (3 h)	>99
2	1b	80 (3 h)	>99
3	1c	83 (2 h)	>99
4	1d	84 (2 h)	>99
5	1e	80 (2 h)	>99
6	1f	75 (4 h)	98
7	1g	77 (4 h)	98
8	1h	81 (3 h)	>99
9	1i	69 (4 h)	93
10	1j	85 (3 h)	97
11	1k	72 (4 h)	87
12	1l	88 (2 h)	94
13	1m	54 (4 h)	92

^a Rendimiento aislado tras cromatografía de columna. Tiempo de reacción entre paréntesis.

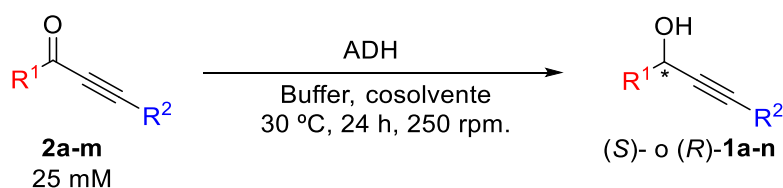
^b Conversiones medidas mediante CG tras 16 horas de reacción a 30 °C (ver parte experimental para más detalles).

Como puede observarse en la Tabla 6, los rendimientos obtenidos con el reactivo de Dess-Martin se encuentran entre el 54 y el 86%, por lo que parecen no superar los excelentes resultados obtenidos en la aproximación quimioenzimática.

4.2 1-Fenilprop-2-in-1-ona y derivados: Reducción enzimática estereoselectiva

Una vez que se han optimizado las condiciones de reacción para llevar a cabo la oxidación enzimática de una serie de alcoholes propargílicos, el siguiente paso ha sido el estudio de la bio-reducción asimétrica de sus correspondientes cetonas **2a-m** (Esquema 20),

comenzando por la 1-fenilprop-2-in-1-ona (**2a**) considerada como sustrato modelo al ser comercialmente accesible.



Esquema 20. *Proceso para la reducción estereoselectiva de las propargilcetonas 2a-m.*

4.2.1 Bioreducción de la 1-fenilprop-2-in-1-ona (**2a**)

En primer lugar, para evaluar la viabilidad de esta etapa, se ha realizado un *screening* con las diferentes ADHs de las que dispone nuestro grupo de investigación (Tabla 7), algunas de las cuales permitieron acceder al alcohol (*S*)-**1a** (entradas 1-4), mientras que otras condujeron a su enantiómero (entradas 5-10)

ADH-A: ADH de *Rhodococcus ruber*.

ADH-T: ADH de *Thermoanaerobium* species.

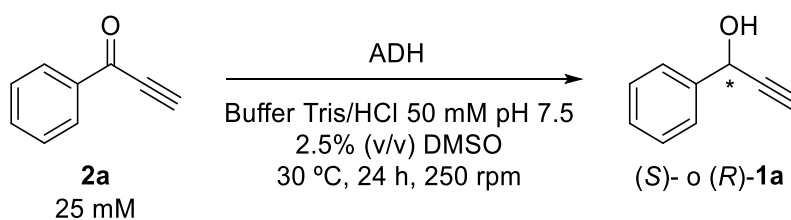
LB-ADH: ADH de *Lactobacillus brevis*.

Ras-ADH: ADH de *Ralstonia* species.

Sy-ADH: ADH de *Sphingobium yanoikuyae*.

Tes-ADH: ADH de *Thermoanaerobacter ethanolicus*.

ADH comercial **evo 1.1.200**.

Tabla 7. Bio-reducción de la propargilcetona **2a** (25 mM) tras 24 horas a 30 °C y 250 rpm.

Entrada	ADH	<i>c</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^b
1	Ras	>99	>99 (<i>S</i>)
2	Sy	95	31 (<i>S</i>)
3 ^c	Sy	>99	69 (<i>S</i>)
4	T	53	98 (<i>S</i>)
5	LB	>99	77 (<i>R</i>)
6 ^c	LB	97	70 (<i>R</i>)
7	Tes	24	35 (<i>R</i>)
8	A	62	98 (<i>R</i>)
9	evo-1.1.200 ^d	90	>99 (<i>R</i>)
10	evo-1.1.200 ^e	>99	86 (<i>R</i>)

^a Conversiones calculadas por CG.

^b Excesos enantioméricos medidos por HPLC. Entre paréntesis se indica el enantiómero mayoritario.

^c Se empleó el sistema de regeneración glucosa/GDH.

^d Se empleó la enzima no liofilizada tal como venía de la casa comercial.

^e Se empleó la enzima liofilizada.

Los mejores resultados se han obtenido en el caso de la Ras-ADH para acceder a (*S*)-**1a** (entrada 1) y con la evo-1.1.200 para la formación de (*R*)-**1a**, ya estuviera liofilizada o no (entradas 9 y 10). Así, en ambos casos ha sido posible alcanzar conversiones altas (>90%) y excelentes selectividades (entradas 1 y 9). En el resto de los casos, o bien la conversión no era buena y se observó la degradación del sustrato de partida (entradas 4, 7 y 8), o bien, aunque se alcanzaron buenos valores de actividad, las selectividades fueron moderadas (entradas 2, 3, 5 y 6).

4.2.2 1-Fenil-prop-2-in-1-ona y derivados: Reducción enzimática estereoselectiva empleando Ras-ADH y evo-1.1.200

En base a los resultados obtenidos con la cetona **2a** se decidió centrar el estudio en la aplicación de la Ras-ADH y de la evo-1.1.200 en la bioreducción de las propargilcetonas **2b-m** (Figura 6), previamente obtenidas por la oxidación de los alcoholes **1b-m** ya fuera por vía química o quimioenzimática.

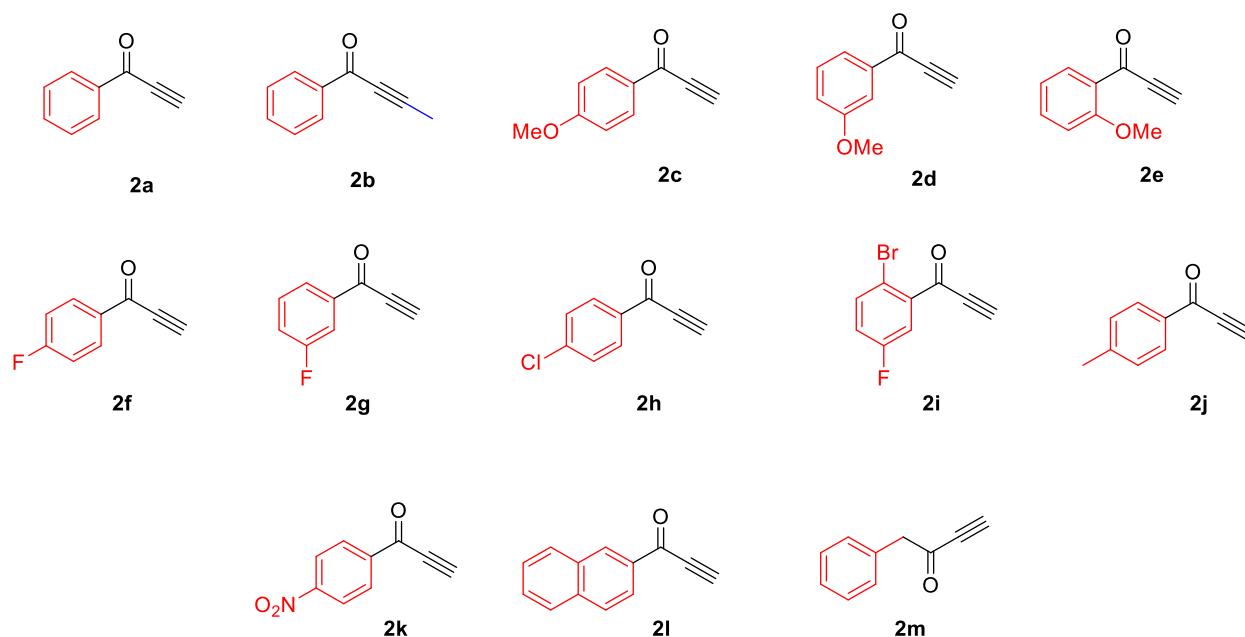
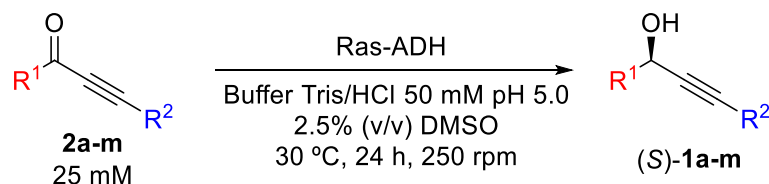


Figura 6. Cetonas propargílicas sobre las que se estudiará su bioreducción con la Ras-ADH y evo-1.1.200.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en el proceso de reducción estereoselectiva de las propargilcetonas **2a-m**, empleando tanto la Ras-ADH (Tabla 8) como la evo-1.1.200 (Tabla 9), con el fin de obtener ambos enantiómeros de los correspondientes alcoholes. Como puede observarse en las Tablas 8 y 9, los resultados en prácticamente todos los casos son excelentes, tanto en términos de conversión como de exceso enantiomérico.

Tabla 8. Bioreducción de las propargilcetona **2a-m** (25 mM) con la Ras-ADH tras 24 horas a 30 °C y 250 rpm.

Entrada	Cetona	<i>c</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^b
1	2a	>99	>99
2	2b	>99	85
3	2c	>99	>99
4	2d	>99	>99
5	2e	>99	>99
6	2f	>99	95
7	2g	>99	>99
8	2h	>99	97
9	2i	>99	93
10	2j	98	>99
11	2k	>99	88
12	2l	>99	97
13	2m	99	<3

^a Conversiones medidas mediante CG.

^b Excesos enantioméricos determinados mediante HPLC.

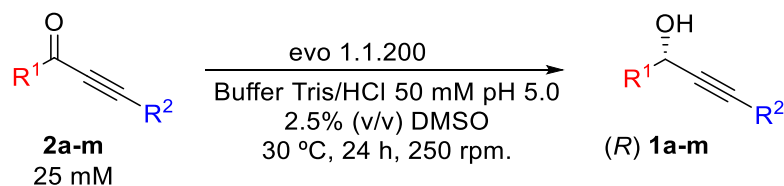
En el caso de la Ras-ADH, en todos los casos se obtienen conversiones mayores del 98%, y al contrario que lo observado con la evo-1.1.200, esta ADH no es dependiente de la naturaleza electrónica de los sustratos, aunque en el caso del sustrato **2k**, el cual presenta un anillo aromático fuertemente desactivado, el exceso enantiomérico decae hasta el 88%. Esta ADH tampoco varía su actividad en función de la posición de los sustituyentes del anillo aromático, obteniéndose excesos enantioméricos del 99% con la *orto*, *meta* y *para* sustitución (por ejemplo en las entradas 3-5 con el grupo metoxi).

