

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

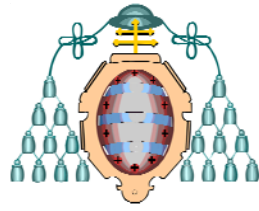
Departamento de Química Orgánica e Inorgánica

BIOTRANSFORMACIONES EN LA SÍNTESIS Y RESOLUCIÓN DE COMPUESTOS DE INTERÉS FARMACÉUTICO

Tesis doctoral

Gonzalo de Gonzalo Calvo

6 JUNIO 2003



Reservados todos los derechos
© El autor
Edita: Universidad de Oviedo
Biblioteca Universitaria, 2009
Colección Tesis Doctoral-TDR nº 45
ISBN: 978-84-692-2222-5
D.L.: AS. 00740-2009

D. **Victor Riera González**, Catedrático de Química Inorgánica y Director del Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo,

CERTIFICA:

Que Gonzalo de Gonzalo Calvo, Licenciado en Química, ha realizado la Memoria titulada “**Biotransformaciones en la síntesis y resolución de compuestos de interés farmacéutico**” en el Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo, bajo la dirección del Profesor Vicente Gotor Santamaría y la Profesora Rosario Brieva Collado.

Oviedo, abril 2003

D. **Vicente Gotor Santamaría**, Catedrático de Química Orgánica del Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo y

Dña. **Rosario Brieva Collado**, Profesora titular de Química Orgánica del Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “**Biotransformaciones en la síntesis y resolución de compuestos de interés farmacéutico**” ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo por el Licenciado en Química Gonzalo de Gonzalo Calvo, constituyendo la Memoria de su Tesis Doctoral, cuya presentación autorizan.

Oviedo, abril 2003

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Vicente Gotor y a la profesora Rosario Brieva, por la orientación prestada durante la realización del trabajo.

Al doctor Victor Sánchez por su implicación en los tres primeros capítulos de esta Memoria.

A Iván Lavandera, por soportarme en el laboratorio, por su ayuda desinteresada y por haberme brindado su amistad.

A los demás compañeros de laboratorio, por haber convivido juntos cinco años de experiencias.

A mis compañeros de facultad Pedro, Corujo, Fros, Fernando, etc., por las vivencias de todo este tiempo. También gracias por esos insuperables partidos de fútbol en los que descargábamos la tensión del trabajo.

A Alfredo y David, por su amistad y por los momentos vividos desde hace muchos años.

A mis padres, Gonzalo y Ángeles, y a mi hermano David por haberme dado su cariño, por todo lo que me han enseñado y por su respaldo en los momentos más duros. Sin ellos, este trabajo no habría podido llevarse a cabo.

A Rosana, por su infinito aguante, su comprensión, su cariño y tantas otras cosas que no se pueden expresar con palabras. Gracias por ser tú, y por todos los momentos compartidos desde aquella guardería.

A la memoria de mi abuelo Felipe.

ABREVIATURAS

Alloc:	Aliloxicarbonilo.
Ac:	Acetilo.
AcCN:	Acetonitrilo.
AcOEt:	Acetato de etilo
Asp:	Ácido aspártico
α :	Rotación óptica específica
Boc:	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo.
^t BuOH:	<i>tert</i> -Butanol.
^t BuOMe:	<i>tert</i> -Butilmetiléter.
Bz:	Benzoílo.
<i>c</i> :	Grado de conversión.
CAL-A:	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> A.
CAL-B:	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> B.
Cbz:	Benciloxicarbonilo.
CG:	Cromatografía de gases.
CRL:	Lipasa de <i>Candida rugosa</i> (<i>Candida cylindracea</i>)
Cys:	Cisteína.
DIBAL-H:	Hidruro de diisobutilaluminio.
DMAP:	Dimetilaminopiridina.
<i>E</i> :	Razón enantiomérica.
<i>ee</i> :	Exceso enantiomérico.
<i>ee</i> _s :	Exceso enantiomérico del sustrato.
<i>ee</i> _p :	Exceso enantiomérico del producto.
EM:	Espectroscopía de masas.
ESI:	Electrospray.
ES:	Complejo enzima-sustrato.
EtOH:	Etanol.
Gli:	Glicina.
G.P.:	Gas portador.
His:	Histidina
HPLC:	Cromatografía líquida de alta eficacia
IE:	Impacto electrónico.
IR:	Infrarrojo.
<i>IT</i> :	Intermedio tetraédrico.
<i>k</i> _{cat} :	Constante o número de recambio.
<i>K</i> _M :	Constante de Michaelis.
(<i>k</i> _{cat} / <i>K</i> _M):	Constante de especificidad.
<i>k</i> _{rel} :	Constante de velocidad relativa.
Leu:	Leucina.
MeOH:	Metanol.
MM:	Mecánica molecular.
MML:	Lipasa de <i>Mucor miehei</i> .
MOM:	Metoximetilo.
P:	Coefficiente de partición.
P _f :	Punto de fusión.
Ph:	Fenilo.
Poc:	Feniloxicarbonilo.
PPL:	Lipasa de páncreas de cerdo.

${}^i\text{Pr}_2\text{O}$:	Éter diisopropílico.
PS-C:	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacea</i> inmovilizada.
PSL:	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacea</i> .
Py:	Piridina.
RMN:	Resonancia magnética nuclear.
RNL:	Lipasa de <i>Rhizomucor miehei</i> .
R_S :	Resolución.
Ser:	Serina.
t:	Tiempo de reacción.
t_R :	Tiempo de retención.
T:	Temperatura.
THF:	Cromatografía en capa fina.
TLL:	Lipasa de <i>Termomyces lanuginosa</i> .

RESUMEN

En los últimos años, el desarrollo de los métodos biocatalíticos ha permitido la preparación de una gran variedad de productos de alto valor añadido, a través de procesos simples, selectivos, de bajo coste y respetuosos con el medio ambiente.

Esta Memoria se divide en dos partes. La primera consta de tres capítulos, en los que se han estudiado diversas metodologías enzimáticas para la preparación de precursores ópticamente activos del antidepresivo (-)-paroxetina. La segunda parte contiene dos capítulos en los que se desarrolla la preparación de ω -hidroxicianhidrinás ópticamente activas, productos de partida de gran importancia en síntesis orgánica, empleando oxinitrilasas o lipasas como biocatalizadores.

Parte 1:

En el primer capítulo se ha llevado a cabo la resolución de diversos precursores de (-)-paroxetina con diferentes lipasas. Se han utilizado una serie de *trans*-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxi metilpiperidinas *N*-protegidas como sustratos de partida en reacciones de hidrólisis y acilación enzimática. También se analizan los parámetros que afectan a la selectividad de los procesos, como el biocatalizador, disolvente, temperatura y agente acilante. Estos estudios se han publicado en:

G. de Gonzalo, R. Brieva, V. M. Sánchez, M. Bayod, V. Gotor, "Enzymatic resolution of *trans*-4-(4'-fluorophenyl)-3-hydroxymethylpiperidines, key intermediates in the synthesis of (-)-Paroxetine", *J. Org. Chem.*, **2001**, *66*, 8947-8953.

M. Bayod, V. M. Sánchez, V. Gotor, R. Brieva, G. De Gonzalo, "Precursores ópticamente puros de paroxetina", ES Patent 2001101648, 2001; "Optically pure paroxetine precursors", Eur. Patent 1,283,200 A2, 2003; U. S. Patent 0018048 A1, 2003; *Chem. Abstr.*, **2003**, *138*, 122554.

En el segundo capítulo, se aplica la reacción de alcoxicarbonilación enzimática con diferentes carbonatos en la resolución del (\pm)-*trans*-*N*-benciloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxi metilpiperidina, precursor de (-)-paroxetina. Este trabajo ha dado lugar a la siguiente publicación:

G. de Gonzalo, R. Brieva, V. M. Sánchez, M. Bayod, V. Gotor, "Enzymatic alkoxycarbonylation reactions on the intermediate in the synthesis of (-)-paroxetine, *trans*-*N*-benzyloxycarbonyl-4-(4'-fluorophenyl)-3-hydroxymethylpiperidine", *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, *14*, 1725-1731.

En el tercer capítulo se utilizan una serie de anhídridos cíclicos como agentes de acilación en la resolución enzimática del intermedio de (-)-paroxetina, (\pm)-*trans*-*N*-feniloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxi metilpiperidina. Se analizan una serie de parámetros que pueden afectar a la selectividad de las acilaciones, como enzima, temperatura y disolvente. Finalmente se realiza un estudio de reciclaje enzimático empleando las mejores condiciones conseguidas. Los resultados se han recogido en la publicación y en la patente:

G. de Gonzalo, R. Brieva, V. M. Sánchez, M. Bayod, V. Gotor, "Anhydrides as acylating agents in the enzymatic resolution of an intermediate of (-)-paroxetine", *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 3333-3336.

M. Bayod, V. M. Sánchez, G. de Gonzalo, R. Brieva, V. Gotor, "Precursores ópticamente puros de paroxetina". ES Patent P200202916.

Parte 2:

En el cuarto capítulo de la presente Memoria se realiza la síntesis de (*R*)-hidroxicianhidrinás quirales mediante la reacción de transcianación enzimática

catalizada por la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus*. Como sustratos de partida se emplean una serie de ω -hidroxialdehídos tanto libres como *O*-protegidos. Los resultados obtenidos se resumen en la publicación:

G. de Gonzalo, R. Brieva, V. Gotor, “(*R*)-oxynitrilase-catalyzed transformation of ω -hydroxyalkanals”, *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, **2002**, 19-20, 223-230.

En el quinto capítulo se estudia la obtención de hidroxicianhidrinas ω -*O*-protegidas ópticamente activas mediante reacciones de acetilación enzimática catalizadas por lipasas. También se analizan diversos factores que afectan a la selectividad de las resoluciones. Por último, se tratan de explicar algunos de los resultados obtenidos a través de la Mecánica Molecular.

SUMMARY

In the last years, the development of the biocatalytic methods has allowed the preparation of a great variety of high value products, through simple, selective, low cost and free environmental impact processes.

This doctoral dissertation has been divided in two parts. First part comprises three chapters, in which some enzymatic methodologies for the preparation of optically active precursors of the antidepressant (-)-paroxetine have been studied. The second section consists in two chapters, in which the preparation of optically enriched ω -hydroxycyanohydrins, high valued material in organic synthesis, has been developed using oxynitrilases or lipases as biocatalysts.

Part 1:

The first chapter describes the lipase-catalysed resolution of some precursors of (-)-paroxetine. Certain *N*-protected *trans*-4-(4'-fluorophenyl)-3-hydroxymethylpiperidines have been used as substrates in enzymatic hydrolysis and acylation reactions. The different parameters that affect the selectivity of the process have been investigated (enzyme, solvent, temperature and acylating agent). These results have been published in:

G. de Gonzalo, R. Brieva, V. M. Sánchez, M. Bayod, V. Gotor, “Enzymatic resolution of *trans*-4-(4'-fluorophenyl)-3-hydroxymethylpiperidines, key intermediates in the synthesis of (-)-paroxetine”, *J. Org. Chem.*, **2001**, 66, 8947-8953.

M. Bayod, V. M. Sánchez, V. Gotor, R. Brieva, G. De Gonzalo, “Precursores ópticamente puros de paroxetina”, ES Patent 2001101648, 2001; “Optically pure paroxetine precursors”, Eur. Patent 1,283,200 A2, 2003; U. S. Patent 0018048 A1, 2003; *Chem. Abstr.*, **2003**, 138, 122554.

In the second chapter, the enzymatic alkoxyacylation reaction using different carbonates, has been applied for the resolution of (\pm)-*trans*-*N*-benzyloxycarbonyl-4-(4'-fluorophenyl)-3-hydroxymethylpiperidine, precursor of (-)-paroxetine. The results are collected in the paper:

G. de Gonzalo, R. Brieva, V. M. Sánchez, M. Bayod, V. Gotor, “Enzymatic alkoxyacylation reactions on the intermediate in the synthesis of (-)-paroxetine, *trans*-*N*-benzyloxycarbonyl-4-(4'-fluorophenyl)-3-hydroxymethylpiperidine”, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 1725-1731.

In the third chapter, cyclic anhydrides have been used as acylating agents in the resolution of (\pm)-*trans*-4-(4'-fluorophenyl)-3-hydroxymethyl-*N*-phenyloxycarbonylpiperidine, an intermediate of (-)-Paroxetine. Some parameters that have influence in the enantioselectivity of the acylations are studied, as enzyme, temperature and solvent. Finally, the feasibility of reusing the enzyme in the best

conditions found for this resolution has been investigated. The results obtained are published in the work and in the patent:

G. de Gonzalo, R. Brieva, V. M. Sánchez, M. Bayod, V. Gotor, "Anhydrides as acylating agents in the enzymatic resolution of an intermediate of (-)-paroxetine", *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 3333-3336.

M. Bayod, V. M. Sánchez, G. de Gonzalo, R. Brieva, V. Gotor, "Precursores ópticamente puros de paroxetina". ES Patent P200202916.

Part 2:

In the fourth chapter, the synthesis of chiral (*R*)-hydroxycyanohydrins has been developed through enzymatic transamination reactions catalysed by the (*R*)-oxynitrilase of *Prunus amygdalus*. Free or *O*-protected ω -hydroxyaldehydes are used as substrates for these reactions. These results have been published in:

G. de Gonzalo, R. Brieva, V. Gotor, "(*R*)-oxynitrilase-catalyzed transformation of ω -hydroxyalkanals", *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2002**, 19-20, 223-230.

