



Departamento de Química Orgánica e Inorgánica  
Máster Universitario en Química y Desarrollo Sostenible

**APLICACIÓN DE TRANSAMINASAS A PROCESOS DE  
DESHALOGENACIÓN DE CETONAS EN POSICIÓN  $\alpha$**

*Trabajo Fin de Máster*

*Julio 2016*

**Marina García Ramos**



**MARINA GARCÍA RAMOS**, estudiante del Máster Universitario “Química y Desarrollo Sostenible”, organizado por el Centro Internacional de Postgrado de la Universidad de Oviedo

## **PRESENTA**

El trabajo titulado “**Aplicación de transaminasas a procesos de deshalogenación de cetonas halogenadas en posición  $\alpha$** ”, que ha sido realizado en el Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo.

Este trabajo de investigación se ha llevado a cabo bajo la tutela del Profesor Titular Miguel Ferrero Fuertes, y la supervisión del Profesor Contratado Doctor Iván Lavandera García, ambos miembros del Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo, los cuales autorizan su presentación para que sea calificado como Proyecto Fin de Máster.

Oviedo, 7 de Julio de 2016

Firmado por:

Iván Lavandera García

Miguel Ferrero Fuertes

Marina García Ramos



## **ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**



<b>AADH</b>	Alanina deshidrogenasa
<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>Ala</b>	Alanina
<b>ArR-TA</b>	Transaminasa de <i>Arthrobacter</i> sp.
<b>Asp</b>	Ácido aspártico
<b>ATs</b>	Aminotransferasas
<b><math>\alpha</math>-TAs</b>	$\alpha$ -Transaminasas
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>CG</b>	Cromatografía de gases
<b>conv</b>	Conversión
<b>CV-TA</b>	Transaminasa de <i>Chromobacterium violaceum</i>
<b>d</b>	Doblete
<b>dd</b>	Doble doblete
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EC</b>	Enzyme Commission (Comisión Enzimática)
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b><i>ee</i></b>	Exceso enantiomérico
<b>E-Factor</b>	Factor medioambiental (environmental factor)
<b>equiv.</b>	Equivalente
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>g</b>	Gramos
<b>GABA-AT</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico aminotransferasa
<b>Glu</b>	Ácido glutámico
<b>h</b>	Horas
<b>Hz</b>	Hertzios
<b><sup>i</sup>PrNH<sub>2</sub></b>	Isopropilamina

<b><sup>i</sup>PrOH</b>	Isopropanol
<b>IPTG</b>	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamiento
<b>Kg</b>	Kilogramos
<b>KPi</b>	Fosfato
<b>L</b>	Litros
<b>LB</b>	Medio Luria Broth
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>Lys</b>	Lisina
<b>m</b>	Multiplete
<b><i>m</i></b>	<i>meta</i>
<b>MeCN</b>	Acetonitrilo
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mg</b>	Miligramos
<b>MHz</b>	Megahertzios
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>μL</b>	Microlitros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mmol</b>	Milimoles
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>μM</b>	Micromolar
<b>NAD</b>	Dinucleótido de nicotinamida adenina (Nicotinamide adenine dinucleotide)
<b>NADH</b>	Dinucleótido de nicotinamida adenina reducido (Nicotinamide adenine dinucleotide reduced)
<b>NH<sub>4</sub>OAc</b>	Acetato de amonio

<b>OMe</b>	Metoxi
<i>p</i>	<i>para</i>
<b>PDC</b>	Piruvato descarboxilasa
<b>Ph</b>	Fenilo
<b>pK<sub>a</sub></b>	Logaritmo de la constante de disociación ácida
<b>PLP</b>	Piridoxal 5'-fosfato
<b>PMP</b>	Piridoxamina 5'-fosfato
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>Pyr</b>	Sistema del anillo del PLP
<b>q</b>	Cuatriplete
<b>Rdto</b>	Rendimiento
<b>R<sub>f</sub></b>	Factor de retención
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>s</b>	Singulete
<b>t</b>	Triplete
<b>T</b>	Temperatura
<b>TA</b>	Transaminasa
<b>t. a.</b>	Temperatura ambiente
<b>TLC</b>	Cromatografía de capa fina (thin layer chromatography)
<b>t<sub>R</sub></b>	Tiempo de retención
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>v/v</b>	Relación volumen/volumen
<b>δ</b>	Desplazamiento químico
<b>λ</b>	Longitud de onda



## **ÍNDICE**



<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>I.1. BIOCATÁLISIS</b> .....	<b>3</b>
<b>I.1.1. Introducción</b> .....	<b>4</b>
<b>I.1.2. El papel de la Biocatálisis en la ‘Química Sostenible’</b> .....	<b>6</b>
<b>I.1.3. Empleo de enzimas sobreexpresados</b> .....	<b>8</b>
<b>I.1.4. Clasificación enzimática</b> .....	<b>9</b>
<b>I.1.5. Promiscuidad catalítica</b> .....	<b>10</b>
<b>I.2. IMPORTANCIA DE LOS COMPUESTOS FLUORADOS</b> .....	<b>11</b>
<b>I.2.1. Ejemplos relevantes de compuestos fluorados como fármacos</b> .....	<b>12</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>15</b>
<b>A.1. TRANSFERASAS</b> .....	<b>17</b>
<b>A.1.1. Transaminasas</b> .....	<b>17</b>
<b>A.1.2. Sistemas de regeneración del cofactor y desplazamiento del equilibrio en reacciones de transaminación</b> .....	<b>22</b>
<b>A.2. EMPLEO DE TRANSAMINASAS CON COMPUESTOS FLUORADOS</b> .....	<b>25</b>
<b>A.3. COMPUESTOS FLUORADOS COMO INHIBIDORES DE TAs</b> .....	<b>27</b>
<b>A.4. APLICACIÓN SINTÉTICA DE LA REACCIÓN DE HIDRODESFLUORACIÓN EMPLEANDO TAs</b> .....	<b>31</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>37</b>
<b>R.1. SÍNTESIS DE SUSTRATOS Y PRODUCTOS</b> .....	<b>40</b>

R.1.1. Síntesis química de las $\alpha$ -fluoroacetofenonas de partida .....	40
R.1.2. Síntesis química de las 1-ariletanaminas 2a-f .....	41
<b>R.2. PRUEBAS ENZIMÁTICAS.....</b>	<b>41</b>
R.2.1. Reacción de la 2-fluoroacetofenona (4a) en presencia de las TAs comerciales con isopropilamina como donador de amino .....	41
R.2.2. Mecanismo de hidrodeshalogenación e inhibición con las $\alpha$ -fluoroacetofenonas.. ....	43
R.2.3. Estudio del efecto del cofactor en la reacción de hidrodeshalogenación sobre 4a y 4d.....	44
R.2.4. Estudio del efecto de la concentración y el tipo de donador de amino en la reacción de hidrodeshalogenación de 4a y 4d .....	46
R.2.5. Hidrodeshalogenación de 4a y 4d empleando CV-TA y ArR-TA a concentraciones superiores del donador de amino .....	47
R.2.6. Reacción de hidrodeshalogenación sobre las $\alpha$ -fluoroacetofenonas 4a-f utilizando la CV-TA e isopropilamina o L-alanina como donador de amino.....	49
R.2.7. Estudio de la reacción de hidrodeshalogenación utilizando la CV-TA con la 2-bromoacetofenona y la 2-cloroacetofenona.....	51
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>53</b>
<b>PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>57</b>
<b>E.1. REACTIVOS Y DISOLVENTES GENERALES .....</b>	<b>59</b>
<b>E.2. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS .....</b>	<b>60</b>
E.2.1. Cromatografía en gel de sílice.....	60
E.2.2. Resonancia magnética nuclear (RMN) .....	60
<b>E.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES .....</b>	<b>61</b>
E.3.1. Síntesis química de las cetonas fluoradas 4a-f.....	61
E.3.2. Síntesis química de las 1-ariletanaminas 2a-f.....	61

E.3.3. Estudio del tipo de cofactor en las reacciones de las $\alpha$ -fluorocetonas 4a y 4d en presencia de las transaminasas.....	62
E.3.4. Reacción de las $\alpha$ -fluorocetonas 4a y 4d con transaminasas empleando distintas concentraciones de dador de amino .....	62
E.3.5. Reacción de deshalogenación de las $\alpha$ -fluorocetonas usando transaminasas .....	63
E.3.6. Reacción de deshalogenación utilizando $\alpha$ -bromoacetofenona y $\alpha$ -cloroacetofenona en presencia de transaminasas .....	63
E.4. MÉTODOS ANALÍTICOS .....	64
E.5. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS.....	66
ESPECTROS DE RMN .....	79
REFERENCIAS .....	99



## **INTRODUCCIÓN**



La catálisis es uno de los campos de investigación más activos en Química hoy en día, y continuará siéndolo debido a que con su uso se pueden obtener compuestos de interés de manera mucho más racional, medioambientalmente más benigna y viable, tanto económica como energéticamente. Así, muchas de las reacciones catalíticas utilizadas hoy en día por los químicos orgánicos sintéticos eran casi impensables solo quince años atrás. De hecho, el empleo de catalizadores heterogéneos u homogéneos se encuentra en continua evolución. Como regla general, un catalizador efectivo debe proporcionar reacciones rápidas, altamente selectivas y susceptibles de ser escaladas. Sin embargo, puesto que las leyes son cada vez más restrictivas con respecto al impacto de los procesos químicos sobre el medioambiente, se debe tener muy en cuenta la fuente de dichos catalizadores así como la de los reactivos y disolventes que forman parte del proceso químico.<sup>1</sup>

## I.1. BIOCATÁLISIS

Dentro de los diferentes tipos de catálisis empleados generalmente en procesos a gran escala, debe reseñarse la Biocatálisis, disciplina que hace referencia al uso de enzimas aislados o a complejos multienzimáticos aplicados como catalizadores en reacciones químicas. Los enzimas o biocatalizadores son proteínas que aumentan la velocidad de diversos procesos químicos sin consumirse ni desplazar el equilibrio químico del mismo. Dado que son capaces de operar en condiciones suaves de reacción, los procesos en los que se ven implicados son menos agresivos con el medioambiente, pudiendo encuadrarse dentro de la denominada ‘Química verde’ o ‘Química sostenible’.<sup>2</sup> Su modo de acción suele ser muy específico, y tradicionalmente se han clasificado en seis grandes grupos de acuerdo con el tipo de reacción que catalizan,<sup>3</sup> si

---

<sup>1</sup> A. Mitchinson, J. Finkelstein, *Nature* **2008**, *455*, 303.

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

<sup>3</sup> K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6<sup>a</sup> Ed., Springer, Berlin, **2011**.

bien en los últimos años se ha descubierto que algunas enzimas muestran una inusual ‘promiscuidad catalítica’, que se define como la capacidad de un biocatalizador para llevar a cabo procesos distintos a su función natural.<sup>4</sup>

### I.1.1. Introducción

Pese a que este tipo de biotransformaciones han sido aprovechadas por el hombre desde tiempos pretéritos, no es hasta entrado el siglo XIX cuando comienzan a estudiarse desde un punto de vista más riguroso. Ya en el siglo XX, más concretamente en 1985, se descubre que algunas enzimas son capaces de llevar a cabo transformaciones en medios no acuosos,<sup>5</sup> lo que supone una auténtica revolución desde un punto de vista sintético debido a las ventajas de la utilización de disolventes orgánicos, pues permite, entre otras cosas, una mayor solubilidad de los compuestos orgánicos hidrofóbicos, una recuperación más sencilla de los productos finales de reacción, y el desarrollo de procesos sintéticos de deshidratación o esterificación frente a otros indeseados de hidrólisis o racemización.

Este descubrimiento, sumado al avance exponencial de disciplinas como la Biología, la Bioquímica o la Ingeniería Genética ha permitido grandes avances en la Biocatálisis.<sup>6</sup> La aplicación de técnicas de ADN recombinante ha permitido modificar la cadena de aminoácidos de los enzimas, haciendo que los procesos que catalizan sean más eficientes y se puedan minimizar las limitaciones que presentan en relación a su estabilidad y selectividad.<sup>7</sup> Esto ha dado lugar a un gran incremento en el número de publicaciones científicas de primer nivel que hacen referencia a esta disciplina (Figura 1).

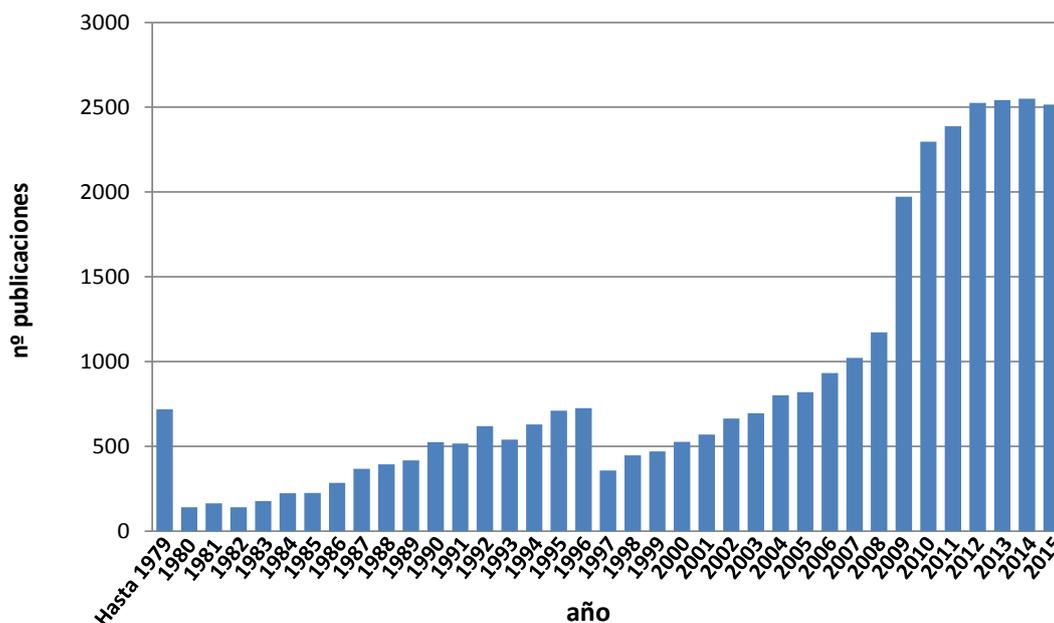
---

<sup>4</sup> (a) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 1695-1733; (b) M. S. Humble, P. Berglund, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3391-3401; (c) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 4504-4523; (d) K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, 25, 232-238; (e) R. J. Kazlauskas, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, 9, 195-201.

<sup>5</sup> A. Zaks, A. M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 3192-3196.

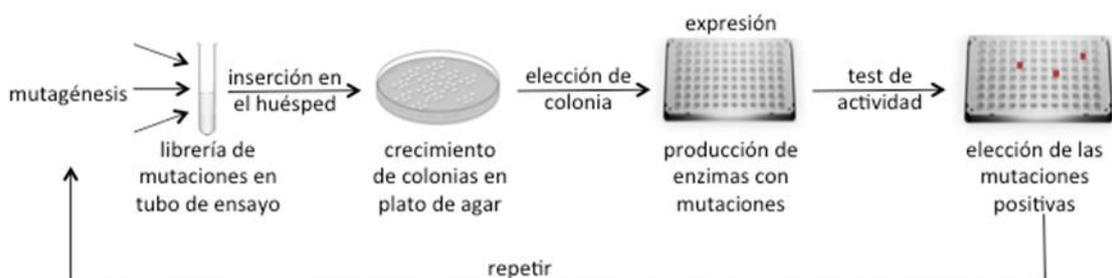
<sup>6</sup> U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, 485, 185-194.

<sup>7</sup> Revisiones: (a) T. Davids, M. Schidt, D. Böttcher, U. T. Bornscheuer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, 17, 215-220; (b) U. T. Bornscheuer, *Synlett* **2013**, 24, 150-156; (c) M. B. Quin, C. Schmidt-Dannert, *ACS Catal.* **2011**, 1, 1017-1021; (d) G. A. Behrens, A. Hummel, S. K. Padhi, S. Schätzle, U. T. Bornscheuer, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 2191-2215.



**Figura 1.** Número de publicaciones obtenidas en la base de datos Scifinder (<https://scifinder.cas.org/>) al introducir en la búsqueda el término ‘Biocatálisis’.

Una de las técnicas más empleadas para modificar un biocatalizador es la evolución dirigida (Esquema 1).<sup>8</sup> Esta consiste en generar de forma aleatoria un conjunto extenso (librería) de enzimas modificados en uno o varios residuos de aminoácidos (mutantes) a partir de la proteína natural. Aquel biocatalizador que haya mostrado mejores propiedades, vuelve a ser empleado para realizar un nuevo ciclo de mutagénesis, expresión y ensayo, el cual se repite las veces que sean necesarias hasta obtener un biocatalizador con las actividades/selectividades requeridas para el proceso en cuestión.<sup>9</sup>



**Esquema 1.** Descripción del procedimiento de mutagénesis a través de la evolución dirigida.

<sup>8</sup> (a) H. Renata, Z. J. Wang, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 3351-3367; (b) C. G. Acevedo-Rocha, R. Agudo, M. T. Reetz, *J. Biotechnol.* **2014**, *191*, 3-10; (c) M. T. Reetz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12480-12496.

<sup>9</sup> M. T. Reetz, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7530-7548.

A pesar del gran avance alcanzado en el campo de la Biocatálisis durante los últimos años, aún existen algunos inconvenientes importantes en muchos de los procesos como la necesidad de utilizar un cosustrato o cofactor, lo que aumenta el coste del mismo. La baja estabilidad del enzima en condiciones más drásticas como temperaturas elevadas, pHs extremos o presencia de disolventes orgánicos, así como problemas de inhibición por concentraciones altas tanto de sustrato como de producto, son otros factores que han de tenerse en consideración. En algunos casos los biocatalizadores son caros y puede haber problemas de accesibilidad comercial. Sin embargo, estos inconvenientes pueden minimizarse gracias a técnicas como la inmovilización enzimática, a sistemas eficientes de regeneración del cofactor y al desarrollo de nuevos enzimas más estables gracias a la ingeniería genética.

### I.1.2. El papel de la Biocatálisis en la ‘Química sostenible’

La ‘Química verde’, también llamada ‘Química sostenible’, consiste en el desarrollo de procesos químicos en los que se reduce o elimina el uso de sustancias nocivas.<sup>10</sup> En este sentido la Biocatálisis es una solución acertada, dado que los enzimas son catalizadores biodegradables que llevan a cabo transformaciones orgánicas en condiciones suaves de reacción (pH, presión o temperatura) que no perjudican al medioambiente. Además, en los métodos químicos convencionales es necesaria muchas veces la utilización de pasos de protección y desprotección, aumentando la cantidad de residuos generados.

Estas desventajas pueden ser minimizadas en muchos casos utilizando biocatalizadores, pues pueden actuar con elevada selectividad en procesos con gran eficiencia atómica.<sup>11</sup> Los enzimas pueden así dar lugar a reacciones con los siguientes tipos de selectividad:<sup>3,12</sup>

---

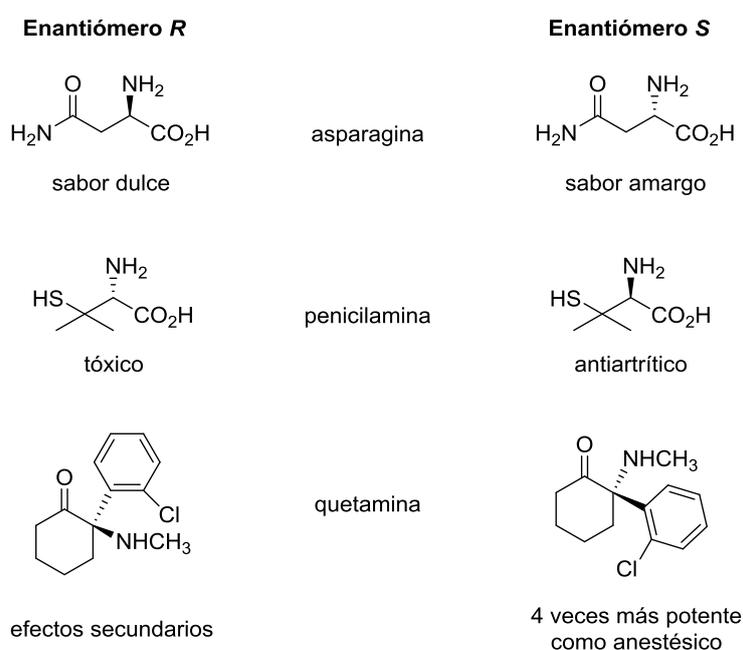
<sup>10</sup> P. J. Dunn, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1452-1461.

<sup>11</sup> G. Zheng, J. Xu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *22*, 784-792.

<sup>12</sup> (a) *Science of Synthesis. Biocatalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Faber, W.-D. Fessner, N. J. Turner, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2015**; (b) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**; (c) *Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions*, Eds. W.-D. Fessner, T. Anthonsen, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**; (d) *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, Eds. V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.

- **Quimioselectividad:** Discriminación selectiva en una molécula entre dos grupos funcionales de similar reactividad frente a un reactivo, evitándose así el uso de grupos protectores.
- **Regioselectividad:** Distinción entre dos o más grupos funcionales idénticos situados en distintas posiciones de una molécula.
- **Estereoselectividad:** Transformación preferencial de un estereoisómero frente a otro(s). En el caso de que el enzima discierna un enantiómero de su imagen especular en una mezcla racémica, se denomina enantioselectividad. Si la distinción se produce entre varios diastereoisómeros, se dice que el proceso es diastereoselectivo. También se puede romper la simetría en un compuesto proquiral generando tan solo uno de los enantiómeros del producto final a través de un proceso de asimetrización o desimetrización.

La importancia de la quiralidad en la Química y en la industria farmacéutica no puede pasarse por alto, ya que una pareja de enantiómeros, pese a poseer las mismas propiedades físico-químicas (tan solo difieren en el signo del ángulo de rotación específica frente a la luz polarizada), cuando se introducen en un entorno quiral (presente en los organismos vivos), pueden desarrollar una respuesta biológica muy diferente (Figura 2).<sup>13</sup>



**Figura 2.** Diferente respuesta biológica entre dos enantiómeros en una mezcla racémica.

<sup>13</sup> E. Thall, *J. Chem. Educ.* **1996**, 73, 481-484.

## Introducción

Así, podemos afirmar que el uso de enzimas en síntesis orgánica cumple varios de los 12 principios de la ‘Química sostenible’, los cuales han sido recogidos en el término inglés *PRODUCTIVELY* (productivamente):<sup>14</sup>

1. *Prevent wastes* (Prevención de residuos)
2. *Renewable materials* (Utilización de materias primas renovables)
3. *Omit derivatization steps* (Omisión de etapas de derivatización)
4. *Degradable chemical products* (Utilización de materias primas biodegradables)
5. *Use safe synthetic methods* (Uso de métodos sintéticos seguros)
6. *Catalytic reagents* (Empleo de sustancias catalíticas)
7. *Temperature, pressure ambient* (Uso de condiciones suaves de reacción)
8. *In-process monitoring* (Monitorización en tiempo real)
9. *Very few auxiliary substances* (Uso de pocas sustancias auxiliares)
10. *E-factor, maximise feed in product* (Economía atómica)
11. *Low toxicity of chemical products* (Baja toxicidad de los reactivos y productos)
12. *Yes, it is safe* (Minimización del riesgo de accidentes)

### I.1.3. Empleo de enzimas sobreexpresados

Los sistemas enzimáticos generalmente emplean células enteras o enzimas aislados tras un proceso de purificación. La elección de uno u otro está condicionada por la reacción que se pretende llevar a cabo, el tipo de cofactor necesario (así como el sistema de regeneración de este), además de la escala a la que se pretende realizar el proceso. Ambos tipos de preparaciones conllevan una serie de ventajas e inconvenientes.<sup>3</sup>

Una tercera opción más reciente es la utilización de enzimas sobreexpresados.<sup>7</sup> Esta metodología está basada en la inserción de un plásmido (conteniendo la información genética del biocatalizador que queremos sobreexpresar), en un organismo huésped modificado genéticamente (por ejemplo, *Escherichia coli*). Una vez insertado,

---

<sup>14</sup> (a) S. Wenda, S. Illner, A. Mell, U. Kragl, *Green Chem.* **2011**, *130*, 3007-3047; (b) N. Ran, L. Zhao, Z. Chen, J. Tao, *Green Chem.* **2008**, *10*, 361-372.

el enzima será expresado dentro del organismo y para emplearlo, además del uso como células en crecimiento o en reposo, se suele utilizar el sobrenadante una vez rotas las paredes celulares mediante, por ejemplo, el uso de ultrasonidos (previo centrifugado para eliminar los restos insolubles de las células). También se usan preparaciones de células liofilizadas por congelación y posterior eliminación del agua, obteniéndose un sólido que contiene el enzima sobreexpresado y que puede almacenarse durante largos periodos de tiempo. Esta técnica es más barata que la utilización de biocatalizadores purificados, y al mismo tiempo minimiza en gran medida las posibles reacciones secundarias que puedan ocurrir en las células enteras ya que el enzima de interés se encuentra en gran cantidad, así como los problemas de difusión puesto que las paredes celulares se encuentran parcialmente destruidas por el proceso de la liofilización.

#### **I.1.4. Clasificación enzimática**

Durante la década de los 50 el descubrimiento e identificación de nuevos biocatalizadores fue rápidamente en aumento, quedando en evidencia la necesidad de un sistema para la clasificación de los mismos. En consecuencia, los enzimas se encuentran clasificados en seis grandes grupos (Tabla 1) en función de la reacción que catalizan, y son descritos por un código numérico de cuatro dígitos (EC x.x.x.x, proviene del inglés *Enzyme Commission number*) los cuales indican: (i) el tipo de reacción, (ii) el tipo de sustrato o molécula transferida, (iii) la naturaleza del cosustrato, y (iv) el número individual del enzima.

**Tabla 1.** Clasificación enzimática en función del tipo de reacción que catalizan.

Tipo de enzima	Número EC	Tipo de reacción (ejemplos)
Oxidorreductasas	1	Oxidación-reducción; oxidación de C–H, C=C, C–N y C–O; reducción de C=O y C=C, aminación reductiva de C=O
Transferasas	2	Transferencia de grupos funcionales: acilo, amino, glucosilo, metilo y fosforilo
Hidrolasas	3	Hidrólisis y formación de ésteres, amidas, lactonas, lactamas, epóxidos, nitrilos, anhídridos y glucósidos
Liasas	4	Adición y eliminación de pequeñas moléculas a dobles enlaces como C=C, C=N y C=O
Isomerasas	5	Isomerizaciones como racemización, epimerización y reagrupamientos intramoleculares
Ligasas	6	Formación y ruptura de enlaces tipo C–O, C–S, C–N y C–C

A lo largo de este Trabajo Fin de Máster se han utilizado exclusivamente enzimas del tipo 2, por lo que en los Antecedentes se hará una descripción más detallada de los mismos.

### I.1.5. Promiscuidad catalítica

Como ya se ha comentado anteriormente, en los últimos años se ha estudiado en detalle el hecho de que los biocatalizadores sean capaces de mediar en su centro activo transformaciones distintas a aquellas para los que están diseñados, denominándose “promiscuidad catalítica” (del inglés, *catalytic promiscuity*).<sup>4</sup> Sin lugar a duda, esta propiedad hace aún más interesante la utilización de los enzimas puesto que amplía sus posibilidades sintéticas.