En el caso de la propargilcetona disustituída (**2i**), aunque la conversión sigue siendo cuantitativa, el exceso enantiomérico decae ligeramente hasta el 93%. Sin embargo, el resultado más llamativo que ofrece esta ADH es el caso correspondiente a la entrada 13, en la cual, para

el sustrato **2m**, en el que el alcohol no se encuentra en posición bencílica, si bien la conversión continúa siendo cuantitativa, el proceso transcurre con nula selectividad.

En el caso de la bioreducción catalizada por la evo-1.1.200, se observó que con esta ADH es posible alcanzar conversiones superiores al 97% en todos los casos, sin embargo, cuando se emplean anillos aromáticos ricos en densidad electrónica, como es el caso de las entradas 3, 4, 5 y 12, el exceso enantiomérico decae. Además, es necesario comentar que la actividad de esta ADH también depende de la posición de los sustituyentes en el anillo aromático, como puede observarse en las entradas 3, 4 y 5, obteniéndose los peores resultados cuando el anillo aromático se encuentra *orto* o *meta* sustituido.

Mención especial merece la entrada 9 de la tabla, en ella se puede observar como para el sustrato disustituido **2i** la conversión continúa siendo cuantitativa, sin embargo, el exceso enantiomérico desciende hasta el 25%, siendo lo más sorprendente el cambio de selectividad, ya que la ADH evo-1.1.200 es una enzima que no sigue la “regla de Prelog” y genera el enantiómero *R*, sin embargo, en este caso da lugar al (*S*)-**1a**, aunque con un exceso enantiomérico muy bajo.

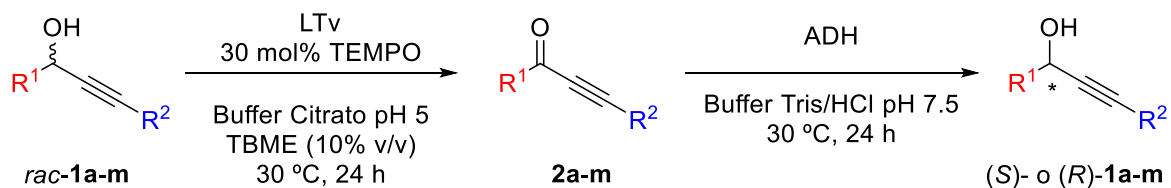
Tabla 9. Bioreducción de las propargilcetona **2a-m** (25 mM) con la *evo-1.1.200* tras 24 horas a 30 °C y 250 rpm.

Entrada	Cetona	<i>c</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^b
1	2a	>99	>99
2	2b	>99	88
3	2c	97	66
4	2d	>99	58
5	2e	>99	55
6	2f	>99	97
7	2g	>99	98
8	2h	>99	95
9	2i	>99	25
10	2j	98	>99
11	2k	>99	>99
12	2l	>99	88
13	2m	>99	>99

^a Conversiones medidas mediante CG.^b Excesos enantioméricos determinados mediante HPLC.

4.3 Proceso secuencial. Desracemización de *1-fenilprop-2-in-1-ol* (**1a**)

Debido a los excelentes resultados obtenidos tanto para la oxidación quimioenzimática, como para la bioreducción estereoselectiva, nuestro último esfuerzo se centró en el desarrollo y optimización de un proceso concurrente que permitiría llevar a cabo la desracemización de alcoholes propargílicos (Esquema 21).

**Esquema 21.** Propuesta de desracemización de alcoholes propargílicos.

Desde el punto de vista sintético la opción más interesante es el diseño de una metodología en cascada, en la cual se dispongan ambos biocatalizadores en el medio de reacción desde el inicio y sean capaces de trabajar conjuntamente para obtener el producto deseado. Sin embargo, en este caso, no fue posible desarrollar una metodología en cascada debido, no a la incompatibilidad ambos biocatalizadores, sino a la incompatibilidad de ambas etapas sintéticas, la cual es debida a que en la primera etapa se produce una oxidación no selectiva de ambos enantiómeros del alcohol, y en el segundo paso se produce la reducción estereoselectiva de la propargilcetona generada, por lo que al desarrollar una metodología en cascada el sistema catalítico lacasa de *Trametes versicolor*/TEMPO oxidaría de nuevo el alcohol generado disminuyendo así la conversión del proceso global y el rendimiento del producto deseado.

Debido a la imposibilidad de desarrollar un procedimiento en cascada se decidió a llevar a cabo la desracemización de alcoholes propargílicos de manera secuencial, donde fue necesario realizar un laborioso proceso de optimización, debido fundamentalmente a dos motivos: (i) cada enzima trabaja a un pH óptimo diferente (5.0 para la lacasa y 7.5 para las dos ADHs consideradas); y (ii) se trabaja a distintas concentraciones de sustrato en cada caso, siendo para el sistema lacasa/TEMPO de 25 o 50 mM, mientras que para las bioreducciones se realizaron a 25 mM.

El proceso de optimización se desarrolló con el sustrato modelo **1a**, estudiando muy diversas posibilidades. En primer lugar, se estudió el proceso a distintas concentraciones, buffer y pHs (Tabla 10), observándose que en todos los casos las conversiones son cuantitativas, sin embargo, los excesos enantioméricos oscilan entre el 68 y el 99%. En el caso de la Ras-ADH los mejores resultados en cuanto a exceso enantiomérico se obtienen cuando se emplea el buffer citrato (entradas 3 y 4), y aparentemente, la concentración del sustrato no tiene influencia en el

resultado, aun así, estos resultados son peores que los obtenidos empleando un buffer Tris/HCl de pH 7.5, como se puede observar en la Tabla 10.

Tabla 10. Estudio del pH y el buffer en las reacciones de biorreducción de **2a** catalizadas por ADHs.

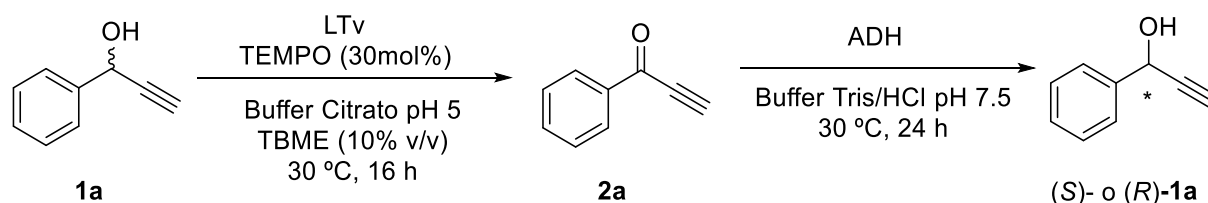
Entrada	[Sustrato](mM)	ADH	pH (buffer)	<i>c</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^b
1	50	Ras	7.5(TRIS/HCl)	99	86 (<i>S</i>)
2	25	Ras	6.5 (TRIS/HCl)	99	89 (<i>S</i>)
3	25	Ras	5.0 (citrato)	99	97 (<i>S</i>)
4	50	Ras	5.0 (citrato)	99	96 (<i>S</i>)
5	50	evo-1.1.200	7.5 (TRIS/HCl)	99	99 (<i>R</i>)
6	25	evo-1.1.200	6.5 (TRIS/HCl)	99	99 (<i>R</i>)
7	25	evo-1.1.200	5.0 (citrato)	99	79 (<i>R</i>)
8	50	evo-1.1.200	5.0 (citrato)	99	68 (<i>R</i>)

^a Conversiones calculadas por CG.

^b Excesos enantioméricos medidos por HPLC. Entre paréntesis se indica el enantiómero mayoritario.

En el caso de la evo-1.1.200, los mejores resultados se obtienen cuando se emplea el buffer de Tris/HCl, independientemente del pH del mismo y de la concentración de sustrato empleado. Los resultados de las entradas 5 y 6 son análogos a los recogidos en la Tabla 7.

En base a estos resultados preliminares, se llevaron a cabo una serie de estudios del proceso secuencial variando los parámetros de concentración de sustrato y pH (Tabla 11):

Tabla 11. Desracemización del alcohol **1a** a través de un proceso secuencial que implica el uso del sistema LTV-TEMPO y una bioreducción catalizada por la Ras-ADH o la evo-1.1200.

Entrada	[1a] (mM)	c (%) (1 ^a etapa) ^a	Dilución hasta 25 mM ^b	pH final	ADH	c (%) (2 ^a etapa) ^c	ee (%) ^d
1	25	99	No	5.0	Ras	27	n.d.
2	25	99	No	5.0	evo-1.1.200	98	93
3	50	99	Si	6.1	Ras	17	17
4	50	99	Si	6.1	evo-1.1.200	88	94
5	25	99	No ^e	8.0	Ras	99	99
6	25	99	No ^e	8.0	evo-1.1.200	98	99
7	50	99	Si ^e	7.5	Ras	99	99
8	50	99	Si ^e	7.5	evo-1.1.200	94	97

^a Conversiones alcanzadas en el proceso de oxidación quimioenzimática medidas mediante CG.

^b Tras las 16 horas de la primera etapa: (i) Si: Se añade el volumen de buffer Tris/HCl pH 7.5 necesario para lograr una concentración de sustrato de 25 mM; (i) No: No se diluye la reacción.

^c Conversiones medidas mediante CG.

^d Excesos enantioméricos medidos mediante HPLC. n.d.: no determinado.

^e Tras la etapa de oxidación quimioenzimática se añaden 30 μL de NaOH 3M.

Como puede observarse en la Tabla 11, los mejores resultados tanto para la conversión como para el exceso enantiomérico se obtienen cuando tras finalizar la primera etapa de oxidación enzimática se añaden 30 μL de NaOH 3 M al medio de reacción con el fin de alcanzar un pH próximo a 7.5, el cual es el pH de trabajo para estas ADHs. Los mejores resultados obtenidos se corresponden a las entradas 5 y 6, en las cuales se trabaja de inicio a una concentración de 25 mM de sustrato **1a**, y tras las 16 horas de la primera etapa del proceso, no se diluye, pero si se ajusta el pH con NaOH 3M hasta un valor de pH de aproximadamente 8.0. En ambas entradas se obtienen conversiones prácticamente cuantitativas y excesos enantioméricos del 99%.