In the last chapter of this doctoral dissertation, the preparation of optically pure hydroxycyanohydrins has been studied using lipase-catalyzed acetylation reactions. The effect of different parameters in the selectivity of the resolutions has been achieved. In addition, some results have been explained through Molecular Mechanics calculations.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
I.1. IMPORTANCIA DE LOS FÁRMACOS QUIRALES.....	1
I.1.1. Métodos de síntesis de fármacos quirales.....	2
I.2. BIOTRANSFORMACIONES.....	2
I.2.1. Enzimas utilizados en procesos biocatalíticos.....	3
I.2.2. Enzimas en disolventes orgánicos.....	4
I.3. RESOLUCIÓN DE MEZCLAS RACÉMICAS.....	5
I.3.1. Resolución cinética enzimática.....	6
I.3.2. Razón enantiomérica.....	6
I.3.3. Medida de la razón enantiomérica.....	7
I.3.4. Factores que influyen en la razón enantiomérica.....	8
I.4. LIPASAS.....	8
I.4.1. Mecanismo de actuación de las lipasas en disolventes orgánicos.....	10
I.4.2. Lipasa de <i>Candida antarctica</i>	11
I.4.3. Lipasa de <i>Pseudomonas cepacea</i>	12
I.5. OXINITRILASAS.....	13
I.5.1. Estructura tridimensional y mecanismo de reacción.....	14
I.5.2. (<i>R</i>)-oxinitrilasa de <i>Prunus amygdalus</i>	15
I.5.3. Otras (<i>R</i>)-oxinitrilasas.....	16
I.5.4. (<i>S</i>)-oxinitrilasas.....	16
I.5.5. Influencia del medio de reacción, fuente de cianuro y otros factores.....	17
I.5.6. Reacción enzimática de transcianación.....	18
I.5.7. Reacción de transcianación sobre cianhidrinas racémicas.....	19
OBJETIVOS GENERALES	21
PARTE A	22
CAPÍTULO 1: RESOLUCIONES ENZIMÁTICAS SOBRE PRECURSORES DE (-)-PAROXETINA	23
1.1. ANTECEDENTES	24
1.1.1. DERIVADOS DE LA PIPERIDINA.....	24
1.1.2. PAROXETINA.....	25
1.1.2.1. Métodos químicos de preparación de (-)-paroxetina.....	25
1.1.2.2. Preparaciones quimioenzimáticas de (-)-paroxetina.....	30
1.1.3. REACCIONES DE RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA SOBRE ALCOHOLES.....	32
1.1.4. REACCIÓN DE ACILACIÓN ENZIMÁTICA.....	33
1.1.4.1. Factores que influyen en la selectividad de las acilaciones enzimáticas.....	35
1.1.4.2. Reacciones de acilación sobre alcoholes primarios.....	36
1.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	40
1.2.1. REACCIONES DE RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA SOBRE (\pm)- <i>trans</i> -3-ETOXICARBONIL-4-(4'-FLUOROFENIL)-2,6-DIONA, (\pm)- <i>trans</i> - XV	40
1.2.1.1. Hidrólisis en disolvente orgánico.....	41
1.2.1.2. Hidrólisis en disolvente orgánico saturado de tampón.....	41
1.2.1.3. Reacciones de aminólisis y amonólisis enzimática sobre (\pm)- <i>trans</i> - XV	41

1.2.1.4. Reacción de transesterificación enzimática sobre (±)- <i>trans</i> - XV	42
1.2.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA SOBRE (±)- <i>trans</i> -3-ACETOXIMETIL- <i>N</i> -BENCILOXICARBONIL-4-(4'-FLUOROFENIL)PIPERIDINA, (±)- <i>trans</i> - 2a	42
1.2.3. ACETILACIONES ENZIMÁTICAS SOBRE (±)- <i>trans</i> - <i>N</i> -BENCILOXICARBONIL-4-(4'-FLUOROFENIL)-3-HIDROXIMETILPIPERIDINA, (±)- <i>trans</i> - 1a	45
1.2.3.1. Influencia del disolvente.....	46
1.2.3.2. Efecto de la temperatura.....	49
1.2.3.3. Efecto del agente acilante.....	50
1.2.3.3.1. Modificaciones en el grupo saliente.....	50
1.2.3.3.2. Modificaciones en la cadena del acilo.....	51
1.2.4. ASIGNACIÓN DE LAS CONFIGURACIONES ABSOLUTAS.....	52
1.2.5. DETERMINACIÓN DE LOS EXCESOS ENANTIOMÉRICOS.....	53
1.2.6. REACCIÓN DE ACILACIÓN SOBRE OTROS PIPERIDINCARBINOLES <i>N</i> -SUSTITUIDOS.....	55
1.2.6.1. Asignación de las configuraciones absolutas.....	56
1.2.6.2. Determinación de los excesos enantioméricos.....	57
1.2.7. OBTENCIÓN DE LOS (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-PIPERIDINCARBINOLES <i>N</i> -PROTEGIDOS Y ESTUDIO CINÉTICO.....	58
1.2.8. ESTUDIOS DE REUTILIZACIÓN DEL BIOCATALIZADOR.....	60
1.3. CONCLUSIONES	63
1.4. PARTE EXPERIMENTAL	64
1.4.1. REACTIVOS Y DISOLVENTES.....	64
1.4.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS.....	64
1.4.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS Y DATOS EXPERIMENTALES.....	65
CAPÍTULO 2: ALCOXICARBONILACIÓN ENZIMÁTICA SOBRE EL PRECURSOR DE (-)-PAROXETINA, (±)-<i>TRANS</i>-<i>N</i>-BENCILOXICARBONIL-4-(4'-FLUOROFENIL)-3-HIDROXIMETILPIPERIDINA	83
2.1. ANTECEDENTES	84
2.1.1. CARBONATOS.....	84
2.1.2. REACCIÓN DE ALCOXICARBONILACIÓN ENZIMÁTICA.....	84
2.1.2.1. Resolución enzimática de alcoholes y aminas mediante alcoxycarbonilaciones.....	86
2.2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS	89
2.2.1. REACCIONES DE ALCOXICARBONILACIÓN CON CARBONATO DE DIALILO.....	89
2.2.2. ALCOXICARBONILACIÓN ENZIMÁTICA CON CARBONATO DE VINILO Y ACETONOXIMA.....	90
2.2.3. REACCIÓN DE ALCOXICARBONILACIÓN ENZIMÁTICA CON CARBONATO DE ALILO Y OXIMA.....	91
2.2.4. REACCIONES DE ALCOXICARBONILACIÓN CON CARBONATOS DE METILO.....	92
2.2.5. ALCOXICARBONILACIONES ENZIMÁTICAS CON CARBONATOS DE BENCILO.....	94

2.2.6. DETERMINACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA.....	95
2.2.7. DETERMINACIÓN DE LA PUREZA ÓPTICA DE LOS CARBONATOS (\pm)- <i>trans</i> -4a-e.....	96
2.3. CONCLUSIONES.....	97
2.4. PARTE EXPERIMENTAL.....	98
2.4.1. TÉCNICAS INSTRUMENTALES Y REACTIVOS DE USO GENERAL.....	98
2.4.2. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS Y DATOS EXPERIMENTALES.....	98
CAPÍTULO 3: ACILACIONES ENZIMÁTICAS SOBRE UN INTERMEDIARIO EN LA SÍNTESIS DE (-)-PAROXETINA UTILIZANDO ANHÍDRIDOS CÍCLICOS.....	105
3.1. ANTECEDENTES.....	106
3.1.1. EMPLEO DE ANHÍDRIDOS DE ÁCIDO COMO AGENTES ACILANTES EN RESOLUCIONES ENZIMÁTICAS DE ALCOHOLES.....	106
3.1.2. REACCIONES DE ACILACIÓN CON ANHÍDRIDOS CÍCLICOS.....	108
3.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	110
3.2.1. REACCIONES DE RESOLUCIÓN CON ANHÍDRIDO SUCCÍNICO.....	110
3.2.2. REACCIONES DE RESOLUCIÓN CON ANHÍDRIDO GLUTÁRICO.....	112
3.2.3. RESOLUCIONES CON ANHÍDRIDO DIGLICÓLICO.....	113
3.2.4. REACCIONES DE ACILACIÓN CON ANHÍDRIDO FTÁLICO Y ANHÍDRIDO MALEICO.....	114
3.2.5. REACCIONES DE RESOLUCIÓN CON EL ÁCIDO DE MELDRUM.....	115
3.2.6. ESTUDIO DE RECICLAJE ENZIMÁTICO.....	116
3.2.7. ASIGNACIÓN DE LAS CONFIGURACIONES ABSOLUTAS.....	117
3.2.8. DETERMINACIÓN DE LOS EXCESOS ENANTIOMÉRICOS.....	117
3.3. CONCLUSIONES.....	119
3.4. PARTE EXPERIMENTAL.....	120
3.4.1. TÉCNICAS INSTRUMENTALES Y REACTIVOS DE USO GENERAL.....	120
3.4.2. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS Y DATOS EXPERIMENTALES.....	120
PARTE B.....	134
CAPÍTULO 4: REACCIONES DE TRANSCIANACIÓN SOBRE ω-HIDROXIALDEHÍDOS.....	135
4.1. ANTECEDENTES.....	136
4.1.1. CIANHIDRINAS.....	136
4.1.1.1. Reacciones de protección sobre el grupo hidroxilo.....	136

4.1.1.2. Inversión del centro estereogénico de las cianhidrinas por desplazamientos nucleófilos.....	137
4.1.1.3. Reacciones sobre el grupo nitrilo.....	138
4.1.1.3.1. Reacciones en condiciones ácidas.....	138
4.1.1.3.2. Reacciones de adición nucleófila al grupo nitrilo.....	139
4.1.1.3.3. Reacciones de transiminación.....	141
4.1.1.4. Reacciones sobre el resto R de cianhidrinas.....	141
4.1.2. REACCIÓN DE TRANSCIANACIÓN ENZIMÁTICA.....	141
4.1.3. HIDROXIALDEHÍDOS COMO SUSTRATOS DE OXINITRILASAS.....	143
4.1.3.1. Hidroxialdehídos con un centro quiral.....	145
4.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	147
4.2.1. PREPARACIÓN DE LOS ω -HIDROXIALDEHÍDOS.....	147
4.2.2. REACCIONES DE TRANSCIANACIÓN ENZIMÁTICA SOBRE LOS HEMIACETALES 7 Y 8	148
4.2.2.1. Efecto de la temperatura.....	149
4.2.2.2. Efecto de la concentración de (R)-oxinitrilasa.....	150
4.2.2.3. Empleo de sistemas “micro-acuosos”.....	151
4.2.2.4. Efecto de la conversión.....	152
4.2.2.5. Influencia de la concentración de la cianhidrina de la acetona.....	152
4.2.2.6. Reacciones de transcianación con otras (R)- y (S)- oxinitrilasas.....	153
4.2.3. ASIGNACIÓN DE LAS CONFIGURACIONES ABSOLUTAS.....	154
4.2.4. DETERMINACIÓN DE LOS EXCESOS ENANTIOMÉRICOS DE LAS CIANHIDRINAS (R)- 11 Y (R)- 12	154
4.2.5. REACCIONES DE TRANSCIANACIÓN ENZIMÁTICA SOBRE LOS HIDROXIALDEHÍDOS <i>O</i> -PROTEGIDOS 10a , 10b y 10c	155
4.2.6. ASIGNACIÓN DE LAS CONFIGURACIONES ABSOLUTAS Y DETERMINACIÓN DE LOS EXCESOS ENANTIOMÉRICOS DE LAS CIANHIDRINAS (R)- 13a , (R)- 13b Y (R)- 13c	157
4.3. CONCLUSIONES.....	159
4.4. PARTE EXPERIMENTAL.....	160
4.4.1. TÉCNICAS INSTRUMENTALES Y REACTIVOS DE USO GENERAL.....	160
3.4.2. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS Y DATOS EXPERIMENTALES.....	160
CAPÍTULO 5: REACCIONES DE ACETILACIÓN ENZIMÁTICA SOBRE ω-HIDROXICIANHIDRINAS.....	180
5.1. ANTECEDENTES.....	181
5.1.1. SÍNTESIS DE CIANHIDRINAS RACÉMICAS.....	181
5.1.2. ACILACIÓN ENZIMÁTICA DE CIANHIDRINAS RACÉMICAS.....	182
5.1.2.1. Resolución cinética dinámica de cianhidrinas racémicas.....	183
5.1.3. MODELADO MOLECULAR.....	185
5.1.3.1. Métodos teóricos.....	185
5.1.3.1.1. Mecánica molecular.....	186

5.1.3.1.2. Métodos cuánticos.....	186
5.1.4. MECÁNICA MOLECULAR.....	187
5.1.4.1 Estudio de la enantioselectividad enzimática mediante mecánica molecular.....	188
5.1.4.2. Aplicación del modelado molecular a la resolución de alcoholes secundarios.....	189
5.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	191
5.2.1. PREPARACIÓN DE LAS HIDROXICIANHIDRINAS 5-O-PROTEGIDAS.....	191
5.2.2. REACCIONES DE ACETILACIÓN SOBRE LAS CIANHIDRINAS 5-O-PROTEGIDAS.....	192
5.2.2.1. Reacciones de acetilación enzimática sobre (±)-5-acetoxi-2-hidroxipentanonitrilo, (±)- 17a	192
5.2.2.2. Acetilación enzimática sobre (±)-5-benzoiloxi-2-hidroxipentanonitrilo, (±)- 17b	193
5.2.2.3. Reacciones de acetilación enzimática sobre (±)-2-hidroxi-5-(metoxi)metoxipentanonitrilo, (±)- 17c	194
5.2.2.3. Reacciones de acetilación enzimática sobre (±)-2-hidroxi-5-tritiloxipentanonitrilo, (±)- 17d	195
5.2.3. REACCIONES DE ACETILACIÓN ENZIMÁTICA SOBRE (±)-2-HIDROXI-6-HEXANONITRILLO, (±)- 19 Y (±)-2-HIDROXI-7-HEPTANONITRILLO, (±)- 13c	196
5.2.4. DETERMINACIÓN DE LAS CONFIGURACIONES ABSOLUTAS.....	197
5.2.5. DETERMINACIÓN DE LOS EXCESOS ENANTIOMÉRICOS.....	197
5.2.6. ESTUDIOS DE MODELADO MOLECULAR.....	199
5.2.6.1. Modelización molecular para la PSL.....	200
5.2.6.2. Estado de transición para el (S)-2-hidroxi-5-tritiloxipentanonitrilo, (S)- 17d	202
5.2.6.3. Estado de transición para el (R)-2-hidroxi-5-tritiloxipentanonitrilo, (R)- 17d	203
5.2.6.4. Estado de transición para el (S)-5-acetoxi-5-hidroxipentanonitrilo, (S)- 17a	204
5.2.6.4. Estado de transición para el (R)-5-acetoxi-5-hidroxipentanonitrilo, (R)- 17a	205
5.3. CONCLUSIONES.....	207
5.4. PARTE EXPERIMENTAL.....	208
5.4.1. TÉCNICAS INSTRUMENTALES Y REACTIVOS DE USO GENERAL.....	208
5.4.2. MODELIZACIÓN MOLECULAR.....	208
5.4.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS Y DATOS EXPERIMENTALES.....	209

INTRODUCCIÓN

I.1. IMPORTANCIA DE LOS FÁRMACOS QUIRALES.