Dentro de todos los tipos de biocatalizadores descritos hasta la fecha, los pertenecientes al grupo de las hidrolasas han sido los más estudiados con respecto a sus posibles actividades ‘no naturales’.<sup>4c,15</sup> Así, lipasas y proteasas (encargadas de catalizar reacciones de hidrólisis de ácidos grasos y enlaces peptídicos), pueden llevar a cabo reacciones de formación de enlaces carbono-carbono tales como reacciones aldólicas,<sup>16</sup> nitroaldólicas (tipo Henry),<sup>17</sup> Baylis-Hillman<sup>18</sup> o Mannich,<sup>19</sup> así como reacciones de formación de enlaces carbono-nitrógeno como adiciones de tipo Michael.<sup>20</sup> Por último, siendo menos común pero no menos importante, se ha demostrado que enzimas de otras clases pueden presentar promiscuidad catalítica.<sup>21</sup>

## I.2. IMPORTANCIA DE LOS COMPUESTOS FLUORADOS

En la actualidad los compuestos con flúor han adquirido un gran valor debido a sus importantes aplicaciones en diversos sectores como son la agroquímica (pesticidas organofluorados), la química médica (uso del flúor como radiotrazador), o en la química farmacéutica (síntesis y desarrollo de fármacos conteniendo uno o varios átomos de flúor).<sup>22</sup>

De esta manera los ejemplos de síntesis de estos compuestos se han visto acrecentados en los últimos años, llegando a incluir el uso de biocatalizadores como complemento a los catalizadores tradicionales debido a las excelentes selectividades y condiciones suaves de reacción conseguidas en dichos procesos.

<sup>15</sup> M. López-Iglesias, V. Gotor-Fernández, *Chem. Rec.* **2015**, *15*, 743-759.

<sup>16</sup> C. Li, Y.-J. Zhou, N. Wang, X.-W. Feng, K. Li, X. Q. Yu, *J. Biotechnol.* **2010**, *150*, 539-545.

<sup>17</sup> J.-L. Wang, X. Li, H.-Y. Xie, B.-K. Liu, X.-F. Lin, *J. Biotechnol.* **2010**, *145*, 240-243.

<sup>18</sup> M. T. Reetz, R. Mondière, J. D. Carballeira, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1679-1681.

<sup>19</sup> 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.

<sup>20</sup> O. Torre, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Commun.* **2004**, 1724-1725.

<sup>21</sup> B. Ferreira-Silva, I. Lavandera, A. Kern, K. Faber, W. Kroutil, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 3410-3414.

<sup>22</sup> (a) A. Harsanyi, G. Sandford, *Green Chem.* **2015**, *17*, 2081-2086; (b) D. Barnes-Seeman, J. Beck, C. Springer, *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 855-864; (c) J. Wang, M. Sánchez-Roselló, J. L. Acena, C. del Pozo, A. E. Sorochinsky, S. Fustero, V. A. Soloshonok, H. Liu, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 2432-2506; (d) M. Tredwell, V. Gouverneur, en *Comprehensive Chirality*, Eds. E. M. Carreira, H. Yamamoto, Elsevier, Amsterdam, **2012**, pp. 70-85; (e) S. Purser, P. R. Moore, S. Swallow, V. Gouverneur, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 320-330; (f) S. M. Ametamey, M. Honer, P. A. Schubiger, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1501-1516.

### I.2.1. Ejemplos relevantes de compuestos fluorados como fármacos

Centrándonos en la química medicinal, cabe destacar que un buen número de los productos farmacéuticos son compuestos naturales o están directamente basados en ellos. En el caso de las moléculas organofluoradas, no existen por sí mismas en la naturaleza, pero sin embargo una cuarta parte de los fármacos utilizados para tratar enfermedades hoy en día (entorno al 20–25% aproximadamente), curiosamente contienen al menos un átomo de flúor.<sup>22</sup>

Esto se debe a las propiedades beneficiosas que son consecuencia de la introducción del flúor en los productos naturales. En este sentido, la fluoración de derivados orgánicos se utiliza actualmente en química médica para mejorar la estabilidad metabólica y las interacciones proteína-ligando.

De hecho, el rápido avance en este campo, fomentado por el desarrollo de nuevas técnicas (tanto el descubrimiento de nuevos agentes de fluoración como nuevas reacciones de fluoración), favorece la creación de ‘*building blocks*’ inéditos y susceptibles a la manipulación de otros grupos funcionales.

El uso estratégico de la introducción de átomos de flúor en fármacos está llegando a su punto álgido con la producción a gran escala de algunos de los medicamentos fluorados más importantes disponibles en el mercado (Figura 3) como son, por ejemplo, la Fluoxetina (antidepresivo),<sup>23</sup> el Faslodex (anticancerígeno),<sup>24</sup> la Fluritromicina (antibacteriano)<sup>25</sup> y el Efavirenz (antiviral).<sup>26</sup>

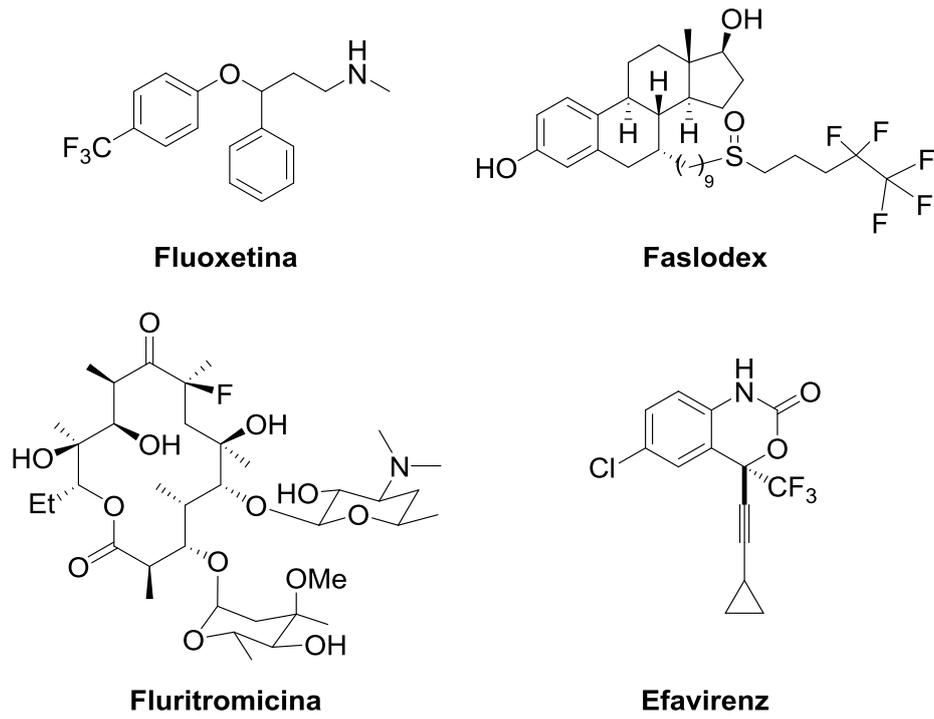
---

<sup>23</sup> D. T. Wong, J. S. Horng, F. P. Bymaster, K. L. Hauser, B. B. Molloy, *Life Sci.* **1974**, *15*, 471-479.

<sup>24</sup> J. F. R. Robertson, S. E. Come, S. E. Jones, L. Beex, M. Kaufmann, A. Makris, J. W. R. Nortier, K. Possinger, L.-E. Rutqvist, *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 346-356.

<sup>25</sup> M. T. Fera, M. Giannone, S. Pallio, A. Tortora, G. Blandino, M. Carbone, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2001**, *17*, 151-154.

<sup>26</sup> S. D. Young, S. F. Britcher, L. O. Tran, L. S. Payne, W. C. Lumma, T. A. Lyle, J. R. Huff, P. S. Anderson, D. B. Olsen, S. S. Carroll, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 2602-2605.



**Figura 3.** Fármacos fluorados más importantes disponibles en el mercado.



## **ANTECEDENTES**



Como se ha comentado en la Introducción, en este Trabajo Fin de Máster se han utilizado enzimas englobados dentro del grupo de las transferasas, por lo que a continuación se realizará una descripción detallada de las mismas.

## A.1. TRANSFERASAS

Este tipo de biocatalizadores (EC 2.x.x.x) suelen ser herramientas muy versátiles aplicadas con fines sintéticos debido a que son capaces de llevar a cabo reacciones difíciles de conseguir mediante métodos químicos convencionales, como son la transferencia de grupos funcionales entre dos sustratos (uno actúa como agente donador y otro como aceptor del grupo funcional). Entre ellas se encuentran enzimas como las metiltransferasas, las quinasas, o las cada vez más importantes transaminasas.

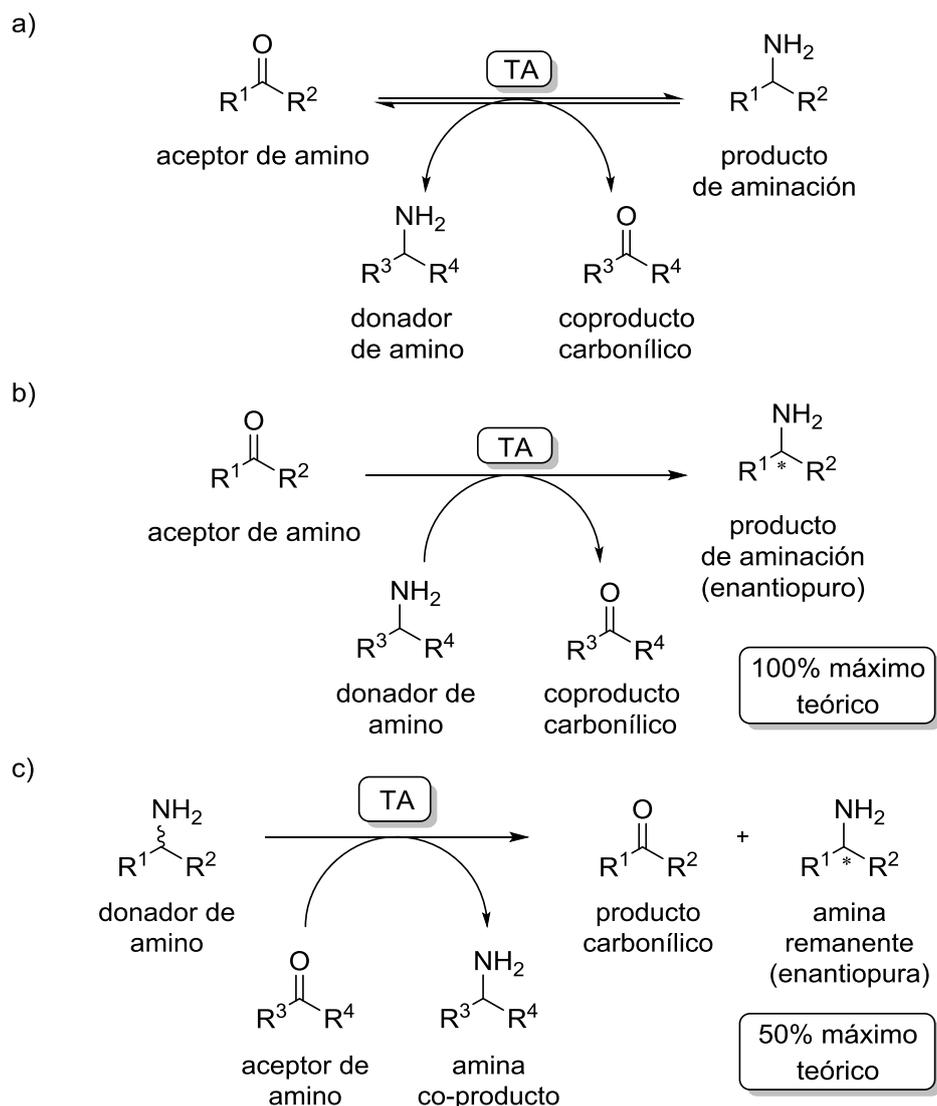
### A.1.1. Transaminasas

Las transaminasas (TAs), también conocidas como aminotransferasas (ATs), se encuentran clasificadas dentro del grupo de las transferasas (EC 2.6.1.x), y son posiblemente los enzimas más importantes en la naturaleza relacionados con la síntesis y degradación de aminas y aminoácidos quirales.<sup>27</sup> Estos biocatalizadores se encuentran presentes tanto en plantas como en animales debido a que son una parte primordial en las rutas metabólicas de dichos organismos.<sup>28</sup> La reacción que llevan a cabo, mostrada en el Esquema 2a, es la transferencia reversible de un grupo amino desde un compuesto que actúa como donador de amino (normalmente un  $\alpha$ -aminoácido) al carbono carbonílico del aceptor de amino (cetoácidos, cetonas o aldehídos), todo ello mediado por el cofactor PLP (piridoxal 5'-fosfato).

---

<sup>27</sup> M. Höhne, U. T. Bornscheuer, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 779-820.

<sup>28</sup> J. Moore, R. Langley, *Biochemistry for Dummies*, John Wiley & Sons, Hoboken, **2008**.



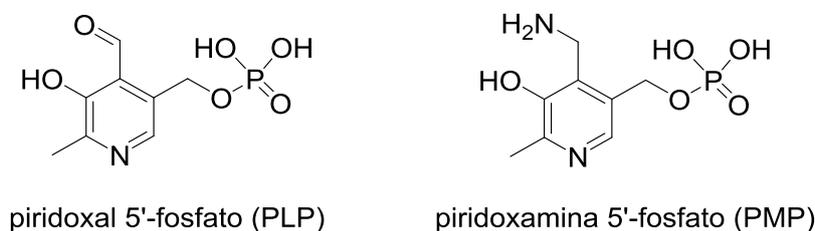
**Esquema 2.** a) Principio de transaminación catalizado por una transaminasa; b) síntesis de aminas enantioenriquecidas a través de un proceso de asimetrización de un compuesto carbonílico; y c) síntesis de aminas enantioenriquecidas a través de una resolución cinética por desaminación de una amina racémica.

Desde un punto de vista sintético,<sup>29</sup> se pueden obtener aminas enantiopuras a partir de las correspondientes cetonas por un proceso de asimetrización empleando un

<sup>29</sup> (a) M. Fuchs, J. E. Farnberger, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 6965-6982; (b) R. C. Simon, E. Busto, E.-M. Fischereder, C. S. Fuchs, D. Pressnitz, N. Richter, W. Kroutil, en *Science of Synthesis, Biocatalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Faber, W.-D. Fessner, N. J. Turner, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2015**, pp. 383-420; (c) R. C. Simon, N. Richter, E. Busto, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 129-143; (d) M. S. Malik, E.-S. Park, J.-S. Shin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *94*, 1163-1171; (e) S. Matthew, H. Yun, *ACS Catal.* **2012**, *2*, 993-1001; (f) D. Koszelewski, K. Tauber, K. Faber, W. Kroutil, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 324-332; (g) H. C. Hailes, P. A. Dalby, G. J. Lye, F. Baganz, M. Micheletti, N. Szita, J. M. Ward, *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 1883-1893; (h) D. Zhu, L. Hua, *Biotechnol. J.* **2009**, *4*, 1420-1431.

donador de amino apropiado (Esquema 2b), o bien partir de una amina racémica y llevar a cabo su resolución cinética utilizando un aceptor de amino adecuado, obteniendo de esta manera el compuesto carbonílico y la amina remanente enantioenriquecida sin reaccionar (Esquema 2c). En la mayoría de los casos se prefiere la primera metodología puesto que se puede obtener la amina enantioenriquecida con un rendimiento máximo teórico del 100%, mientras que en el segundo de los casos sólo se puede llegar al 50%. Sin embargo, este proceso está termodinámicamente favorecido en comparación con la ruta de la aminación.<sup>30</sup> Las aminas son compuestos muy importantes desde un punto de vista biológico al realizar múltiples funciones, entre las que destacan procesos de regulación (neurotransmisores como la serotonina), o mecanismos de defensa (adrenalina).

Como ya se ha mencionado, para que estas transformaciones ocurran es necesaria la acción del cofactor piridoxal 5'-fosfato, presente normalmente en una concentración en torno a 50-100  $\mu\text{M}$ , y a través de la especie piridoxamina 5'-fosfato (PMP) generada, se transfiere el grupo amino al sustrato carbonílico para regenerar el PLP, actuando así de manera catalítica (Figura 4).



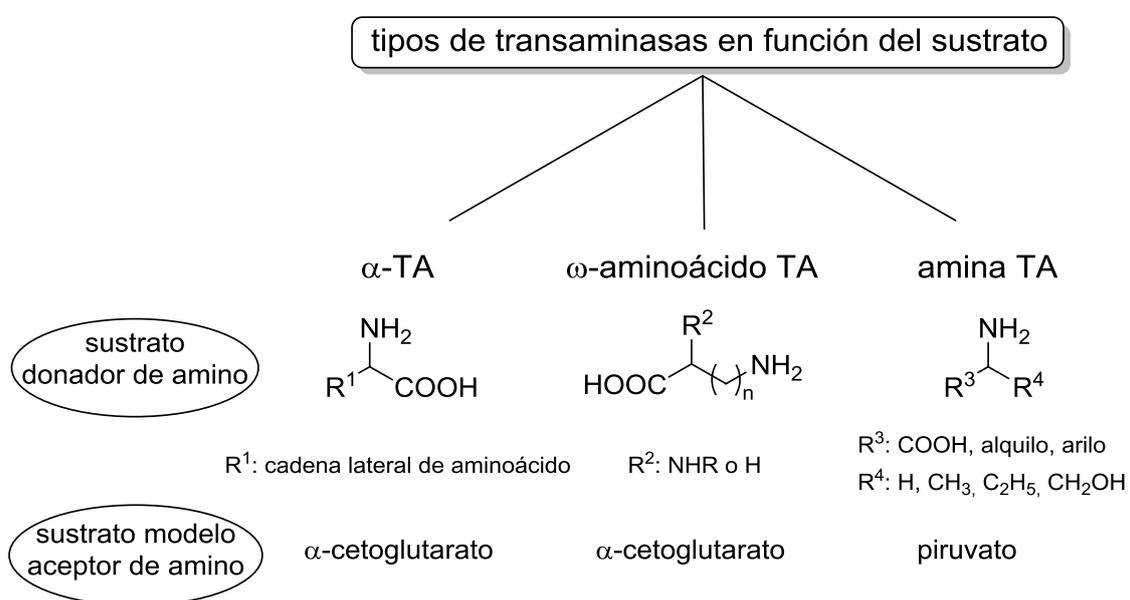
**Figura 4.** Cofactor necesario en las reacciones de transaminación.

La primera evidencia de la existencia de un enzima capaz de llevar a cabo reacciones de transaminación fue publicada por Needham en 1930, quien observó una relación entre las concentraciones de ácido L-glutámico, ácido L-aspártico y el ácido oxalacético en el músculo de una paloma.<sup>31</sup> Desde entonces, un gran número de transaminasas han sido descubiertas y caracterizadas con la capacidad de catalizar la transaminación de aminas primarias o  $\beta$ -aminoácidos, entre otros.

<sup>30</sup> (a) P. Tufvesson, J. S. Jenness, W. Kroutil, J. M. Woodley, *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 2159-2162; (b) J.-S. Shin, B.-G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *60*, 534-540.

<sup>31</sup> D. M. Needham, *Biochem. J.* **1930**, *24*, 208-227.

En función de su especificidad de sustrato estas enzimas se han clasificado en tres grupos (Esquema 3):<sup>27</sup> las  $\alpha$ -transaminasas ( $\alpha$ -TAs), las  $\omega$ -aminoácido transaminasas ( $\omega$ -TAs) y las amino transaminasas (ATAs). Las del primer grupo sólo aceptan sustratos que posean en su estructura un grupo carboxílico en posición  $\alpha$  al grupo amino. Un buen ejemplo es la aspartato transaminasa, la cual está involucrada en el metabolismo de aminoácidos proteínogénicos. El segundo grupo, el más reducido, transfiere grupos amino terminales unidos a carbonos primarios separados al menos en un carbono del grupo carboxílico.



**Esquema 3.** Clasificación de las transaminasas en función de la estructura del sustrato donador de amino.

Por último, el tercer grupo engloba a biocatalizadores que son capaces de aceptar sustratos carentes de grupo carboxílico (como por ejemplo cetonas o aldehídos), con lo que ofrecen la posibilidad de generar aminas quirales, siendo en los últimos años muy aplicados en síntesis orgánica.<sup>29,32</sup> En este punto hay que reseñar que también en muchas ocasiones a este grupo de enzimas se las ha denotado como  $\omega$ -TAs puesto que son capaces de convertir  $\beta$ - u  $\omega$ -aminoácidos.

<sup>32</sup> M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42-51.

Las ATAs suelen usar piruvato como agente aceptor del grupo amino, mientras que los otros dos grupos usan  $\alpha$ -cetoglutarato como aceptor más adecuado (Esquema 3). En cuanto al equilibrio de la reacción, mientras que en las transaminaciones catalizadas por las  $\alpha$ -TAs se mantiene cercano a la unidad, en el caso de las ATAs está fuertemente favorecido hacia la producción de la alanina (y el compuesto aceptor de amino). Esto tiene importantes implicaciones sintéticas, ya que si se desea sintetizar una amina a partir de un compuesto carbonílico, se requieren metodologías especiales para poder desplazar el equilibrio.

Por lo tanto, para llevar a cabo la resolución cinética de una amina racémica empleando piruvato como aceptor de amino, solo se necesita un equivalente para realizar dicha transformación, mientras que para el caso contrario es necesario un gran exceso molar de alanina como donador de amino.<sup>33</sup>

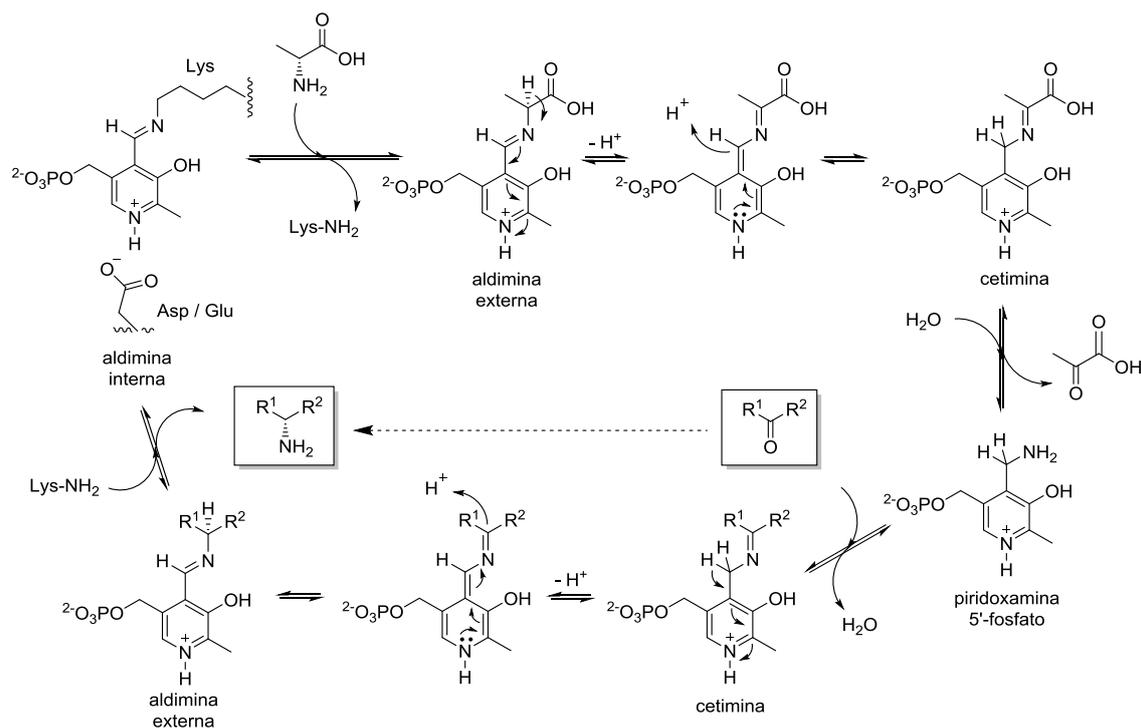
El mecanismo de la reacción de transaminación se ha dilucidado y estudiado en detalle en el caso de la aspartato aminotransferasa,<sup>34</sup> el cual se cree totalmente análogo para el resto de las transaminasas (Esquema 4). El cofactor piridoxal 5'-fosfato es el encargado de transferir el grupo amino desde el sustrato donador de amino hasta el carbonilo que actúa como aceptor. Así, en un principio, el PLP se encuentra enlazado al grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina catalítica en el centro activo del enzima mediante un enlace imínico reversible y está activado por un grupo aspartato o glutamato.

---

<sup>33</sup> J.-S. Shin, B.-J. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, 65, 206-211.

<sup>34</sup> (a) H. Mizuguchi, H. Hayashi, K. Okada, I. Miyahara, K. Hirotsu, H. Kagamiyama, *Biochemistry* **2001**, 40, 353-360; (b) J. M. Goldberg, J. F. Kirsh, *Biochemistry* **1996**, 35, 5280-5291.

## Antecedentes



**Esquema 4.** Mecanismo catalítico de transaminación en el centro activo de una transaminasa.

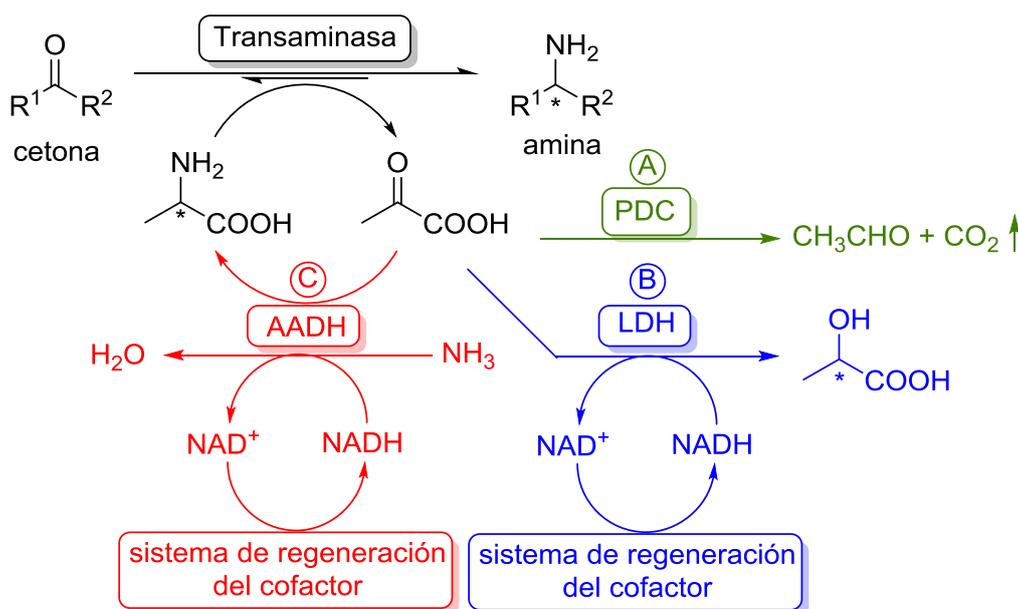
El mecanismo, totalmente reversible, puede dividirse en dos pasos. En un primer lugar, el PLP unido al centro activo del enzima, reacciona con el donador de amino (L-alanina en el Esquema 4) generando una aldimina que, por isomerización del doble enlace, da lugar a una cetimina que posteriormente se hidroliza obteniéndose la especie piridoxamina 5'-fosfato (PMP) y ácido pirúvico como subproducto. En el segundo paso, de nuevo formando enlaces imínicos, la PMP reacciona con el carbonilo de, por ejemplo, una cetona, formándose la cetimina que posteriormente isomeriza a una aldimina externa que, por reacción con la lisina del centro activo, permite obtener el producto de transaminación con un centro quiral creado, regenerando a su vez el cofactor PLP que se podrá incorporar de nuevo a otro ciclo catalítico.