En base a estos resultados, la metodología planteada en este *Trabajo Fin de Máster* se puede considerar como una alternativa exitosa a la hora de llevar a cabo la desracemización de alcoholes propargílicos. Actualmente se está trabajando para extender este procedimiento al resto de sustratos utilizados en esta investigación.

4.3.1 Escalado para la desracemización secuencial del alcohol propargílico **1a**

Con motivo de los excelentes resultados obtenidos para el procedimiento secuencial de desracemización del alcohol propargílico **1a**, el siguiente paso ha sido tratar de demostrar la aplicabilidad de esta metodología. Para ello se ha realizado un escalado a 50 mg (0.38 mmol) del alcohol racémico **1a**, empleando las condiciones previamente optimizadas para el proceso secuencial. Los resultados obtenidos se muestran a continuación en la Tabla 12:

Tabla 12. Resultados obtenidos para el escalado del proceso de desracemización secuencial del sustrato **1a**.

Entrada	<i>c</i> (%) (1ª Etapa) ^a	ADH	<i>c</i> (%) (2ª Etapa) ^b	<i>ee</i> (%) ^c	Rendimiento (%) ^d
1	>99	Ras	97	98	83
2	>99	evo-1.1.200	98	98	79

^a Conversiones alcanzadas en el proceso de oxidación quimioenzimática medidas mediante CG.

^b Conversiones medidas mediante CG.

^c Excesos enantioméricos medidos mediante HPLC.

^d Rendimiento aislado tras purificación por columna en cromatografía de gel de sílice

A pesar de que los resultados obtenidos para la primera etapa del proceso continúan siendo excelentes, los resultados obtenidos para el escalado no son tan buenos, en la segunda etapa, como los obtenidos en una escala menor del procedimiento, sin embargo, actualmente se continúa estudiando la optimización de esta metodología intentando alcanzar la conversión y el exceso enantiomérico completo.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este *Trabajo Fin de Máster* se pueden resumir en los siguientes puntos:

- Se ha llevado a cabo la síntesis de una serie de alcoholes propargílicos mediante la reacción de los correspondientes aldehídos con un reactivo de Grignard (bromuro de etinil magnesio o bromuro de 1-propinil magnesio).
- El estudio de la oxidación de esta familia de alcoholes propargílicos a las correspondientes cetonas, permitió presentar el uso de una estrategia quimioenzimática empleando el sistema catalítico lacasa de *Trametes versicolor*-TEMPO como un sistema eficaz, y que ofrece ventajas, respecto al uso de otros oxidantes convencionales como el MnO₂, reactivo de Jones o el Dess-Martin.
- Se ha llevado a cabo un estudio de la bioreducción estereoselectiva de las cetonas propargílicas obtenidas, mediante el empleo de ADHs, donde se encontraron los mejores resultados con las enzimas *Ralstonia* ADH sobreexpresada en *E. coli* y la comercial evo-1.1.200, que mostraron una alta actividad y excelente selectividad hacia la formación de los correspondientes alcoholes propargílicos.
- Adicionalmente se ha logrado desarrollar una metodología secuencial de desracemización del 1-fenilprop-2-in-1-ol, con el fin de obtener el enantiómero *R* o *S* según la enzima empleada.
- Como planes futuros una vez finalizado este *Trabajo Fin de Master*, nos planteamos la optimización del proceso de desracemización, así como su extensión a aquellos sustratos donde los procesos individuales de oxidación y reducción transcurran con conversiones completas.

Parte experimental

6.1 Disolventes y reactivos generales

Los reactivos químicos fueron adquiridos en distintas casas comerciales tales como Sigma-Aldrich, Acros o Fluka, y se emplearon sin purificación adicional. El reactivo de Jones ha sido preparado previamente disolviendo, con mucha precaución y en un baño de hielo, 67 g de CrO₃ en 58 mL de H₂SO₄ concentrado. La mezcla se diluye hasta un volumen final de 250 mL con agua destilada, y se deja enfriar durante al menos 30 minutos.

En cuanto a los enzimas, la lacasa de *Trametes versicolor* (13.6 U/mg) fue adquirida a Sigma-Aldrich, mientras que la ADH evo-1.1.200 (0.42 U/mg) fue obtenida de Evocatal GmbH. El resto de ADHs (Ras-ADH, LB-ADH, Sy-ADH, TES-ADH, ADH-T y ADH-A) se emplearon de una colección propia del grupo de investigación, todas ellas sobreexpresadas en *Escherichia coli*.

Los disolventes empleados en las reacciones químicas y enzimáticas: acetato de etilo (AcOEt), acetona, diclorometano (CH₂Cl₂), dimetilsulfóxido (DMSO), hexano, isopropanol (iPrOH) y *tert*-butil metil éter (TBME) se emplearon sin tratamiento alguno, a excepción del tetrahidrofurano (THF) para la preparación de los alcoholes **1a-n** que fue previamente secado empleando el sistema sodio-benzofenona bajo atmósfera de nitrógeno.

6.2 Técnicas de purificación y análisis

6.2.1 Cromatografía en gel de sílice

Para la cromatografía en capa fina (TLC) se han empleado cromatofolios de gel de sílice 60 de 0.25 mm de espesor y con un indicador ultravioleta incorporado, comercializados por Merck.

Como revelador se utilizó una lámpara de ultravioleta ($\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$), y posteriormente una disolución acuosa al 1% de KMnO₄ (2 g), 5% de K₂CO₃ (10 g) y 5% de NaOH (10 g) en

200 mL de H₂O, siendo todas las proporciones en peso:volumen. Solo en algunos casos, se empleó complementariamente como revelador una disolución de vainillina, la cual se preparó disolviendo 2.50 g de vainillina en 200 mL de EtOH, al cual se añaden previamente 10 mL de H₂SO₄ concentrado.

Las purificaciones por cromatografía de columna se realizaron sobre gel de sílice 60 (230-400 *mesh*) adquirida a Merck.

6.2.2 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los experimentos de resonancia magnética nuclear de ¹H-RMN, ¹³C{¹H}-RMN y ¹⁹F-RMN se realizaron en los espectrómetros Bruker AV-300 (300.13 MHz para ¹H, 75.5 MHz para ¹³C{¹H} y 282 MHz para ¹⁹F) o Bruker DPX-300 (300.13 MHz para ¹H, 75.5 MHz para ¹³C{¹H} y 282 MHz para ¹⁹F), empleando en todos los casos cloroformo deuterado (CDCl₃) como disolvente.

Los valores de los desplazamientos químicos (δ) están referidos en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) se dan en hertzios (Hz). Para indicar la multiplicidad de las señales en los espectros de ¹H-RMN se emplearon las siguientes iniciales: *s* (singulete), *sa* (singulete ancho), *d* (doblete), *dd* (doble doblete), *ddd* (doble doblete de dobletes), *dt* (doble triplete), *t* (triplete), *c* (cuartete) y *m* (multiplete).

6.2.3 Cromatografía de gases

Para la determinación de las conversiones en las reacciones de oxidación con el sistema catalítico lacasa de *Trametes versicolor*/TEMPO y las bio reducciones, se empleó un cromatógrafo Hewlett-Packard 6890 (12.2 psi N₂) utilizando las siguientes columnas con fases estacionarias aquirales:

- Hewlett-Packard HP-1 (30 m x 0.32 mm x 0.25 μ m)

- DB-1701 (30 m x 0.25 mm x 0.25 0.25 μm)

Los tiempos de retención de los productos se han detallado en las Tablas 13 (alcoholes **1a-m**) y 14 (cetonas **2a-m**).

Tabla 13. *Tiempos de retención de los alcoholes 1a-m medidos mediante CG.*

Entrada	Alcohol	Columna	Programa ^a	Tiempo de retención (min)
1	1a	HP-1	90/0/1.5/110/1/40/220/1	4.9
2	1b	HP-1	110/0/1.5/150/1/40/220/1	8.1
3	1c	HP-1	110/0/1.5/150/1/40/220/1	13.1
4	1d	HP-1	110/0/1.5/150/1/40/220/1	9.5
5	1e	HP-1	110/0/1.5/150/1/40/220/1	9.4
6	1f	HP-1	110/0/1.5/150/1/40/220/1	4.4
7	1g	HP-1	110/0/1.5/150/1/40/220/1	3.1
8	1h	HP-1	110/0/1.5/150/1/40/220/1	6.0
9	1i	HP-1	110/0/1.5/150/1/40/220/1	10.2
10	1j	DB-1701	110/0/1.5/150/1/40/220/1	9.8
11	1k	HP-1	110/0/1.5/150/1/40/220/1	14.2
12	1l	HP-1	110/0/1.5/150/1/40/220/1	20.3
13	1m	HP-1	90/0/1.5/135/0/40/220/1	6.5

^a Programa: temperatura inicial (°C)/ tiempo (min)/ pendiente (°C/min)/ temperatura (°C)/ tiempo (min).

Tabla 14. *Tiempos de retención de las cetonas 2a-m medidos mediante CG.*

Entrada	Cetona	Columna	Programa ^a	Tiempo de retención (min)
1	2a	HP-1	90/0/1.5/110/1/40/220/1	4.4
2	2b	HP-1	110/0/1.5/150/1/40/220/1	8.5
3	2c	HP-1	110/0/1.5/150/1/40/220/1	11.2
4	2d	HP-1	110/0/1.5/150/1/40/220/1	9.8
5	2e	HP-1	110/0/1.5/150/1/40/220/1	9.8
6	2f	HP-1	110/0/1.5/150/1/40/220/1	3.7
7	2g	HP-1	110/0/1.5/150/1/40/220/1	2.6
8	2h	HP-1	110/0/1.5/150/1/40/220/1	5.3
9	2i	HP-1	110/0/1.5/150/1/40/220/1	8.7
10	2j	DB-1701	110/0/1.5/150/1/40/220/1	4.5
11	2k	HP-1	110/0/1.5/150/1/40/220/1	4.4
12	2l	HP-1	110/0/1.5/150/1/40/220/1	19.6
13	2m	HP-1	90/0/1.5/135/0/40/220/1	5.4

^a Programa: temperatura inicial (°C)/ tiempo (min)/ pendiente (°C/min)/ temperatura (°C)/ tiempo (min)

6.2.4 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Se emplearon análisis de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para la medida de los excesos enantioméricos de las bioreducciones, utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 y la columna quiral Chiralcel IA (25 x 4.6 mm D.I) a una temperatura de 30 °C. La detección empleada fue visible-ultravioleta a las longitudes de onda de 210 y 214 nm. Como fase móvil se ha utilizado una mezcla hexano/isopropanol en proporciones variables según la naturaleza del compuesto. Los tiempos de retención de los alcoholes **1a-m** se detallan en la Tabla 15.