Las ventas mundiales de fármacos quirales en forma de un único enantiómero han crecido a un ritmo mayor del 13% anual durante los últimos años de la década de los 90 hasta los 133 billones de dólares en el año 2000. Según las estimaciones, se podría llegar hasta los 200 billones en el año 2008. Actualmente, un 40% de todas las ventas de productos farmacéuticos lo son en formato de un único enantiómero.¹

En un organismo, la mayoría de procesos relevantes en la acción de un fármaco, como la inhibición selectiva de enzimas, el transporte a través de membranas celulares y la función como agonistas o antagonistas de receptores, dependen estrechamente de la estereoquímica del mismo. Factores tan fundamentales como la actividad biológica, toxicidad y metabolismo pueden ser diferentes para los enantiómeros de un medicamento quiral.²

Existen numerosos ejemplos,³ si consideramos un fármaco con un único centro quiral, en los que uno de los enantiómeros tiene efecto terapéutico mientras que el otro enantiómero puede presentar cuatro posibles comportamientos: la misma actividad, ningún efecto, tóxico para el organismo receptor o bien una actividad antagónica a la del enantiómero terapéutico, con lo cual anula su acción. Algunos casos se muestran en la tabla I.1.

Tabla I.1. Relación entre configuración absoluta y efecto biológico para ciertos compuestos ópticamente activos

Compuesto	Configuración	Efecto biológico
Talidomida	<i>R</i>	Sedante
	<i>S</i>	Extremadamente teratogéno
Cloranfenicol	<i>R,R</i>	Antibacteriano
	<i>S,S</i>	Inactivo
Etambutol	<i>S,S</i>	Tratamiento de tuberculosis
	<i>R,R</i>	Causa ceguera
Propranolol	<i>R</i>	Anticonceptivo
	<i>S</i>	Antihipertensivo, antiarrítmico
Paclobutrazol	<i>R,R</i>	Fungicida
	<i>S,S</i>	Regulador del crecimiento de plantas

A pesar de estas evidencias, hasta la década de los 80 la mayoría de medicamentos sintéticos eran comercializados como racematos.⁴ Así, en 1985, la proporción de fármacos presentados como mezcla de enantiómeros frente a los que se presentaban como un único enantiómero era de 7 a 1. Existen dos razones fundamentales para el cambio de tendencia observado en este campo:

- 1) Las nuevas disposiciones, que obligan a realizar estudios exhaustivos sobre cada uno de los enantiómeros de un fármaco racémico, han facilitado el desarrollo de los mismos en forma de un único enantiómero.
- 2) Los avances conseguidos en la síntesis de compuestos ópticamente puros, especialmente en el campo de la biocatálisis.

¹ S. C. Stinson, *Chem. Eng. News*. **2001**, October 1, 79-97.

² (a) B. Testa, M. Mayer, *Prog. Drug. Res.* **1988**, 32, 249-303. (b) A. Beckett, *Biochem. Soc. Trans.* **1991**, 19, 443-446.

³ E. J. Ariens, *J. Med. Res. Rev.* **1986**, 6, 451-466.

⁴ E. J. Ariens, E. W. Wuis, E. J. Veringa, *Biochem. Pharmacol.* **1988**, 37, 9-18.

I.1.1. Métodos de síntesis de fármacos quirales.

Los intermedios quirales de los compuestos con acción terapéutica pueden prepararse de diversas maneras:

1) Obtención a partir de sintones quirales naturales,⁵ producidos generalmente por procesos de fermentación. En este caso los productos de partida son quirales, evitándose de esta manera pasos de síntesis. Su limitación estriba en la ausencia de ciertos compuestos ópticamente activos en la naturaleza, lo que dificulta su obtención a gran escala.

2) Resolución de mezclas racémicas, por métodos como cristalización preferente de estereo- o diastereoisómeros o por resolución cinética de compuestos racémicos por métodos químicos o biocatalíticos. El problema de la resolución de mezclas racémicas radica en que el rendimiento máximo que se puede obtener de cada enantiómero es del 50%. En ciertos casos, este inconveniente se puede superar con métodos como la racemización del enantiómero no deseado en el medio de reacción (resolución cinética dinámica)⁶ o mediante la separación del enantiómero no deseado y posterior resolución.⁷

3) Síntesis asimétrica, empleando un reactivo o catalizador quiral que convierta un sustrato proquiral en un producto quiral.⁸ En este caso, se puede acceder a cualquiera de los enantiómeros de la mezcla con un rendimiento del 100% dependiendo de la configuración del catalizador utilizado.

En los últimos años, los métodos biocatalíticos han demostrado ser una herramienta muy eficaz en las síntesis no sólo de productos farmacéuticos,⁹ sino en el desarrollo de una cantidad creciente de productos de alto valor añadido.¹⁰

I.2. BIOTRANSFORMACIONES.

Se denomina biotransformación a todo aquel proceso en el que se utiliza como catalizador un microorganismo o bien un enzima aislado para la conversión de un sustrato en un producto.

El estado físico de estos biocatalizadores, así como la elección acerca de utilizar enzimas aislados (más o menos purificados) o microorganismos va a depender del tipo de reacción a realizar, de la necesidad o no de cofactores y de la escala en que se va a desarrollar la biotransformación. En la presente Memoria nos vamos a centrar exclusivamente en la utilización de enzimas aislados.

La gran mayoría de los enzimas empleados en biotransformaciones se utilizan en forma cruda y son accesibles a bajo coste. Las preparaciones contienen entre un 1-30% del enzima, siendo el resto proteínas inactivas, estabilizantes, sales y carbohidratos. Los crudos enzimáticos son generalmente más estables que los enzimas purificados. En los

⁵ J. Crosby en "Chirality in Industry", John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, **1992**, 5-20.

⁶ U. T. Strauss, U. Felfer, K. Faber, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, *10*, 107-117.

⁷ Z. W. Guo, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5748-5752.

⁸ "Comprehensive Asymmetric Catalysis" (Eds.: E. N. Jacobsen, A. Pfaltz, H. Yamamoto), Vol. I-III, Springer, New York, **1999**.

⁹ (a) A. L. Margolin, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, *15*, 266-280. (b) V. Gotor, *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6*, 420-426. (c) R. N. Patel, *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 804-826.

¹⁰ (a) C.-H. Wong, G. M. Whitesides, "Enzymes in Synthetic Organic Chemistry", *Tetrahedron Organic Chemistry*, Vol. 12, Pergamon, Oxford, **1994**. (b) "Biotechnology, Biotransformations" (Eds. H. J. Rehn, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler), Vol. 8, Wiley-VCH, Weinheim, **1998**. (c) A. Leiese, K. Seelbach, C. Wandrey. "Industrial Biotransformations", Wiley-VCH, Weinheim, **2000**. (d) K. Faber, "Biotransformations in Organic Chemistry", Springer-Verlag, Berlin, **2000**. (e) K. M. Koeller, C.-H. Wong, *Nature*, **2001**, *409*, 232-240.

últimos años, el desarrollo de las técnicas de purificación de proteínas ha provocado un aumento en la utilización de enzimas parcialmente purificados en biotransformaciones.

Los enzimas se obtienen mayoritariamente de fuentes microbianas.¹¹ Así, un gran número de biocatalizadores se consiguen de bacterias y hongos por procesos de fermentación. Otra fuente muy importante de enzimas son ciertos órganos de mamíferos, como hígado o riñones. Sólo un pequeño porcentaje de enzimas se obtienen a partir de vegetales.

Los biocatalizadores presentan generalmente una elevada quimio-, regio- y enantioselectividad, razón fundamental para su empleo en síntesis orgánica. Catalizan prácticamente todas las reacciones químicas conocidas de manera muy efectiva, pudiendo llegar a aumentar las velocidades de reacción 10^{12} veces.

Las reacciones enzimáticas se llevan a cabo en condiciones suaves, como temperatura ambiente y pH neutro o cercano al neutro, lo que reduce el problema de la posible isomerización o racemización del producto. Los procesos biocatalíticos son menos contaminantes y presentan un menor consumo de energía que los métodos convencionales de catálisis química, especialmente aquellos que emplean metales pesados.

1.2.1. Enzimas utilizados en procesos biocatalíticos.

En la actualidad, se conocen más de 3000 enzimas, pero esta cantidad representa un porcentaje muy pequeño de los que existen en la naturaleza. Alrededor de unos 300 han sido investigados y son accesibles comercialmente, lo que da idea del grado de desarrollo que aún es posible en este campo.

Los enzimas se clasifican generalmente en seis categorías según el tipo de reacción que catalizan. Entre ellas, vamos a centrarnos en las dos empleadas en esta Memoria para la síntesis de compuestos ópticamente activos.

El grupo de biocatalizadores más utilizado en síntesis orgánica y en procesos industriales son las hidrolasas.¹² Se estima que más de un 70 % de los enzimas empleados en la industria (sobre todo en la alimentaria y en la preparación de detergentes) pertenecen a esta familia.^{10c} Las hidrolasas catalizan la hidrólisis selectiva de enlaces del tipo C-O, C-N e incluso de enlaces tipo P-O. Son enzimas fácilmente accesibles, que no requieren cofactor y que presentan una gran versatilidad catalítica, puesto que pueden adoptar diversas conformaciones que les permite acomodar en su centro activo una amplia variedad de sustratos.¹³ Dentro de este grupo de enzimas, destacan las amidasas, estererasas, proteasas, nitrilasas y especialmente las lipasas, que catalizan la hidrólisis de amidas, ésteres, péptidos, nitrilos y triglicéridos, respectivamente.

Las liasas catalizan la adición asimétrica de pequeñas nucleófilos a dobles enlaces C=C, C=N y C=O. Son enzimas mucho menos empleados en síntesis orgánica que las hidrolasas, pero con un gran futuro dentro de las biotransformaciones, pues catalizan una reacción fundamental en la Química Orgánica, como es la formación de enlaces C-C. Dentro de las liasas, son de especial importancia las aldolasas,¹⁴ que intervienen en la adición selectiva de carbonos nucleófilos a enlaces C=O y las

¹¹ J. S. White, D.C. White, "Source Book of Enzymes", CRC Press, Boca Raton, 1997.

¹² S. M. Roberts, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 2001, 1475-1499.

¹³ U. T. Bornscheuer, R. S. Kaszlauskas, "Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations", Wiley-VCH, Weinheim, 1999.

¹⁴ W. D. Fessner, "Enzymatic Asymmetric Synthesis Using Aldolasas" en "Stereoselective Biocatalysis" (Ed. R. N. Patel), Marcel Dekker, Nueva York, 2000, 239-265.

oxinitrilasas, que catalizan procesos de adición de cianuro de hidrógeno a aldehídos y cetonas, formándose así las correspondientes cianhidrinas ópticamente activas.¹⁵

I.2.2. Enzimas en disolventes orgánicos.

A pesar de que el agua es el medio natural donde trascurren las biotransformaciones, los enzimas tienen la capacidad de trabajar en mezclas miscibles agua-disolvente orgánico,¹⁶ en sistemas bifásicos agua-disolvente orgánico inmiscible,¹⁷ en sistemas micelares reversos^{17a,18} o en medios orgánicos “secos”.^{17a,19} Todos los enzimas que se emplean en disolventes orgánicos, tanto hidrofílicos como hidrofóbicos, no están rodeados por el propio disolvente, sino por agua. Las proteínas presentan alrededor una *capa esencial de agua*, que es fundamental para su actividad catalítica. Debido a las diferentes solubilidades en agua de los distintos disolventes orgánicos, se requieren diferentes cantidades de agua para mantener la actividad catalítica de cada enzima, ya que la actividad de los procesos enzimáticos depende en gran medida de esta capa esencial de agua.