### A.1.2. Sistemas de regeneración del cofactor y desplazamiento del equilibrio en reacciones de transaminación

En el caso de las ATAs, y debido a que el equilibrio de la reacción está favorecido hacia la formación de la alanina, que actúa como donador de amino, y del compuesto carbonílico que debe ser aminado, es necesario utilizar un sistema adicional

para desplazar el equilibrio hacia la formación de la amina deseada. Obviamente, para el caso contrario de la resolución cinética por desaminación catalizada por ATAs, normalmente el empleo de un aceptor de amino en cantidades *cuasi*-estequiométricas suele funcionar correctamente.

El donador de amino natural de este tipo de enzimas es la alanina, la cual una vez transferido el grupo amino, se transforma en ácido pirúvico. Una metodología comúnmente utilizada para evitar la reversibilidad del proceso y aumentar la conversión de la reacción, es la eliminación de dicho coproducto acoplando una segunda reacción muy favorecida termodinámicamente (Esquema 5). Para llevar a cabo este proceso se han desarrollado varias alternativas enzimáticas tales como la utilización de la lactato deshidrogenasa (LDH),<sup>35</sup> la piruvato descarboxilasa (PDC)<sup>36</sup> o la alanina deshidrogenasa (AADH).<sup>37</sup>



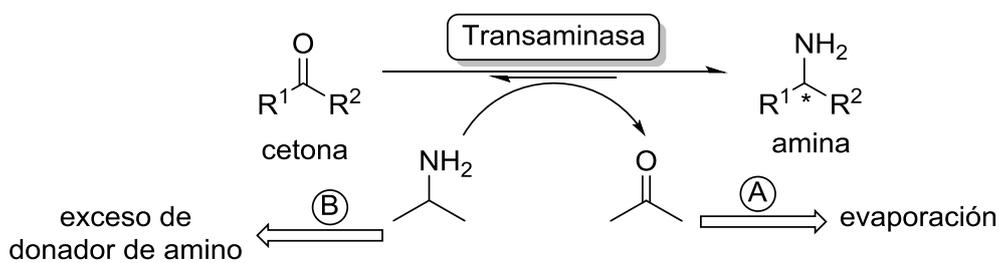
**Esquema 5.** Metodologías enzimáticas para desplazar el equilibrio mediante la eliminación del ácido pirúvico. PDC: piruvato descarboxilasa, LDH: lactato deshidrogenasa, AADH: alanina deshidrogenasa.

<sup>35</sup> H. K. Chenault, G. M. Whitesides, *Bioorg. Chem.* **1989**, *17*, 400-409.

<sup>36</sup> M. Höhne, S. Köhl, K. Robins, U. T. Bornscheuer, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 363-365.

<sup>37</sup> D. Koszelewski, I. Lavandera, D. Clay, G. M. Guebitz, D. Rozzzell, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9337-9340.

Recientemente, gracias a los avances en Biología Molecular, se han desarrollado transaminasas más estables y con un intervalo mayor de sustratos aceptados como donadores de amino. Entre ellos, uno de los más utilizados debido a su fácil accesibilidad y bajo precio es la isopropilamina (Esquema 6).<sup>38</sup> En este caso el subproducto generado es la acetona, la cual puede ser eliminada del medio mediante evaporación<sup>39</sup> debido a su punto de ebullición bajo, siempre y cuando los sustratos y/o productos involucrados no sean volátiles. Sino es factible la evaporación de la acetona formada, hay que utilizar un gran exceso (en torno a 50 equivalentes con respecto al sustrato) del donador de amino, forzando así la reacción a desplazarse hacia la formación del producto deseado. El inconveniente de esta técnica es el posible problema de inhibición causado por las altas concentraciones de la isopropilamina adicionada, así como la purificación del producto final.



**Esquema 6.** Empleo de isopropilamina como agente donador de amino en procesos de transaminación.

Por otro lado, en estos últimos años se han desarrollado nuevos donadores de amino que pueden ser utilizados en cantidades *cuasi*-estequiométricas con respecto al sustrato carbonílico debido a una posterior reacción del coproducto obtenido muy favorecida termodinámicamente. Así, se han empleado tanto aminas cíclicas<sup>40</sup> como diaminas,<sup>41</sup> diseñadas para dar posteriormente una reacción de aromatización una vez que se ha formado el coproducto carbonílico, desplazando el equilibrio en el sentido de la aminación.

<sup>38</sup> K. E. Cassimjee, C. Branneby, V. Abedi, A. Wells, P. Berglund, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5569-5571.

<sup>39</sup> G. Matcham, M. Bhatia, W. Lang, C. Lewis, R. Nelson, A. Wang, W. Wu, *Chimia* **1999**, 53, 584-589.

<sup>40</sup> B. Wang, H. Land, P. Berglund, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 161-163.

<sup>41</sup> (a) L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Adv. Synth. Catal.* **2016**, 358, 1618-1624; (b) A. P. Green, N. J. Turner, E. O. Reilly, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 10714-10717.

El desarrollo de estas metodologías está abocado al diseño de sistemas autosuficientes más prácticos para su posterior aplicación en la síntesis asimétrica de aminas a escala industrial. La obtención de células enteras capaces de sobreexpresar la transaminasa conjuntamente con el(los) enzima(s) utilizado(s) para la eliminación del piruvato, o el desarrollo de transaminasas más robustas y capaces de aceptar aminas comerciales y baratas como cosustratos, son dos ejemplos de la línea a seguir en este sentido. Todo esto ha conllevado un mayor desarrollo en procesos catalizados por TAs a nivel industrial.<sup>29</sup>

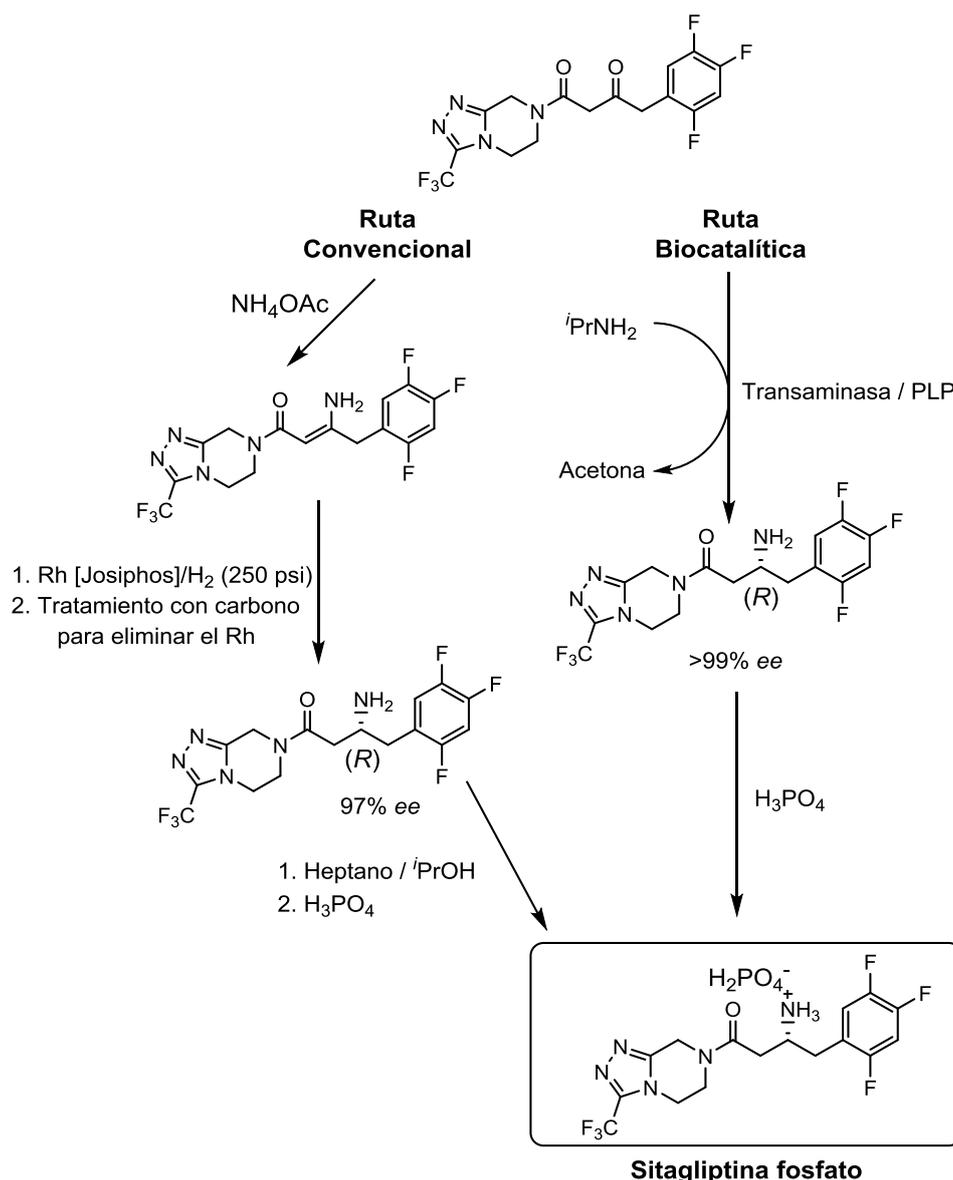
## A.2. EMPLEO DE TRANSAMINASAS CON COMPUESTOS FLUORADOS

En cuanto a la aplicación de TAs sobre derivados fluorados, hay que destacar el trabajo de Saville y colaboradores,<sup>42</sup> en el cual se realizó un cribado de transaminasas comerciales sobre el precursor del antidiabético Sitagliptina mostrado en el Esquema 7, observándose una actividad enzimática casi nula, como era de esperar puesto que la mayoría de estas enzimas solo aceptan cetonas cuyo sustituyente más pequeño no sea mucho mayor que un grupo metilo. Sin embargo, a través de estudios de modelización molecular y tras varias rondas de mutaciones sobre una transaminasa de *Arthrobacter* sp., se desarrolló una variante enzimática con 27 mutaciones para un proceso competitivo a gran escala con respecto a la metodología no enzimática.

En comparación con el proceso catalizado por rodio, el método biocatalítico mejora el rendimiento y minimiza la generación de residuos, y por lo tanto de los costes globales. Asimismo, se evita el uso de material especializado y caro para la hidrogenación catalítica del método no enzimático.

---

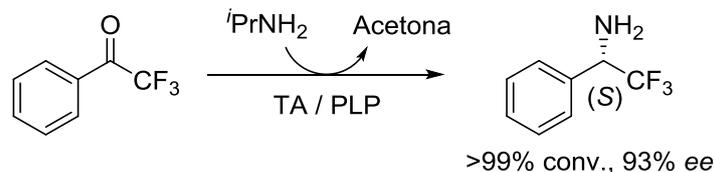
<sup>42</sup> C. K. Saville, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Branz, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science* **2010**, 329, 305-309.



**Esquema 7.** Síntesis catalítica convencional y biocatalítica de la Sitagliptina.

El enzima desarrollado para la síntesis de la Sitagliptina admite un mayor intervalo de sustratos y aumenta la tolerancia a concentraciones altas del donador de amino y de disolventes orgánicos, lo cual aumenta su utilidad práctica. De este modo, se sintetizaron distintas 1-feniletilaminas con sustituyentes electroattractores con una elevada enantiopureza, encontrándose entre ellas la amina  $\beta,\beta,\beta$ -trifluorosustituída mostrada en el Esquema 8.<sup>42</sup> Asimismo, en un trabajo posterior, Truppo y colaboradores inmovilizaron este biocatalizador en una resina de polimetacrilato (SEPABEADS

EXE120) para sintetizar los derivados anteriores. La ventaja de utilizar esta preparación radica en la posibilidad de poder reciclarla durante varios ciclos de reacción.<sup>43</sup>



**Esquema 8.** Síntesis de una amina fluorada con una transaminasa diseñada mediante estudios de modelización molecular.

Recientemente en nuestro grupo de investigación se han obtenido varias 1-feniletilaminas con halógenos en diversas posiciones del anillo utilizando TAs comerciales, obteniéndose resultados especialmente satisfactorios cuando dichos átomos se encontraban en la posición *orto* del fenilo empleando como donador de amino tanto isopropilamina<sup>44</sup> como una diamina especialmente diseñada para ser utilizada en cantidades *cuasi*-estequiométricas.<sup>41a</sup> Asimismo, Faber y colaboradores han descrito la aminación de 1, $\omega$ -haloalcoholes a través de un proceso en cascada utilizando una alcohol oxidasa junto con una TA para obtener las aminas halogenadas.<sup>45</sup>

### A.3. COMPUESTOS FLUORADOS COMO INHIBIDORES DE TAs

Silverman y colaboradores han trabajado ampliamente con ácidos 4-aminopentanoicos halogenados en posición 5 (Figura 5), como inhibidores del enzima ácido  $\gamma$ -aminobutírico aminotransferasa (GABA-AT).<sup>46</sup> El GABA es el neurotransmisor principal en el sistema nervioso central de los mamíferos, y su baja concentración parece estar directamente relacionada con la aparición de enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson. Dicha concentración depende básicamente de dos enzimas, la GABA-AT, encargada de metabolizarlo, y la L-glutamato descarboxilasa, encargada de

<sup>43</sup> M. D. Truppo, H. Strotmann, G. Hughes, *ChemCatChem* **2012**, *4*, 1071-1074.

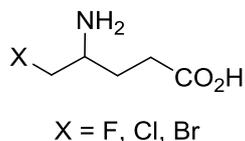
<sup>44</sup> C. E. Paul, M. Rodríguez-Mata, E. Busto, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, S. García-Cerrada, J. Mendiola, O. de Frutos, I. Collado, *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18*, 788-792.

<sup>45</sup> M. Pickl, M. Fuchs, S. M. Glueck, K. Faber, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 3121-3124.

<sup>46</sup> R. B. Silverman, M. A. Levy, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 815-818.

## Antecedentes

sintetizarlo. De ahí que la GABA-AT haya sido estudiada como diana terapéutica para tratar enfermedades neurodegenerativas.



**Figura 5.** Ejemplos de ácidos 4-aminopentanoicos halogenados en la posición 5 utilizados como inhibidores de la GABA-AT.

Así, cuando se incubaba la GABA-AT junto con los sustratos halogenados, se observaba la reacción de aproximadamente un equivalente de dicho compuesto con la proteína, detectándose un cambio en el espectro visible-UV del enzima, así como la obtención en disolución del correspondiente anión halogenuro que pudo ser cuantificado mediante estudios potenciométricos.<sup>47</sup> Asimismo, se observó que el derivado  $\beta,\beta$ -dihalogenado mostraba ser un excelente inhibidor, mientras que el  $\beta,\beta,\beta$ -trihalogenado no.<sup>48</sup> Tras realizar diferentes estudios cinéticos con sustratos marcados isotópicamente, se llegó a la conclusión de que el mecanismo por el cual estos compuestos podrían actuar sería el que se observa en el Esquema 9.<sup>49</sup>

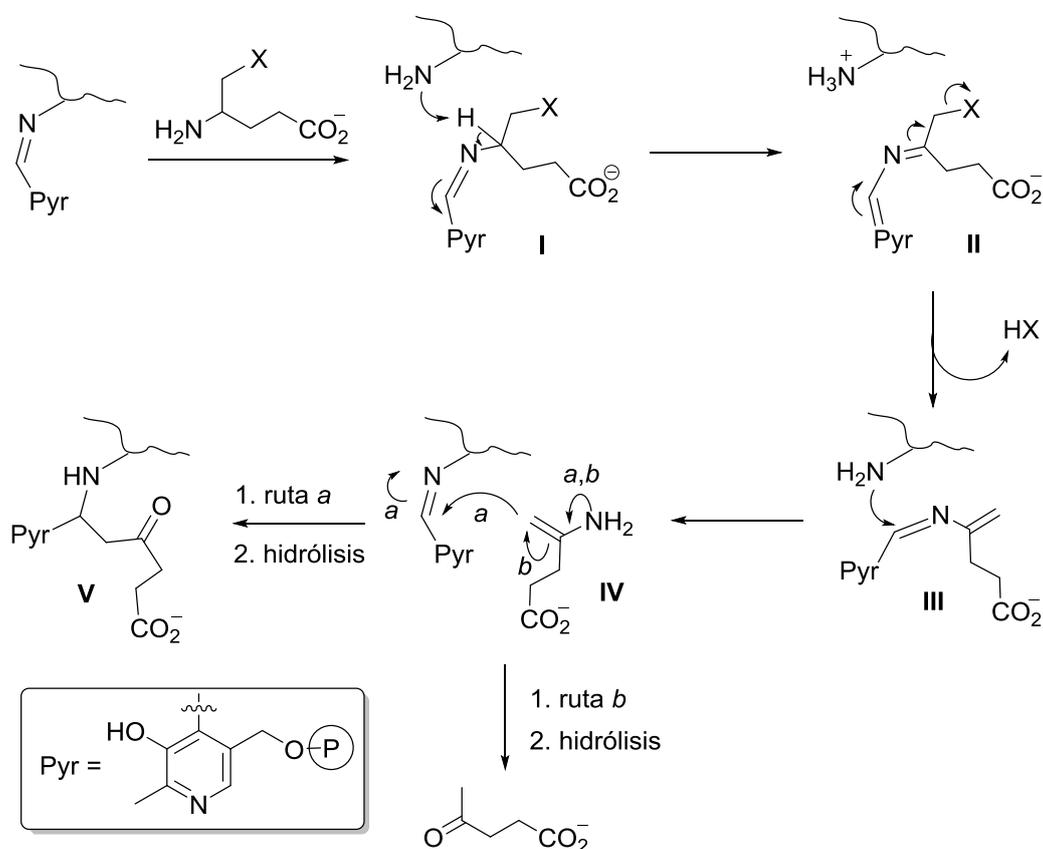
Así, el sustrato halogenado interacciona primero con el PLP formando el típico aducto **I**. Posteriormente, esta aldimina isomeriza a la cetimina **II**. Debido a la presencia del halógeno en posición  $\alpha$ , en lugar de liberar la cetona halogenada a través de un proceso de hidrólisis, se libera el correspondiente halogenuro de hidrógeno a través de un proceso de eliminación, probablemente catalizado por el grupo amino perteneciente a la lisina que se encuentra en el centro activo, generándose el intermedio **III**. En un siguiente paso, la lisina ataca a la aldimina liberando la enamina deshalogenada **IV**, la cual puede evolucionar a través de dos caminos diferentes. Por un lado (ruta a), la enamina puede atacar a la aldimina formada entre la lisina catalítica y el PLP, generando el aducto covalente **V** tras un proceso de hidrólisis de la imina intermedia, lo cual inactivaría irreversiblemente a la transaminasa. Por otro lado (ruta b), la enamina

<sup>47</sup> R. B. Silverman, M. A. Levy, *Biochemistry* **1981**, 20, 1197-1203.

<sup>48</sup> P. Bey, M. J. Jung, F. Gerhart, D. Schirlin, V. Van Dorsselaer, P. Casara, *J. Neurochem.* **1981**, 37, 1341-1344.

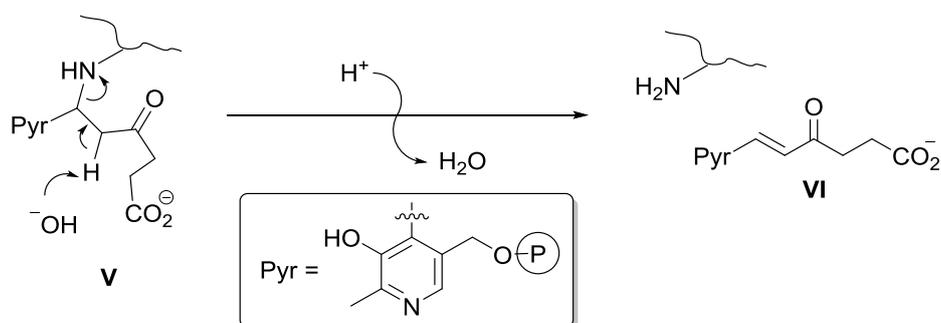
<sup>49</sup> R. B. Silverman, B. J. Invergo, *Biochemistry* **1986**, 25, 6817-6820.

**IV** puede tautomerizar para luego hidrolizarse generando el compuesto carbonílico deshalogenado. En este caso la transaminasa puede entrar en un nuevo ciclo catalítico no inactivándose.



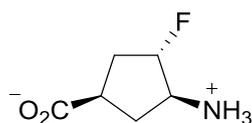
**Esquema 9.** Mecanismo de inhibición de la GABA-AT con el ácido 4-amino-5-halopentanoico.<sup>49</sup>

Dicho mecanismo pudo ser demostrado mediante el tratamiento del aducto **V** en condiciones básicas, el cual generó como producto la especie **VI**, que pudo ser aislada (Esquema 10).



**Esquema 10.** Formación del compuesto **VI** por tratamiento de **V** en condiciones básicas.<sup>49</sup>

Además de los derivados halogenados del GABA, se han estudiado también como inhibidores de la GABA-AT a los análogos fluorados de la  $\beta$ -alanina,<sup>50</sup> los ácidos 5-amino-hexanoicos halogenados en posición 6<sup>52</sup> y los ácidos 4-amino-5-fluoropent-2-enoicos.<sup>51</sup> Todos ellos siguen el mecanismo de inhibición a través de la “enamino”, tal como se describe en el Esquema 9. Mención especial requiere el compuesto **VII** (Figura 6), cuyo aducto de tipo **V** con la GABA-AT fue cristalizado y resuelto a través de un estudio de difracción de Rayos X, siendo otra prueba fehaciente del mecanismo de inhibición mencionado anteriormente.<sup>52</sup>



**VII**

**Figura 6.** Inhibidor cíclico de la GABA-AT.

Otro ejemplo de TA desactivada por aminas  $\beta$ -halogenadas es la ornitina aminotransferasa, la cual en presencia de la 5-fluorometilornitina se inhibía,<sup>53</sup> se supone que también mediante el mecanismo de inhibición a través de la “enamino”.

Hay que señalar que Silverman clasificó los inhibidores del GABA en 4 tipos diferentes.<sup>54</sup> Así, englobó a las aminas  $\beta$ -halogenadas dentro de la clase 2 mientras que a las cetonas  $\alpha$ -halogenadas las incluyó dentro de las de tipo 4. Hasta ahora, existe un único ejemplo descrito en la literatura donde se ha demostrado que una  $\alpha$ -fluorocetona era capaz de inhibir a la GABA-AT, empleando en este caso el ácido 5-fluoro-4-oxopentanoico.<sup>55</sup> Lógicamente en este caso el sustrato interacciona con la forma aminada del PLP, el PMP, para formar el intermedio **II**, el cual ya evoluciona del mismo modo siguiendo el mecanismo descrito en el Esquema 9.

<sup>50</sup> D. Schirlin, S. Baltzer, J.-G. Heydt, M. J. Jung, *J. Enzyme Inhib.* **1987**, *1*, 243-258.

<sup>51</sup> R. B. Silverman, B. J. Invergo, J. Mathew, *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1840-1846.

<sup>52</sup> P. Storici, J. Qiu, T. Schirmer, R. B. Silverman, *Biochemistry* **2004**, *43*, 14057-14063.

<sup>53</sup> F. N. Bolkenius, B. Knödgen, N. Seiler, *Biochem. J.* **1990**, *268*, 409-414.

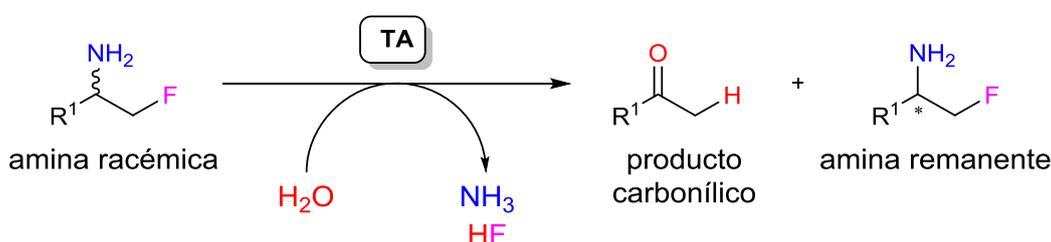
<sup>54</sup> S. M. Nanavati, R. B. Silverman, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2413-2421.

<sup>55</sup> B. Lippert, B. W. Metcalf, R. J. Resvick, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1982**, *108*, 146-152.

#### A.4. APLICACIÓN SINTÉTICA DE LA REACCIÓN DE HIDRODESFLUORACIÓN EMPLEANDO TAs

Como se ha observado en los ejemplos anteriores, las transaminasas son capaces de catalizar la deshalogenación de  $\beta$ -haloaminas o  $\alpha$ -halocetonas. Esta actividad no esperada (es decir, promiscua), ha sido explotada desde un punto de vista biológico para obtener compuestos inhibidores de enzimas dependientes de PLP, pero hasta hace poco no lo ha sido desde un punto de vista sintético. Hay que destacar que la reacción de hidrolesfluoración (ruptura de un enlace C–F para formar un enlace C–H),<sup>56</sup> ha sido mucho menos estudiada que la reacción contraria de fluoración, pero no por ello tiene menos importancia ya que a partir de un compuesto (poli)halogenado se pueden sintetizar nuevos derivados de interés. Desde un punto de vista químico realizar esta transformación es especialmente difícil, ya que el enlace C–F se encuentra entre los más estables, especialmente los de carácter no aromático.

Aprovechando esta actividad promiscua mostrada por las TAs, en nuestro grupo de investigación se ha puesto a punto muy recientemente un sistema para llevar a cabo la resolución cinética de  $\beta$ -fluoroaminas aromáticas racémicas, a través de un proceso simultáneo de desaminación e hidrolesfluoración utilizando una serie de enzimas sobreexpresados (Esquema 11). Además, dicho proceso se realiza en ausencia de un aceptor de amino (por ejemplo, acetona), y en condiciones suaves de reacción en medio acuoso.<sup>57</sup>



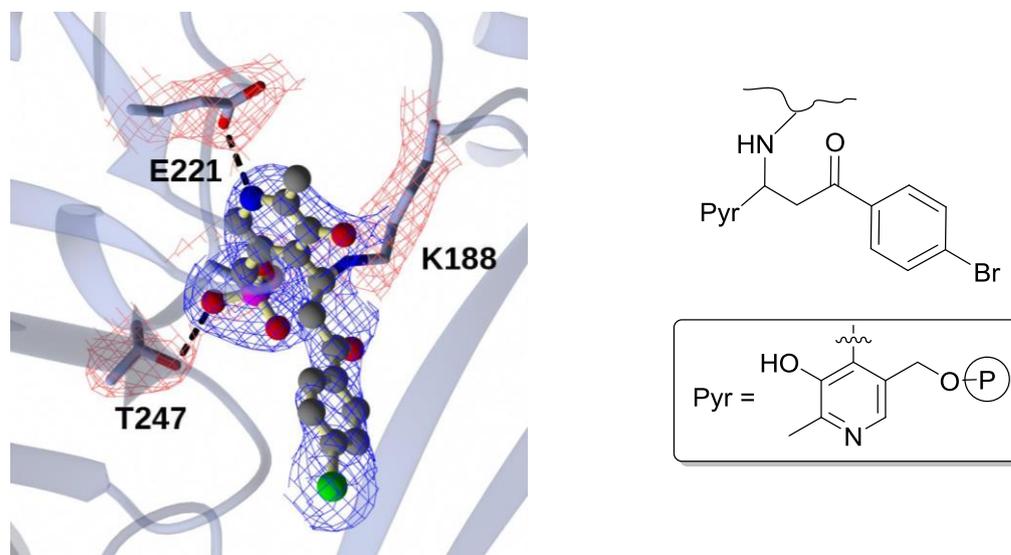
**Esquema 11.** Proceso tándem de hidrolesfluoración/desaminación aplicado a la resolución cinética de  $\beta$ -fluoroaminas racémicas.