Tabla 15. *Tiempos de retención de los alcoholes 1a-m medidos mediante HPLC.*

Entrada	Alcohol	Eluyente (hexano/ <i>i</i> PrOH)	Tiempo de retención (min) ^a
1	1a	95:5	8.5 (<i>R</i>), 9.1 (<i>S</i>)
2	1b	95:5	8.2 (<i>R</i>), 9.0 (<i>S</i>)
3	1c	95:5	12.2 (<i>R</i>), 13.2 (<i>S</i>)
4	1d	95:5	12.4 (<i>R</i>), 13.2 (<i>S</i>)
5	1e	95:5	12.3 (<i>R</i>), 13.1 (<i>S</i>)
6	1f	95:5	8.7 (<i>R</i>), 9.5 (<i>S</i>)
7	1g	98:2	24.9 (<i>R</i>), 26.6 (<i>S</i>)
8	1h	95:5	8.8 (<i>R</i>), 9.6 (<i>S</i>)
9	1i	97:3	16.9 (<i>R</i>), 17.7 (<i>S</i>)
10	1j	98:2	20.5 (<i>R</i>), 22.7 (<i>S</i>)
11	1k	95:5	13.6 (<i>R</i>), 17.4 (<i>S</i>)
12	1l	95:5	14.6 (<i>R</i>), 16.4 (<i>S</i>)
13	1m	97:3	17.1 (<i>R</i>), 18.2 (<i>S</i>)

^a Enantiómero correspondiente entre paréntesis.

6.2.5 Espectrometría de masas de alta resolución (EMAR)

Los experimentos de espectrometría de masas de alta resolución se realizaron en un espectrómetro Bruker con un equipo Hewlett-Packard 5973, empleando la técnica de ionización por electrospray en modo positivo (ESI⁺).

6.2.6 Espectroscopia de infrarrojo (IR)

Los espectros se registraron en un espectrómetro Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR usando placas de NaCl. Las bandas de tensión se indican en valores de ν máxima y se expresan en cm^{-1} , destacando únicamente las señales más representativas como son las bandas de alcoholes, carbonilos de cetona y triples enlaces carbono-carbono.

6.2.7 Puntos de fusión

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

6.3 Procedimientos experimentales

A continuación, se detallan los protocolos seguidos para la preparación de los compuestos orgánicos estudiados en este *Trabajo Fin de Máster*.

6.3.1 Síntesis de los alcoholes propargílicos *1a-m*

En un bulbo y bajo atmósfera inerte de argón, se añaden el correspondiente aldehído **3a-m** (5 mmol), THF seco (2.5 mL) y lentamente una disolución 0.5 M de bromuro de etinilmagnesio (**4a**) o bromuro de 1-propinilmagnesio (**4b**) en THF (11.0 mL, 5.5 mmol). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 4 horas, comprobando su evolución mediante análisis de TLC (30% AcOEt/hexano). Tras completarse la reacción, esta se detiene añadiendo una disolución acuosa saturada de NH₄Cl y agitando durante 30 minutos. Tras ese tiempo, se elimina el THF en el rotavapor, y se extrae la mezcla con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). Se combinan las fases orgánicas, las cuales se secan sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtran y se destila el disolvente a presión reducida.

En los casos que fueron necesarios se realiza una columna cromatográfica en gel de sílice (30% AcOEt/hexano), obteniéndose los correspondientes alcoholes propargílicos **1a-m** con rendimientos comprendidos entre el 38 y el 95% (ver Tabla 5 en el apartado de Resultados y discusión).

6.3.2 Biooxidación de los alcoholes propargílicos *1a-m* empleando el sistema catalítico lacasa de *Trametes versicolor*/TEMPO

En un tubo de microondas abierto al aire, se añade el correspondiente alcohol propargílico **1a-m** (0.05 mmol), TBME (200 µL, 10% v/v) y una disolución reguladora 50 mM de citrato pH 5.0 (2 mL) la cual ha sido oxigenada previamente con un globo de O₂ durante al menos 30 minutos. A continuación, se añade la lacasa de *Trametes versicolor* (10 mg) y el TEMPO (2.40 mg, 0.015 mmol) y la mezcla se deja reaccionando durante 16 horas, con

agitación magnética a 30 °C. Transcurrido este tiempo, la mezcla se extrae con AcOEt (3 x 1 mL), se combinan las fases orgánicas que se secan sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtran. La disolución se concentra burbujeando nitrógeno sobre ella, y se mide la conversión mediante cromatografía de gases (ver Tablas 9 y 10).

6.3.3 Oxidación química del alcohol propargílico 1a empleando MnO₂

Se introduce en un matraz el 1-fenilprop-2-in-1-ol (**1a**, 200 mg, 1.52 mmol), MnO₂ (396 mg, 4.55 mmol,) y CH₂Cl₂ (2.1 mL) y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 6 horas. Al finalizar este tiempo, se filtra la suspensión sobre celita y se extrae con H₂O destilada (3 x 15 mL) combinando las fases orgánicas y secándolas sobre Na₂SO₄ anhidro. Se filtran las fases orgánicas y se destila el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía de columna cromatográfica en gel de sílice (30% AcOEt/hexano), obteniendo la cetona **2a** como un sólido amarillento (19% rendimiento).

6.3.4 Oxidación química del alcohol propargílico 1a empleando el reactivo de Jones

Se introduce en un bulbo y bajo atmósfera de nitrógeno el 1-fenilprop-2-in-1-ol (**1a**, 100 mg, 0.75 mmol), el reactivo de Jones (250 µL) y acetona seca (250 µL). La disolución se agita durante 7 horas, siguiendo el transcurso de la reacción mediante análisis de TLC (30% AcOEt/hexano). Transcurrido este tiempo se diluye la mezcla con agua (5 mL) y se agita durante 15 minutos. Posteriormente se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 10 mL), se combinan las fases orgánicas, se lavan con brine (3 x 10 mL), y se secan sobre Na₂SO₄ anhidro. Una vez filtradas las fases orgánicas, se destilan los disolventes a presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante columna cromatográfica sobre gel de sílice (30% AcOEt/hexano), obteniendo **1a** como un sólido amarillento (35% rendimiento).

6.3.5 Oxidación química de los alcoholes propargílicos 1a-m con el reactivo de Dess-Martin

Se mezcla en un matraz el alcohol propargílico correspondiente **1a-n** (2.27 mmol), el reactivo de Dess-Martin (1.4 g, 3.2 mmol) y CH₂Cl₂ (22.7 mL) y se agita la reacción a temperatura ambiente. Tras 4 horas se comprueba la desaparición del producto de partida mediante análisis de TLC (30% AcOEt/hexano), deteniendo la reacción por adición de una disolución acuosa al 50% (v/v) NaHCO₃/Na₂S₂O₃ (22.7 mL). Posteriormente se realiza una extracción con CH₂Cl₂ (3 x 15 mL), se combinan las fases orgánicas y se secan sobre Na₂SO₄ anhidro. Una vez filtradas las fases orgánicas, se destila el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante columna cromatográfica sobre gel de sílice (30% AcOEt/hexano), obteniendo las cetonas **2a-m** (23-88% rendimiento, ver Tabla 6 en el apartado de Resultado y discusión).

6.3.6 Bio-reducción de las propargilcetonas 2a-m empleando la Ras-ADH

En un *ependorf* de 1.5 mL de volumen se añade la correspondiente cetona propargílica **2a-n** (0.015 mmol), DMSO (75 µL) en el caso de que fuera necesario solubilizar el compuesto (**2a**, **2b**, **2h**, **2i**, **2j**, **2l** y **2m**), 60 µL de una disolución de GDH (glucosa deshidrogenasa, 10 U), 60 µL de una disolución acuosa de *D*-glucosa (50 mM), 60 µL de una disolución acuosa de NADPH (10 mM), 420 µL de buffer Tris/HCl pH 7.5 (50 mM) y Ras-ADH (12 mg). A continuación, se cierra el *ependorf* y se mantiene bajo agitación orbital a 250 rpm y 30 °C durante 24 horas. Tras ese tiempo, se realiza una extracción con AcOEt (3 x 0.5 mL), se combinan las fases orgánicas y se secan sobre Na₂SO₄ anhidro. La disolución se concentra haciendo pasar una corriente de nitrógeno, midiendo a continuación la conversión y exceso enantiomérico de los alcoholes **1a-m** (ver Tabla 6).

6.3.7 Bio-reducción de las propargilcetonas 2a-m empleando la ADH evo-1.1.200

En un *ependorf* de 1.5 mL se añade la correspondiente cetona propargílica **2a-n** (0.0125 mmol), DMSO (56 μ L) en el caso de que fuera necesario solubilizar el compuesto (**2a,2b, 2h, 2i, 2j, 2l y 2m**), *i*PrOH (25 μ L), una disolución acuosa 10 mM de MgCl₂ (50 μ L), una disolución acuosa 10 mM de NADH (50 μ L), una buffer 50 mM Tris/HCl pH 7.5 (375 μ L) y evo-1.1.200 (12 mg). A continuación, se cierra el *ependorf* y se mantiene bajo agitación orbital a 250 rpm y 30 °C, durante 24 horas. Tras ese tiempo, se realiza una extracción con AcOEt (3 x 0.5 mL), se combinan las fases orgánicas y se secan sobre Na₂SO₄ anhidro. Una vez filtrada la fase orgánica, la disolución se concentra haciendo pasar una corriente de nitrógeno, midiendo a continuación la conversión y exceso enantiomérico de los alcoholes **1a-n** (ver Tablas 7).

6.3.8 Bio-reducción de la propargilcetona 2a empleando las ADH Sy-ADH, TES-ADH y ADH-T

En un *ependorf* de 1.5 mL se añade la cetona propargílica **2a** (0.015 mmol), DMSO (56 μ L), *i*PrOH (30 μ L), una disolución acuosa 10 mM de NADPH (60 μ L), una buffer 50 mM Tris/HCl pH 7.5 (510 μ L) y la ADH correspondiente (12 mg). A continuación, se cierra el *ependorf* y se mantiene bajo agitación orbital a 250 rpm y 30 °C, durante 24 horas. Tras ese tiempo, se realiza una extracción con AcOEt (3 x 0.5 mL), se combinan las fases orgánicas y se secan sobre Na₂SO₄ anhidro. Una vez filtrada la fase orgánica, la disolución se concentra haciendo pasar una corriente de nitrógeno, midiendo a continuación la conversión y exceso enantiomérico del alcohol **1a** (ver Tabla 5).