En el caso de emplear un enzima en forma sólida (liofilizado o adsorbido sobre un soporte inerte) en disolvente orgánico, va a producirse un proceso de catálisis heterogénea en el que aparecen dos fases: una líquida formada por el disolvente orgánico y los reactivos en él disueltos y otra sólida, constituida por el enzima con su capa esencial de agua.

Las ventajas sintéticas de llevar a cabo procesos biocatalizados en disolventes orgánicos son las siguientes:²⁰

- Catálisis de un gran número de reacciones que serían desfavorables en agua.
- Ausencia de reacciones laterales no deseadas que suelen suceder en medios acuosos.
- Solubilización de sustratos hidrofóbicos.
- Facilidad de recuperación de ciertos productos insolubles y del propio catalizador, con lo cual el trabajo de estas reacciones es mucho más sencillo que en agua.
- Incremento de la estabilidad térmica de los enzimas, especialmente a bajos niveles de agua.
- Posibilidad de producir cambios importantes en la selectividad de los biocatalizadores.

La actividad de los enzimas en medios orgánicos depende de manera muy importante de factores como la cantidad de agua, la solvatación de los sustratos, el control del pH, el estado físico del enzima y la naturaleza del disolvente.

¹⁵ (a) M. Schmidt, H. Griengl, “Oxynitrilasas: From Cyanogenesis to Asymmetric Synthesis” en “*Topics in Current Chemistry*” (Ed. W. D. Fessner), Springer-Verlag, Berlin, Vol. 200, **1999**, 193-226. (b) F. Effenberger, “Hydroxynitrile Lyases in Stereoselective Synthesis” en “*Stereoselective Biocatalysis*” (Ed. R.N. Patel), Marcel Dekker, Nueva York, **2000**, 321-342.

¹⁶ L. G. Butler, *Enzyme Microb. Technol.* **1979**, *1*, 253-259.

¹⁷ (a) “*Biocatalysis in Non-Conventional Media*” (Eds. J. Tramper, M. H. Vermue, H. H. Beftink, U. von Stockar), Elsevier, Amsterdam, **1992**. (b) M. Garguri, M. D. Legoy, *Biochim. Biophys. Acta*, **1997**, *1337*, 22-232.

¹⁸ R. M. D. Verhaert, R. Hilhorst, M. Vermue, T. J. Schaafsma, C. Veeger, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *187*, 59-72.

¹⁹ (a) A. M. Klibanov, *CHEMTECH*, **1986**, *16*, 354-359. (b) C.-S. Chen, C. J. Sih, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1989**, *28*, 695-707. (c) A. M. Klibanov, *Acc. Chem. Res.* **1990**, *23*, 114-120. (d) “*Enzymatic Reactions in Organic Media*” (Eds. A. M. P. Koskinen, A. M. Klibanov), Blackie Academic & Professional, Londres, **1996**.

²⁰ (a) G. Carrea, S. Riva, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2226-2254. (b) A. M. Klibanov, *Nature*, **2001**, *39*, 241-246.

Sin embargo, se ha observado que los enzimas presentan una actividad mucho menor en disolventes orgánicos que en agua, debido a factores como las limitaciones difusionales, la poca estabilización del intermedio enzima-sustrato, la flexibilidad restringida de las proteínas en medio orgánico e incluso una desnaturalización parcial del biocatalizador en el proceso de liofilización.²¹

Para contrarrestar estos problemas se han desarrollado técnicas como la solubilización del enzima en el disolvente orgánico²² o la adsorción de los preparados enzimáticos en soportes porosos que reduzcan las limitaciones difusionales.²³ También se ha empleado la adición de excipientes o de sales antes de la liofilización del biocatalizador,²⁴ o la preparación de crudos enzimáticos a partir de disoluciones acuosas con el pH óptimo para la actividad catalítica.²⁵

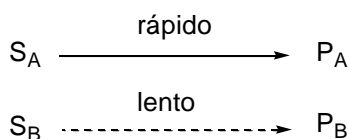
I.3. RESOLUCIÓN DE MEZCLAS RACÉMICAS.

Existen tres metodologías fundamentales para la resolución de mezclas racémicas:²⁶

Resoluciones clásicas. Consisten en el uso de una cantidad estequiométrica del agente de resolución quiral, que se une de forma covalente o no covalente con el sustrato a resolver para formar un par de diastereoisómeros. Una vez separados, el sustrato se libera del agente de resolución por una transformación química. Esta técnica es muy utilizada si la formación de sales es sencilla, como en el caso de aminas y ácidos.

Cromatografía quiral. Implica el empleo de una fase estacionaria quiral donde se separan los enantiómeros disueltos en una fase móvil. Puede llevarse a cabo de forma analítica o preparativa, aunque a gran escala es menos empleada por el alto coste que implica.

Resolución cinética. En este caso se utiliza un catalizador o reactivo quiral que reacciona con distinta velocidad con un enantiómero que con el otro, generando así una mezcla del sustrato de partida y del producto enantioenriquecida. El componente deseado de la mezcla será posteriormente separado. En las resoluciones cinéticas catalizadas, las velocidades relativas de reacción para los enantiómeros del sustrato se expresan como $k_{rel} = k_{rápido}/k_{lento}$ y dependen de la magnitud $\Delta\Delta G^\ddagger$, que representa la diferencia de energía entre los estados de transición diastereoisoméricos formados por cada enantiómero con el agente de resolución en el paso determinante de la reacción. Cuanto mayor sea $\Delta\Delta G^\ddagger$ y mayor el grado de reversibilidad de la reacción, mayores serán los excesos enantioméricos del sustrato (ee_s) y del producto (ee_p).



Esquema I.1. Resolución cinética

²¹ A. M. Klivanov, *Trends. Biotechnol.* **1997**, *15*, 97-101.

²² (a) V. M. Paradkar, J. S. Dordick, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 5009-5010. (b) F. Secundo, G. Carrea, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2002**, *19-20*, 93-102.

²³ (a) R. J. Barros, E. Wehtje, P. Adlercreutz, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *59*, 364-373. (b) J. Deere, E. Magner, J. G. Wall, B. K. Hodnett, *Chem. Commun.* **2001**, 465-466.

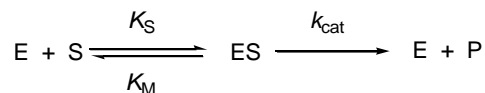
²⁴ (a) A. M. Santos, M. Vidal, Y. Pacheco, J. Frontera, C. Báez, O. Ornellas, G. Barletta, K. Griebenow, *Biotechnol. Bioeng.*, **2001**, *74*, 295-308. (b) M. Persson, I. Mladenoska, E. Wehtje, P. Adlercreutz, *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *31*, 833-341.

²⁵ K. Xu, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9815-9819.

²⁶ J. M. Keith, J. F. Larrow, E. N. Jacobsen, *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 5-26.

I.3.1. Resolución cinética enzimática.

El comportamiento cinético que presentan la mayoría de las reacciones enzimáticas (una excepción se encuentra en las reacciones con lipasas en medios acuosos) se ajusta a las teorías propuestas por Michaelis-Menten, como se muestra en el esquema I.2.



Esquema I.2. Mecanismo de Michaelis-Menten en resoluciones enzimáticas

En este mecanismo, se produce la unión del sustrato (S) mediante procesos físicos al centro activo del enzima, formando el complejo enzima-sustrato (ES) conocido como complejo de Michaelis. La concentración de este intermedio viene dada por la constante de Michaelis (K_M), que representa la concentración de sustrato a la que la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. Posteriormente, se forma el producto de reacción (P) y su separación del enzima, con una constante de velocidad de primer orden que se denomina número de recambio (k_{cat}). Un parámetro muy interesante en este mecanismo es la constante de especificidad (k_{cat}/K_M), que representa la constante de velocidad aparente de segundo orden de la reacción enzimática global a muy bajas concentraciones de sustrato.

Ecuación 1

$$v = \left(\frac{k_{cat}}{K_M} \right) [E][S]$$

I.3.2. Razón enantiomérica (E).

En una resolución cinética irreversible (la situación es mucho más compleja cuando hay reversibilidad), a diferencia de lo que ocurre en una síntesis asimétrica en condiciones normales, la velocidad de transformación de cada enantiómero varía con el grado de conversión (c), debido a que la relación entre los dos enantiómeros no se mantiene constante a lo largo del proceso. Al inicio de la reacción, el producto que se forma tiene un gran exceso enantiomérico, que va disminuyendo en el transcurso de la resolución, ya que el sustrato es cada vez más rico en el enantiómero que reacciona más lentamente. Así, el exceso enantiomérico del sustrato se hace cada vez mayor y la reacción más lenta. Por lo tanto, las purezas ópticas tanto del sustrato como del producto son una función del grado de conversión de la reacción.

El parámetro que describe la selectividad de una resolución se denomina razón enantiomérica (E),²⁷ una variable adimensional que se mantiene constante a lo largo de todo el proceso y que es función del entorno en el que tiene lugar la biotransformación. La razón enantiomérica se corresponde con la relación entre las constantes relativas de segundo orden de los enantiómeros del sustrato. Como estas constantes están expresadas en términos de energía libre ($\Delta G_A^\ddagger = -RT \ln(k_{cat}/K_M)_A$) y lo mismo para el enantiómero B), la razón enantiomérica se relaciona también con la diferencia de energía libre de los estados de transición diastereoméricos (ecuación 2).

Ecuación 2

$$E = \frac{(k_{cat}/K_M)_A}{(k_{cat}/K_M)_B}$$

²⁷ C.-S. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdeauskas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7294-7299.

La razón enantiomérica puede tener valores entre 1 (reacción no selectiva) y $+\infty$ (proceso totalmente selectivo). Como regla general según ciertos autores, razones enantioméricas por debajo de 15 no son adecuadas con fines prácticos. Pueden considerarse de moderadas con valores entre 15-30 y por encima de este valor se califican como buenas. Para valores de $E > 200$ no se puede determinar el valor de la razón enantiomérica con exactitud, debido a los errores que se cometen en la determinación de los excesos enantioméricos, pues pequeñas variaciones de los excesos enantioméricos del sustrato o del producto provocan grandes cambios en la E .²⁸

I.3.3. Medida de la razón enantiomérica.²⁹

Cuando se realiza una resolución cinética sobre un sustrato racémico, hay cuatro parámetros que pueden ser medidos: El tiempo (t), el grado de conversión (c) y los excesos enantioméricos del sustrato (ee_s) y del producto (ee_p).

Si suponemos que el proceso es irreversible, que sigue una cinética de Michaelis-Menten y que no hay inhibición por parte del producto, la razón enantiomérica se puede calcular combinando al menos dos de estas cuatro variables, por lo que existen seis metodologías para calcular la E . La elección de un método u otro depende de la medida de las variables experimentales, de la disponibilidad de los enantiómeros por separado de sustrato y producto, de la presencia de reacciones laterales en la resolución, etc.

A pesar de ser el tiempo la variable más sencilla de medir, los métodos en los que se incluye éste para el cálculo de la razón enantiomérica son los menos utilizados, por la falta de exactitud que presentan en ciertas circunstancias.

Sih y col.²⁹ desarrollaron una estrategia basada en la determinación de la E combinando medidas de la conversión con la del exceso enantiomérico del producto o bien del sustrato (ecuaciones 3 y 4). Su inconveniente radica en que las medidas de conversión están sujetas a un cierto error experimental, debido a la posible presencia de impurezas en el sustrato o a reacciones laterales.

$$\text{Ecuación 3} \quad E = \frac{\ln[(1-c)(1-ees)]}{\ln[(1-c)(1+ees)]}$$

$$\text{Ecuación 4} \quad E = \frac{\ln[1-c(1+eep)]}{\ln[1-c(1-ee_p)]}$$

La combinación de los excesos enantioméricos de sustrato y producto suele ser la metodología más utilizada en la determinación de la razón enantiomérica (ecuación 5),³⁰ a pesar de que sus medidas presentan también un cierto error experimental.

$$\text{Ecuación 5} \quad E = \frac{\ln \left[\frac{1-ee_p}{1+(ee_s/ee_p)} \right]}{\ln \left[\frac{1+ee_s}{1+(ee_s/ee_p)} \right]}$$

²⁸ G. Garon, G. W.-M. Tseng, R. J. Kazlauskas, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1994**, 5, 83-92.

²⁹ A. J. J. Straathof, J. A. Jongejan, *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, 21, 559-571.

³⁰ J. L. L. Rakels, A. J. J. Straathof, J. J. Heijnen, *Enzyme Microb. Technol.* **1993**, 15, 1051-1056.

Por otro lado, la medida de ee_s y ee_p también permite conocer el grado de conversión de la reacción según la ecuación 6, siempre que el sustrato se encuentre en forma racémica al inicio de la reacción.³¹

$$\text{Ecuación 6} \quad c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p}$$

A partir de los datos obtenidos en el cálculo de la razón enantiomérica, es posible conocer cuales son las mejores condiciones de reacción para la obtención del sustrato y del producto de una resolución enzimática en forma más enantiopura.

I.3.4. Factores que influyen en la razón enantiomérica.

La razón enantiomérica es una propiedad que se puede modificar variando ciertos parámetros de reacción. El objetivo es conseguir una E lo más alta posible para conseguir un proceso rentable.