<sup>56</sup> M. K. Whittlesey, E. Peris, *ACS Catal.* **2014**, 4, 3152-3159.

<sup>57</sup> A. Cuetos, M. García-Ramos, E.-M. Fischereder, A. Díaz-Rodríguez, G. Grogan, V. Gotor, W. Kroutil, I. Lavandera, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 3144-3147.

## Antecedentes

Estudios posteriores demostraron que esta transformación lleva asociada una inhibición enzimática, tal como se detalla en el Esquema 9. Como prueba de ello, se obtuvo una estructura de rayos X del aducto de tipo **V** entre la TA proveniente de la *Arthrobacter* sp. con 27 mutaciones ya mencionada anteriormente en el Esquema 7 y la 1-(4-bromofenil)-2-fluoroetilamina (Figura 7).



**Figura 7.** Estructura de rayos X del aducto covalente formado en el centro activo de una TA al reaccionar con una  $\beta$ -fluoroamina.

Dependiendo de la estereopreferencia de la transaminasa empleada, se pudieron obtener ambos enantiómeros a partir de la mezcla racémica. Así, se escogieron las TAs de *Chromobacterium violaceum* (CV-TA, *S*-selectiva) y la de *Arthrobacter* sp. (ArR-TA, *R*-selectiva).

Así pues, basados en los resultados obtenidos con esta metodología utilizando  $\beta$ -fluoroaminas, nos hemos propuesto en este Trabajo Fin de Máster realizar el proceso de hidrodeshalogenación sobre varias  $\alpha$ -halocetonas para obtener las correspondientes cetonas deshalogenadas, reacción difícil de conseguir a través de otras metodologías, especialmente si el átomo de halógeno es el flúor.

## **OBJETIVOS**



En la Introducción y los Antecedentes de este trabajo se ha puesto de manifiesto la importancia de las aplicaciones de las transaminasas en síntesis orgánica, así como la actividad promiscua de dichas enzimas en procesos de hidroduesfluoración.

Con estos precedentes nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- Establecer una metodología enzimática sencilla aplicable a la síntesis de acetofenonas a partir de  $\alpha$ -fluorocetonas en condiciones suaves de reacción.
- Sintetizar y caracterizar una serie de 1-aril-2-fluoroetanonas sustituidas en posiciones *meta* y *para* para aplicarlas en las reacciones de hidrodueshalogenación, así como las 1-feniletilaminas, posibles productos de la reacción de aminación.
- Desarrollar métodos de cromatografía de gases en columnas de relleno aquiral para el seguimiento de las conversiones de las reacciones enzimáticas.
- Estudiar el efecto del donador de amino en las reacciones catalizadas por una serie de transaminasas sobreexpresadas en *E. coli*.
- Aprovechar la promiscuidad catalítica demostrada por las transaminasas para obtener varias acetofenonas sustituidas a través de un proceso novedoso de hidrodueshalogenación.
- Ampliar la aplicabilidad de las preparaciones enzimáticas utilizadas para llevar a cabo transformaciones de hidrodueshalogenación utilizando cetonas aromáticas sustituidas en  $\alpha$  con otros halógenos como cloro y bromo.



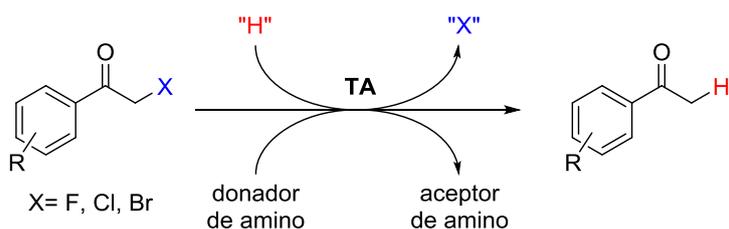
## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



En la Introducción y Antecedentes de este Trabajo Fin de Máster se ha puesto de manifiesto la importancia de la catálisis aplicada en síntesis orgánica, así como el uso de transaminasas en reacciones de (des)aminación e hidrodeshalogenación.

Como se ha comentado anteriormente, nuestro grupo de investigación ha puesto a punto una metodología consistente en la resolución cinética de  $\beta$ -fluoroaminas racémicas por desaminación sumado a un proceso de hidrodeshalogenación de manera simultánea, aprovechando la promiscuidad catalítica mostrada por las transaminasas.<sup>57</sup>

Llegados a este punto hemos decidido centrarnos en el estudio del proceso de hidrodeshalogenación sobre una serie de cetonas halogenadas en posición  $\alpha$  empleando transaminasas (Esquema 12), para lo cual se sintetizarán primero diversas cetonas fluoradas en  $\alpha$ , extendiéndose la metodología a una familia de compuestos estructuralmente similares, con diversos halógenos y grupos metoxi en posiciones 3 y 4, por lo que será necesario optimizar las condiciones de reacción, así como el desarrollo de métodos eficaces para poder evaluar las conversiones de las reacciones enzimáticas.



**Esquema 12.** Proceso de hidrodeshalogenación catalizado por transaminasas sobre cetonas halogenadas en posición  $\alpha$ .

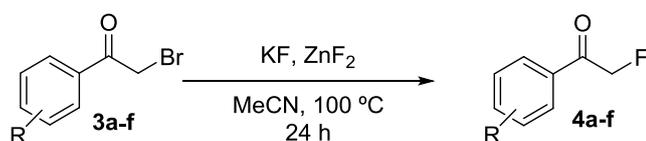
Por último, se llevará a cabo el mismo proceso aplicado a otros halógenos, como el caso de cetonas bromadas o cloradas en posición  $\alpha$ .

## R.1. SÍNTESIS DE SUSTRATOS Y PRODUCTOS

Puesto que nuestro principal interés era mostrar una metodología enzimática para llevar a cabo la deshalogenación de una serie de cetonas halogenadas en posición  $\alpha$ , en un primer lugar decidimos sintetizar tanto los sustratos de partida como los posibles productos de reacción que no fueran comerciales, para posteriormente poner a punto los métodos analíticos necesarios para poder medir las conversiones de las reacciones enzimáticas.

### R.1.1. Síntesis química de las $\alpha$ -fluoroacetofenonas de partida

Así, en un primer lugar nos propusimos realizar la síntesis de una familia de cetonas aromáticas sustituidas en las posiciones 3 o 4 y fluoradas en la posición  $\alpha$ . Para ello, partiendo de las correspondientes cetonas bromadas **3a-f**, comercialmente disponibles, se sustituyó el átomo de bromo por el flúor a través de un proceso de sustitución nucleófila bimolecular mediante la adición de dos sales de flúor como son el fluoruro de zinc y el fluoruro de potasio (Esquema 13). Estas transformaciones se realizaron dentro de tubos sellados, utilizando acetonitrilo como disolvente, durante 24 horas a 100 °C, proporcionando los productos **4a-f** con rendimientos entre el 47 y el 82%.<sup>58</sup> Cabe destacar que estas cetonas fluoradas son extremadamente volátiles, por lo que cualquier proceso realizado a presión reducida requirió extremada precaución.



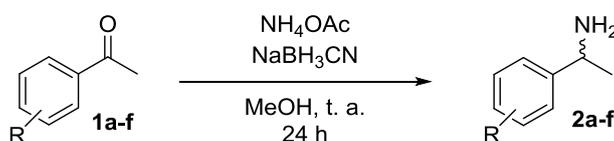
**a**, R = H; **b**, R = *p*-F; **c**, R = *p*-Cl; **d**, R = *p*-Br; **e**, R = *p*-OMe; **f**, R = *m*-OMe;

**Esquema 13.** Síntesis de las  $\alpha$ -fluoroacetofenonas de partida **4a-f**.

<sup>58</sup> (a) W. Borzęcka, I. Lavandera, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 7312-7317; (b) C. Zizhan, W. Zhu, Z. Zheng, X. Zou, *J. Fluorine Chem.* **2010**, 131, 340-344.

### R.1.2. Síntesis química de las 1-ariletanaminas 2a-f

Por otro lado, se sintetizaron las correspondientes aminas deshalogenadas aromáticas racémicas que podrían obtenerse como subproducto en las reacciones de deshalogenación. Así, partiendo de las acetofenonas **1a-f**, disponibles comercialmente, se llevó a cabo la aminación reductiva en presencia de acetato amónico y cianoborohidruro de sodio, utilizando metanol seco como disolvente, a temperatura ambiente durante 24 h (Esquema 14),<sup>58a</sup> obteniendo las correspondientes aminas **2a-f** con unos rendimientos entre el 20 y el 62%. Nuevamente estos compuestos son volátiles, por lo que hay que trabajar con ellos con mucho cuidado.



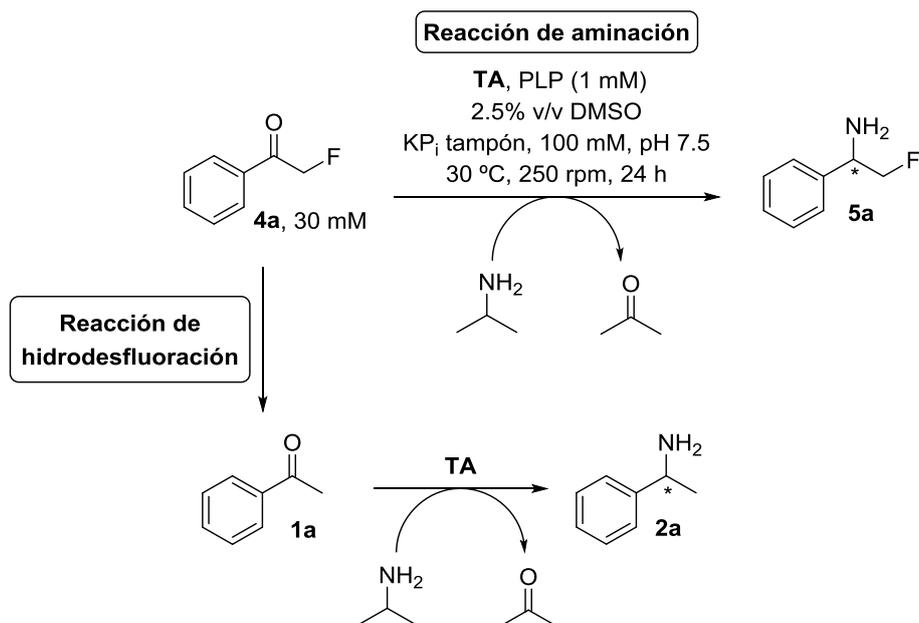
Esquema 14. Síntesis de las 1-ariletanaminas racémicas **2a-f**.

## R.2. PRUEBAS ENZIMÁTICAS

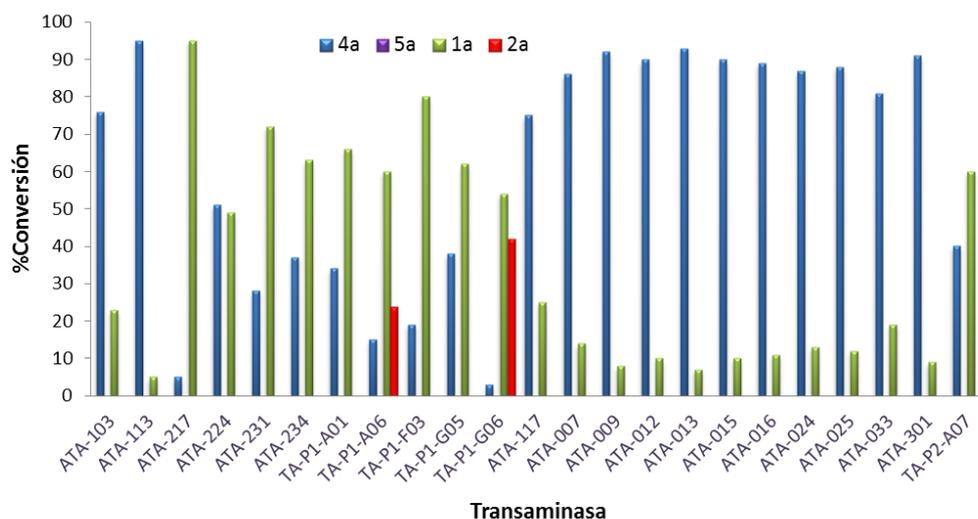
### R.2.1. Reacción de la 2-fluoroacetofenona (**4a**) en presencia de las TAs comerciales con isopropilamina como donador de amino

Debido a nuestro reciente interés por el uso de las transaminasas con fines sintéticos para obtener derivados de interés enantiopuros,<sup>44,59</sup> decidimos utilizar una serie de 23 transaminasas de la casa comercial Codexis, 11 *S*-selectivas y 12 *R*-selectivas, con el fin de estudiar la aminación sobre cetonas fluoradas en posición  $\alpha$  empleando isopropilamina (1 M) como donador del grupo amino, puesto que se sabe que estas enzimas aceptan dichas condiciones de reacción (Esquema 15). Las primeras pruebas se llevaron a cabo utilizando el sustrato **4a** (30 mM) en presencia de un tampón fosfato pH 7.5 y un pequeño porcentaje de DMSO para ayudar a solubilizar el sustrato en el medio acuoso. Las transformaciones se hicieron a 30 °C durante 24 h utilizando agitación orbital (250 rpm), obteniendo los resultados mostrados en la Figura 8.

<sup>59</sup> A. Cuetos, I. Lavandera, V. Gotor, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 10688-10690.



**Esquema 15.** Transaminación de la  $\alpha$ -fluoroacetona **4a** usando isopropilamina como dador de amino.



**Figura 8.** Conversiones obtenidas con distintas transaminasas con la cetona fluorada **4a**.

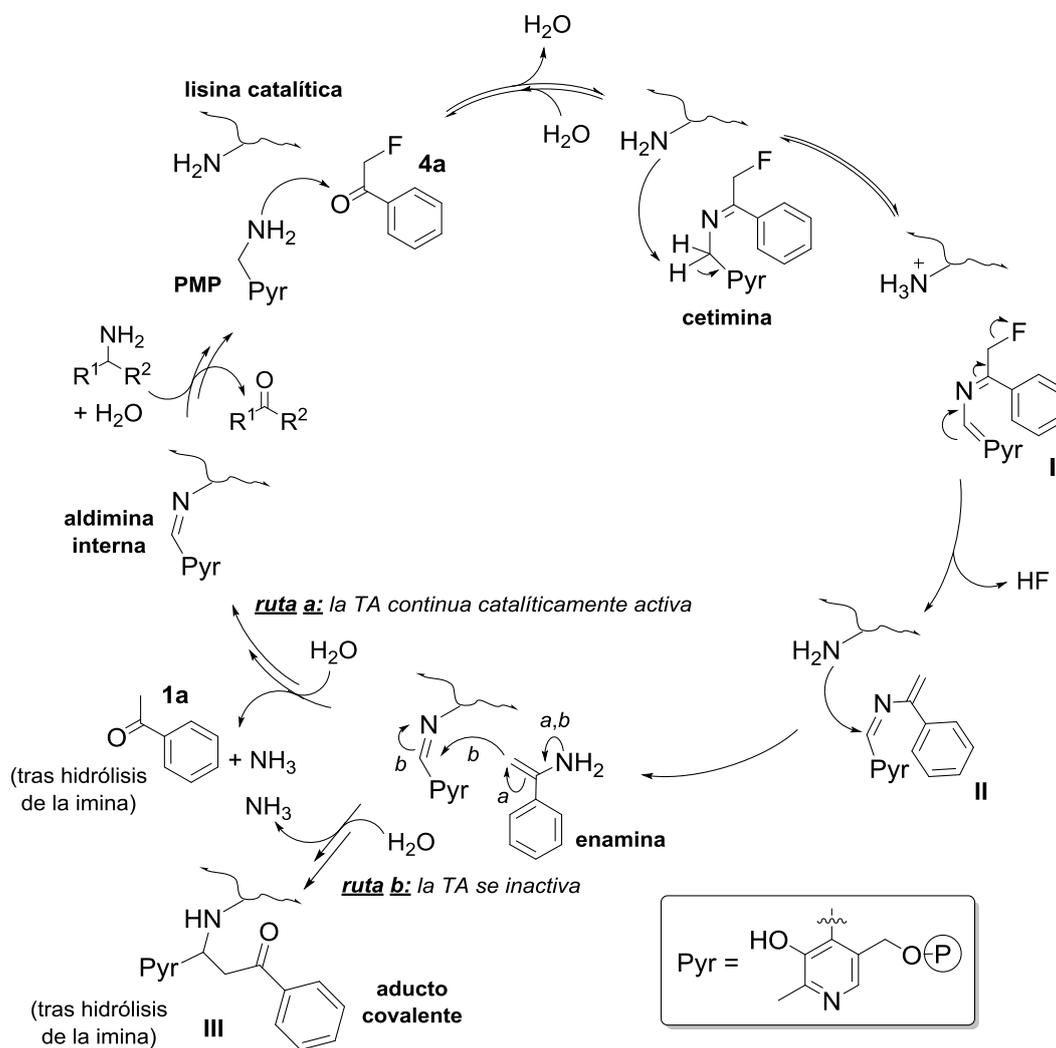
De los resultados obtenidos se pueden sacar dos conclusiones fundamentales:

- 1) En ningún caso hay conversión hacia la amina fluorada **5a**, obteniéndose en cambio en todos los casos la cetona deshalogenada **1a**.
- 2) Por otro lado, salvo para la TA-P1-A06 y la TA-P1-G06, dicha cetona no se transformó en la 1-feniletanamina **2a**. Este hecho viene a confirmar que este proceso de hidrodeshalogenación lleva asociado la inhibición enzimática de

las TAs puesto que sabíamos por resultados previos que prácticamente todas estas transaminasas podían reaccionar con la acetofenona para dar lugar a la 1-feniletanamina.<sup>44</sup>

### R.2.2. Mecanismo de hidrodesfluoración e inhibición con las $\alpha$ -fluorocetonas

En base a estos resultados y con los precedentes descritos en la bibliografía, se propone el siguiente mecanismo tanto para la hidrodesfluoración como para la inhibición observada empleando  $\alpha$ -fluorocetonas (Esquema 16).



**Esquema 16.** Mecanismo de hidrodesfluoración y de inhibición empleando TAs y cetonas fluoradas en posición  $\alpha$ .

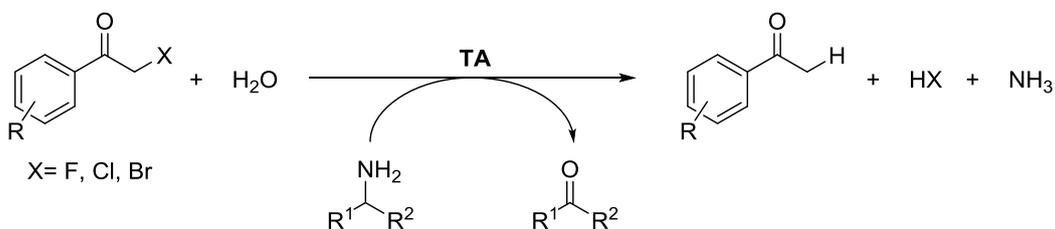
En un primer paso, la  $\alpha$ -fluorocetona (en este caso **4a**) interacciona con el PMP formando el intermedio cetimínico típico, que por desprotonación catalizada por la

## Resultados y discusión

lisina del centro activo del enzima da lugar a la cetimina **I**. Debido a la presencia del átomo de flúor en posición  $\alpha$  se produce la pérdida del átomo de halógeno dando lugar a la formación de la especie enamínica **II**, la cual, por ataque de la lisina catalítica forma la aldimina interna desprendiéndose la enamina deshalogenada.

Llegados a este punto, el sistema puede seguir a través de dos caminos de reacción distintos. Si la enamina queda “retenida” el suficiente tiempo en el centro activo de la transaminasa, atacará a la imina formada entre el PLP y la lisina catalítica generando un aducto imínico, que tras ser hidrolizado generará el producto **III** (ruta *b*), inactivando irreversiblemente a la transaminasa. Si por el contrario esta enamina difunde rápidamente hacia la disolución generará, tras un paso de hidrólisis, la cetona deshalogenada (en este caso **1a**, ruta *a*), pudiendo entrar el enzima en un nuevo ciclo catalítico. Por último, para regenerar el PMP, es necesaria la participación de otro compuesto que actúe como donador de amino.

Por lo tanto, la reacción general de hidrodeshalogenación quedaría tal como se muestra en el Esquema 17.



**Esquema 17.** Reacción de hidrodeshalogenación de cetonas fluoradas en posición  $\alpha$  mediada por TAs.

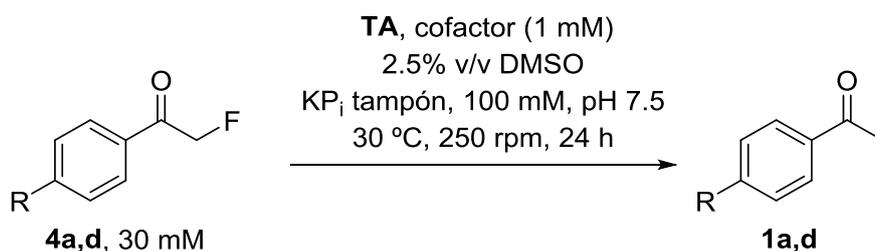
### R.2.3. Estudio del efecto del cofactor en la reacción de hidrodeshalogenación sobre **4a** y **4d**

Como ya hemos comentado anteriormente, el PLP es el cofactor necesario para la reacción de transaminación, y es una de las formas de la vitamina B<sub>6</sub>, que tiene tres derivados, piridoxal, piridoxina y piridoxamina. Este cofactor actúa como mediador en las reacciones que involucran a los compuestos aminados como transferidor del grupo amino. Así, el PLP reacciona con el donador de amino, el cual transfiere dicho grupo al

PLP para formar la piridoxamina 5'-fosfato (PMP), la cual a su vez transferirá el grupo amino al compuesto carbonílico aceptor del mismo, regenerándose de nuevo el PLP.

Puesto que en las reacciones con las  $\beta$ -fluoroaminas no fue necesaria la adición de ningún aceptor de amino,<sup>57</sup> decidimos estudiar si para las reacciones con las cetonas halogenadas era necesaria la adición de un donador de amino. Así, en un primer lugar se realizaron una serie de pruebas en las que se añadió al medio PLP o la forma aminada PMP en ausencia del donador de amino (Tabla 2). Para realizar dicho estudio se emplearon las transaminasas de *Chromobacterium violaceum* (CV-TA) y de *Arthrobacter* sp. (ArR-TA) sobreexpresadas en *Escherichia coli*, ya que habían mostrado los mejores resultados con las  $\beta$ -fluoroaminas.

**Tabla 2.** Hidrodesfluoración de los sustratos **4a** y **4d** añadiendo distintas formas del cofactor en ausencia de donador de amino.<sup>a</sup>



Entrada	TA	Cofactor	Compuesto			
			4a (%)	1a (%)	4d (%)	1d (%)
1	CV-TA	PLP	76	24	n.d	n.d.
2	ArR-TA	PLP	80	20	81	19
3	CV-TA	PMP	85	15	47	53
4	ArR-TA	PMP	96	4	75	25

<sup>a</sup> Conversiones calculadas por cromatografía de gases con fase estacionaria aquiral.

Como se puede observar, por lo general se obtuvieron conversiones muy bajas de la cetona deshalogenada tanto cuando se empleó PLP como cuando se utilizó PMP

como cofactor, lo que viene a corroborar el mecanismo propuesto en el Esquema 16, ya que para que tenga lugar el proceso de hidrogenofluoración es necesaria la participación de un donador de amino que permita la regeneración del PMP. Puesto que la concentración del cofactor (1 mM), es mucho más baja que la del sustrato (30 mM), en el momento que se acabe dicho cofactor la reacción de hidrogenohalogenación ya no podrá continuar.

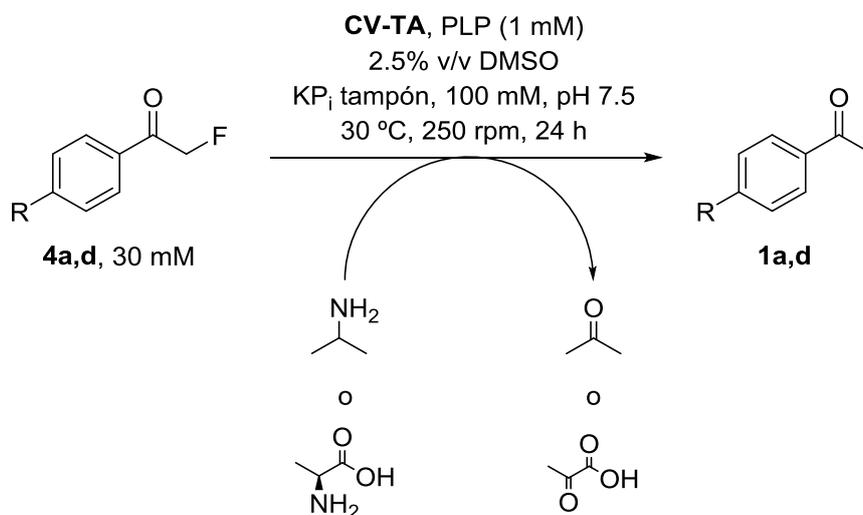
#### **R.2.4. Estudio del efecto de la concentración y el tipo de donador de amino en la reacción de hidrogenofluoración de 4a y 4d**

Llegados a este punto, decidimos investigar cual era la concentración más baja necesaria para llevar a cabo con éxito la reacción estudiada. Para ello, se realizaron las reacciones de hidrogenohalogenación sobre las cetonas fluoradas **4a** y **4d** empleando distintas concentraciones de dos donadores de amino, isopropilamina y L-alanina, en este caso utilizando únicamente la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* (Tabla 3). Se utiliza la alanina de configuración natural ya que se sabe por estudios previos que este enzima acepta como donador de amino este sustrato y no el de configuración D.

Como se aprecia en los resultados, tanto con isopropilamina como con L-alanina, la conversión hacia la formación de la cetona deshalogenada disminuye a medida que se reduce la concentración del donador de amino con ambas cetonas, observándose que es necesaria al menos una concentración de 50 mM de dicho compuesto, lo que es lógico teniendo en cuenta que se ha utilizado una concentración del sustrato de 30 mM, y que por cada molécula de cetona halogenada se necesita una molécula del donador de amino, tal como se ha propuesto en el Esquema 16.

En cuanto a la utilización de uno u otro donador de amino, se observó que normalmente se obtenían conversiones ligeramente superiores cuando se empleó isopropilamina, aunque a una concentración de 50 mM se obtuvieron conversiones cuantitativas hacia la formación de las cetonas deshalogenadas con ambos donadores. Cabe destacarse que en ningún caso se observó la aparición de las aminas desfluoradas **2a** y **2d**.

**Tabla 3.** Reacción de hidrodeshalogenación sobre **4a** y **4d** utilizando isopropilamina o L-alanina como dadores de amino en distintas concentraciones.<sup>a</sup>



Dador de amino	Concentración (mM)	Compuesto			
		4a (%)	1a (%)	4d (%)	1d (%)
Isopropilamina	50	>1	<99	1	99
Isopropilamina	25	21	79	28	72
Isopropilamina	10	25	75	33	67
L-Alanina	50	>1	<99	1	99
L-Alanina	25	28	72	10	90
L-Alanina	10	39	61	65	35

<sup>a</sup> Conversiones calculadas por cromatografía de gases con fase estacionaria aquiral.