6.3.9 Bio-reducción de la propargilcetona 2a empleando LB-ADH

En un *ependorf* de 1.5 mL se añade la cetona propargílica **2a** (0.015 mmol), DMSO (56 μ L), *i*PrOH (30 μ L), una disolución acuosa 10 mM de MgCl₂ (60 μ L), una disolución

acuosa 10 mM de NADPH (60 μ L), una buffer 50 mM Tris/HCl pH 7.5 (480 μ L) y la LB-ADH (12 mg). A continuación, se cierra el *ependorf* y se mantiene bajo agitación orbital a 250 rpm y 30 °C, durante 24 horas. Tras ese tiempo, se realiza una extracción con AcOEt (3 x 0.5 mL), se combinan las fases orgánicas y se secan sobre Na₂SO₄ anhidro. Una vez filtrada la fase orgánica, la disolución se concentra haciendo pasar una corriente de nitrógeno, midiendo a continuación la conversión y exceso enantiomérico del alcohol **1a** (ver Tabla 5).

6.3.10 Bio-reducción de la propargilcetona **2a empleando ADH-A**

En un *ependorf* de 1.5 mL se añade la cetona propargílica **2a** (0.015 mmol), DMSO (56 μ L), *i*PrOH (30 μ L), una disolución acuosa 10 mM de NADH (60 μ L), una buffer 50 mM Tris/HCl pH 7.5 (510 μ L) y la ADH-A (12 mg). A continuación, se cierra el *ependorf* y se mantiene bajo agitación orbital a 250 rpm y 30 °C, durante 24 horas. Tras ese tiempo, se realiza una extracción con AcOEt (3 x 0.5 mL), se combinan las fases orgánicas y se secan sobre Na₂SO₄ anhidro. Una vez filtrada la fase orgánica, la disolución se concentra haciendo pasar una corriente de nitrógeno, midiendo a continuación la conversión y exceso enantiomérico del alcohol **1a** (ver Tabla 5).

6.3.11 Procedimiento secuencial para la desracemización del alcohol **1a empleando el sistema catalítico lacasa/TEMPO y Ras-ADH**

En un tubo de microondas (19 x 130 x 3 mm) abierto al aire, se añade el 1-fenilprop-2-in-1-ol (**1a**, 0.05 mmol), TBME (200 μ L) y de una disolución reguladora 50 mM citrato pH 5.0 (2 mL), la cual ha sido oxigenada previamente con un globo de O₂ durante al menos 30 minutos. A continuación, se añade la lacasa de *Trametes versicolor* (10 mg) y el TEMPO (0.3 equivalentes, 2.40 mg, 0.015 mmol). La mezcla se deja reaccionando durante 16 horas con agitación magnética a 30 °C, y tras este tiempo, se añade al medio de reacción GDH (240 μ L, 10 U), una disolución acuosa 50 mM de glucosa (240 μ L), una disolución acuosa 10 mM de

NADPH (240 μL), NaOH 3 M (57 μL) para tratar de ajustar el pH de la mezcla a un valor comprendido entre 7.5 y 8.0 y Ras-ADH (12 mg). El tubo se cierra y se agita orbitalmente a 250 rpm y 30 °C durante 24 horas. Tras ese tiempo, se realiza una extracción con AcOEt (3 x 0.5 mL), se combinan las fases orgánicas y se secan sobre Na_2SO_4 anhidro. Una vez filtrada la fase orgánica la disolución se concentra haciendo pasar una corriente de nitrógeno, midiendo a continuación la conversión y exceso enantiomérico de los alcoholes **1a-n** (ver Tabla 8).

6.3.12 Procedimiento secuencial para la desracemización del alcohol 1a empleando el sistema catalítico lacasa/TEMPO y evo-1.1.200

En un tubo de microondas (19 x 130 x 3 mm) abierto al aire, se añade el 1-fenilprop-2-in-1-ol (**1a**, 0.05 mmol), TBME (200 μL , 10% v/v) y una disolución reguladora 50 mM de citrato pH 5.0 (2.0 mL), la cual ha sido oxigenada previamente con un globo de O_2 durante al menos 30 minutos. A continuación, se añade la lacasa de *Trametes versicolor* (10 mg) y el TEMPO (0.3 equivalentes, 2.40 mg, 0.015 mmol) y la mezcla se deja reaccionando durante 16 horas, con agitación magnética a 30 °C. Tras el tiempo de reacción, se añade al medio de reacción 250 μL de $^i\text{PrOH}$, una disolución acuosa 10 mM de MgCl_2 (250 μL), una disolución acuosa 10 mM de NADH (250 μL), 57 μL de una disolución 3M de NaOH para tratar de ajustar el pH de la mezcla a un valor comprendido entre 7.5 y 8.0, y 12 mg de evo-1.1.200. El tubo sellado se cierra, y se somete a agitación orbital, a 30 °C durante 24 horas. Tras ese tiempo, la mezcla de reacción se extrae con AcOEt (3 x 1 mL), se combinan las fases orgánicas y se secan sobre Na_2SO_4 anhidro. Una vez filtrada la fase orgánica, la disolución se concentra haciendo pasar una corriente de nitrógeno y se realizan las correspondientes medidas de conversión y de exceso enantiomérico (ver Tabla 8).

6.3.13 Procedimiento secuencial para la desracemización del alcohol **1a empleando el sistema catalítico lacasa/TEMPO y Ras-ADH a escala semipreparativa**

En un tubo de microondas (19 x 130 x 3 mm) abierto al aire, se añade el 1-fenilprop-2-in-1-ol (**1a**, 0.35 mmol), TBME (1.4 mL, 10% v/v) y una disolución reguladora 50 mM de citrato pH 5.0 (14 mL), la cual ha sido oxigenada previamente con un globo de O₂ durante al menos 30 minutos. A continuación, se añade la lacasa de *Trametes versicolor* (48 mg) y el TEMPO (0.3 equivalentes, 0.105 mmol, 16.50 mg). La mezcla se deja reaccionando durante 16 horas, con agitación magnética a 30 °C. Tras el tiempo de reacción, se añade al medio de reacción 1.4 mL de GDH (glucosa deshidrogenasa, 10 U), una disolución acuosa de *D*-glucosa 50 mM (1.4 mL), una disolución acuosa de NADPH 10 mM (1.4 mL), una disolución acuosa de NaOH 3M (420 µL) para tratar de ajustar el pH de la mezcla a un valor comprendido entre 7.5 y 8.0, y 80 mg de Ras-ADH. El tubo sellado se cierra, y se somete a agitación orbital (250 rpm), a 30 °C durante 24 horas. Tras ese tiempo, la mezcla de reacción se extrae con AcOEt (3 x 3 mL), se combinan las fases orgánicas y se secan sobre Na₂SO₄ anhidro. Tras filtrarla, la disolución se concentra haciendo pasar N₂ a su a través y se realizan las correspondientes medidas de conversión y de exceso enantiomérico (ver Tabla 9). Para purificar el compuesto se realiza una columna cromatográfica sobre gel de sílice (30% AcOEt/hexano), obteniéndose el compuesto **1a** con un rendimiento del 85%.

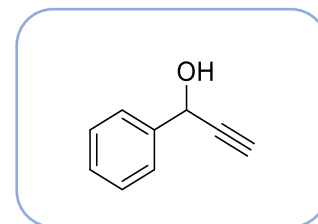
6.3.14 Procedimiento secuencial para la desracemización del alcohol **1a empleando el sistema catalítico lacasa/TEMPO y evo-1.1.200 a escala semipreparativa**

En un tubo de microondas (19 x 130 x 3 mm) abierto al aire, se añade el 1-fenilprop-2-in-1-ol (**1a**, 0.35 mmol), TBME (1.4 mL, 10% v/v) y una disolución reguladora 50 mM de citrato pH 5.0 (14 mL), la cual ha sido oxigenada previamente con un globo de O₂ durante al menos 30 minutos. A continuación, se añade la lacasa de *Trametes versicolor* (48 mg) y el TEMPO (0.3 equivalentes, 0.105 mmol, 16.50 mg). La mezcla se deja reaccionando durante 16

horas, con agitación magnética a 30 °C. Tras el tiempo de reacción, se añade al medio de reacción 788 μL de $i\text{PrOH}$, una disolución acuosa de MgCl_2 10 mM (1.55 mL), una disolución acuosa de NADH 10 mM (1.55 mL), una disolución acuosa de NaOH 3M (420 μL) para tratar de ajustar el pH de la mezcla a un valor comprendido entre 7.5 y 8.0, y 80 mg de evo-1.1.200. El tubo microondas se cierra, y se somete a agitación orbital (250 rpm), a 30 °C durante 24 horas. Tras ese tiempo, la mezcla de reacción se extrae con AcOEt (3 x 3 mL), se combinan las fases orgánicas y se secan sobre Na_2SO_4 anhidro. Tras filtrarla, la disolución se concentra haciendo pasar N_2 a su a través y se realizan las correspondientes medidas de conversión y de exceso enantiomérico (ver Tablas xx, 9, 10 y 11). Para purificar el compuesto se realiza una columna cromatográfica sobre gel de sílice empleando una mezcla 30% AcOEt/hexano como eluyente, obteniéndose el compuesto **1a** con un rendimiento del 83%.

6.4 Caracterización estructural de los compuestos sintetizados

1-Fenilprop-2-in-1-ol (1a)



Aspecto: Líquido amarillo

Formula empírica: C₉H₈O

Peso Molecular: 132.16 g/mol

R_f (30% AcOEt/Hexano): 0.55

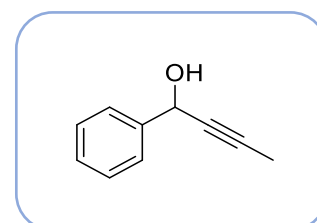
IR (NaCl): ν 3290, 2095 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.59 (*dd*, 2H, *J* = 7.4, 1.8 Hz), 7.47-7.39 (*m*, 3H), 5.46 (*d*, 1H, *J* = 2.3 Hz), 3.82 (*sa*, 1H), 2.73 (*d*, 1H, *J* = 2.3 Hz)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 140.2 (C), 128.7 (2CH), 128.5 (CH), 126.9 (2CH), 83.8 (C), 75.1 (CH), 64.2 (CH).