Un primer modo de variar la enantioselectividad de una resolución consiste en utilizar diferentes biocatalizadores para una misma resolución, ya que pueden presentar selectividades muy dispares e incluso opuestas.

También se pueden realizar modificaciones en el propio biocatalizador, bien por la aplicación de tratamientos físicos o químicos sobre el mismo,³² o bien mediante métodos de ingeniería genética que alteren la secuencia de aminoácidos, y por tanto las propiedades del enzima.³³

La selectividad de los enzimas va a depender drásticamente del disolvente empleado y de la cantidad de agua presente en el medio,^{20,34} pudiendo incluso obtenerse selectividades opuestas para un mismo proceso utilizando diferentes disolventes. Esta capacidad de influir en la E de una reacción a través de variaciones en el disolvente se conoce como *ingeniería del medio*.

Otros factores sobre los que se puede actuar para variar la razón enantiomérica de un proceso son el pH,³⁵ la temperatura³⁶ y el empleo de aditivos en el medio de reacción.³⁷

I.4. LIPASAS.

Las lipasas (triacilglicerol hidrolasas) son enzimas que catalizan la hidrólisis de aceites y grasas con la subsiguiente formación de ácidos grasos libres, digliceroleos, monogliceroleos y glicerol. Estos biocatalizadores se distribuyen en animales, plantas y microorganismos como enzimas digestivas que facilitan el transporte, la deposición y la

³¹ C. J. Sih, S.-H. Wu, *Top. Stereochem.* **1989**, *19*, 63-125.

³² (a) M. Kawase, A. Tanaka, *Enzyme Microb. Technol.* **1989**, *11*, 44-48. (b) J. J. Lalonde, C. Govardhan, N. Khalaf, A. G. Martinez, K. Visuri, A.L. Margolin, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6845-6852. (c) W. Tischer, F. Wedekind, *Top. Curr. Chem.* **1999**, *200*, 96-126.

³³ (a) J. L. Cleland, C. S. Craik, "Protein Engineering: Principles and Practice", Wiley-Liss, Nueva York, **1996**. (b) F. H. Arnold, *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 125-131. (c) K. A. Powell, S. W. Ramer, S. B. del Cardayré, W. P. C. Stemmer, M. B. Tobin, P. F. Longchamp, G. W. Huisman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3948-3959.

³⁴ (a) S. Parida, J. S. Dordick, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2253-2259. (b) C. R. Wescott, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10365-10370. (c) P. Pepin, R. Lortie, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *63*, 502-505.

³⁵ (a) A. Zaks, A. M. Klibanov, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 3194-3201. (b) T. Sugai, K. Hamada, T. Akeboshi, H. Ikeda, H. Ohta, *Synlett*, **1997**, 983-985.

³⁶ (a) E. Holmberg, K. Hult, *Biotechnol. Lett.* **1991**, *13*, 323-326. (b) R. S. Philips, *Trends Biotechnol.* **1996**, *14*, 13-16.

³⁷ F. Theil, *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 2905-2919.

movilización de las grasas. Además, juegan un papel fundamental en el metabolismo intracelular de lípidos y en el funcionamiento de membranas biológicas.³⁸

Las lipasas son utilizadas como fármacos en desórdenes digestivos y enfermedades del páncreas. Se emplean también como aditivos de detergentes y como catalizadores en la industria oleoquímica y alimentaria, sin olvidar su función como catalizadores en síntesis orgánica.

Presentan un elevado potencial sintético en contraste con otros enzimas, ya que no requieren de cofactor y son capaces de aceptar una amplia variedad de sustratos. Así, las lipasas pueden acomodar ésteres alifáticos, aromáticos, bicíclicos e incluso ésteres de compuestos organometálicos tipo “sandwich”. También se ha descrito el empleo de tioésteres y aminas activadas como sustratos para las lipasas.

Una gran variedad de estos biocatalizadores son producidos por bacterias u hongos y son excretadas como enzimas extracelulares, por lo que su producción a gran escala es un proceso relativamente sencillo. La mayoría de las lipasas existen en los organismos en forma de 2 isoenzimas (A y B), que generalmente presentan la misma enantiopreferencia, pero cuyas ligeras diferencias estructurales provocan variaciones en la enantioselectividad de las reacciones que catalizan. Las preparaciones de lipasas crudas contienen las 2 isoenzimas, salvo en el caso de la lipasa de *Candida antarctica*, donde se han conseguido separar a través de procesos de ingeniería genética. Sólo unas pocas lipasas han conseguido aislarse de mamíferos.

Una característica fundamental de las lipasas, que las diferencia de otras hidrolasas y las convierte en los enzimas con mayor potencial sintético, es la interacción que presentan con los sustratos. Al contrario que las esterasas, las cuales muestran una mayor actividad a mayor concentración de sustrato hasta llegar a la saturación, la catálisis en medio acuoso con lipasas presenta muy baja actividad con sustratos hidrosolubles, pero cuando la concentración del sustrato es tan alta que sobrepasa el límite de solubilidad formando una segunda fase lipofílica, se produce un gran incremento en la actividad de la lipasa. Esta propiedad se conoce como *activación interfacial*.³⁹ El hecho de que las lipasas durante la catálisis estén expuestas a una fase lipídica demuestra que son capaces de trabajar en entornos hidrofóbicos manteniendo su actividad.

Por ello, es posible reemplazar el nucleófilo natural de las lipasas (agua) por una gran variedad de nucleófilos orgánicos como alcoholes, aminas, amoníaco, tioles, peróxidos, hidrazinas., etc.

Las lipasas son capaces de catalizar la esterificación selectiva entre ácidos y alcoholes. También intervienen en reacciones de transesterificación, procesos en los que se produce un intercambio de radicales acilo entre un éster y un ácido (acidólisis), un éster y otro éster (interesterificación) o un éster y un alcohol (alcoholólisis).¹² Pero las lipasas no están limitadas a reacciones de síntesis e hidrólisis sobre ésteres de ácidos carboxílicos. Son capaces de catalizar procesos de aminólisis para la síntesis de amidas, tanto racémicas como ópticamente activas.⁴⁰ La reacción de aminólisis también es muy útil para la resolución de aminas.⁴¹ En los procesos de amonólisis enzimática, el

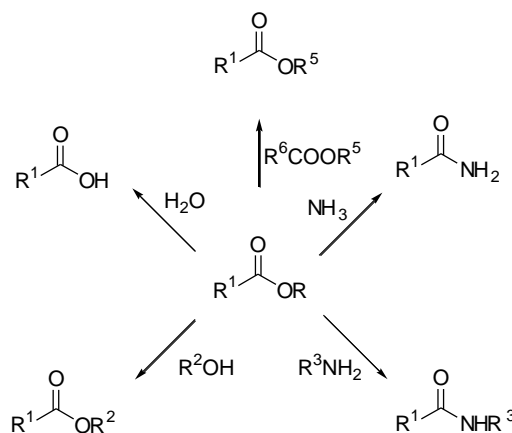
³⁸ (a) P. Wooley, S. B. Petersen, “*Lipases, Their Structure, Biochemistry and Application*”, Cambridge University Press, Cambridge, **1994**. (b) R. D. Schmid, R. Verger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608-1633.

³⁹ R. Verger, *Trends. Biotechnol.* **1997**, *15*, 32-38.

⁴⁰ V. Gotor, R. Brieva, C. González, F. Rebolledo, *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 9207-9214. (b) V. M. Sánchez, F. Rebolledo, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 1464-1470.

⁴¹ L. E. Iglesias, V. M. Sánchez, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, *8*, 2675-2677. (b) V. Gotor, “Enzymes in Action: Green Solutions for Chemical Problems” in “*NATO Science Series*” Vol. 33, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **2000**, 117-132.

nucleófilo empleado en la síntesis es el amoníaco.^{41b, 42} Se ha descrito el empleo de lipasas en reacciones selectivas de hidrazinólisis de ésteres, formándose hidrazinas con buenos rendimientos.⁴³ Finalmente, también se han utilizado lipasas en procesos de oximólisis⁴⁴ y tioesterificación⁴⁵ en disolventes orgánicos con elevada selectividad.



Esquema I.3. Principales reacciones catalizadas por lipasas

Independientemente de las diferencias en tamaño, secuencia de péptidos, sustratos, activadores, inhibidores y otras propiedades, las lipasas que han conseguido ser elucidadas hasta la fecha adoptan la misma estructura, conocida como el pliegue de α/β hidrolasa, que consta de una serie de hebras paralelas β rodeadas por hélices α . Una secuencia de aminoácidos aparece en todas las lipasas, el pentapéptido Gli-X-Ser-Y-Gli (donde X e Y son restos variables). La conservación de esta serina y la pérdida de actividad que se produce cuando se modifica o reemplaza indica que este aminoácido es crucial para la catálisis. Además de la serina catalítica, el centro activo de las lipasas consta de histidina (His) y de otro aminoácido que puede ser ácido aspártico (Asp) o glutámico (Glu). Estos tres residuos forman la tríada catalítica,⁴⁶ que se encuentra en una cavidad conocida como hueco hidrofóbico del enzima.

Los métodos comentados en el apartado I.3.4 pueden ser aplicados a las lipasas para incrementar su actividad, estabilidad o selectividad.⁴⁷

I.4.1. Mecanismo de actuación de las lipasas en disolventes orgánicos.

Dentro de los diferentes mecanismos de reacción que se postulan para las hidrolasas, en las lipasas la actividad catalítica se produce a través del mecanismo de las proteasas serínicas, también presente en esterasas y ciertas proteasas.⁴⁸

En primer lugar, se produce la formación del complejo enzima-sustrato (complejo de Michaelis). Este complejo orienta al sustrato dentro del centro activo del enzima. La función de la tríada catalítica es la siguiente: el ácido aspártico polariza el grupo imidazol de la histidina, lo que facilita la transferencia de protones a través de puentes de hidrógeno y finalmente, el protón hidroxílico de la serina se une a la

⁴² (a) M. J. García, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 38, 6141-6142. (b) E. García Urdiales, F. Rebolledo, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, 10, 721-726.

⁴³ V. Gotor, C. Astorga, F. Rebolledo, *Synlett*, **1990**, 387-388.

⁴⁴ V. Gotor, E. Menéndez, *Synlett*, **1990**, 699-700.

⁴⁵ D. Bianchi, P. Cesti, *J. Org. Chem.*, **1990**, 55, 5657-5659.

⁴⁶ L. Brady, A.M. Brzozowski, Z. S. Derewenda, E. Dodson, D. Dodson, S. Tolley, J. P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Høge-Jensen, L. Nørskov, L. Thim, U. Menge, *Nature*, **1990**, 343, 767-770.

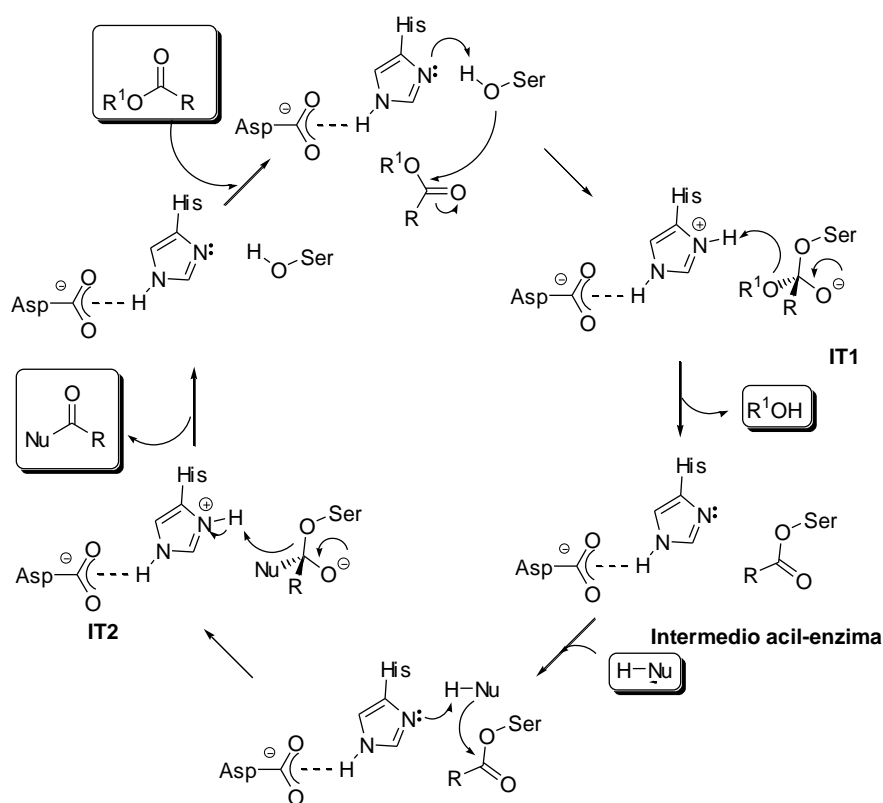
⁴⁷ (a) P. Villeneuve, J. M. Muderhwa, J. Graille, M. J. Haas, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, 9, 113-148.

(b) M. T. Reetz, *Current Opin. Chem. Biol.*, **2002**, 6, 145-150.