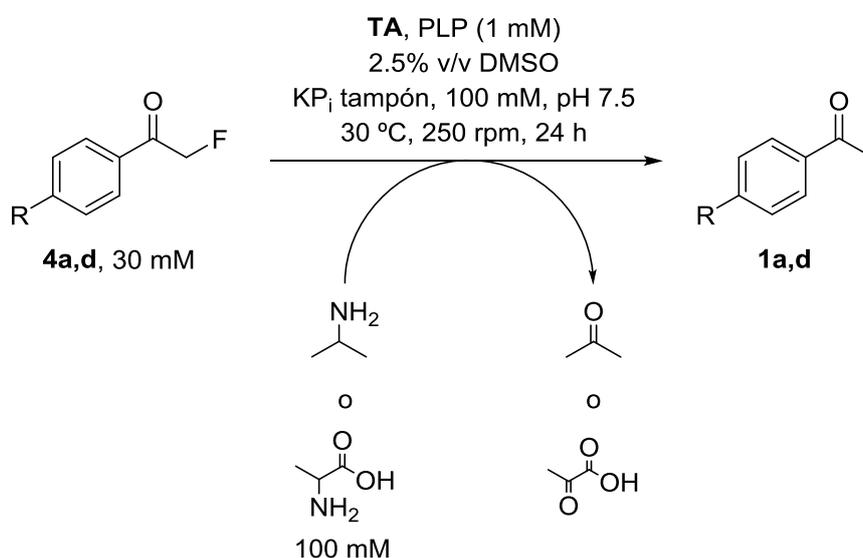
### R.2.5. Hidrodesfluoración de **4a** y **4d** empleando CV-TA y ArR-TA a concentraciones superiores del donador de amino

A continuación se estudió el proceso de hidrodesfluoración sobre las cetonas **4a** y **4d** empleando tanto la CV-TA, *S*-selectiva, como la ArR-TA, *R*-selectiva, empleando tanto isopropilamina como alanina como donadores de amino a una concentración de 100 mM. Para la primera se empleó el aminoácido en su forma natural L, mientras que para el segundo enzima se utilizó la forma D.

## Resultados y discusión

Decidimos llevar a cabo este estudio ya que en experimentos previos utilizando como dador de amino isopropilamina a una concentración de 1 M (Figura 8), en algún caso se apreciaba la amina deshalogenada en un pequeño porcentaje, por lo que decidimos estudiar el proceso a una concentración del donador de 100 mM, para ver si podría ocurrir la reacción de transaminación una vez transcurrida la deshalogenación (Tabla 4).

**Tabla 4.** Estudio de la reacción de hidrodeshalogenación de **4a** y **4d** utilizando isopropilamina, D- o L-alanina como dador de amino.<sup>a</sup>



Entrada	TA	Dador de amino	Compuesto			
			4a (%)	1a (%)	4d (%)	1d (%)
1	CV-TA	Isopropilamina	<1	>99	<1	>99
2	ArR-TA	Isopropilamina	<1	>99	3	97
3	CV-TA	L-Alanina	<1	>99	<1	>99
4	ArR-TA	D-Alanina	>1	>99	>1	>99

<sup>a</sup> Conversiones calculadas por cromatografía de gases con fase estacionaria aquiral.

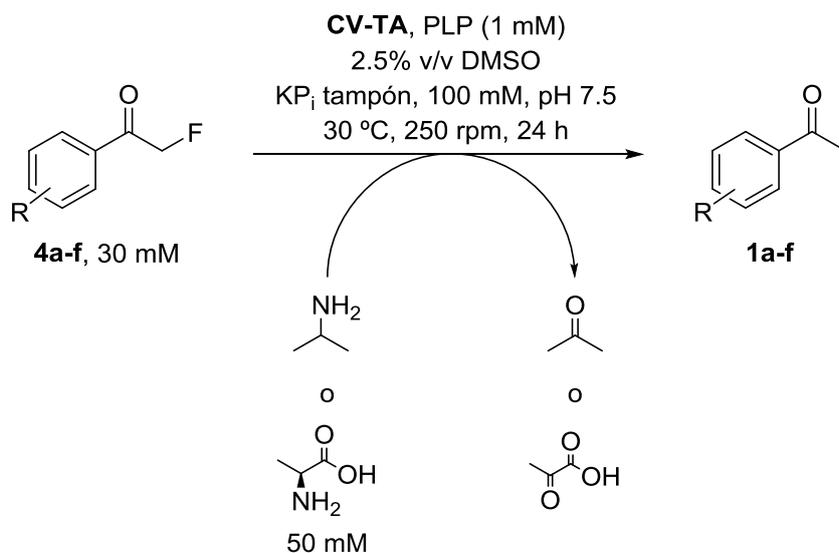
Como se puede observar en estas condiciones también se obtuvieron las cetonas desfluoradas con conversiones excelentes y además no se detectó la presencia de las

correspondientes aminas desfluoradas **2a** y **2d**. Comparando los resultados obtenidos con ambas enzimas tanto para el proceso de deshalogenación de  $\alpha$ -fluorocetonas como los resultados expuestos en procesos de resolución cinética de  $\beta$ -fluoroaminas,<sup>57</sup> decidimos utilizar únicamente la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* para los siguientes estudios, debido a los mejores resultados mostrados con respecto a la transaminasa de *Arthrobacter* sp.

#### **R.2.6. Reacción de hidrodesfluoración sobre las $\alpha$ -fluorocetonas 4a-f utilizando la CV-TA e isopropilamina o L-alanina como dador de amino**

Una vez sintetizados los sustratos de partida, se llevaron a cabo las reacciones de deshalogenación de las  $\alpha$ -fluorocetonas **4a-f** con la CV-TA utilizando tanto isopropilamina como L-alanina como dador de amino en una concentración de 50 mM (Tabla 5), ya que en estas condiciones se consiguieron conversiones cuantitativas hacia la formación de las cetonas deshalogenadas para los sustratos **4a** y **4d**, tal como se mostró en la Tabla 3, minimizando además el riesgo de formación de las aminas deshalogenadas.

Como se puede observar, en prácticamente todos los casos las reacciones transcurrieron con conversión completa, obteniéndose los correspondientes derivados de acetofenona independientemente del dador de amino utilizado. Solamente en el caso de la 2-fluoro-1-(4-metoxifenil)etanona **4e**, se obtuvieron conversiones buenas en torno al 70-80%, apreciándose una leve mejoría al utilizar L-alanina en lugar de isopropilamina. Asimismo, no se observó en ninguno de los casos la transformación de la cetona deshalogenada hacia la 1-ariletanamina.

**Tabla 5.** Reacción de hidrodesfluoración de **4a-f** utilizando la CV-TA.<sup>a</sup>

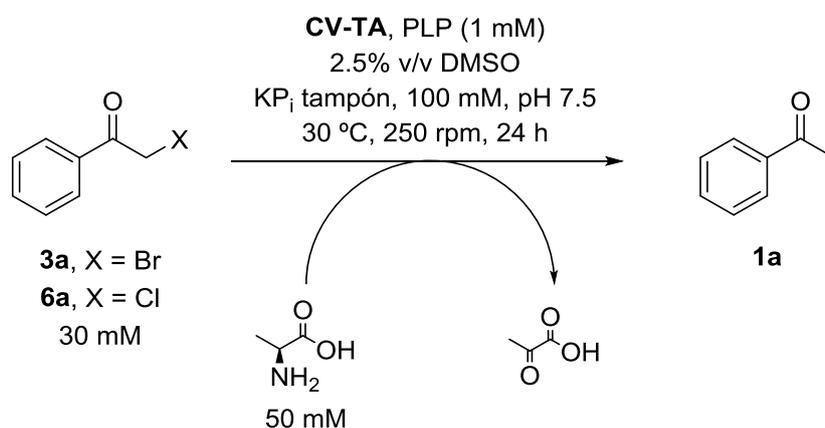
<b>R</b>	<b>Dador de amino</b>	<b>4a-f (%)</b>	<b>1a-f (%)</b>
<b>a = H</b>	Isopropilamina	<1	>99
	L-Alanina	<1	>99
<b>b = p-F</b>	Isopropilamina	<1	>99
	L-Alanina	<1	>99
<b>c = p-Cl</b>	Isopropilamina	<1	>99
	L-Alanina	<1	>99
<b>d = p-Br</b>	Isopropilamina	<1	>99
	L-Alanina	1	99
<b>e = p-OMe</b>	Isopropilamina	28	72
	L-Alanina	22	78
<b>f = m-OMe</b>	Isopropilamina	<1	>99
	L-Alanina	<1	>99

<sup>a</sup> Conversiones calculadas por cromatografía de gases con fase estacionaria aquiral.

### R.2.7. Estudio de la reacción de hidrodeshalogenación utilizando la CV-TA con la 2-bromoacetofenona y la 2-cloroacetofenona

El hecho de que estas enzimas actuaran sobre sustratos aromáticos fluorados en  $\alpha$  nos llevó a plantearnos la posibilidad de ampliar esta metodología a otros sustratos aromáticos pero modificando el halógeno en dicha posición. Así, se decidió realizar las pruebas de hidrodeshalogenación utilizando como sustratos la  $\alpha$ -bromoacetofenona (**3a**) y  $\alpha$ -cloroacetofenona (**6a**), para investigar si las transaminasas catalizaban la deshalogenación de sustratos que no fueran únicamente fluorados. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Hidrodeshalogenación de **3a** y **6a** catalizada por la CV-TA con L-alanina.<sup>a</sup>



<b>R</b>	<b>3a o 6a (%)</b>	<b>1a (%)</b>
<b>X=Br</b>	76	24
<b>X=Cl</b>	70	30

<sup>a</sup> Conversiones calculadas por cromatografía de gases con fase estacionaria quiral.

En este caso se optó en un primer lugar por emplear la L-alanina como donador de amino ya que hay que tener en cuenta que estas cetonas halogenadas pueden ser inestables frente a una amina nucleófila como la isopropilamina.

Los resultados obtenidos muestran que efectivamente ocurre el mismo proceso que en los análogos fluorados, si bien las conversiones obtenidas fueron moderadas, por

## *Resultados y discusión*

lo que habrá que seguir optimizando estas reacciones. Por último, al igual que en los sustratos aromáticos fluorados, en estas condiciones no se observó la transformación de la cetona deshalogenada hacia la correspondiente amina.

## **CONCLUSIONES**



En este Trabajo Fin de Máster se ha descrito el efecto inhibitorio de las  $\alpha$ -fluorocetonas sobre las transaminasas, utilizando tanto enzimas comerciales como sobreexpresados, observándose la hidrodeshalogenación de dichos sustratos tal como se ha descrito con las transaminasas y  $\beta$ -fluoroaminas. Es por ello que se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- Se ha llevado a cabo la síntesis de una serie de 1-aril-2-fluoroetanonas, que varían en el tipo de sustitución y su posición en el anillo aromático, obteniéndose con rendimientos de moderados a altos.
- Se ha empleado con éxito la cromatografía de gases para el seguimiento de las reacciones enzimáticas y poder calcular así las conversiones obtenidas en las mismas.
- Se ha aprovechado la promiscuidad catalítica mostrada por las transaminasas para obtener una serie de acetofenonas a partir de las correspondientes  $\alpha$ -fluorocetonas aplicando una metodología novedosa de hidrodeshalogenación. De entre todos los biocatalizadores estudiados, la transaminasa de *Chromobacterium violaceum* ha mostrado los mejores resultados.
- Se ha descrito el mecanismo de dicha reacción demostrándose la utilidad del donador de amino para poder realizar este proceso con éxito. En este sentido, se ha estudiado tanto la influencia de la concentración como del tipo de donador.
- Se han llevado a cabo otras reacciones de hidrodeshalogenación con sustratos similares utilizando transaminasas, donde únicamente se ha modificado el átomo de halógeno en posición  $\alpha$  a la cetona, observándose actividad cuando dicho átomo era cloro o bromo.



## **PARTE EXPERIMENTAL**



## E.1. REACTIVOS Y DISOLVENTES GENERALES

Las acetofenonas (**1a-f**) y las bromoacetofenonas (**3a-f**) de partida, la cloroacetofenona (**6a**), y los demás reactivos químicos se adquirieron de las siguientes casas comerciales: Acros Organics, Sigma Aldrich y Alfa Aesar, utilizándose sin ninguna purificación adicional.

Las transaminasas comerciales fueron adquiridas a la casa comercial Codexis, mientras que las de *Chromobacterium violaceum* (CV-TA) y *Arthrobacter* sp. (ArR-TA) sobreexpresadas en células de *E. coli*, fueron donadas por el Prof. Wolfgang Kroutil de la Universidad de Graz (Austria).

Las células se crecieron en un medio de tipo *luria broth* (LB) con ampicilina como antibiótico (20 mL, 120 mg/L; 330 mL, 100 mg/L para la ArR-TA) a 37 °C y 120 rpm. 10 mL de ese precultivo se usaron para añadir a un nuevo medio LB con ampicilina (330 mL, 90 mg/L) a 37 °C y 120 rpm, y se midió la densidad óptica a 600 nm hasta que alcanzó un valor de 0.7 para la CV-TA y de 0.5 para la ArR-TA. En ese momento se añadió una nueva cantidad de ampicilina (30 mg/L) e isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, 120 mg/L). Se dejó agitando a 20 °C durante 3 h. Posteriormente, las células se centrifugaron a 4800 rpm durante 20 min a 4 °C y se lavaron con tampón fosfato (pH 7.5, 50 mM para la CV-TA, 100 mM para la ArR-TA), y se dejó reposar con otra porción del mismo tampón, para posteriormente congelarlo con nitrógeno líquido y liofilizarlo. Las células obtenidas se almacenaron a 4 °C.

Los disolventes empleados, diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), acetonitrilo (MeCN), dimetilsulfóxido (DMSO) y acetato de etilo (AcOEt) fueron empleados sin ningún secado previo, mientras que el metanol (MeOH) fue destilado previamente bajo nitrógeno y secado sobre hidruro cálcico.

## E.2. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS

### E.2.1. Cromatografía en gel de sílice

Para la cromatografía en capa fina (TLC, del inglés *thin layer chromatography*) se utilizaron 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 una disolución acuosa al 1% de  $\text{KMnO}_4$  (2 g), 5% de NaOH (10 g) en 200 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , siendo todas las proporciones en peso/volumen. En algunos casos y alternativamente se empleó como revelador una disolución de ninhidrina (0.3 g) en EtOH (100 mL). La cromatografía en columna se realizó sobre gel de sílice 60 (230-400 *mesh*) adquirida a Merck.

### E.2.2. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los experimentos de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN y  $^{19}\text{F}$ -RMN se realizaron en los espectrómetros Bruker AV-300 (300.13 MHz para  $^1\text{H}$ , 75.5 MHz para  $^{13}\text{C}$  y 282 MHz para  $^{19}\text{F}$ ), y Bruker DPX-300 (300.13 MHz para  $^1\text{H}$ , 75.5 MHz para  $^{13}\text{C}$  y 282 MHz para  $^{19}\text{F}$ ), empleando en todos los casos  $\text{CDCl}_3$  como disolvente. Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) 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  $^1\text{H}$ -RMN se emplearon las siguientes iniciales: *s* (singulete), *d* (doblete), *dd* (doble doblote), *t* (triplete), *q* (cuatriplete) y *m* (multiplete).

### E.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

A continuación se detallan los protocolos seguidos para la preparación de los materiales de partida y de referencia utilizados en este Trabajo Fin de Máster, así como los obtenidos en las reacciones enzimáticas.

#### E.3.1. Síntesis química de las cetonas fluoradas 4a-f

Se preparó una mezcla de KF (6.90 mmol, 1.5 equiv.) y ZnF<sub>2</sub> (6.90 mmol, 1.5 equiv.) en 10 mL de MeCN en un tubo sellado, y se dejó agitar calentando a 100 °C durante 1 h. Posteriormente se añadió una disolución del sustrato bromado **3a-f** (4.60 mmol, 1 equiv.) en 10 mL de MeCN, y se dejó 24 h con agitación y calentando a 100 °C.

Posteriormente se evaporó el disolvente bajo presión reducida en el rotavapor con el baño frío y se añadió agua (20 mL). La disolución se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 20 mL) y la fase orgánica se lavó con una disolución saturada de NaCl (2 x 20 mL) y se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se evaporó una vez más bajo presión reducida en el rotavapor con el baño frío, obteniéndose las cetonas deseadas. Las cetonas **4a** y **4c** se purificaron mediante cromatografía en columna, utilizando en ambos casos un eluyente hexano-AcOEt (90:10).

#### E.3.2. Síntesis química de las 1-ariletanaminas 2a-f

A una disolución de la acetofenona correspondiente **4a-f** (0.72 mmol, 1 equiv.) en MeOH seco (2.4 mL), se le añadió NH<sub>4</sub>OAc (7.2 mmol, 10 equiv.) y NaBH<sub>3</sub>CN (1.44 mmol, 2 equiv.). El tubo Schlenk utilizado se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Tras ese tiempo, se acidificó el medio de reacción con HCl 2 N hasta pH 5, y el MeOH se evaporó bajo presión reducida en el rotavapor. La reacción se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 x 10 mL) y se recogió la fase acuosa. Posteriormente, la fase orgánica se lavó con HCl 2 N (2 x 15 mL). La fase acuosa se basificó con NaOH 2 N hasta pH 9 y después se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 x 10 mL), recogiendo la fase orgánica, que se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se evaporó bajo presión reducida en el rotavapor

obteniendo las aminas deseadas sin necesidad de realizar procesos adicionales de purificación.

### **E.3.3. Estudio del tipo de cofactor en las reacciones de las $\alpha$ -fluorocetonas **4a** y **4d** en presencia de las transaminasas**

En un tubo eppendorf se añadió la correspondiente transaminasa CV-TA o ArR-TA sobreexpresada en *E. coli* (10 mg), y posteriormente se adicionó una mezcla de la disolución reguladora fosfato (100 mM, pH 7.5) conteniendo 1 mM de PLP o 1 mM de PMP, y DMSO (25  $\mu$ L, volumen total: 1 mL). Finalmente se añadió el sustrato correspondiente **4a** o **4d** (30 mM) a la mezcla de reacción y se dejó agitando durante 24 h a 30 °C y 250 rpm en un agitador orbital.

La reacción se paró adicionando una disolución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (350  $\mu$ L) y se extrajo con AcOEt (3 x 350  $\mu$ L). Las fases orgánicas se juntaron y secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Las conversiones se midieron por cromatografía de gases empleando el análisis detallado en la Tabla 7.

### **E.3.4. Reacción de las $\alpha$ -fluorocetonas **4a** y **4d** con transaminasas empleando distintas concentraciones de dador de amino**

En un tubo eppendorf se añadió la correspondiente transaminasa CV-TA o ArR-TA sobreexpresada en *E. coli* (10 mg), y posteriormente se adicionó una mezcla de la disolución reguladora fosfato (100 mM, pH 7.5, 1 mM PLP), posteriormente el dador de amino a la concentración deseada (isopropilamina o L- o D-alanina, desde 10 mM hasta 1 M), y DMSO (25  $\mu$ L, volumen total: 1 mL). Finalmente se añadió el sustrato correspondiente **4a** o **4d** (30 mM) a la mezcla de reacción y se dejó agitando durante 24 h a 30 °C y 250 rpm en un agitador orbital.

La reacción se paró adicionando una disolución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (350  $\mu$ L) y se extrajo con AcOEt (3 x 350  $\mu$ L). Las fases orgánicas se juntaron y secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Las conversiones se midieron por cromatografía de gases empleando el análisis detallado en la Tabla 7.

### E.3.5. Reacción de deshalogenación de las $\alpha$ -fluorocetonas usando transaminasas

En un tubo eppendorf se añadió la transaminasa CV-TA sobreexpresada en *E. coli* (10 mg), y posteriormente se adicionó una mezcla de la disolución reguladora fosfato (100 mM, pH 7.5, 1 mM PLP) con una concentración de 50 mM para el dador de amino, utilizando isopropilamina o L-alanina, y DMSO (25  $\mu$ L, volumen total: 1 mL). Finalmente se añadió el sustrato correspondiente **4a-f** (30 mM) a la mezcla de reacción y se dejó agitando durante 24 h a 30 °C a 250 rpm en un agitador orbital.

La reacción se paró adicionando una disolución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (350  $\mu$ L) y se extrajo con AcOEt (2 x 350  $\mu$ L). Las fases orgánicas se juntaron y secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Las conversiones se midieron por cromatografía de gases empleando el análisis detallado en la Tabla 7.

### E.3.6. Reacción de deshalogenación utilizando $\alpha$ -bromoacetofenona y $\alpha$ -cloroacetofenona en presencia de transaminasas

En un tubo eppendorf se añadió la transaminasa CV-TA sobreexpresada en *E. coli* (10 mg), y posteriormente se adicionó una mezcla de la disolución reguladora fosfato (100 mM, pH 7.5, 1 mM PLP) con una concentración 50 mM para la isopropilamina y DMSO (25  $\mu$ L, volumen total: 1 mL). Finalmente se añadió el sustrato correspondiente **3a** o **5a** (30 mM) a la mezcla de reacción y se dejó agitando 24 h a 30 °C a 250 rpm en un agitador orbital.

La reacción se paró adicionando una disolución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (350  $\mu$ L) y se extrajo con AcOEt (2 x 350  $\mu$ L). Las fases orgánicas se juntaron y secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Las conversiones se midieron por cromatografía de gases empleando el análisis detallado en la Tabla 7.

#### E.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

Para las medidas de las conversiones se utilizaron las siguientes columnas con fases estacionarias aquirales:

Hewlett Packard HP-5 (30 m x 0.32 mm x 0.25  $\mu$ m, 12.2 psi N<sub>2</sub>).

Hewlett Packard HP-1 (30 m x 0.32 mm x 0.25  $\mu$ m, 12.2 psi N<sub>2</sub>).

**Tabla 7.** Determinación de las conversiones por CG con fase estacionaria aquiral.

Compuesto	Columna	Programa <sup>a</sup>	Tiempo de retención (min)
1a	HP-5	50/20/6/60/0/40/220/2	15.4
2a	HP-5	50/20/6/60/0/40/220/2	13.5
4a	HP-5	50/20/6/60/0/40/220/2	21.8
1b	HP-1	80/8/40/180/1	3.9
2b	HP-1	80/8/40/180/1	3.5
4b	HP-1	80/8/40/180/1	4.4
1c	HP-1	75/15/20/180/0	12.8
2c	HP-1	75/15/20/180/0	16.2
4c	HP-1	75/15/20/180/0	15.1
1d	HP-1	75/15/20/180/2	17.4
2d	HP-1	75/15/20/180/2	17.7
4d	HP-1	75/15/20/180/2	17.9
1e	HP-1	90/0/2.5/120/1/40/200/1	8.8
2e	HP-1	90/0/2.5/120/1/40/200/1	7.1
4e	HP-1	90/0/2.5/120/1/40/200/1	9.7
1f	HP-1	120/8/40/200/0	4.0

---

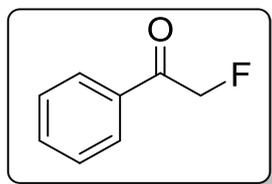
<b>2f</b>	HP-1	120/8/40/200/0	3.8
<b>4f</b>	HP-1	120/8/40/200/0	4.6
<b>3a</b>	HP-5	50/20/6/60/0/40/220/2	26.1
<b>5a</b>	HP-5	50/20/6/60/0/40/220/2	24.6

---

<sup>a</sup> Programa: temperatura inicial (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ temperatura (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ temperatura (°C)/ tiempo (min).

## E.5. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS

### 1-Fenil-2-fluoroetanon (4a)



Sólido naranja

**Rendimiento:** 60%

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>OF

**Peso molecular:** 138.14 g/mol

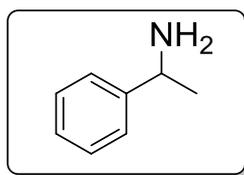
**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt/hexano): 0.47

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 5.52 (*d*, *J* = 46.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>F), 7.48 (*m*, 2H, Ph), 7.58 (*m*, 1H, Ph), 7.86 (*dd*, *J* = 8.3, 1.4 Hz, 2H, Ph)

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 83.5 (*d*, *J* = 182.1 Hz), 127.8 (*d*, *J* = 2.6 Hz), 128.9, 133.7, 134.2, 193.4 (*d*, *J* = 15.5 Hz)

**<sup>19</sup>F-RMN** (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) -230.97.

**1-Feniletanamina (2a)**



Compuesto comercial disponible en el laboratorio

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>N

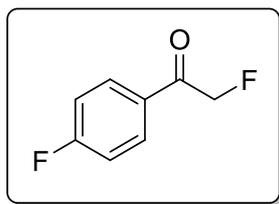
**Peso molecular:** 121.18 g/mol

**R<sub>f</sub>** (5% MeOH/AcOEt): 0.18

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 1.40 (*d*, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.56 (*s*, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.13 (*q*, *J* = 6.6 Hz, 1H, CH), 7.26 (*m*, 1H, Ph), 7.35 (*m*, 4H, Ph)

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 25.7, 51.4, 125.7, 126.8, 128.5, 147.8

**2-Fluoro-1-(4-fluorofenil)etanona (4b)**



Sólido naranja

**Rendimiento:** 82%

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>OF<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 156.13 g/mol

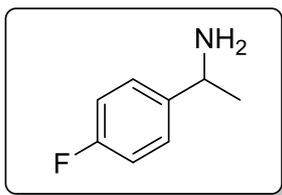
**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt/Hexano): 0.48

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 5.48 (*d*, *J* = 46.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>F), 7.17 (*t*, *J* = 8.6 Hz, 2H, Ph), 7.94 (*dd*, *J* = 8.9, 5.3 Hz, 2H, Ph)

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 83.6 (*d*, *J* = 183.2 Hz), 116.2 (*d*, *J* = 22.2 Hz), 130.8 (*dd*, *J* = 9.5, 3.2 Hz), 131.1 (*d*, *J* = 9.5 Hz), 166.2 (*d*, *J* = 256.6 Hz), 192.1 (*d*, *J* = 15.9 Hz)

**<sup>19</sup>F-RMN** (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) -229.58, -102.78.

**1-(4-Fluorofenil)etanamina (2b)**



Aceite amarillo

**Rendimiento:** 47%

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>NF

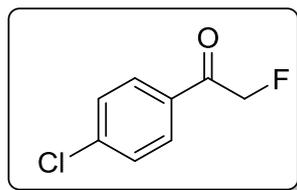
**Peso molecular:** 139.17 g/mol

**R<sub>f</sub>** (5% MeOH/AcOEt): 0.10

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 1.36 (*d*, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.64 (*s*, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.11 (*q*, *J* = 6.6 Hz, 1H, CH), 7.00 (*t*, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ph), 7.30 (*dd*, *J* = 8.4, 5.6 Hz, 2H, Ph)

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 25.9, 50.8, 115.3 (*d*, *J* = 21.3 Hz), 127.3 (*d*, *J* = 7.8 Hz), 143.4, 161.8 (*d*, *J* = 244.4 Hz)

**1-(4-Clorofenil)-2-fluoroetanona (4c)**



Sólido naranja

**Rendimiento:** 63%

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

**Peso molecular:** 172.58 g/mol

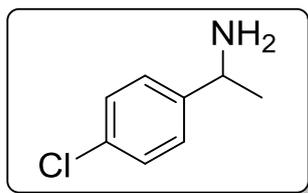
**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt/Hexano): 0.53

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 5.48 (*d*, *J* = 46.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>F), 7.47 (*d*, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ph), 7.84 (*d*, *J* = 8.6 Hz, 2H, Ph)

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 83.7 (*d*, *J* = 183.4 Hz), 129.4, 129.5 (*d*, *J* = 3.2 Hz), 132.1, 140.8, 192.6 (*d*, *J* = 16.1 Hz)

**<sup>19</sup>F-RMN** (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) -229.69

**1-(4-Clorofenil)etanamina (2c)**



Aceite amarillo

**Rendimiento:** 59%

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>NCl

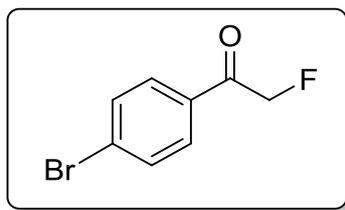
**Peso molecular:** 155.63 g/mol

**R<sub>f</sub>** (5% MeOH/AcOEt) : 0.14

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 1.32 (*d*, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.60 (*s*, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.06 (*q*, *J* = 6.6 Hz, 1H, CH), 7.24 (*s*, 4H, Ph)