EMAR (ESI⁺, *m/z*): (C₉H₉O)⁺ (M+H)⁺: calculada 133.0648, encontrada 133.0638

1-Fenilbut-2-in-1-ol (1b)



Aspecto: Sólido amarillento

Formula empírica: C₁₀H₁₀O

Peso Molecular: 146.19 g/mol

R_f (20% AcOEt/Hexano): 0.36

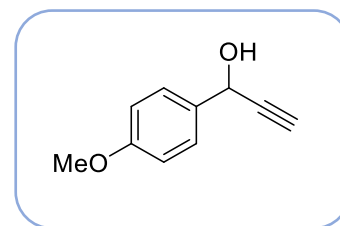
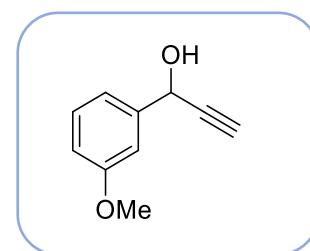
Punto de fusión: 36-37 °C

IR (NaCl): ν 3414, 2226 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.58-7.55 (*m*, 2H), 7.43-7.34 (*m*, 3H), 5.46 (*d*, 1H, *J* = 2.3 Hz), 2.21 (*sa*, 1H), 1.93 (*d*, 3H, *J* = 2.2 Hz)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 141.2 (C), 128.6 (2CH), 128.3 (CH), 126.6 (2CH), 83.1 (C), 79.2 (C), 64.9 (CH), 3.7 (CH₃)

EMAR (ESI⁺, *m/z*): (C₁₀H₉O)⁺ (M+H)⁺: calculada 145.0648, encontrada 146.0670

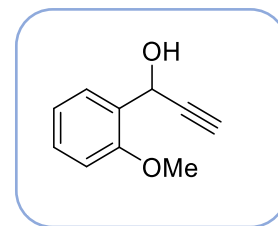
1-(4-Metoxifenil)prop-2-in-1-ol (1c)**Aspecto:** Sólido amarillento**Formula empírica:** C₁₀H₁₀O₂**Peso Molecular:** 162.19 g/mol**R_f** (30% AcOEt/Hexano): 0.42**Punto de fusión:** 172-173 °C**IR** (NaCl): ν 3289, 2091 cm⁻¹**¹H-RMN** (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.52-7.49 (*m*, 2H), 6.96-6.91 (*m*, 2H), 5.44 (*s*, 1H), 3.83 (*s*, 3H), 2.69 (*d*, 1H, *J* = 2.2 Hz), 2.24 (*sa*, 1H)**¹³C-RMN** (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 159.8 (C), 132.4 (C), 128.1 (2CH), 114.0 (2CH), 83.7 (C), 74.7 (CH), 64.1 (CH), 55.4 (CH₃)**EMAR** (ESI⁺, *m/z*): (C₁₀H₁₀NaO₂)⁺ (M+Na)⁺: calculada 185.0573, encontrada 185.0560**1-(3-Metoxifenil)prop-2-in-1-ol (1d)****Aspecto:** Aceite amarillento**Formula empírica:** C₁₀H₁₀O₂**Peso Molecular:** 162.19 g/mol**R_f** (30% AcOEt/Hexano): 0.46**IR** (NaCl): ν 3287, 2091 cm⁻¹**¹H-RMN** (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.31 (*t*, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.14 (*d*, 2H, *J* = 8.2 Hz), 6.89 (*d*, 1H, *J* = 7.1 Hz), 5.43 (*s*, 1H), 3.83 (*s*, 3H), 2.73 (*sa*, 1H), 2.68 (*s*, 1H)**¹³C-RMN** (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 156.7 (C), 129.8 (C), 128.4 (CH), 127.8 (CH), 120.9 (CH), 111.0 (CH), 83.5 (C), 74.1 (CH), 60.5 (CH), 55.6 (CH₃)**EMAR** (ESI⁺, *m/z*): (C₁₀H₁₁O₂)⁺ (M+H)⁺: calculada 163.0754, encontrada 163.0736

1-(2-Metoxifenil)prop-2-in-1-ol (1e)**Aspecto:** Aceite amarillento**Formula empírica:** C₁₀H₁₀O₂**Peso Molecular:** 162.19 g/mol**R_f** (30% AcOEt/Hexano): 0.49**IR** (NaCl): ν 3287, 2091 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.60 (*dd*, 1H, *J* = 7.5, 1.7 Hz), 7.33 (*td*, 1H, *J* = 7.9, 1.7 Hz), 7.00 (*td*, 1H, *J* = 7.5, 1.0 Hz), 6.91 (*dd*, 1H, *J* = 8.2, 1.0 Hz), 5.74 (*d*, 1H, *J* = 2.3 Hz), 3.85 (*s*, 3H), 3.46 (*sa*, 1H), 2.64 (*d*, 1H, *J* = 2.3 Hz)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 156.7 (C), 129.8 (CH), 128.4 (C), 127.8 (CH), 120.9 (CH), 111.0 (CH), 83.5 (C), 74.1 (CH), 60.5 (CH), 55.6 (CH₃)

EMAR (ESI⁺, *m/z*): (C₁₀H₁₀NaO₂)⁺ (M+Na)⁺: calculada 185.0573, encontrada 185.0567

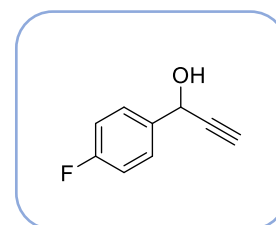
**1-(4-Fluorofenil)prop-2-in-1-ol (1f)****Aspecto:** Líquido amarillo**Formula empírica:** C₉H₇FO**Peso Molecular:** 150.15 g/mol**R_f** (30% AcOEt/Hexano): 0.54**IR** (NaCl): ν 3299, 2094 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.5-7.53 (*m*, 2H), 7.12-7.06 (*m*, 2H), 5.47 (*d*, 1H, *J* = 2.5 Hz), 2.71 (*s*, 1H), 2.19 (*sa*, 1H)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 162.7 (*d*, C, *J* = 247.5 Hz), 135.8 (C), 128.5 (*d*, CH, *J* = 8.25 Hz), 115.5 (*d*, CH, *J* = 21.75), 83.3 (C), 75.1 (CH), 63.7 (CH)

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ -131.51

EMAR (ESI⁺, *m/z*): (C₉H₈FO)⁺ (M+H)⁺: calculada 151.0543, encontrada 151.0540



1-(3-Fluorofenil)prop-2-in-1-ol (1g)

Aspecto: Aceite oscuro

Formula empírica: C₉H₇FO

Peso Molecular: 150.15 g/mol

R_f (20% AcOEt/Hexano): 0.47

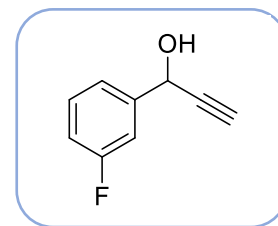
IR (NaCl): ν 3299, 2097 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.39-7.28 (*m*, 3H), 7.08-7.02 (*m*, 1H), 5.48 (*d*, 1H, *J* = 2.1 Hz), 2.71 (*d*, 1H, *J* = 2.3 Hz), 2.30 (*sa*, 1H)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 160.8 (*d*, C, *J* = 247.5), 140.5 (*d*, C, *J* = 7.5 Hz), 128.2 (CH), 120.2 (*d*, CH, *J* = 3 Hz), 113.4 (*d*, CH, *J* = 21 Hz), 111.7 (*d*, CH, *J* = 22.5 Hz), 81.0 (C), 73.2 (CH), 61.6 (CH)

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ -112.44

EMAR (ESI⁺, *m/z*): (C₉H₈FO)⁺ (M+H)⁺: calculada 151.0554, encontrada 151.0540



1-(4-Clorofenil)prop-2-in-1-ol (1h)

Aspecto: Sólido amarillento

Formula empírica: C₉H₇ClO

Peso Molecular: 166.60 g/mol

R_f (20% AcOEt/Hexano): 0.59

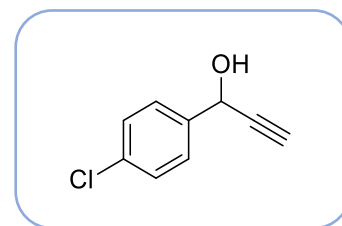
Punto de fusión: 47-48 °C

IR (NaCl): ν 3289, 2099 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.47-7.42 (*m*, 2H), 7.37-7.32 (*m*, 2H), 5.39 (*d*, 1H, *J* = 2.3 Hz), 3.37 (*sa*, 1H), 2.69 (*d*, 1H, *J* = 2.3 Hz)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 138.4 (C), 134.3 (C), 128.8 (2CH), 128.1 (2CH), 83.1 (C), 75.3 (CH), 63.5 (CH)

EMAR (ESI⁺, *m/z*): (C₉H₇ClNaO)⁺ (M+Na)⁺: calculada 189.0078, encontrada 189.0069



1-(2-Bromo-5-fluorofenil)prop-2-in-1-ol (Ii)

Aspecto: Sólido blanquecino

Formula empírica: C₉H₆BrFO

Peso Molecular: 229.05 g/mol

R_f (30% AcOEt/Hexano): 0.58

Punto de fusión: 24-25 °C

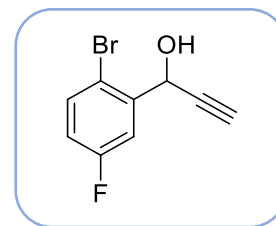
IR (NaCl): ν 3281, 2093 cm⁻¹

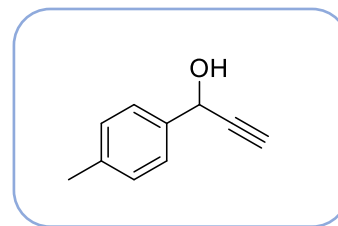
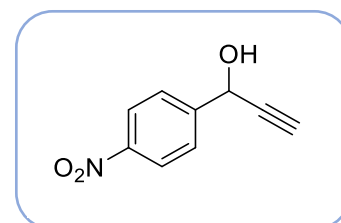
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.57-7.52 (*m*, 2H), 6.97 (*ddd*, 1H, *J* = 8.8, 7.8, 3.1 Hz), 5.76 (*s*, 1H), 2.70 (*s*, 1H), 2.61 (*sa*, 1H)