⁴⁸ L. Hedstrom, *Chem. Rev.* **2002**, 102, 4501-4523.

histidina. Ahora, la serina activada es capaz de atacar al compuesto carbonílico, con lo que se forma el primer intermedio tetraédrico (IT1), en el que el oxianión del sustrato se estabiliza por interacciones con la cadena proteínica. Se produce posteriormente la transferencia de un protón de la serina al residuo de histidina, que ésta transfiere al átomo de oxígeno del grupo saliente del sustrato. Esta transferencia provoca la descomposición del intermedio tetraédrico 1 para generar el *complejo acil-enzima*. A continuación, tiene lugar el ataque del nucleófilo correspondiente (el natural es el agua, aunque ya se ha comentado que son aceptados otros muchos) con lo cual se genera un segundo intermedio tetraédrico (IT2), que colapsa en el producto de reacción y regenera la serina, para comenzar un nuevo ciclo catalítico.

El enzima posee un ambiente quiral específico dentro de su centro activo que es el responsable de su selectividad. Esta selectividad puede manifestarse bien durante la formación del complejo acil-enzima, durante el posterior ataque del nucleófilo o bien durante ambos.



Esquema I.4. Mecanismo de las hidrolasas serínicas.

I.4.2. Lipasa de *Candida antarctica*.

Es una de las lipasas más versátiles empleadas en el campo de las biotransformaciones. Este biocatalizador fue aislado en la Antártida cuando se examinaban enzimas capaces de trabajar en condiciones extremas. Existen dos isoenzimas de esta lipasa, la forma A y la forma B, que presentan ciertas diferencias.⁴⁹ La lipasa A es dependiente de Ca^{2+} y más termoestable, mientras que el componente B es menos termotolerante e independiente de metales para su actividad. Su especificidad de sustrato presenta grandes diferencias, ya que la CAL-B es muy activa frente a una gran variedad de sustratos no naturales, mientras que la CAL-A tiene una menor

⁴⁹ S.A. Patkar, F. Björkling, M. Zyndel, M. Schulein, A. Svendsen, H. P. Heldt-Hansen, E. Gormsen, *Indian J. Chem.* **1993**, 32B, 76-80.

versatilidad. Ambos isoenzimas han sido obtenidos en forma pura a través de procesos de clonación y sobreexpresión en *Aspergillus oryzae*. Para aplicaciones preparativas, el componente B ha sido mucho más utilizado.⁵⁰

La estructura tridimensional de la CAL-B libre y asociada a diversos inhibidores ha sido resuelta mediante difracción de rayos X.⁵¹ La enzima está formada por 317 aminoácidos, con un peso molecular de 33 KDa. Tiene la estructura de pliegues de α/β hidrolasas, no presenta activación interfacial (o ésta es muy escasa) y es muy poco activa frente a triglicéridos de cadena larga.

Como la mayoría de las lipasas, su mecanismo de actuación es el de las hidrolasas serínicas. La secuencia de aminoácidos alrededor de la serina difiere de otras lipasas, ya que presenta un resto de treonina en lugar de una glicina. En este cambio se cree que está la explicación de la menor estabilidad térmica de esta lipasa, puesto que al sustituir la treonina por un resto de glicina, se consigue una variedad de CAL-B que presenta mucha mayor termoestabilidad, aunque su actividad disminuye considerablemente frente a la variedad nativa.⁵²

LA CAL-B se presenta en diferentes preparados comerciales que difieren en el soporte sobre el que se incorpora el enzima. El preparado comercial empleado mayoritariamente en esta memoria es el comercializado por Novo Nordisk como “Novozym 435”, donde el enzima está soportado en una resina conocida como “Lewatit E”. Una de las ventajas de este preparado es que es más estable térmicamente que el enzima nativo.⁵³

La isoenzima CAL-A ha sido mucho menos empleada en síntesis orgánica.⁵⁴ Presenta un peso molecular de 43 KDa, aunque no se conocen muchos más datos sobre la misma, pues su estructura terciaria aún no ha sido elucidada.

1.4.3. Lipasa de *Pseudomonas cepacia*.

Esta lipasa, al igual que otras aisladas pertenecientes a las especies *Pseudomonas*, ha sido empleada con alta selectividad tanto en reacciones de hidrólisis y alcoholólisis de ésteres y anhídridos como en procesos de transesterificación de alcoholes. La estructura de rayos X de su conformación abierta ha sido elucidada, presentando la típica estructura de α/β hidrolasa.⁵⁵ El enzima está formado por 320 aminoácidos, con un peso molecular de 34 KDa.

Su tríada catalítica consta de serina, histidina y ácido aspártico mientras que los aminoácidos leucina y glicina contribuyen de manera fundamental a la catálisis por formación de puentes de hidrógeno con el intermedio oxianiónico. Parece que esta lipasa posee un centro activo mucho más estrecho que otras lipasas, ya que en ciertos casos presenta inconvenientes para acomodar sustratos muy voluminosos. La lipasa de *Pseudomonas cepacia* principalmente utilizada en esta memoria es la comercializada por Amano Pharmaceutical Co., tanto en la variedad lipasa Amano PS como en la forma lipasa Amano PS-C. En este último preparado, el enzima está inmovilizado sobre un soporte de tipo cerámico.

⁵⁰ E. M. Anderson, K. M. Larsson, O. Kirk, *Biocatal. Biotransform.* **1998**, *16*, 181-204.

⁵¹ J. Uppenberg, M. T. Hansen, S. Patkar, T. A. Jones, *Structure*, **1994**, *2*, 293-308.

⁵² S. Patkar, A. Svendsen, O. Kirk, I. G. Clausen, K. Borch, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1997**, *3*, 51-54.

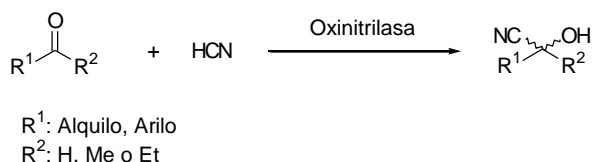
⁵³ M. Arroyo, J. M. Sánchez-Montero, J. V. Sinisterra, *Enzym. Microb. Technol.* **1999**, *24*, 3-12.

⁵⁴ (a) S. H. Krishna, M. Persson, U. T. Bornscheuer, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**, *13*, 2693-2696. (b) M. Solymar, F. Filop, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**, *13*, 2383-2388.

⁵⁵ K. K. Kim, H. K. Song, D. H. Shin, K. Y. Hwang, S. W. Suh, *Structure*, **1997**, *5*, 173-185. (b) J. D. Schrag, Y. G. Li, M. Cygler, D. M. Lang, T. Burgdorf, H. J. Hecht, R. Schmid, D. Schomburg, T. J. Rydel, J. D. Oliver, L. C. Strickland, C. M. Dunaway, S. B. Larson, J. Day, A. Macpherson, *Structure*, **1997**, *5*, 197-211.

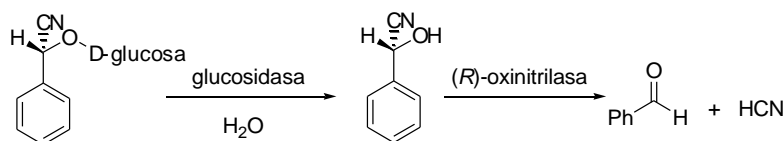
I.5. OXINITRILASAS.

Las oxinitrilasas o hidroxinitrilo liasas (HNLs) son los enzimas de mayor aplicación dentro las liasas. Catalizan la formación reversible de cianhidrinas ópticamente activas mediante un proceso de adición selectiva de HCN a aldehídos y cetonas. Dependiendo de la estereoquímica de la oxinitrilasa, el ataque nucleófilo del cianuro de hidrógeno podrá darse por una cara u otra del compuesto carbonílico, obteniéndose tanto (*R*)- como (*S*)-cianhidrinas (esquema I.5).⁵⁶



Esquema I.5. Hidrocianación selectiva de aldehídos y cetonas

Las oxinitrilasas están muy distribuidas en la naturaleza. Se cree que unas 3000 plantas poseen estos enzimas, además de un gran número de microorganismos, como bacterias y hongos. En estos seres vivos, existen numerosas cianhidrinas de aldehídos y cetonas en forma de lípidos y glucósidos.⁵⁷ En un proceso conocido como cianogénesis (esquema I.6), inicialmente se produce la separación de la cianhidrina del glucósido catalizada por una glucosidasa, y posteriormente las oxinitrilasas son capaces de catalizar la formación de cianuro de hidrógeno a partir de estas cianhidrinas libres, con dos misiones fundamentales: como defensa frente a un daño externo y como fuente de nitrógeno para posteriores biosíntesis de aminoácidos.



Esquema I.6. Cianogénesis de la prunasina en plantas de la familia *Rosacea*.

Se pueden agrupar las oxinitrilasas en dos grandes grupos: aquellas que contienen dinucleótido de flavina y adenina (FAD) como cofactor, y las que no lo presentan. Las oxinitrilasas que contienen FAD se encuentran únicamente en la familia de las *Rosacea*. Todos estos enzimas presentan propiedades bioquímicas muy similares. Su peso molecular está entre los 50 y los 80 KDa y están constituidos por varias isoformas. En todos los casos, el FAD se encuentra unido no covalentemente a un grupo prostético en una región hidrofóbica cercana al centro activo. Parece ser que el cofactor no interviene en la catálisis, sino que su función es la de estabilizar la estructura de la proteína.⁵⁸

Las oxinitrilasas que no contienen FAD pueden encontrarse en varias familias de plantas. Presentan una gran diversidad dentro de sus propiedades bioquímicas como masa molecular, estructura primaria, punto isoeléctrico, etc.⁵⁷

⁵⁶ (a) R. J. H. Gregory, *Chem. Rev.* **1999**, 99, 3649-3682. (b) F. Effenberger, *Chimia*, **1999**, 53, 3-10. (c) H. Griengl, H. Schwab, M. Fechter, *TIBTECH*, **2000**, 18, 425-429. (d) J. Brusse, A. van der Gen, "Biocatalysis in the Enantioselective Formation of Chiral Cyanohydrins, Valuable Building Blocks in Organic Synthesis" en "*Stereoselective Biocatalysis*" (Ed. R. N. Patel), Marcel Dekker, Nueva York, **2000**, 289-320. (e) M. North, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2003**, 14, 147-176.

⁵⁷ A. Hickel, M. Hasslacher, H. Griengl, *Physiol. Plant.*, **1996**, 98, 891-898.

⁵⁸ (a) M. S. Jorns, *J. Biol. Chem.*, **1979**, 254, 12145-12152. (b) H. Wajant, F. Effenberger, *Biol. Chem.*, **1996**, 377, 611-617.

En la actualidad se han purificado y caracterizado oxinitrilasas de 11 plantas diferentes, pertenecientes a 6 familias, aunque sólo 5 de éstas se producen en cantidades suficientes como para tener aplicación sintética.

La (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus* se obtiene fácilmente de las almendras y es accesible comercialmente en grandes cantidades. A partir de 1 kg de fuente natural pueden obtenerse 4 g de este enzima. La (*S*)-oxinitrilasa de *Sorghum Bicolor* se presenta en la planta de mijo, pero su obtención es mucho más costosa que la de *Prunus amygdalus*, ya que sólo se consiguen 30 mg de enzima por kg de semillas de mijo. Todos los esfuerzos de mejora genética sobre este enzima han fallado hasta la fecha. Las (*S*)-oxinitrilasas de *Hevea Brasiliensis* y de *Manihot esculenta* han sido sobreexpresadas con éxito en *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*,⁵⁹ con lo que en la actualidad son accesibles en cantidades suficientes para su posterior aplicación. En los últimos años, la clonación sobre *Pichia pastoris* de la (*R*)-oxinitrilasa de *Linux usitatissimum* ha supuesto la aparición de una nueva (*R*)-oxinitrilasa con un gran número de posibilidades sintéticas.⁶⁰

I.5.1. Estructura tridimensional y mecanismo de reacción.

A pesar de los esfuerzos realizados, en la actualidad sólo ha conseguido ser elucidada la estructura tridimensional de la oxinitrilasa de *Hevea Brasiliensis*.⁶¹ Este biocatalizador presenta la estructura de pliegue de hidrolasas α/β , que aparece en muchos otros enzimas y que consta de una serie de láminas tipo β rodeadas de hélices α . El centro activo del enzima se encuentra profundamente insertado en el interior de la estructura proteínica y es accesible mediante un estrecho túnel. Este centro activo está formado por los aminoácidos serina, histidina y ácido aspártico, que constituyen la tríada catalítica, como se ha observado para otros enzimas de este tipo. Los aminoácidos cisteína y la treonina parecen tener un papel importante en la catálisis, ya que el reemplazo de cisteína por serina en procesos de mutagénesis conlleva una significativa pérdida de la actividad del enzima.

La combinación de estudios de rayos X, de mutagénesis y de inhibición ha permitido elucubrar un mecanismo de actuación para esta oxinitrilasa.⁶² A través de la tríada catalítica se produce un desplazamiento de protones que activa a la serina, la cual ataca posteriormente al compuesto carbonílico para generar un intermedio tetraédrico. La carga negativa del hemiacetal formado es estabilizada por enlaces de puente de hidrógeno con la cadena de tipo amida que presenta la cisteína y con las cadenas laterales de la cisteína y la treonina, en un lugar conocido como hueco del oxianión. El siguiente paso en la catálisis implica la incorporación del cianuro de hidrógeno. Se cree que la cisteína juega un papel fundamental en su desprotonación y la posterior protonación del hemiacetal. El desplazamiento nucleófilo de la serina activada por parte del anión cianuro es ahora posible, concluyendo la catálisis con la liberación de la cianhidrina formada.