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 25.8, 50.8, 127.3, 128.7, 132.5, 146.1

**1-(4-Bromofenil)-2-fluoroetanova (4d)**



Sólido rosa

**Rendimiento:** 73%

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

**Peso molecular:** 217.04 g/mol

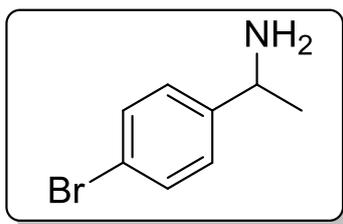
**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt/Hexano): 0.68

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 5.48 (*d*, *J* = 46.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>F), 7.64 (*d*, *J* = 8.6 Hz, 2H, Ph), 7.77 (*d*, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ph)

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 83.7 (*d*, *J* = 183.6 Hz), 129.6 (*d*, *J* = 2.7 Hz), 130.0, 132.4, 132.6, 192.8 (*d*, *J* = 16.5 Hz)

**<sup>19</sup>F-RMN** (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) -229.82

**1-(4-Bromofenil)etanamina (2d)**



Aceite amarillo

**Rendimiento:** 20%

**Fórmula empírica:** C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>NBr

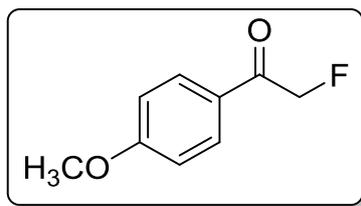
**Peso molecular:** 200.08 g/mol

**R<sub>f</sub>** (5% MeOH/AcOEt): 0.10

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm) 3.32 (*d*, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.64 (*s*, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.05 (*q*, *J* = 6.6 Hz, 1H, CH), 9.19 (*d*, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ph), 9.41 (*d*, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ph)

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 25.8, 50.9, 120.5, 127.7, 131.6, 146.7

**2-Fluoro-1-(4-metoxifenil)etanona (4e)**



Sólido naranja

**Rendimiento:** 85%

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

**Peso molecular:** 168.17 g/mol

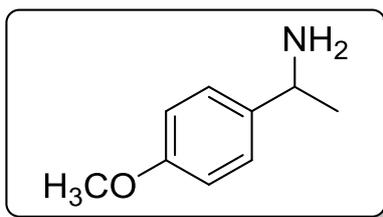
**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt/Hexano): 0.36

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 3.87 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 5.47 (d, *J* = 47.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>F), 6.95 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, Ph), 7.88 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H)

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 55.7, 83.6 (d, *J* = 181.8 Hz), 114.2, 126.9, 130.4 (d, *J* = 2.8 Hz), 164.3, 192.1 (d, *J* = 15.7 Hz)

**<sup>19</sup>F-RMN** (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) -230.05

**2-Fluoro-1-(4-metoxifenil)etanamina (2e)**



Aceite blanco

**Rendimiento:** 62%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>NO

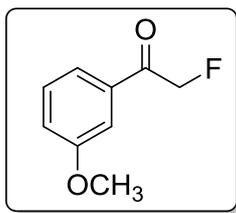
**Peso molecular:** 151.21 g/mol

**R<sub>f</sub>** (5% MeOH/AcOEt): 0.10

**<sup>1</sup>H NMR** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 1.40 (*d*, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.77 (*s*, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.83 (*s*, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.11 (*q*, *J* = 6.6 Hz, 1H, CH), 6.91 (*d*, *J* = 8.6 Hz, 2H, Ph), 7.30 (*d*, *J* = 8.5, 2H, Ph)

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 25.7, 50.7, 55.3, 113.8, 126.7, 139.9, 158.4

**2-Fluoro-1-(3-metoxifenil)etanona (4f)**



**Rendimiento:** 47%

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

**Peso molecular:** 168.17 g/mol

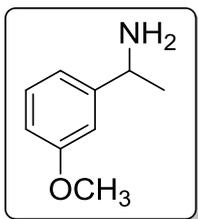
**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt/Hexano): 0.53

**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 3.76 (*s*, 3H, OCH<sub>3</sub>), 5.42 (*d*, *J* = 46.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>F), 7.06 (*m*, 1H, Ph), 7.15 (*s*, 1H, Ph), 7.32 (*m*, 2H, Ph)

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 55.6, 83.6 (*d*, *J* = 182.3 Hz), 112.1, 120.2, 120.7, 130.01, 134.9, 160.1, 193.2 (*d*, *J* = 15.2 Hz)

**<sup>19</sup>F-RMN** (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) -230.89

**2-Fluoro-1-(3-metoxifenil)etanamina (2f)**



Aceite amarillo

**Rendimiento:** 52%

**Fórmula empírica:** C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>NO

**Peso molecular:** 151.21 g/mol

**R<sub>f</sub>** (5% MeOH/AcOEt): 0.11

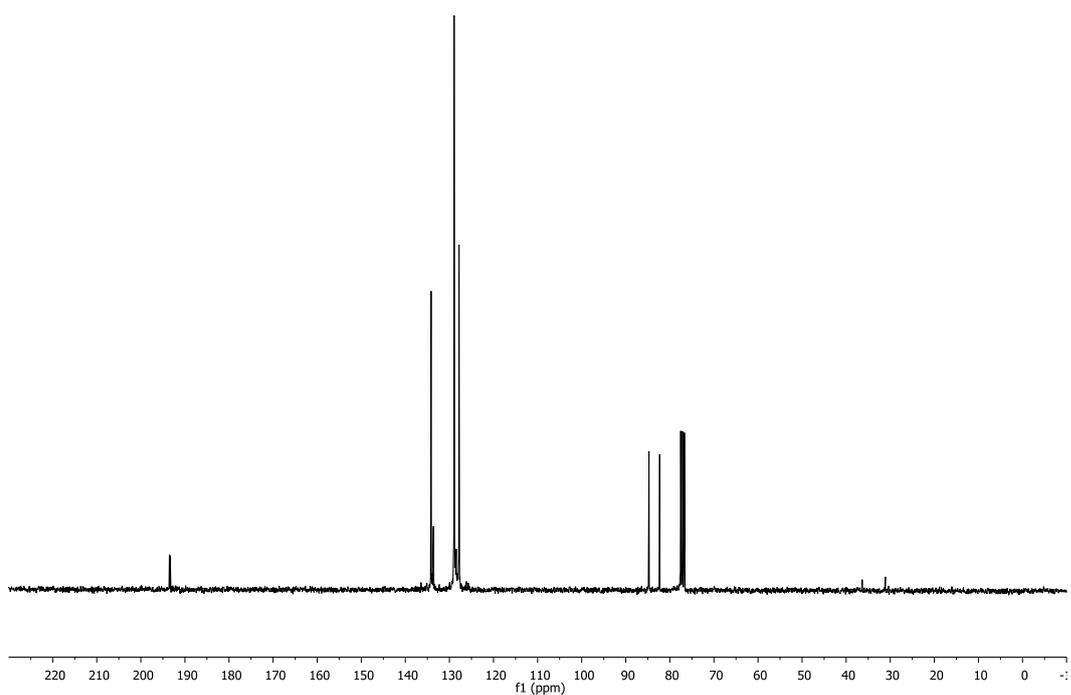
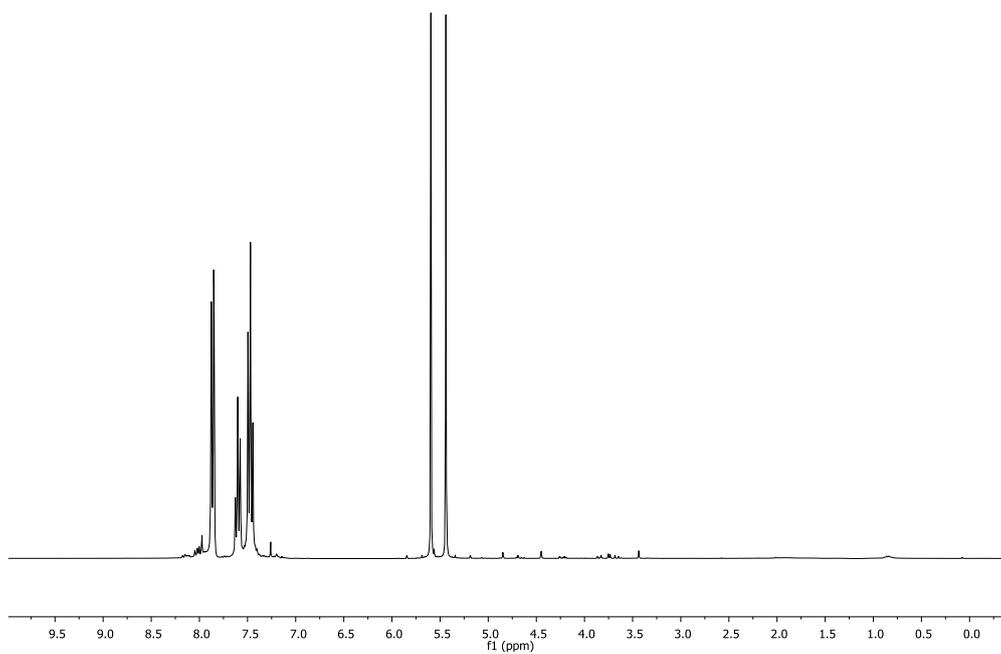
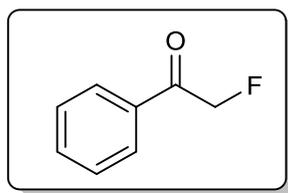
**<sup>1</sup>H-RMN** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ(ppm) 1.37 (*d*, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.74 (*s*, 2H, NH<sub>2</sub>), 3.79 (*s*, 3H, OCH<sub>3</sub>), 4.07 (*q*, *J* = 6.7 Hz, 1H, CH), 6.77 (*m*, 1H, Ph), 6.91 (*m*, 2H, Ph), 7.23 (*t* aparente, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ph)

**<sup>13</sup>C-RMN** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ (ppm) 25.6, 51.3, 55.2, 111.4, 112.1, 118.1, 129.5, 149.5, 159.8

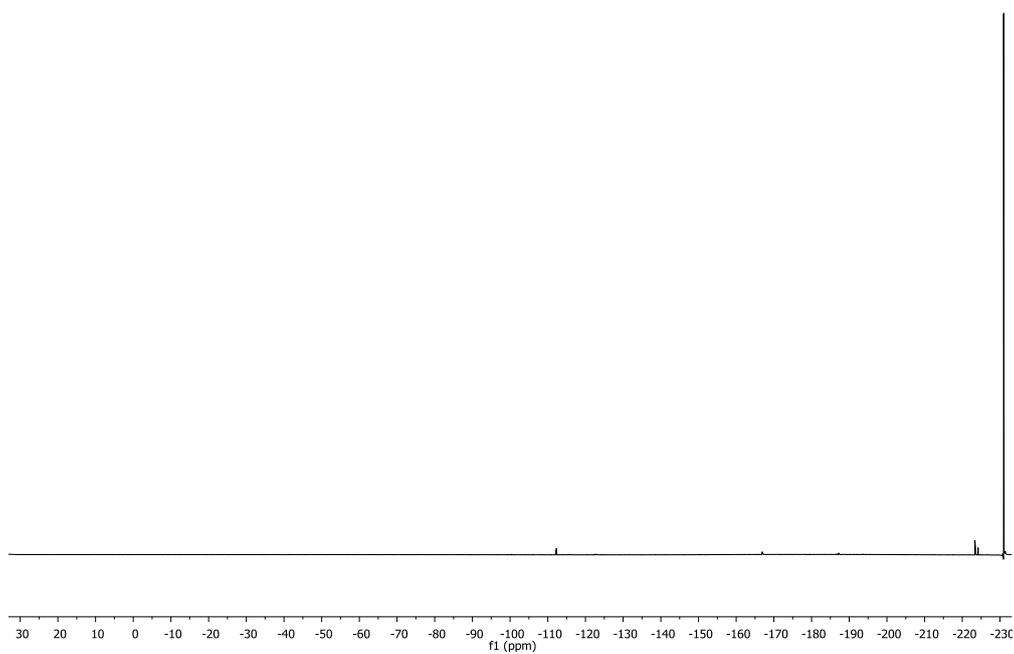
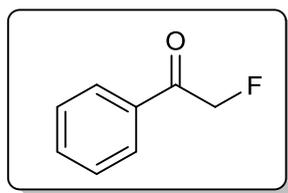


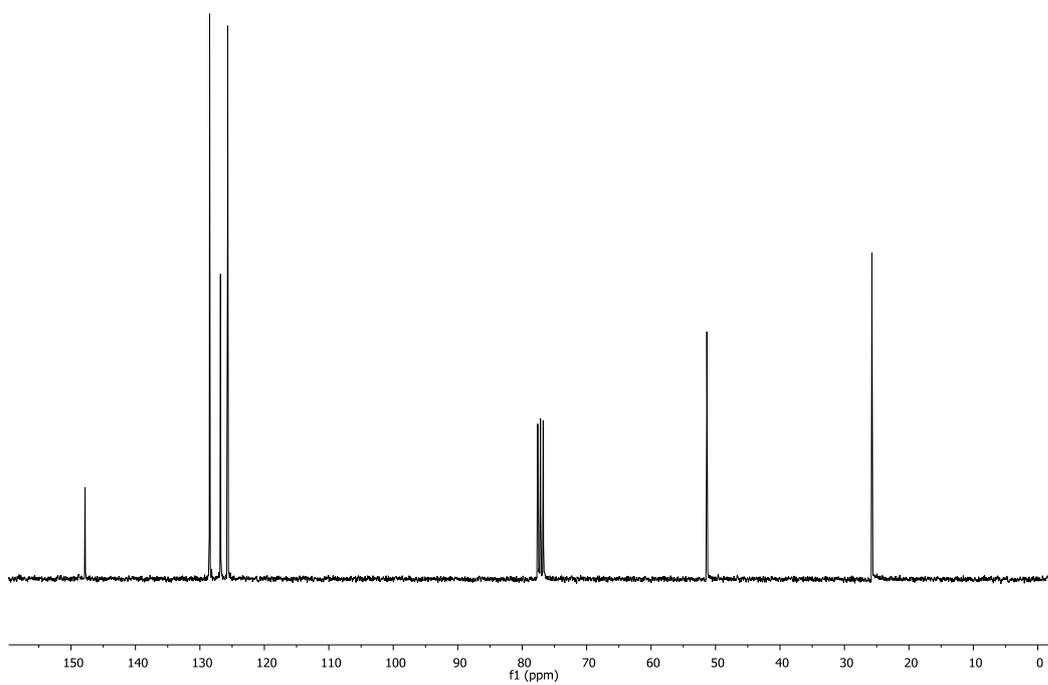
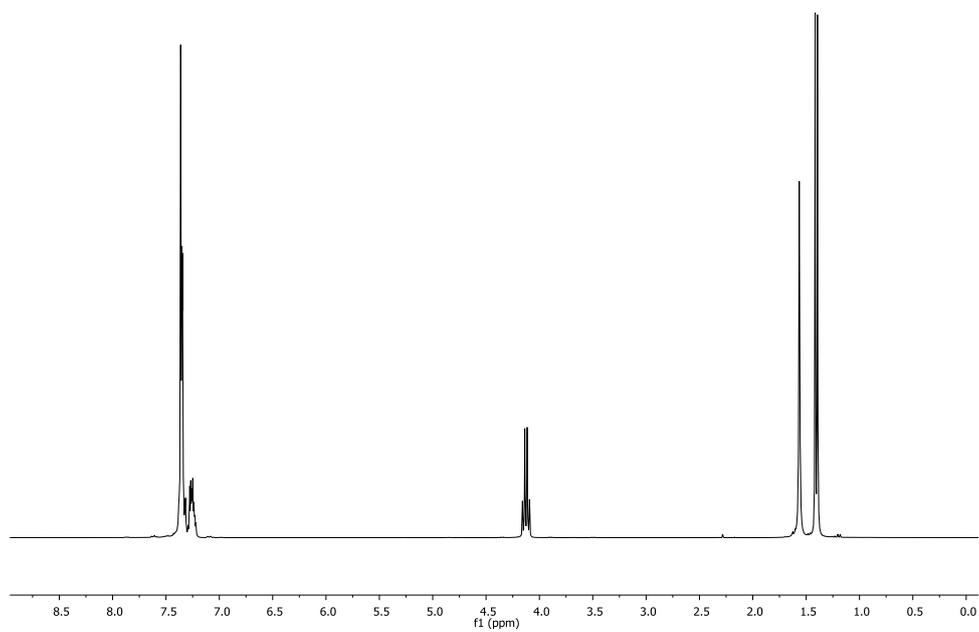
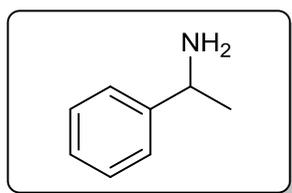
## **ESPECTROS DE RMN**



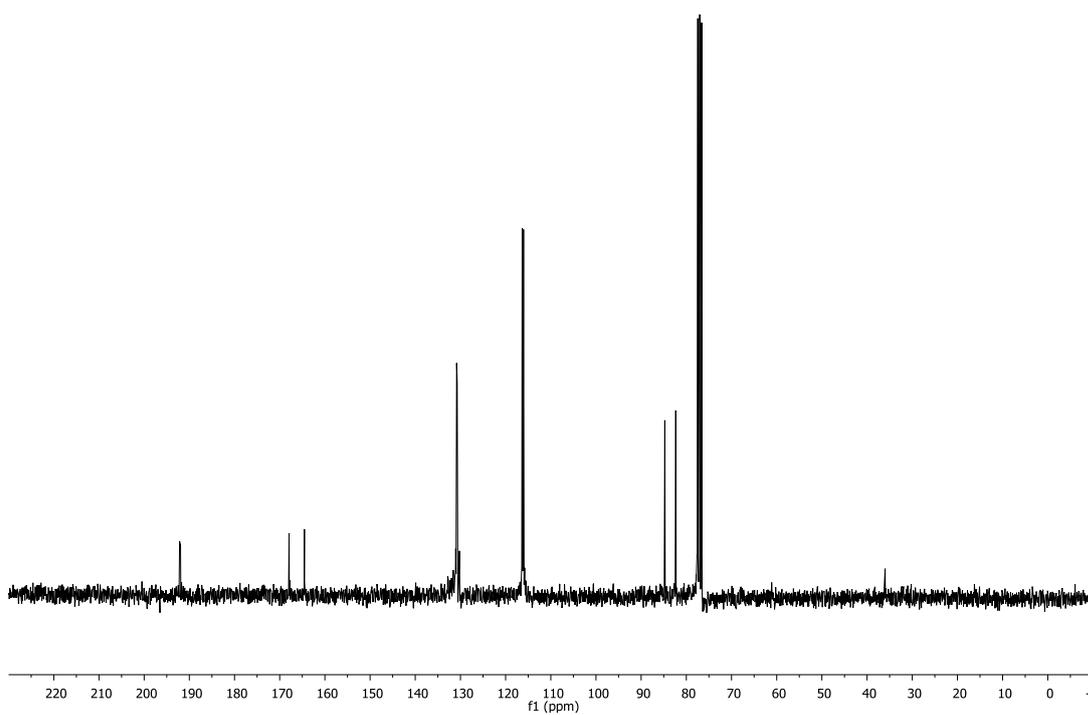
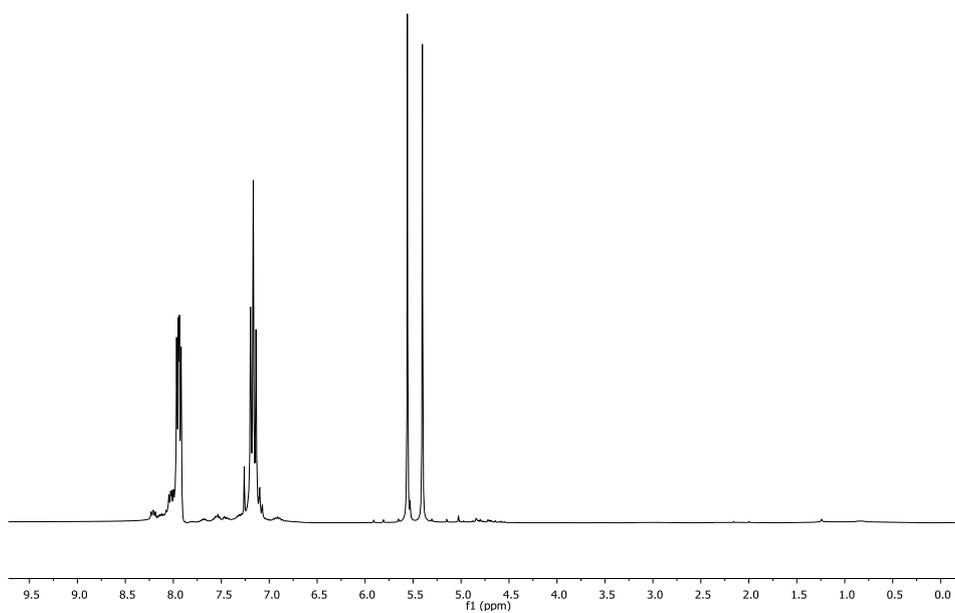
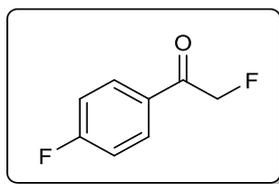


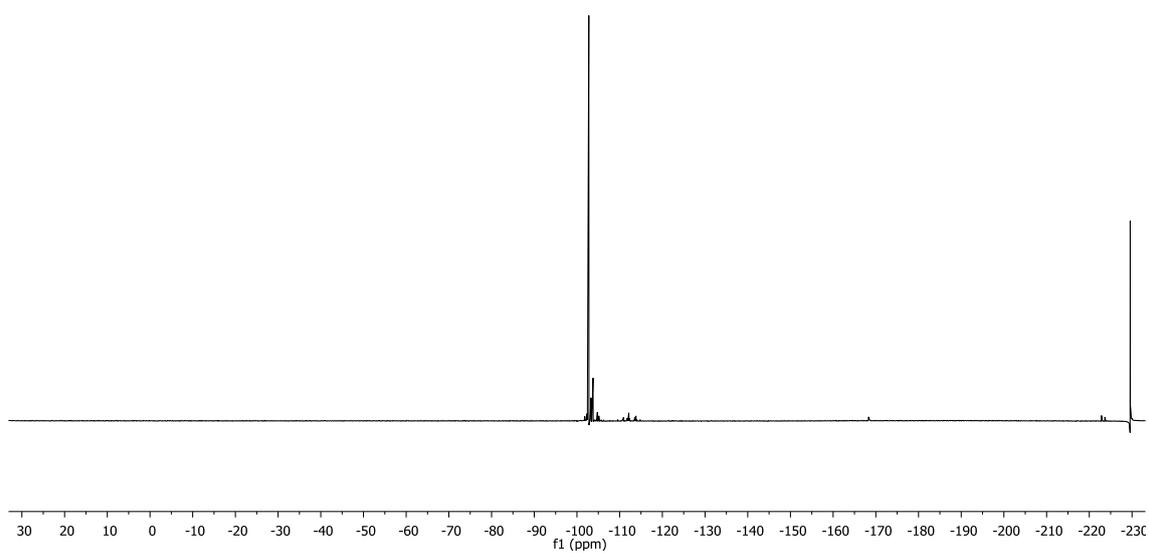
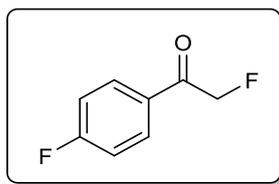
*Espectros de RMN*



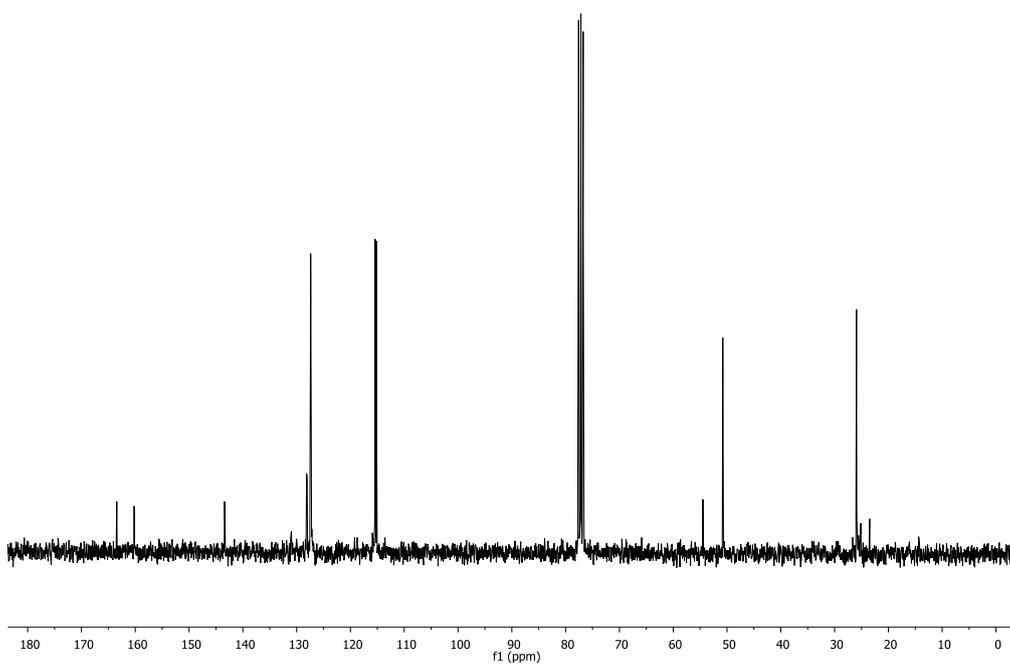
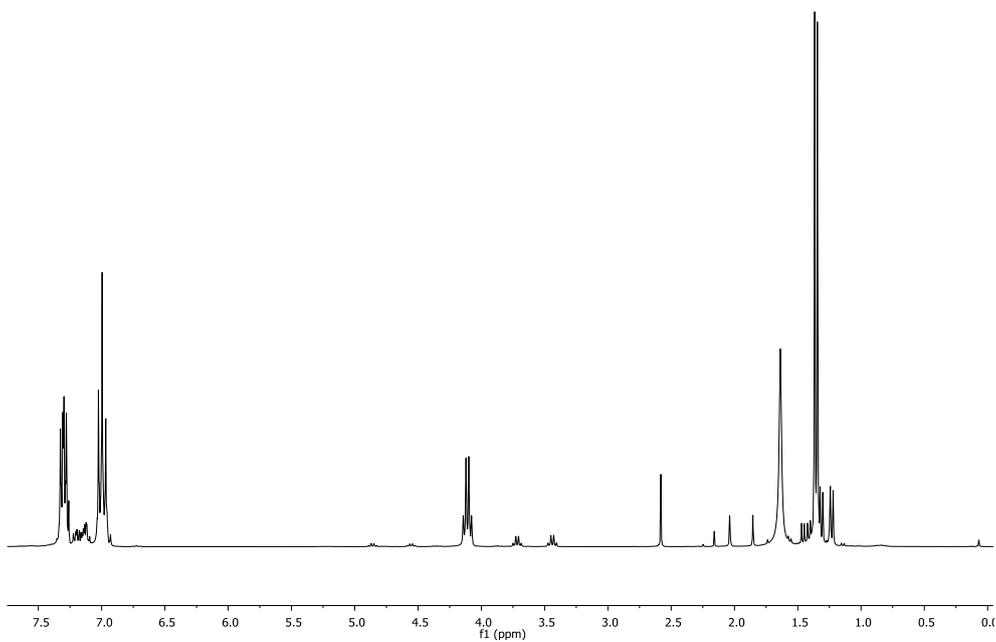
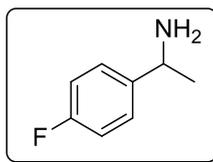