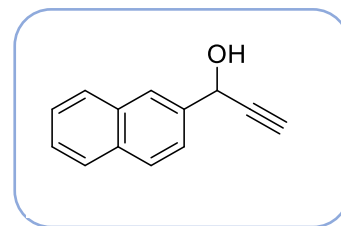
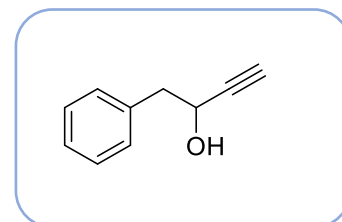
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 162.2 (*d*, C, *J* = 242.25 Hz), 141.0 (*d*, C, *J* = 6.75), 134.2 (*d*, CH, *J* = 7.5 Hz), 117.2 (*d*, CH, *J* = 22.5 Hz), 116.4 (*d*, CH, *J* = 3.75 Hz), 115.7 (*d*, CH, *J* = 24.75 Hz), 81.8 (C), 75.3 (CH), 63.7 (CH)

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ -113.15

EMAR (ESI⁺, *m/z*): (C₉H₆BrFNaO)⁺ [M(⁷⁹Br)+Na]⁺: calculada 250.9478, encontrada 250.9467



1-(*p*-Tolil)prop-2-in-1-ol (1j)**Aspecto:** Sólido anaranjado**Formula empírica:** C₁₀H₁₀O**Peso Molecular:** 146.19 g/mol**R_f** (20% AcOEt/Hexano): 0.47**Punto de fusión:** 28-29 °C**IR** (NaCl): ν 3268, 2098 cm⁻¹**¹H-RMN** (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.48-7.44 (*m*, 2H), 7.22 (*d*, 2H, *J* = 7.9 Hz), 5.46 (*d*, 1H, *J* = 2.2 Hz) 2.68 (*d*, 1H, *J* = 2.2 Hz), 2.39 (*s*, 3H), 1.98 (*sa*, 1H)**¹³C-RMN** (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 138.5 (C), 137.2 (C), 129.4 (2CH), 126.6 (2CH) 83.6 (C), 74.6 (CH), 64.3 (CH), 21.2 (CH₃)**EMAR** (ESI⁺, *m/z*): (C₁₀H₁₁O)⁺ (M+H)⁺: calculada 147.0804, encontrada 147.0797**1-(4-Nitrofenil)prop-2-in-1-ol (1k)****Aspecto:** Sólido amarillento**Formula empírica:** C₉H₇NO₃**Peso Molecular:** 177.04 g/mol**R_f** (30% AcOEt/Hexano): 0.36**Punto de fusión:** 61-63 °C**IR** (NaCl): ν 3263, 2098 cm⁻¹**¹H-RMN** (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 8.29-8.25 (*m*, 2H), 7.76 (*d*, 2H, *J* = 8.5 Hz) 5.60 (*s*, 1H), 2.76 (*d*, 1H, *J* = 2.3 Hz), 2.48 (*sa*, 1H)**¹³C-RMN** (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 147.9 (C), 146.6 (C), 127.4 (2CH), 123.8 (2CH), 82.3 (C), 76.0 (CH), 63.3 (CH)**EMAR** (ESI⁺, *m/z*): (C₉H₈NO₃)⁺ (M+H)⁺: calculada 178.0499, encontrada 178.0485

1-Naftalen-2-il-prop-2-in-1-ol (1l)**Aspecto:** Sólido amarillento**Formula empírica:** C₁₃H₁₀O**Peso Molecular:** 182.22 g/mol**R_f** (30% AcOEt/Hexano): 0.47**Punto de fusión:** 53-54 °C**IR** (NaCl): ν 3267, 2091 cm⁻¹**¹H-RMN** (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 8.03 (*s*, 1H), 7.92-7.85 (*m*, 3H), 7.68 (*dd*, 1H, *J* = 8.5, 1.8 Hz), 7.56-7.50 (*m*, 2H), 5.67 (*d*, 1H, *J* = 2.1 Hz), 2.76 (*d*, 1H, *J* = 2.2 Hz), 1.67 (*sa*, 1H)**¹³C-RMN** (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 137.3 (C), 133.3 (C), 133.1 (C), 128.7 (CH), 128.21 (CH), 127.7 (CH), 126.4 (CH), 126.4 (CH), 125.5 (CH), 124.4 (CH), 83.4 (C), 75.1 (CH), 64.6 (CH)**EMAR** (ESI⁺, *m/z*): (C₁₃H₁₀NaO)⁺ (M+Na)⁺: calculada 205.0624, encontrada 205.0617**1-Fenilbut-3-in-2-ol (1m)****Aspecto:** Líquido amarronado**Formula empírica:** C₁₀H₁₀O**Peso Molecular:** 146.19 g/mol**R_f** (40% AcOEt/Hexano): 0.46**IR** (NaCl): ν 3290, 2089 cm⁻¹**¹H-RMN** (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.39-7.28 (*m*, 5H), 4.75-4.47 (*m*, 1H), 3.05 (*d*, 2H, *J* = 6.0 Hz), 2.52 (*d*, 1H, *J* = 2.2 Hz), 2.27 (*sa*, 1H)**¹³C-RMN** (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 137.3 (C), 130.9 (2CH), 129.6 (2CH), 128.1 (CH), 85.2 (C), 75.0 (CH), 64.1 (CH), 45.0 (CH₂)**EMAR** (ESI⁺, *m/z*): (C₁₀H₁₁O)⁺ (M+H)⁺: calculada 147.0804, encontrada 147.0797

1-Fenilprop-2-in-1-ona (2a)

Aspecto: Sólido amarillento

Formula empírica: C₉H₆O

Peso Molecular: 130.15 g/mol

R_f (30% AcOEt/Hexano): 0.73

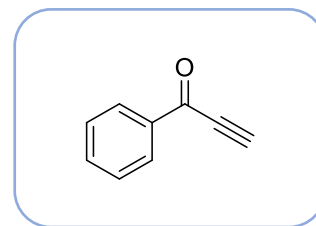
Punto de fusión: 50-51 °C

IR (NaCl): ν 2094, 1662 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 8.18 (*d*, 2H, *J* = 7.6 Hz), 7.68-7.50 (*m*, 3H), 3.46 (*s*, 1H)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 175.5 (C), 134.2 (C), 132.6 (CH), 127.8 (2CH), 126.8 (2CH), 78.9 (CH), 78.4 (C)

EMAR (ESI⁺, *m/z*): (C₉H₇O)⁺ (M+H)⁺: calculada 131.0491, encontrada 131.0485



1-Fenilbut-2-in-1-ona (2b)

Aspecto: Líquido amarillento

Formula empírica: C₁₀H₈O

Peso Molecular: 144.17 g/mol

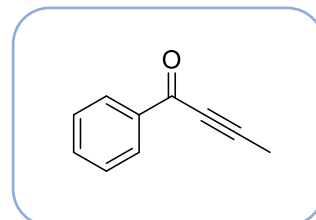
R_f (20% AcOEt/Hexano): 0.51

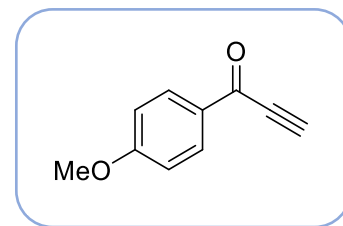
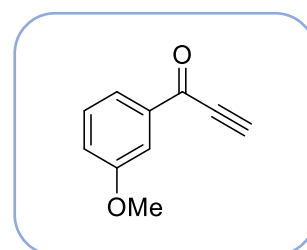
IR (NaCl): ν 2204, 1642 cm⁻¹

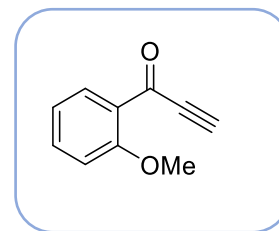
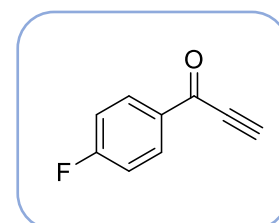
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 8.14 (*d*, 2H, *J* = 7.1 Hz), 7.60-7.45 (*m*, 3H), 2.15 (*s*, 3H)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 178.2 (C), 136.8 (C), 133.9 (CH), 129.6 (2CH), 128.5 (2CH), 92.5 (C), 79.0 (C), 4.3 (CH₃)

EMAR (ESI⁺, *m/z*): (C₁₀H₉O)⁺ (M+H)⁺: calculada 145.0648, encontrada 145.0643



1-(4-Metoxifenil)prop-2-in-1-ona (2c)**Aspecto:** Sólido amarillento**Formula empírica:** C₁₀H₈O₂**Peso Molecular:** 160.17 g/mol**R_f** (30% AcOEt/Hexano): 0.63**Punto de fusión:** 82-83 °C**IR** (NaCl): ν 2091, 1650 cm⁻¹**¹H-RMN** (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 8.18-8.14 (*m*, 2H), 7.01-6.96 (*m*, 2H), 3.92 (*s*, 3H), 3.40 (*s*, 1H)**¹³C-RMN** (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 173.5 (C), 164.8 (C), 144.9 (C), 132.2 (2CH), 114.0 (2CH), 80.4 (C), 80.0 (CH), 55.6 (CH₃)**EMAR** (ESI⁺, *m/z*): (C₁₀H₈NaO₂)⁺ (M+Na)⁺: calculada 183.0417, encontrada 183.0420**1-(3-Metoxifenil)prop-2-in-1-ona (2d)****Aspecto:** Aceite amarillento**Formula empírica:** C₁₀H₈O₂**Peso Molecular:** 160.17 g/mol**R_f** (30% AcOEt/Hexano): 0.68**IR** (NaCl): ν 2091, 1652 cm⁻¹**¹H-RMN** (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 8.09 (*dd*, 1H, *J* = 7.8, 1.8 Hz), 7.57 (*ddd*, 1H, *J* = 8.5, 7.4, 1.8 Hz), 7.08-7.01 (*m*, 2H), 3.95 (*s*, 3H), 3.39 (*s*, 1H)**¹³C-RMN** (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 176.0 (C), 160.1 (C), 135.5 (CH), 133.2 (CH), 125.8 (C), 120.3 (CH), 112.2 (CH), 82.2 (C), 79.3 (CH), 55.9 (CH₃)**EMAR** (ESI⁺, *m/z*): (C₁₀H₉O₂)⁺ (M+H)⁺: calculada 161.0597, encontrada 161.0598