En los últimos años, los estudios de mutagénesis sobre la oxinitrilasa de *Manihot esculenta* parecen indicar que la formación de cianhidrinas en este enzima ocurre por un

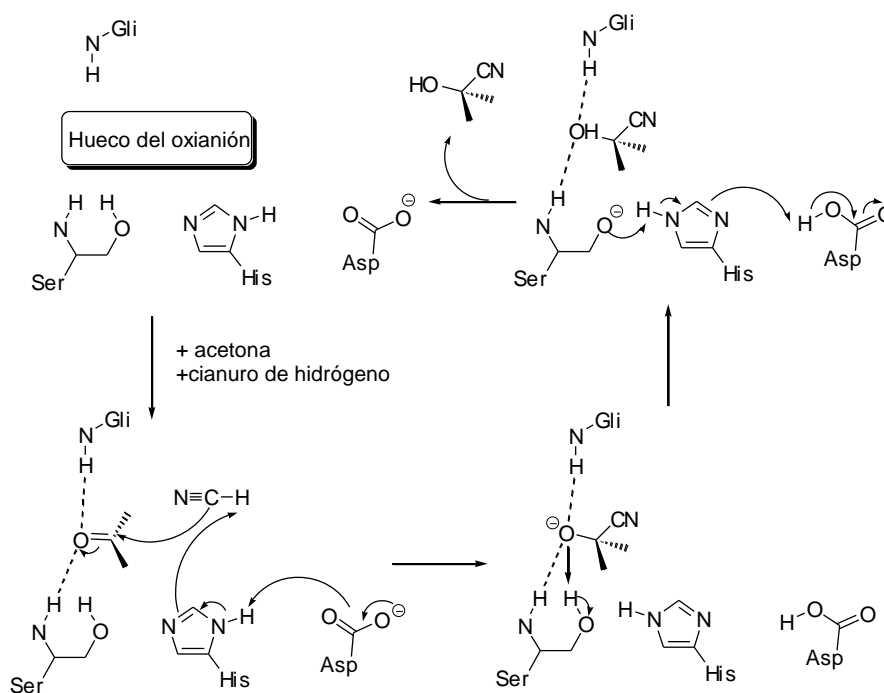
⁵⁹ (a) S. Förster, J. Roos, F. Effenberger, H. Wajant, A. Sprauer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1996**, *35*, 437-439. (b) M. Hasslacher, M. Schall, M. Hayn, H. Griengl, S. D. Kohlwein, H. Schwab, *J. Biol. Chem.*, **1996**, *271*, 5884-5891.

⁶⁰ K. Trummler, J. Roos, U. Schwaneberg, F. Effenberger, S. Förster, H. Wajant, *Plant Sci.* **1998**, *139*, 19-27.

⁶¹ (a) U. G. Wagner, M. Hasslacher, H. Griengl, H. Schwab, C. Kratky, *Structure*, **1996**, *4*, 811-822. (b) J. Zuegg, K. Gruber, M. Gugganig, U. G. Wagner, C. Kratky, *Protein. Sci.* **1999**, *8*, 1990-2000.

⁶² M. Hasslacher, C. Kratky, H. Griengl, H. Schwab, S. D. Kohlwein, *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **1997**, *27*, 438.

mecanismo diferente (esquema I.7).⁶³ En este caso, la unión de la serina activada al compuesto carbonílico genera un ácido de Lewis que favorece la adición del anión cianuro (posiblemente disociado del cianuro de hidrógeno por acción de la tríada catalítica). El anión resultante, estabilizado dentro del hueco del oxianión, es protonado a través de la tríada catalítica para generar la correspondiente cianhidrina. Sin embargo, para corroborar estas dos hipótesis mecánicas se requieren más datos experimentales.



Esquema I.7. Mecanismo propuesto para la (*S*)-oxinitrilasa de *Manihot esculenta*.

I.5.2. (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus*.

Las almendras son la fuente más abundante de (*R*)-oxinitrilasa. El enzima puede obtenerse de éstas bien en forma pura o bien puede utilizarse como un crudo a partir de la harina de almendras desengrasada. Tanto el extracto puro como el crudo del enzima presentan una selectividad similar.

La (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus* es un enzima que contiene FAD, formada por 4 isoenzimas (todos ellos constituidos por un polipéptido sencillo), con un peso molecular de 60 KDa.⁶⁴

Este enzima cataliza la adición de cianuro de hidrógeno por la cara *si* de compuestos carbonílicos. Su sustrato natural es el benzaldehído, aunque presenta una gran tolerancia en este sentido. Un amplio número de aldehídos aromáticos y alifáticos tanto saturados como insaturados se transforman en cianhidrinas con altos excesos enantioméricos. La longitud de la cadena de los aldehídos alifáticos inicialmente se limitó a C₆, aunque se ha demostrado que aldehídos mayores de C₁₀ pueden reaccionar con esta oxinitrilasa.⁶⁵ También los aldehídos heteroaromáticos (tionil, furil, etc.) son buenos sustratos.⁶⁶

⁶³ H. Wajant, K. Pfizenmaier, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 25830-25834.

⁶⁴ H. Lauble, K. Müller, H. Schindelin, S. Förster, H. Wajant, F. Effenberger, *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **1994**, 19, 343-347.

⁶⁵ (a) F. Effenberger, B. Hörsch, F. Weingart, T. Ziegler, S. Kühler, *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32, 2605-2608. (b) T. T. Huuhtanen, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1992**, 3, 1223-1226.

⁶⁶ P. Chen, S. Han, G. Lin, H. Huang, Z. Li, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, 12, 3273-3279.

Ciertas metil cetonas alifáticas son convertidas en (*R*)-cianhidrinas con buenas conversiones y excesos enantioméricos.⁶⁷ En el caso de etil cetonas, las conversiones conseguidas son muy bajas en largos tiempos de reacción, lo que parece indicar que este es el límite de tolerancia del enzima. Sin embargo, recientemente ha sido descrita la síntesis de cianhidrinas quirales a partir de cetonas bíclicas en procesos catalizados por la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus*.⁶⁸

I.5.3. Otras (*R*)-oxinitrilasas.

La (*R*)-oxinitrilasa de *Linux usitatissimum* (planta de lino) no contiene FAD como cofactor y presenta una especificidad de sustrato muy diferente a la (*R*)-oxinitrilasa de almendras. Sus sustratos naturales son la acetona y la 2-butanona, pero se ha descubierto que los aldehídos alifáticos y algunas cetonas alifáticas se transforman en las correspondientes (*R*)-cianhidrinas. Este biocatalizador no reacciona con aldehídos aromáticos. En general, se ha descubierto que los sustratos de pequeño tamaño son los mejor aceptados por este enzima.⁶⁹

También han sido investigadas otras (*R*)-oxinitrilasas de la familia *Rosacea* obtenidas de manzanas, albaricoques, cerezas y melocotones. En cada caso, los enzimas fueron usados en forma de crudo preparado a partir de las semillas de estos frutos. La oxinitrilasa de manzana es la más activa y se ha descubierto que produce mejores resultados para aldehídos muy impedidos estéricamente que la oxinitrilasa de almendras.⁷⁰ También se han realizado estudios comparativos de estos dos enzimas cuando se emplean metil cetonas como sustratos, siendo la oxinitrilasa de manzana ligeramente más selectiva.^{67b} La oxinitrilasa de albaricoque presenta únicamente reactividad sobre aldehídos aromáticos y heteroaromáticos, mientras que la obtenida del melocotón parece tener una tolerancia de sustratos similar a la (*R*)-oxinitrilasa de almendras.⁷¹

I.5.4. (*S*)-oxinitrilasas.

Las (*S*)-oxinitrilasas catalizan la adición de cianuro de hidrógeno a la cara *re* de diversos compuestos carbonílicos, no presentando ninguna de ellas FAD como cofactor.

La primera (*S*)-oxinitrilasa empleada en síntesis orgánica fue la de *Sorghum bicolor* (mijo), pero su obtención es difícil y por consiguiente presenta poca aplicabilidad. Su sustrato natural es el 4-hidroxibenzaldehído, aceptando únicamente aldehídos aromáticos como sustratos.⁷²

La clonación de la (*S*)-oxinitrilasa de *Manihot esculenta* (obtenida de la planta de mango) sobre *E. coli* genera una oxinitrilasa 25 veces más activa que el enzima natural. Se ha encontrado que acepta una gran variedad de sustratos entre los que se incluyen aldehídos aromáticos, heteroaromáticos, alifáticos y α,β -insaturados. En el caso de las cetonas, la especificidad de sustratos es mayor, ya que sólo acepta ciertas metil cetonas. Sus sustratos naturales son la acetona y la 2-butanona.⁷³

⁶⁷ (a) F. Effenberger, S. Heid, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 2945-2952. (b) E. Kiljunen, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, 8, 1551-1557.

⁶⁸ R. J. H. Gregory, S. M. Roberts, J. V. Barkley, S. J. Coles, M. B. Hursthouse, D. E. Hibbs, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 7407-7411.

⁶⁹ J. Albercht, I. Jansen, M. R. Kula, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1993**, 17, 191-203.

⁷⁰ E. Kiljunen, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, 8, 1225-1234.

⁷¹ G. Lin, S. Han, Z. Li, *Tetrahedron*, **1999**, 55, 3531-3540.

⁷² (a) E. Kiljunen, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1994**, 5, 311-314. (b) F. Effenberger, J. Eichhorn, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, 8, 469-476.

⁷³ (a) H. Bühler, A. Bayer, F. Effenberger, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 2564-2571. (b) F. Effenberger, J. Roos, C. Kobler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1876-1879.

Recientemente se ha aislado una (*S*)-oxinitrilasa a partir de las hojas del árbol del caucho. La oxinitrilasa de *Hevea Brasiliensis* clonada sobre *P. Pastoris* presenta como sustrato natural la acetona, pero al igual que la de *Manihot esculenta*, tiene una baja especificidad de sustrato, pues cataliza la formación de cianhidrinas de aldehídos alifáticos, α,β -insaturados y aromáticos con altas purezas ópticas. Las únicas excepciones son los aldehídos heteroaromáticos nitrogenados, que no reaccionan y benzaldehídos *orto*-sustituidos, cuyos productos se aíslan con muy bajos excesos enantioméricos. También es capaz de generar las correspondientes cianhidrinas a partir de metil cetonas.⁷⁴

1.5.5. Influencia del medio de reacción, fuente de cianuro y otros factores.

Hasta la década de los años 60, en que Pfeil y col. aislaron la (*R*)-oxinitrilasa de almendras, no se produjo la aplicación de las oxinitrilasas en síntesis orgánica.⁷⁵ Inicialmente, las reacciones se llevaron a cabo en medios acuosos o alcohólicos en un rango de pHs comprendido entre 5 y 6, ya que así se consigue la mayor actividad enzimática. El inconveniente en estas condiciones es que se produce la adición espontánea no deseada de cianuro de hidrógeno, con lo que las cianhidrinas obtenidas presentan una baja pureza enantiomérica.⁷⁶

Kula y col. fueron capaces de suprimir la adición química no deseada reduciendo el pH del medio acuosa a valores inferiores de 4.⁷⁷ El problema de esta técnica radica en que a estos pHs la estabilidad de las cianhidrinas es muy baja y se produce la desactivación de la oxinitrilasa. Este inconveniente se intentó solucionar mediante la adición de grandes cantidades de enzima, pero aún así se conseguían bajos excesos enantioméricos para aquellos sustratos poco reactivos.

El mayor avance en la síntesis de cianhidrinas quirales fue el descubrimiento de que la adición espontánea de cianuro de hidrógeno podía ser prácticamente suprimida empleando un disolvente orgánico no miscible con el agua. En un sistema bifásico disolvente orgánico/ agua se consiguen altas velocidades de reacción y el tiempo de residencia del sustrato en medio acuoso se reduce, lo que disminuye la posibilidad de procesos de racemización.⁷⁸

Los disolventes orgánicos más empleados con las oxinitrilasas son acetato de etilo y éter diisopropílico, aunque también se ha empleado otros como *tert*-butilmetil éter y dietiléter. El éter diisopropílico es especialmente ventajoso, ya que la actividad del enzima permanece constante durante largos períodos de reacción. Su baja solubilidad en agua es la responsable de este aumento de actividad y estabilidad de las oxinitrilasas. El acetato de etilo es empleado con frecuencia, pero al presentar una mayor solubilidad en agua, la actividad del enzima disminuye de manera significativa.⁷⁹

La fase acuosa empleada en este sistema bifásico suele ser una disolución tampón con un pH cercano a 5.5, el óptimo para la actividad del enzima. El tipo de

⁷⁴ (a) M. Schmidt, S. Hervé, N. Klempier, H. Griengl, *Tetrahedron*, **1996**, 52, 7833-7840. (b) H. Griengl, N. Klempier, P. Pöchlauer, M. Schmidt, A. Zabelinskaja-Mackova, *Tetrahedron*, **1998**, 54, 14477-14486. (c) U. Hanefeld, A. J. J. Straathof, J. J. Heijnen, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2001**, 11, 213-218.

⁷⁵ W. Becker, E. Freund, E. Pfeil, *Biochem. Z.*, **1963**, 333, 160-166.

⁷⁶ W. Becker, E. Freund, E. Pfeil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1965**, 4, 1079.

⁷⁷ U. Niedermeyer, M. R. Kula, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, 29, 386-387.

⁷⁸ F. Effenberger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1994**, 33, 1555-1564.