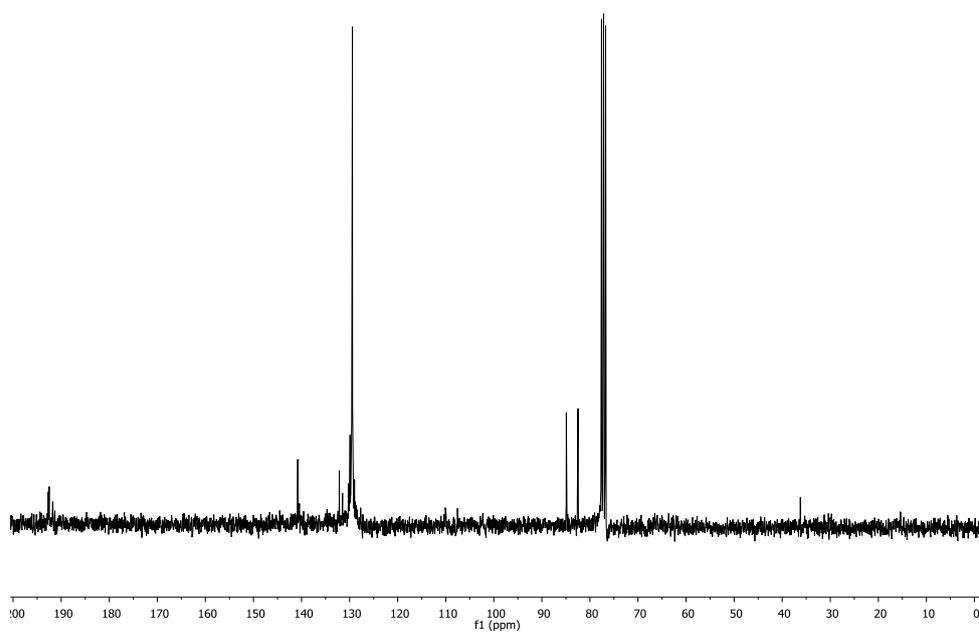
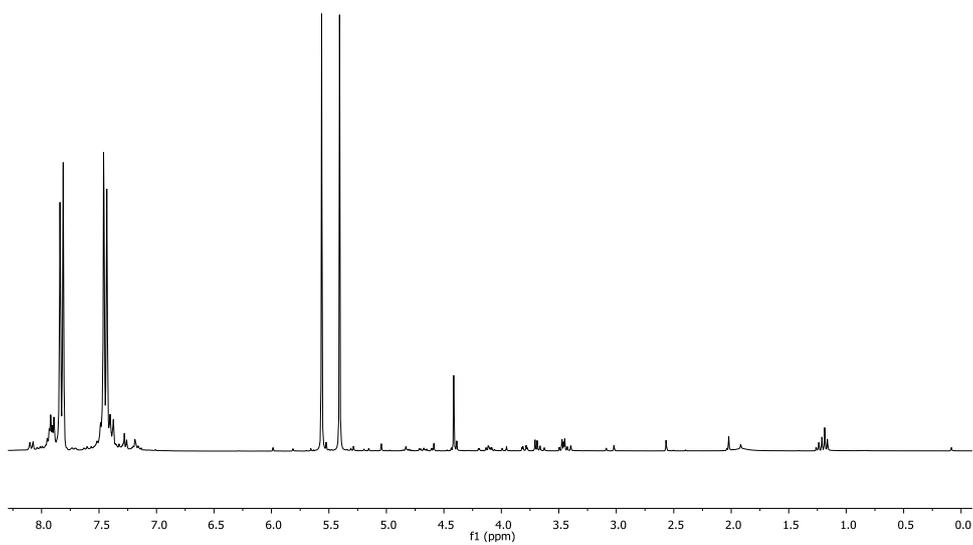
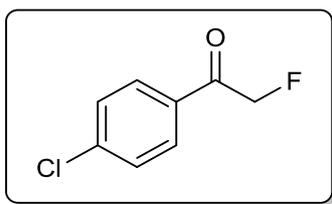
*Espectros de RMN*



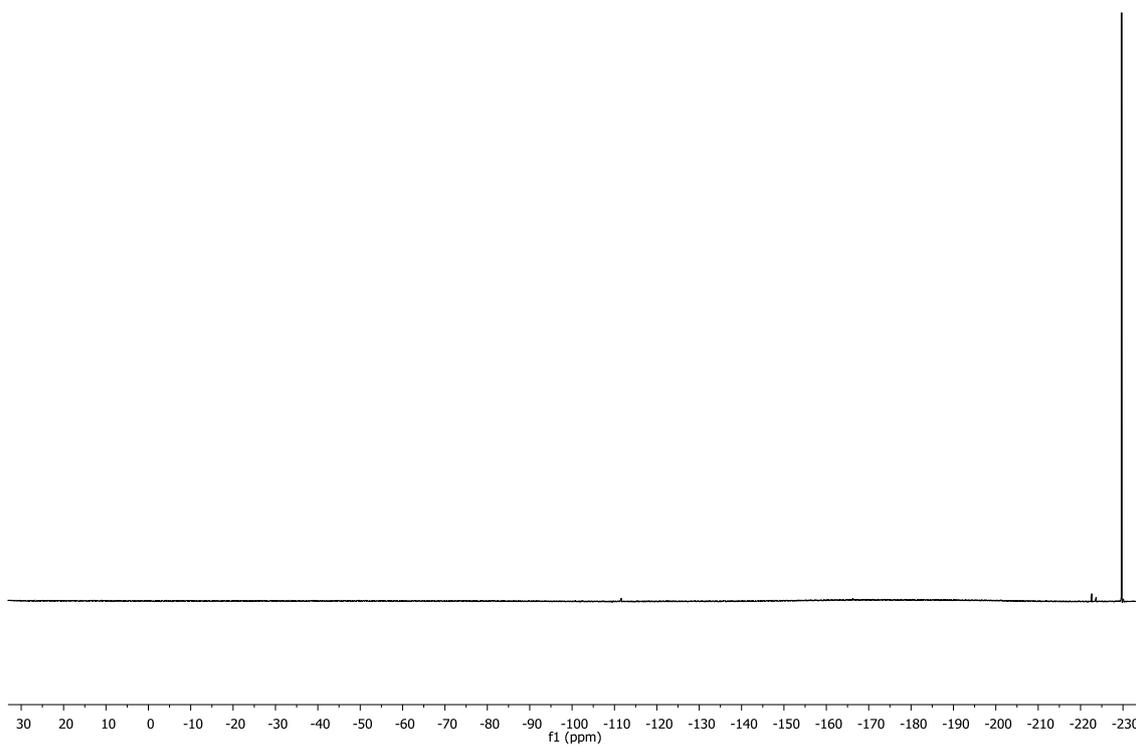
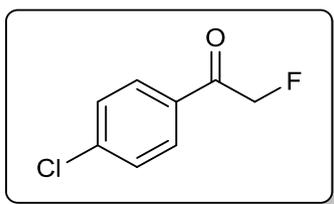


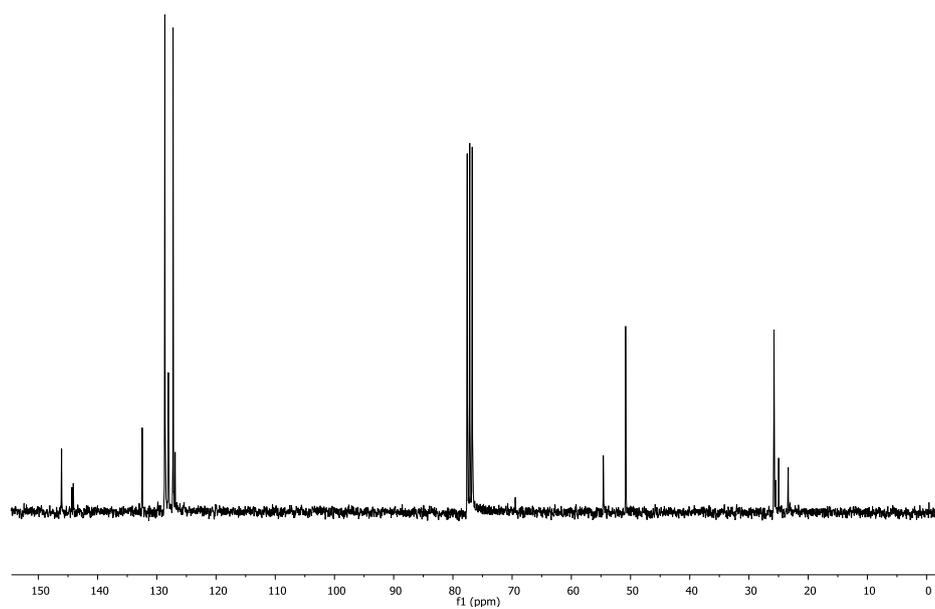
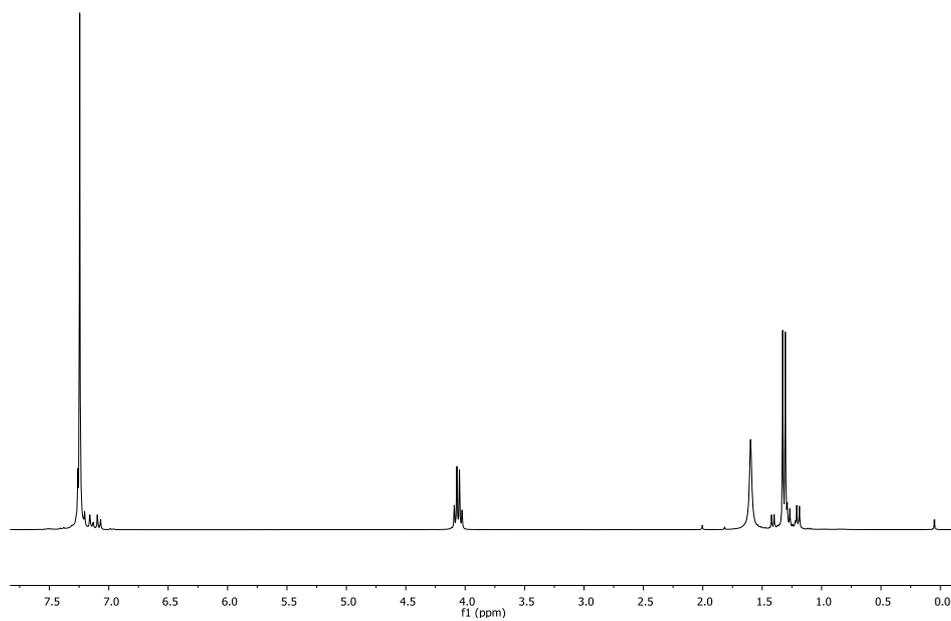
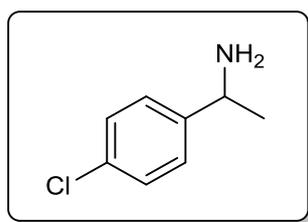
*Espectros de RMN*



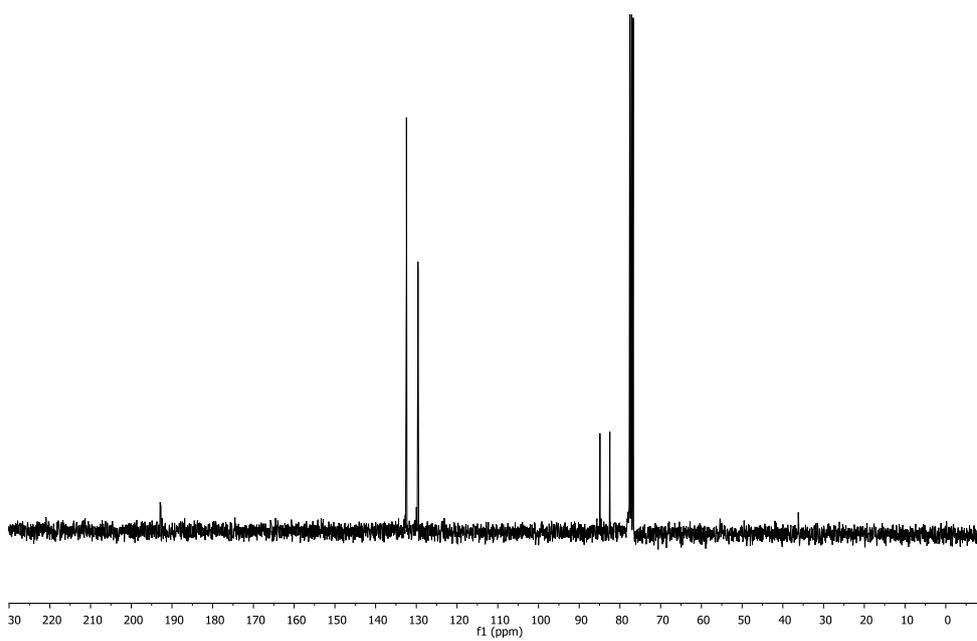
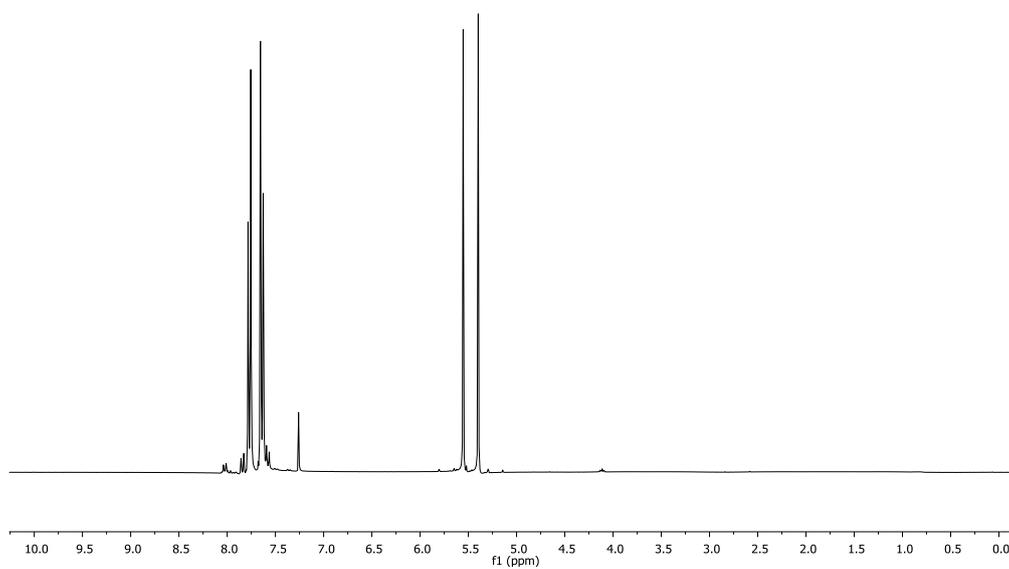
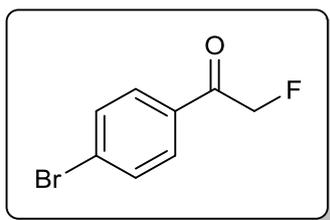


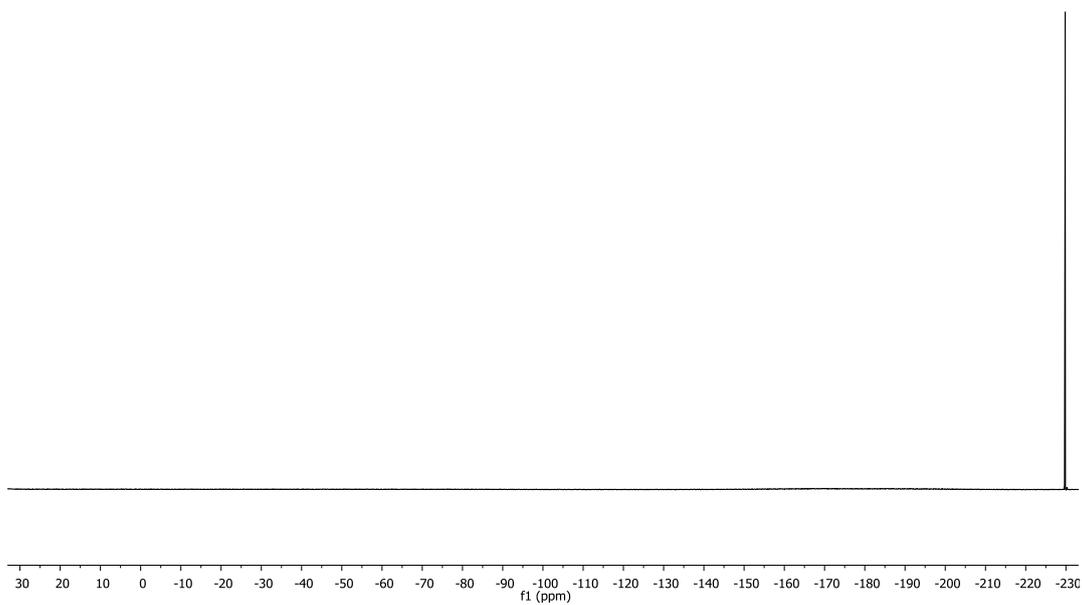
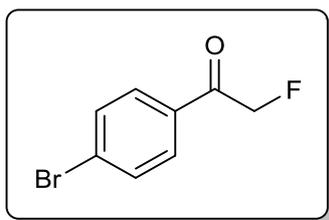
*Espectros de RMN*



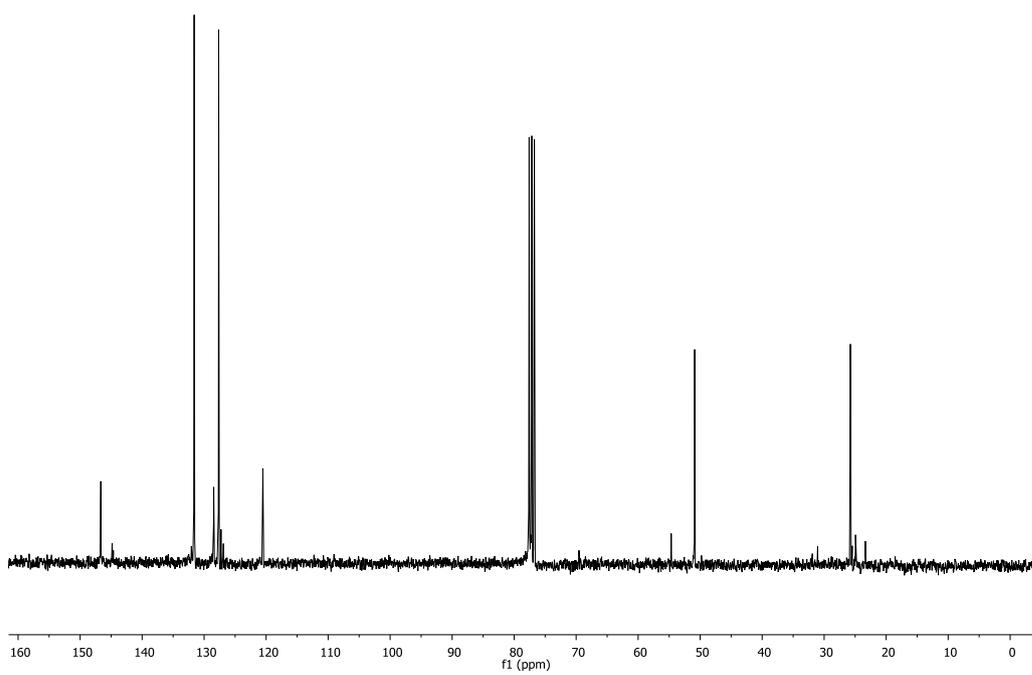
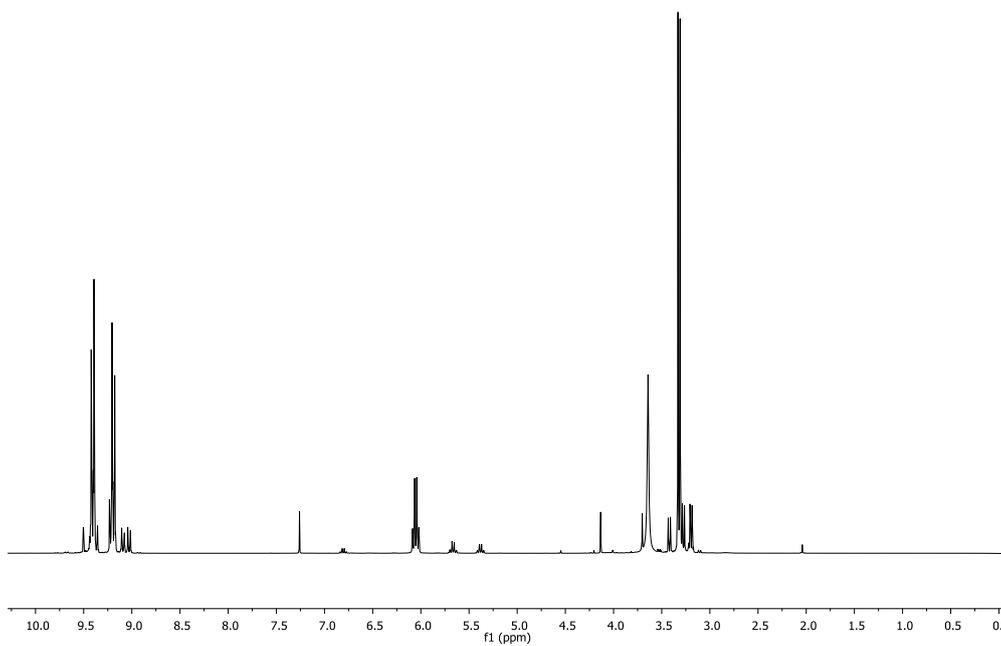
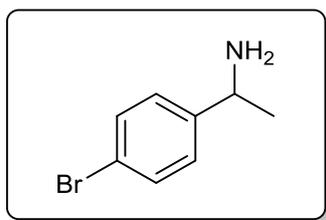


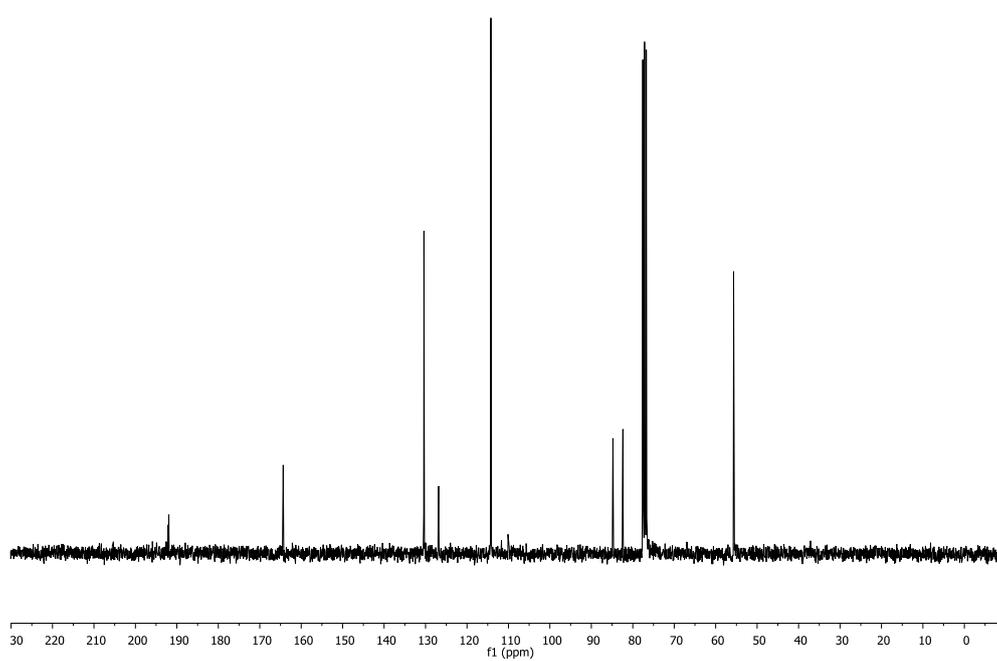
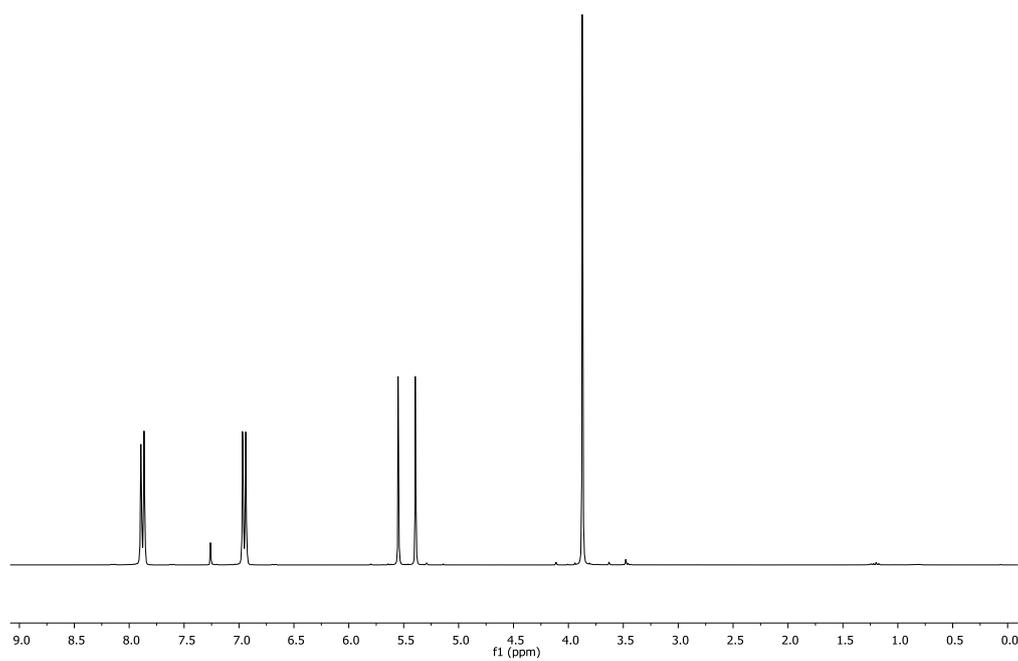
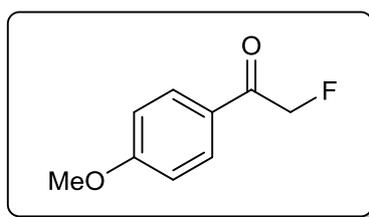
*Espectros de RMN*