1-(2-Metoxifenil)prop-2-in-1-ona (2e)**Aspecto:** Aceite amarillento**Formula empírica:** C₁₀H₈O₂**Peso Molecular:** 160.17 g/mol**R_f** (30% AcOEt/Hexano): 0.68**IR** (NaCl): ν 2091, 1655 cm⁻¹**¹H-RMN** (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 8.05 (*dd*, 1H, *J* = 7.8, 1.8 Hz), 7.54 (*ddd*, 1H, *J* = 8.3, 7.4, 1.8 Hz), 7.05-6.98 (*m*, 2H), 3.92 (*s*, 3H), 3.41 (*s*, 1H)**¹³C-RMN** (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 176.0 (C), 160.0 (C), 135.5 (CH), 133.2 (CH), 125.8 (C), 120.3 (CH), 112.3 (CH), 82.2 (C), 79.5 (CH), 55.8 (CH₃)**EMAR** (ESI⁺, *m/z*): (C₁₀H₉O₂)⁺ (M+H)⁺: calculada 161.0597, encontrada 161.0598**1-(4-Fluorofenil)prop-2-in-1-ona (2f)****Aspecto:** Sólido amarillento**Formula empírica:** C₉H₅FO**Peso Molecular:** 148.14 g/mol**R_f** (30% AcOEt/Hexano): 0.69**Punto de fusión:** 53-54 °C**IR** (NaCl): ν 2094, 1653 cm⁻¹**¹H-RMN** (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 8.19-8.13 (*m*, 2H), 7.18-7.11 (*m*, 2H), 3.51 (*s*, 1H)**¹³C-RMN** (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 175.7 (C), 166.6 (*d*, *J* = 255.7 Hz), 132.6 (*d*, *J* = 2.25 Hz), 132.4 (*d*, *J* = 10.0 Hz), 115.9 (*d*, *J* = 21.75 Hz), 81.2 (CH), 80.0 (C)**¹⁹F-RMN** (282 MHz, CDCl₃): δ -102.35**EMAR** (ESI⁺, *m/z*): (C₉H₆FO)⁺ (M+H)⁺: calculada 149.0397, encontrada 149.0390

1-(3-Fluorofenil)prop-2-in-1-ona (2g)

Aspecto: Sólido marrón

Formula empírica: C₉H₅FO

Peso Molecular: 148.14 g/mol

R_f (20% AcOEt/Hexano): 0.61

Punto de fusión: 56-57 °C

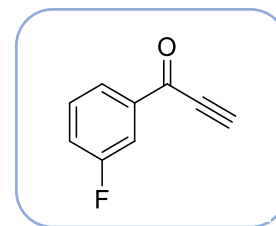
IR (NaCl): ν 2097, 1664 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 8.00-7.79 (*m*, 2H), 7.53-7.30 (*m*, 2H), 3.50 (*s*, 1H)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 176.0 (C), 162.7 (*s*, *J* = 248.25 Hz), 138.1 (CH), 130.4 (*d*, CH, *J* = 7.5 Hz), 125.6 (CH), 121.6 (*d*, CH, *J* = 21.75 Hz), 115.9 (*d*, CH, *J* = 22.5 Hz), 81.4 (CH), 79.8 (C)

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ -111.53

EMAR (ESI⁺, *m/z*): (C₉H₅FO)⁺ (M+H)⁺: calculada 149.0397, encontrada 149.0393



1-(4-Clorofenil)prop-2-in-1-ona (2h)

Aspecto: Sólido amarillento

Formula empírica: C₉H₅ClO

Peso Molecular: 164.59 g/mol

R_f (20% AcOEt/Hexano): 0.74

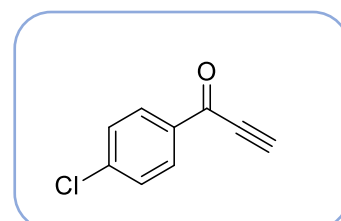
Punto de fusión: 100-102 °C

IR (NaCl): ν 2099, 1639 cm⁻¹

¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 8.13-8.09 (*m*, 2H), 7.52-7.47 (*m*, 2H), 3.49 (*s*, 1H)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 176.1 (C), 141.2 (C), 134.5 (C), 131.0 (2CH), 129.1 (2CH), 81.3 (CH), 79.9 (C)

EMAR (ESI⁺, *m/z*): (C₉H₅ClO)⁺ (M+H)⁺: calculada 165.0102, encontrada 165.0096



1-(2-Bromo-5-fluorofenil)prop-2-in-1-ona (2i)

Aspecto: Líquido amarillo

Formula empírica: C₉H₄BrFO

Peso Molecular: 227.03 g/mol

R_f (30% AcOEt/Hexano): 0.71

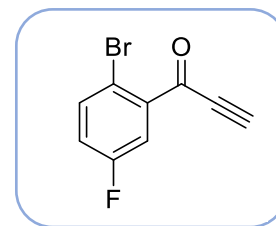
IR (NaCl): ν 2093, 1658 cm⁻¹

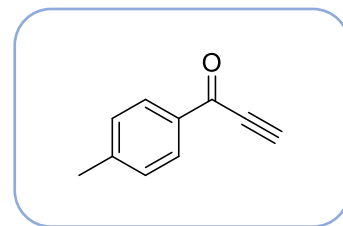
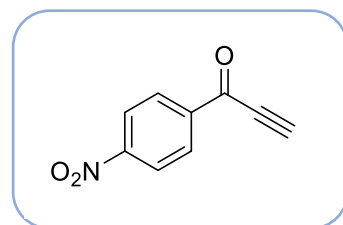
¹H-RMN (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.81 (*dd*, 1H, *J* = 8.7, 3.1 Hz), 7.67 (*dd*, 1H, *J* = 8.8, 5.0 Hz), 7.15 (*ddd*, 1H, *J* = 8.8, 7.4, 3.1 Hz), 3.57 (*s*, 1H)

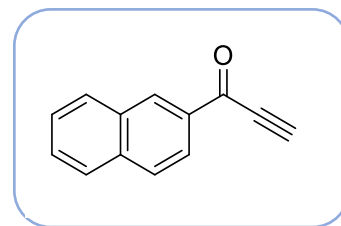
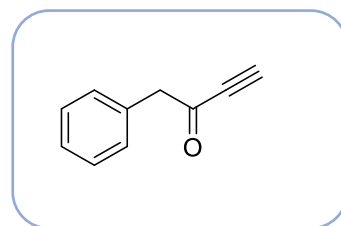
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 175.1 (C), 161.3 (*d*, C, *J* = 248.25 Hz), 137.2 (*d*, *J* = 6.75 Hz), 136.6 (*d*, *J* = 6.75 Hz), 121.2 (*d*, *J* = 22.5 Hz), 120.3 (*d*, *J* = 24.75 Hz), 115.6 (*d*, *J* = 3.75 Hz), 82.3 (CH), 80.4 (C)

¹⁹F-RMN (282 MHz, CDCl₃): δ -113.08

EMAR (ESI⁺, *m/z*): (C₉H₅BrFO)⁺ [M(⁷⁹Br)+H]⁺: calculada 226.9502, encontrada 226.9500



1-(*p*-Tolil)prop-2-in-1-ona (2j)**Aspecto:** Sólido anaranjado**Formula empírica:** C₁₀H₈O**Peso Molecular:** 144.17 g/mol**R_f** (20% AcOEt/Hexano): 0.68**Punto de fusión:** 38-39 °C**IR** (NaCl): ν 2098, 1657 cm⁻¹**¹H-RMN** (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 8.08-8.05 (*m*, 2H), 7.30 (*d*, 2H, *J* = 8.3 Hz), 3.44 (*s*, 1H), 2.45 (*s*, 3H)**¹³C-RMN** (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 177.0 (C), 145.7 (C), 133.9 (C), 129.8 (2CH), 129.4 (2CH), 80.4 (CH), 76.8 (C), 21.8 (CH₃)**EMAR** (ESI⁺, *m/z*): (C₁₀H₉O)⁺ (M+H)⁺: calculada 145.0648, encontrada 145.0655**1-(4-Nitrofenil)prop-2-in-1-ona (2k)****Aspecto:** Sólido blanquecino**Formula empírica:** C₉H₅NO₃**Peso Molecular:** 175.14 g/mol**R_f** (30% AcOEt/Hexano): 0.49**Punto de fusión:** 129-130 °C**IR** (NaCl): ν 2098, 1659 cm⁻¹**¹H-RMN** (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 8.40-8.33 (*m*, 4H), 3.63 (*s*, 1H)**¹³C-RMN** (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 175.4 (C), 151.1 (C), 140.1 (C), 130.6 (2CH), 123.9 (2CH), 82.8 (CH), 79.7 (C)**EMAR** (ESI⁺, *m/z*): (C₉H₆NO₃)⁺ (M+H)⁺: calculada 176.0342, encontrada 176.0338

1-Naftalen-2-il-prop-2-in-1-ona (2l)**Aspecto:** Sólido amarillento**Formula empírica:** C₁₃H₈O**Peso Molecular:** 180.21 g/mol**R_f** (30% AcOEt/Hexano): 0.62**Punto de fusión:** 102-103 °C**IR** (NaCl): ν 2091, 1638 cm⁻¹**¹H-RMN** (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 8.74 (*s*, 1H), 8.14 (*dd*, 1H, *J* = 8.7, 1.7 Hz), 8.00 (*d*, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.89 (*d*, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.68-7.54 (*m*, 2H), 3.55 (*s*, 1H)**¹³C-RMN** (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 177.3 (C), 136.3 (C), 133.7 (C), 133.4 (CH), 132.3 (CH), 130.0 (CH), 129.3 (CH), 128.7 (CH), 128.0 (CH), 127.1 (CH), 123.6 (CH), 80.9 (CH), 80.5 (C)**EMAR** (ESI⁺, *m/z*): (C₁₃H₉O)⁺ (M+H)⁺: calculada 181.0648, encontrada 181.0655**1-Fenilbut-3-in-2-ona (2m)****Aspecto:** Líquido amarronado**Formula empírica:** C₁₀H₈O**Peso Molecular:** 144.17 g/mol**R_f** (40% AcOEt/Hexano): 0.70**IR** (NaCl): ν 2095, 1653 cm⁻¹**¹H-RMN** (CDCl₃, 300.13 MHz): δ 7.41-7.29 (*m*, 5H), 3.89 (*s*, 2H), 3.25 (*s*, 1H)**¹³C-RMN** (CDCl₃, 75.5 MHz): δ 184.4 (C), 129.9 (2CH), 129.8 (2CH), 128.8 (C), 127.6 (CH), 80.1 (CH), 77.2 (C), 52.0 (CH₂)

Apéndice de espectros RMN