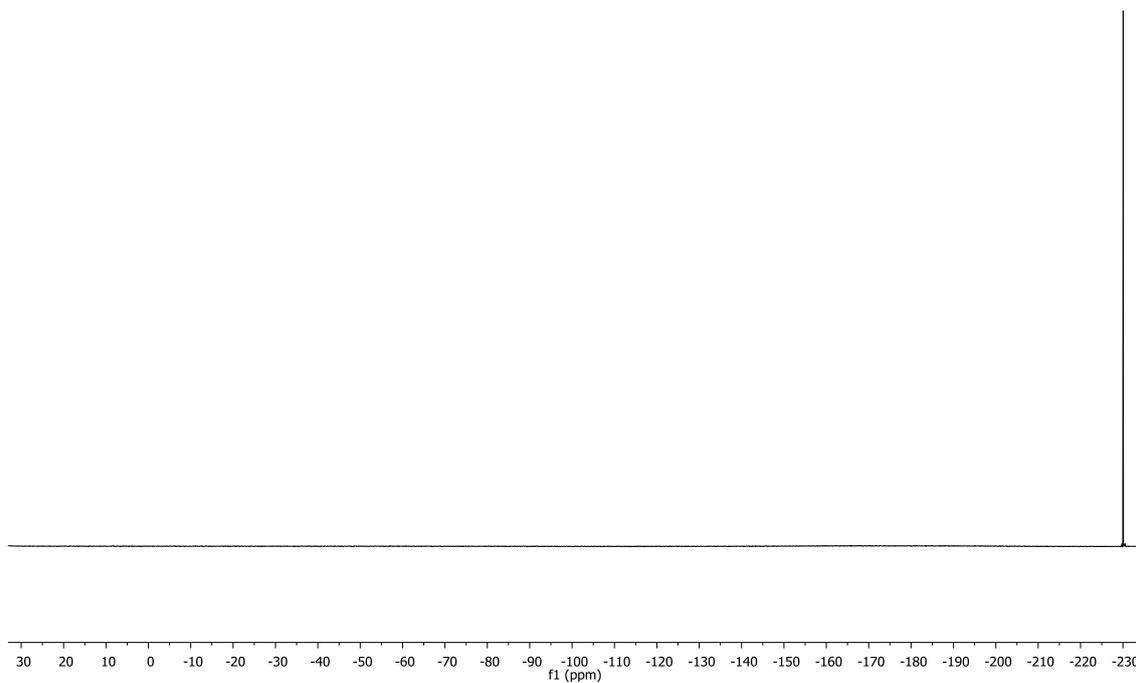
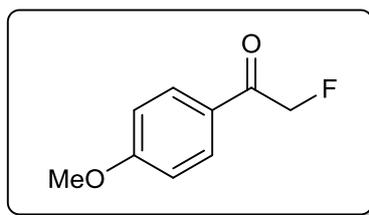


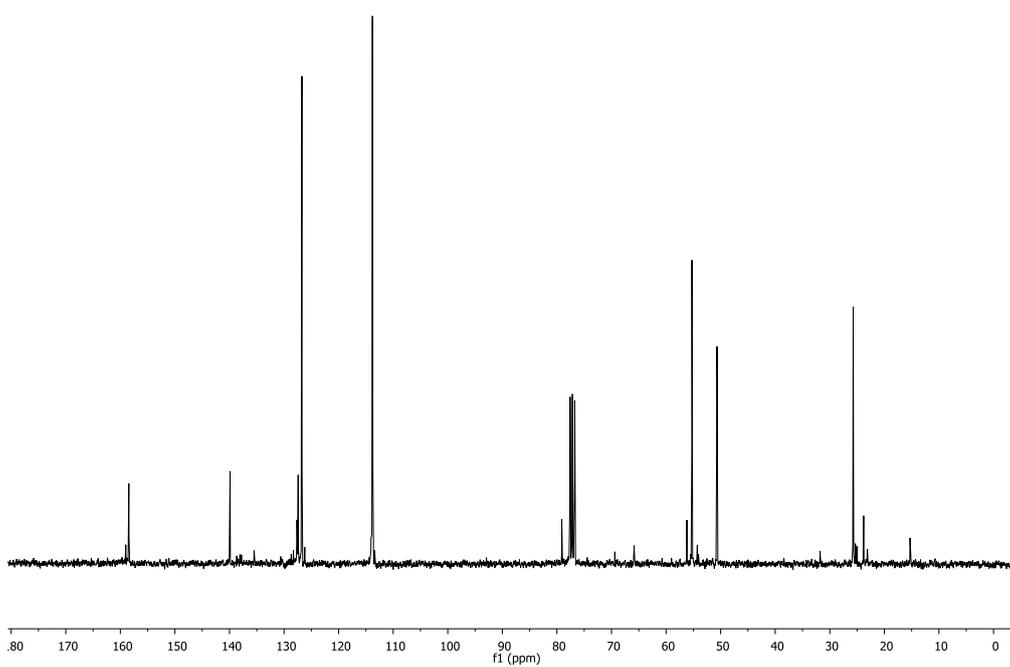
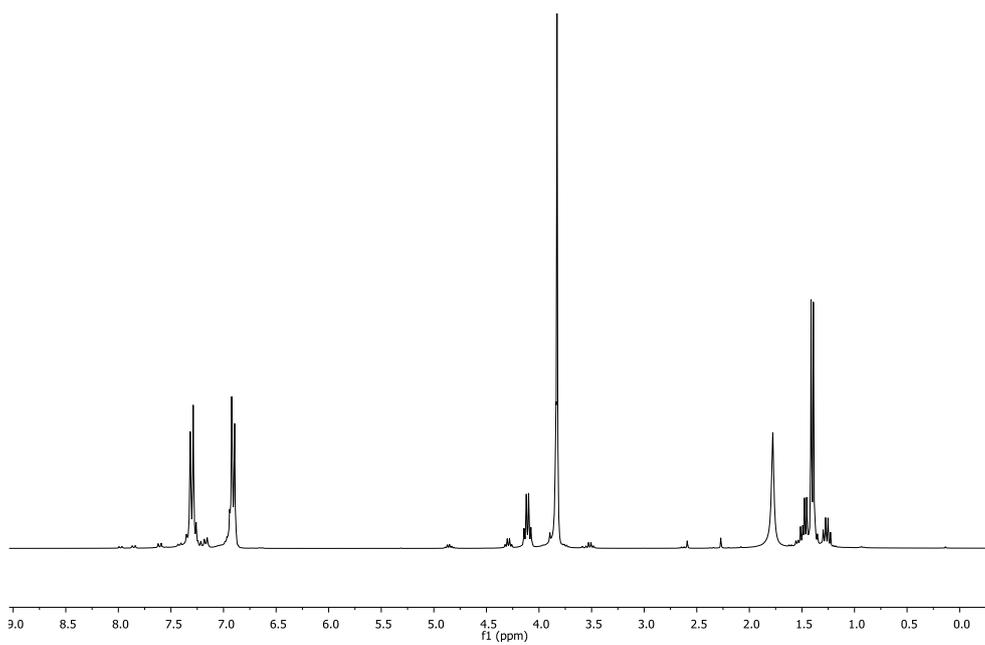
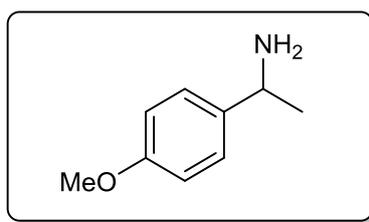
*Espectros de RMN*



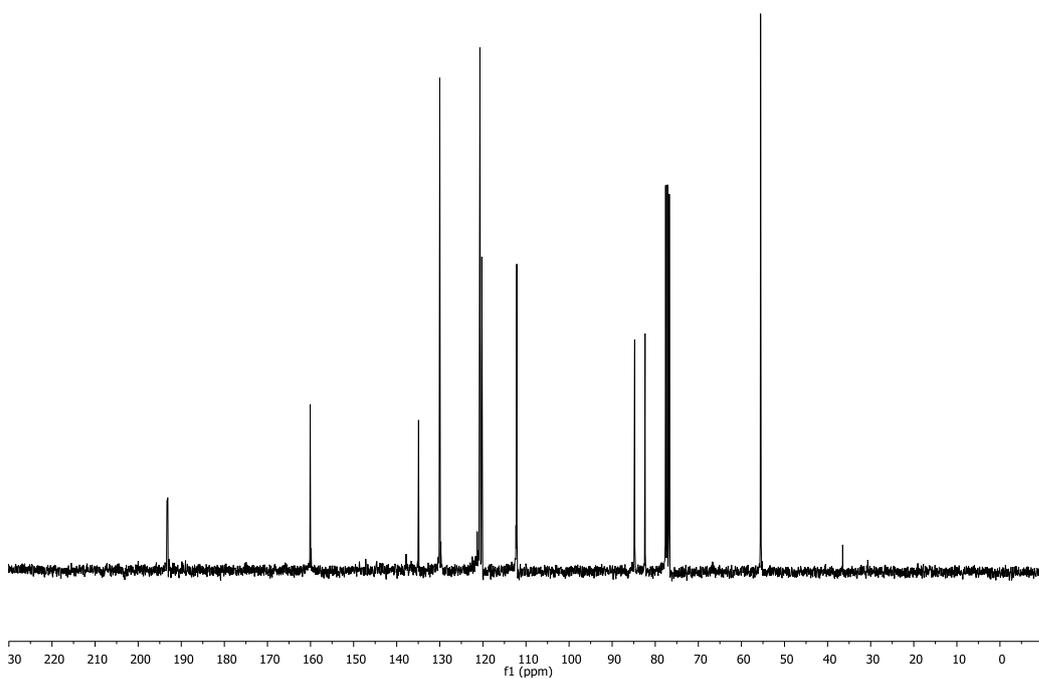
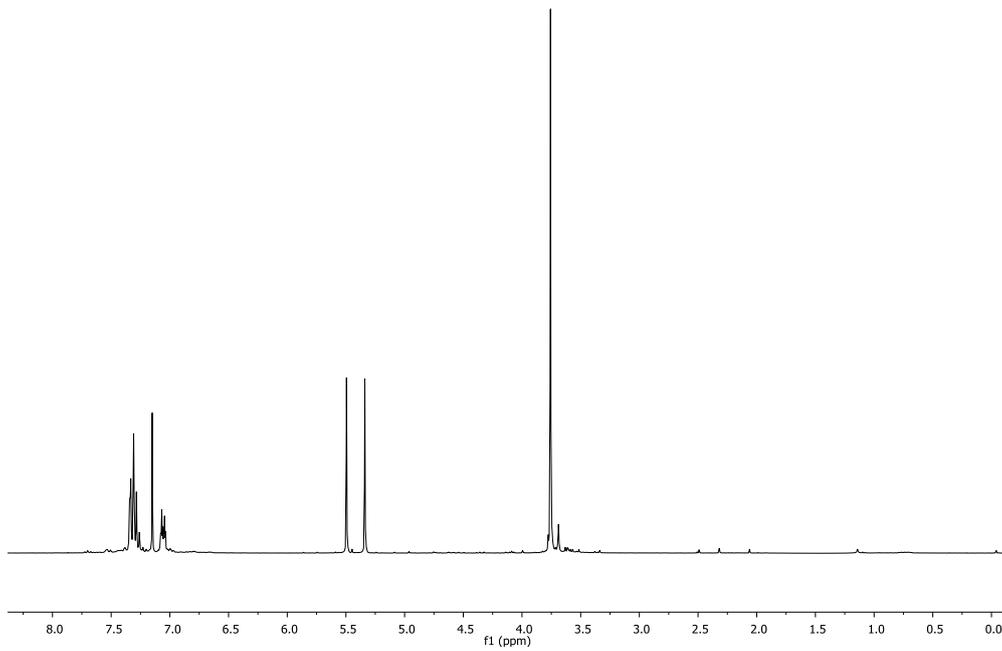
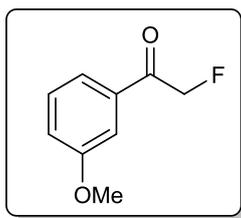


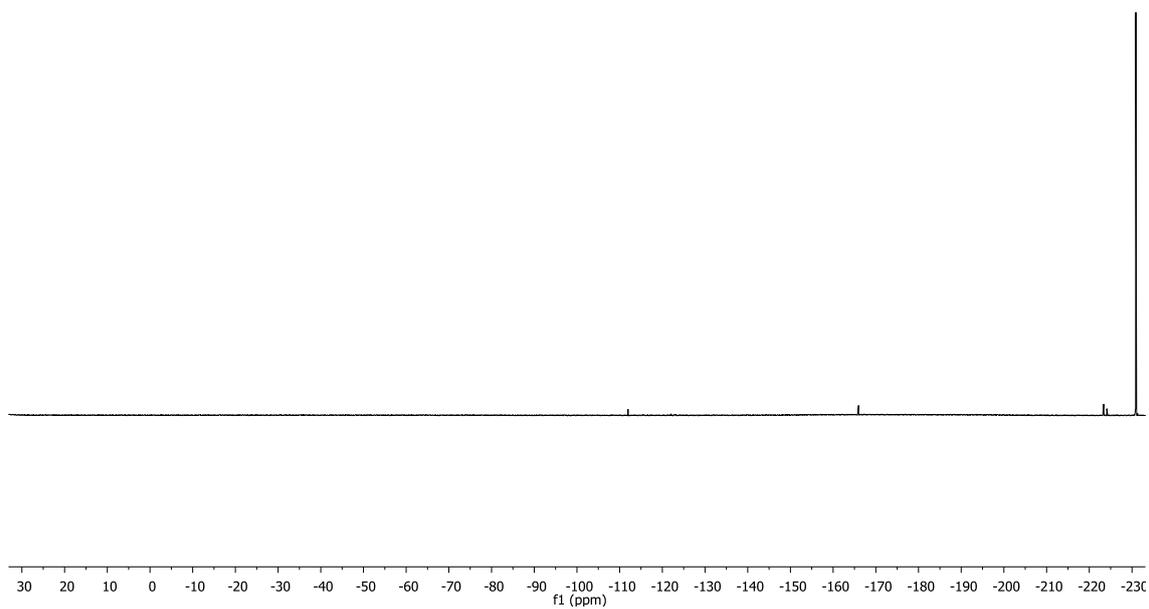
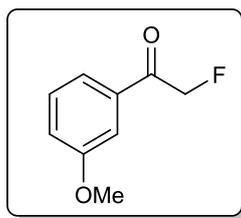
*Espectros de RMN*



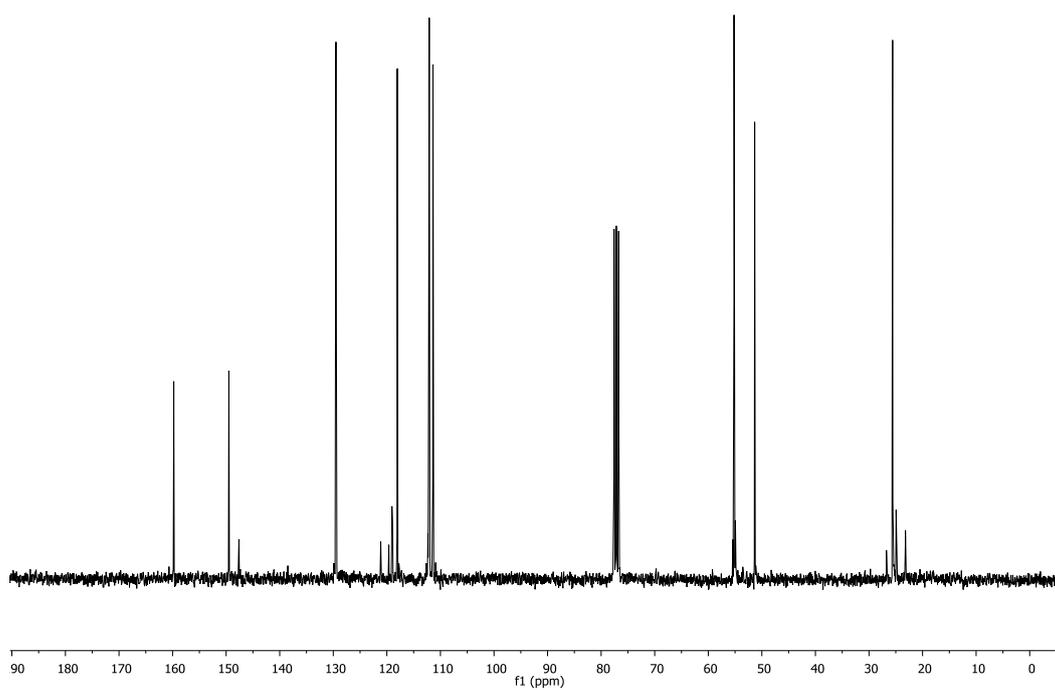
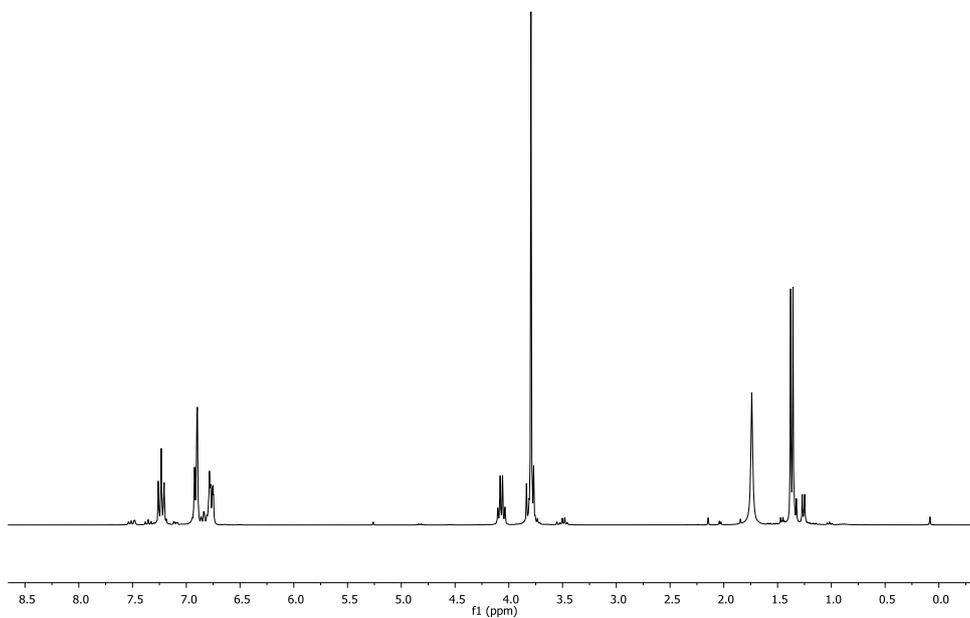
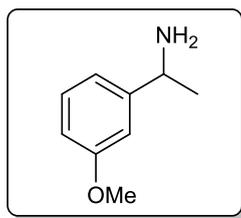


*Espectros de RMN*





*Espectros de RMN*



## **REFERENCIAS**



1. A. Mitchinson, J. Finkelstein, *Nature* **2008**, 455, 303.
2. (a) P. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 301-312; (b) J. M. Clark, *Nature Chem.* **2009**, 1, 12-13.
3. K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6<sup>a</sup> Ed., Springer, Berlin, **2011**.
4. (a) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 1695-1733; (b) M. S. Humble, P. Berglund, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3391-3401; (c) E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 4504-4523; (d) K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, 25, 232-238; (e) R. J. Kazlauskas, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, 9, 195-201.
5. A. Zaks, A. M. Klivanov, *Proc. 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. Revisiones: (a) T. Davids, M. Schidt, D. Böttcher, U. T. Bornscheuer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, 17, 215-220; (b) U. T. Bornscheuer, *Synlett* **2013**, 24, 150-156; (c) M. B. Quin, C. Schmidt-Dannert, *ACS Catal.* **2011**, 1, 1017-1021; (d) G. A. Behrens, A. Hummel, S. K. Padhi, S. Schätzle, U. T. Bornscheuer, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 2191-2215.
8. (a) H. Renata, Z. J. Wang, F. H. Arnold, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 3351-3367; (b) C. G. Acevedo-Rocha, R. Agudo, M. T. Reetz, *J. Biotechnol.* **2014**, 191, 3-10; (c) M. T. Reetz, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 12480-12496.
9. M. T. Reetz, *Tetrahedron* **2012**, 68, 7530-7548.
10. P. J. Dunn, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 1452-1461.
11. G. Zheng, J. Xu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, 22, 784-792.
12. (a) *Science of Synthesis. Biocatalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Faber, W.-D. Fessner, N. J. Turner, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2015**; (b) *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**; (c) *Modern Biocatalysis: Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions*, Eds. W.-D. Fessner, T. Anthonsen, Wiley-VCH, Weinheim, **2009**; (d) *Asymmetric Organic Synthesis with*

## Referencias

- Enzymes*, Eds. V. Gotor, I. Alfonso, E. García-Urdiales, Wiley-VCH, Weinheim, **2008**.
13. E. Thall, *J. Chem. Educ.* **1996**, *73*, 481-484.
  14. (a) S. Wenda, S. Illner, A. Mell, U. Kragl, *Green Chem.* **2011**, *130*, 3007-3047; (b) N. Ran, L. Zhao, Z. Chen, J. Tao, *Green Chem.* **2008**, *10*, 361-372.
  15. M. López-Iglesias, V. Gotor-Fernández, *Chem. Rec.* **2015**, *15*, 743-759.
  16. C. Li, Y.-J. Zhou, N. Wang, X.-W. Feng, K. Li, X. Q. Yu, *J. Biotechnol.* **2010**, *150*, 539-545.
  17. J.-L. Wang, X. Li, H.-Y. Xie, B.-K. Liu, X.-F. Lin, *J. Biotechnol.* **2010**, *145*, 240-243.
  18. M. T. Reetz, R. Mondière, J. D. Carballeira, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1679-1681.
  19. 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.
  20. O. Torre, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Commun.* **2004**, 1724-1725.
  21. B. Ferreira-Silva, I. Lavandera, A. Kern, K. Faber, W. Kroutil, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 3410-3414.
  22. (a) A. Harsanyi, G. Sandford, *Green Chem.* **2015**, *17*, 2081-2086; (b) D. Barnes-Seeman, J. Beck, C. Springer, *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 855-864; (c) J. Wang, M. Sánchez-Roselló, J. L. Acena, C. del Pozo, A. E. Sorochinsky, S. Fustero, V. A. Soloshonok, H. Liu, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 2432-2506; (d) M. Tredwell, V. Gouverneur, en *Comprehensive Chirality*, Eds. E. M. Carreira, H. Yamamoto, Elsevier, Amsterdam, **2012**, pp. 70-85; (e) S. Purser, P. R. Moore, S. Swallow, V. Gouverneur, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 320-330; (f) S. M. Ametamey, M. Honer, P. A. Schubiger, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 1501-1516.
  23. D. T. Wong, J. S. Horng, F. P. Bymaster, K. L. Hauser, B. B. Molloy, *Life Sci.* **1974**, *15*, 471-479.
  24. J. F. R. Robertson, S. E. Come, S. E. Jones, L. Beex, M. Kaufmann, A. Makris, J. W. R. Nortier, K. Possinger, L.-E. Rutqvist, *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 346-356.
  25. M. T. Fera, M. Giannone, S. Pallio, A. Tortora, G. Blandino, M. Carbone, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2001**, *17*, 151-154.

26. S. D. Young, S. F. Britcher, L. O. Tran, L. S. Payne, W. C. Lumma, T. A. Lyle, J. R. Huff, P. S. Anderson, D. B. Olsen, S. S. Carroll, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1995**, *39*, 2602-2605.
27. M. Höhne, U. T. Bornscheuer, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 779-820.
28. J. Moore, R. Langley, *Biochemistry for Dummies*, John Wiley & Sons, Hoboken, **2008**.
29. (a) M. Fuchs, J. E. Farnberger, W. Kroutil, *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, 6965-6982; (b) R. C. Simon, E. Busto, E.-M. Fischereder, C. S. Fuchs, D. Pressnitz, N. Richter, W. Kroutil, en *Science of Synthesis, Biocatalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Faber, W.-D. Fessner, N. J. Turner, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2015**, pp. 383-420; (c) R. C. Simon, N. Richter, E. Busto, W. Kroutil, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 129-143; (d) M. S. Malik, E.-S. Park, J.-S. Shin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *94*, 1163-1171; (e) S. Matthew, H. Yun, *ACS Catal.* **2012**, *2*, 993-1001; (f) D. Koszelewski, K. Tauber, K. Faber, W. Kroutil, *Trends Biotechnol.* **2010**, *28*, 324-332; (g) H. C. Hailes, P. A. Dalby, G. J. Lye, F. Baganz, M. Micheletti, N. Szita, J. M. Ward, *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 1883-1893; (h) D. Zhu, L. Hua, *Biotechnol. J.* **2009**, *4*, 1420-1431.
30. (a) P. Tufvesson, J. S. Jenness, W. Kroutil, J. M. Woodley, *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 2159-2162; (b) J.-S. Shin, B.-G. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *60*, 534-540.
31. D. M. Needham, *Biochem. J.* **1930**, *24*, 208-227.
32. M. Höhne, U. T. Bornscheuer, *ChemCatChem* **2009**, *1*, 42-51.
33. J.-S. Shin, B.-J. Kim, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *65*, 206-211.
34. (a) H. Mizuguchi, H. Hayashi, K. Okada, I. Miyahara, K. Hirotsu, H. Kagamiyama, *Biochemistry* **2001**, *40*, 353-360; (b) J. M. Goldberg, J. F. Kirsh, *Biochemistry* **1996**, *35*, 5280-5291.
35. H. K. Chenault, G. M. Whitesides, *Bioorg. Chem.* **1989**, *17*, 400-409.
36. M. Höhne, S. Köhl, K. Robins, U. T. Bornscheuer, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 363-365.
37. D. Koszelewski, I. Lavandera, D. Clay, G. M. Guebitz, D. Rozzell, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9337-9340.

## Referencias

38. K. E. Cassimjee, C. Branneby, V. Abedi, A. Wells, P. Berglund, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5569-5571.
39. G. Matcham, M. Bhatia, W. Lang, C. Lewis, R. Nelson, A. Wang, W. Wu, *Chimia* **1999**, *53*, 584-589.
40. B. Wang, H. Land, P. Berglund, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 161-163.
41. (a) L. Martínez-Montero, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 1618-1624; (b) A. P. Green, N. J. Turner, E. O. Reilly, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10714-10717.
42. C. K. Saville, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Branz, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science* **2010**, *329*, 305-309.
43. M. D. Truppo, H. Strotmann, G. Hughes, *ChemCatChem* **2012**, *4*, 1071-1074.
44. C. E. Paul, M. Rodríguez-Mata, E. Busto, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, S. García-Cerrada, J. Mendiola, O. de Frutos, I. Collado, *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18*, 788-792.
45. M. Pickl, M. Fuchs, S. M. Glueck, K. Faber, *ChemCatChem* **2015**, *7*, 3121-3124.
46. R. B. Silverman, M. A. Levy, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 815-818.
47. R. B. Silverman, M. A. Levy, *Biochemistry* **1981**, *20*, 1197-1203.
48. P. Bey, M. J. Jung, F. Gerhart, D. Schirlin, V. Van Dorsselaer, P. Casara, *J. Neurochem.* **1981**, *37*, 1341-1344.
49. R. B. Silverman, B. J. Invergo, *Biochemistry* **1986**, *25*, 6817-6820.
50. D. Schirlin, S. Baltzer, J.-G. Heydt, M. J. Jung, *J. Enzyme Inhib.* **1987**, *1*, 243-258.
51. R. B. Silverman, B. J. Invergo, J. Mathew, *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1840-1846.
52. P. Storici, J. Qiu, T. Schirmer, R. B. Silverman, *Biochemistry* **2004**, *43*, 14057-14063.
53. F. N. Bolkenius, B. Knödgen, N. Seiler, *Biochem. J.* **1990**, *268*, 409-414.
54. S. M. Nanavati, R. B. Silverman, *J. Med. Chem.* **1989**, *32*, 2413-2421.
55. B. Lippert, B. W. Metcalf, R. J. Resvick, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1982**, *108*, 146-152.
56. M. K. Whittlesey, E. Peris, *ACS Catal.* **2014**, *4*, 3152-3159.

57. A. Cuetos, M. García-Ramos, E.-M. Fischereder, A. Díaz-Rodríguez, G. Grogan, V. Gotor, W. Kroutil, I. Lavandera, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 3144-3147.
58. (a) W. Borzęcka, I. Lavandera, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 7312-7317;  
(b) C. Zizhan, W. Zhu, Z. Zheng, X. Zou, *J. Fluorine Chem.* **2010**, *131*, 340-344.
59. A. Cuetos, I. Lavandera, V. Gotor, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 10688-10690.