⁷⁹ E. Wehjte, *Parameters influencing Enzyme Activity in Organic Media*, Univ. Lund, **1992**. (b) E. G. J. C. Warmerdam, A. M. C. H. van Nieuwendijk, C. G. Kruse, J. Brussee, A. van der Gen, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1996**, 115, 1675-1682.

disolución tampón empleado es un parámetro importante para el desarrollo de la reacción, obteniéndose los mejores resultados con disoluciones de citratos y tartratos.⁸⁰ Recientemente ha sido estudiado la formación de (*R*)-cianhidrinas catalizada por la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus* en disolventes orgánicos secos, eliminando así la presencia de cualquier fase acuosa.⁸¹ En estas condiciones se consigue suprimir totalmente la adición espontánea de cianuro de hidrógeno, con lo cual las reacciones de síntesis pueden realizarse a temperaturas más altas que en los sistemas bifásicos, sin que se produzca disminución de la pureza óptica de los productos. Al trabajar en una sola fase de reacción, se logra una interacción más fácil entre el enzima y los sustratos implicados en la misma. Además, la recuperación del enzima es más fácil y es posible utilizar como sustratos aldehídos y cetonas no solubles en agua. El inconveniente es una posible desactivación del enzima, ya que la fase acuosa al pH óptimo es necesaria para su actividad.⁸²

Cuando se emplean disolventes orgánicos es conveniente trabajar con enzimas inmovilizados para facilitar su recuperación y posterior reutilización. En el caso de la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus*, ésta se puede emplear de manera inmovilizada en forma de harina de almendra desengrasada. Si las oxinitrilasas se utilizan purificadas, se han desarrollado otros soportes diferentes al natural, como los intercambiadores iónicos basados en celulosas, gel de sílice, celulosa microcristalina (Avicel), nitrocelulosas y Celite.⁸³

La temperatura es otro parámetro fundamental en el desarrollo de las reacciones enzimáticas. Recientemente se han realizado estudios matemáticos de optimización de la temperatura en la síntesis de (*R*)-mandelonitrilo con la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus* en un sistema bifásico, en los que se observa una reducción de la conversión mucho más acusada en la adición química no deseada que en la reacción enzimática al disminuir la temperatura.⁸⁴ A pesar de la pérdida de actividad enzimática a bajas temperaturas, pueden obtenerse cianhidrinas con mayores excesos enantioméricos.

Varias fuentes de cianuro han sido utilizadas en las biotransformaciones con oxinitrilasas. En sistemas acuosos con pHs bajos, el cianuro potásico es un reactivo muy eficiente.⁸⁵ En medios orgánicos se han utilizado sobre todo combinaciones de cianuro potásico con ácido acético,⁸⁶ aunque el cianuro de hidrógeno es la fuente preferida. Alternativamente, este cianuro de hidrógeno puede crearse en una disolución acuosa, por acidificación de un cianuro alcalino y luego extraerse en un disolvente orgánico para ser utilizado directamente en la reacción enzimática.⁸⁷

1.5.6. Reacción enzimática de transcianación.

Debido a la toxicidad del cianuro de hidrógeno, se han investigado otros métodos para la formación de cianhidrinas quirales. Kyler y col.⁸⁸ desarrollaron el uso de la cianhidrina de la acetona como fuente de cianuro en las síntesis catalizadas por la

⁸⁰ E. Kiljunen, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, 7, 1105-1116.

⁸¹ S. Han, G. Lin, Z. Li, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 9, 1835-1838.

⁸² E. Wehtje, P. Adlecreutz, B. Mattiasson, *Biotechnol. Bioeng.* **1990**, 36, 39-46.

⁸³ (a) F. Effenberger, T. Ziegler, S. Förster, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1987**, 26, 458-460. (b) E. Wehtje, P. Adlecreutz, B. Mattiasson, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1988**, 29, 419. (c) E. Wehtje, P. Adlecreutz, B. Mattiasson, *Biotechnol. Bioeng.* **1994**, 41, 171-178. (d) D. Costes, E. Wehtje, P. Adlecreutz, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2002**, 11, 607-612.

⁸⁴ W. F. Willeman, A. J. J. Straathof, J. J. Heijnen, *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, 30, 200-208.

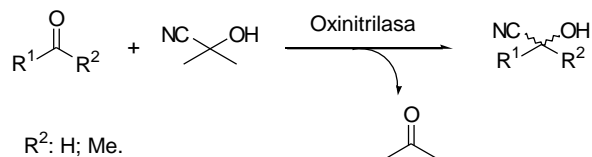
⁸⁵ A. M. C. H. van den Nieuwendijk, E. G. J. C. Warmerdam, J. Brussee, A. van der Gen, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 801-806.

⁸⁶ J. Brussee, E. C. Roos, A. van der Gen, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 4485-4488.

⁸⁷ P. Zandbergen, J. Van der Linden, J. Brussee, A. Van der Gen, *Synth. Commun.* **1991**, 21, 1387-1391.

⁸⁸ V. I. Ognyanov, K. Datcheva, K. S. Kyler, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 6992-6996.

(*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus*. Esta cianhidrina acquiral presenta las ventajas de ser accesible comercialmente, soluble en agua, descomponer fácilmente en cianuro de hidrógeno y formar un subproducto de reacción (acetona) fácilmente eliminable del medio por simple destilación (esquema I.8).



Esquema I.8. Proceso de transcianación enzimática.

La utilización de este reactivo provoca que la formación de cianuro de hidrógeno sea más lenta que en la hidrocianación. Por ello, generalmente se obtienen bajas purzas ópticas para aquellos sustratos poco reactivos, debido al predominio de la adición química no enzimática.

La reacción de transcianación ha sido aplicada también a las oxinitrilasas de *Hevea Brasiliensis*⁸⁹ y de *Sorghum bicolor*.⁸⁰ Este último enzima no acepta la cianhidrina de la acetona como sustrato y se requieren largos tiempos de reacción o la presencia de grandes cantidades de agua, lo que repercute negativamente en los excesos enantioméricos obtenidos. En esta Memoria se ha utilizado esta metodología para la preparación de cianhidrinas ópticamente activas empleando (*R*)-oxinitrilasas.

I.5.7. Reacción de transcianación sobre cianhidrinas racémicas.

Debido a que en la naturaleza la función de las oxinitrilasas es la descomposición de cianhidrinas, es posible utilizar estos enzimas en la preparación de cianhidrinas de cetonas que son difíciles de obtener en reacciones de cianación directa. Así, se pueden conseguir (*R*)-cianhidrinas por la acción de una (*S*)-oxinitrilasa, ya que el enantiómero *R* no es el sustrato para este tipo enzimas. De manera inversa, se pueden conseguir (*S*)-cianhidrinas por la acción de (*R*)-oxinitrilasas. Así, la (*S*)-oxinitrilasa de *Sorghum bicolor* se ha empleado en la resolución de una mezcla racémica de la cianhidrina del 4-hidroxibenzaldehído, su sustrato natural.⁹⁰ El problema que presentan estas resoluciones es que sólo se consiguen elevados rendimientos si los subproductos generados en el proceso (compuesto carbonílico y cianuro de hidrógeno), son eliminados del medio de reacción.

Se han desarrollado diversas técnicas para solucionar este inconveniente. La eliminación del cianuro de hidrógeno puede realizarse a través de extracción con una membrana de gases,⁹¹ o bien por la introducción en el medio de reacción de un compuesto carbonílico que sea capaz de reaccionar con el cianuro desprendido.

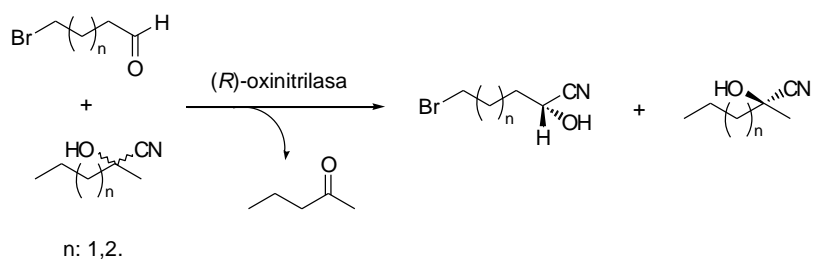
En nuestro grupo de investigación se ha llevado a cabo la transcianación de cianhidrinas de cetonas racémicas empleando bromoaldehídos como aceptores de cianuro en reacciones catalizadas por la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus* (esquema I.9). Se consiguen así (*S*)-cianhidrinas de cetonas y (*R*)-bromoaldehídos con elevados rendimientos y excesos enantioméricos.⁹²

⁸⁹ (a) N. Klempier, H. Griengl, M. Hayn, *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 7833-7840. (b) U. Hanefeld, A. J. J. Strathoft, J. J. Heijnen, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2001**, 11, 213-218.

⁹⁰ C.-H. Mao, L. Anderson, *Phytochemistry*, **1967**, 6, 473.

⁹¹ P. van Eikeren, U. S. Patent 5,241,087, **1993**; *Chem. Abstr.* **1994**, 120, 8336f.

⁹² E. Menéndez, R. Brieva, F. Rebolledo, V. Gotor, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 989-990.



Esquema I.9. Resolución de cetonas con bromoaldehídos empleando la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus*.

Kanerva y col.⁹³ han descrito un proceso análogo catalizado por (*R*)-oxinitrilasas para la resolución de cianhidrinas racémicas cetonas aromáticas y alifáticas empleando aldehídos alifáticos como aceptores de cianuro.

⁹³ G. Rotcenkovs, L. T. Kanerva, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2000**, *11*, 37-43.

OBJETIVOS GENERALES

La posibilidad que ofrecen algunos biocatalizadores de actuar en medios no acuosos, ha permitido transformar de un modo altamente selectivo una amplia variedad de sustratos distintos a los naturales. Por ello, en nuestro grupo de investigación se han desarrollado una serie de metodologías quimioenzimáticas que permiten la obtención de un gran número de productos de alto valor añadido, utilizando principalmente lipasas y oxinitrilasas como biocatalizadores.

La presente Memoria se divide en dos partes. En ambas se ha tratado de poner a punto diferentes reacciones enzimáticas con lipasas y oxinitrilasas para la obtención de compuestos ópticamente activos de interés biológico.

La **Parte A** consta de tres capítulos en los que se van a desarrollar diferentes métodos para la obtención de precursores ópticamente puros del antidepressivo (-)-paroxetina, haciendo uso de reacciones catalizadas por lipasas. El objetivo final de estos capítulos consiste en desarrollar un método que pueda ser aplicado en la preparación de (-)-paroxetina a gran escala. Este trabajo se ha desarrollado en colaboración con la empresa Asturpharma S.A., que es la encargada de realizar el proceso a escala industrial.

En el primer capítulo se estudian procesos de resolución del (\pm)-*trans*-3-etoxicarbonil-4-(4'-fluorofenil)piperidina y de una serie de 4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxi metilpiperidinas *N*-protegidas, precursores de (-)-paroxetina, empleando fundamentalmente reacciones de hidrólisis y acilación enzimática catalizadas por lipasas.

En el segundo capítulo se estudia la reacción de alcoxicarbonilación enzimática con diferentes carbonatos sobre el intermedio de (-)-paroxetina, (\pm)-*trans-N*-benciloxicarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxi metilpiperidina.

El tercer capítulo desarrolla una serie de resoluciones enzimáticas catalizadas por lipasas, sobre otro de los intermedios en la preparación de (-)-paroxetina, (\pm)-*trans-N*-feniloxicarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxi metilpiperidina, utilizando una serie de anhídridos de ácido cíclicos como agentes de acilación.

En los capítulos 4 y 5, **Parte B**, se han estudiado una serie de reacciones para la obtención de ω -hidroxicianhidrinan enantioméricamente puras, moléculas funcionalizadas que pueden ser utilizadas como precursoras de un gran número de compuestos con actividad biológica.

En el capítulo 4, a partir de una serie de ω -hidroxialdehídos, tanto libres como *O*-protegidos, se estudia la síntesis de ω -hidroxicianhidrinan mediante la reacción de transcianación enzimática catalizada por la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus*.

El objetivo del quinto capítulo consiste en la preparación de las ω -hidroxicianhidrinan ópticamente puras, utilizando reacciones de acilación enzimática catalizadas por lipasas sobre una serie de hidroxicianhidrinan racémicas *O*-protegidas. También se analiza la influencia del grupo protector y se tratan de explicar algunos de los resultados obtenidos mediante estudios teóricos de Mecánica Molecular.

PARTE A

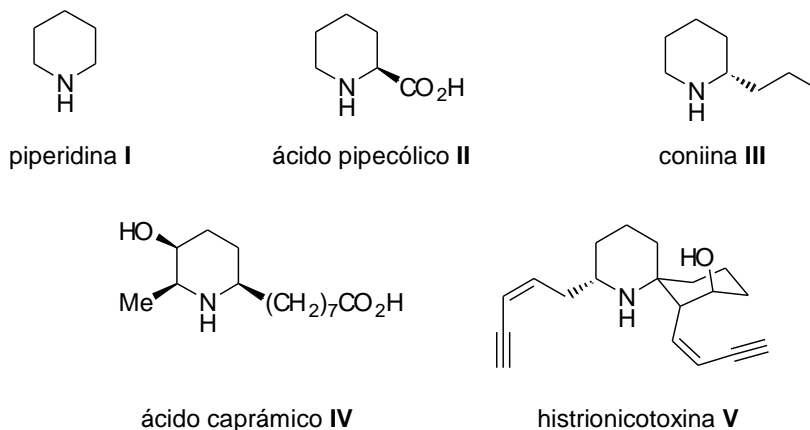
Capítulo 1

Resoluciones enzimáticas sobre precursores de (-)-paroxetina

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. DERIVADOS DE LA PIPERIDINA

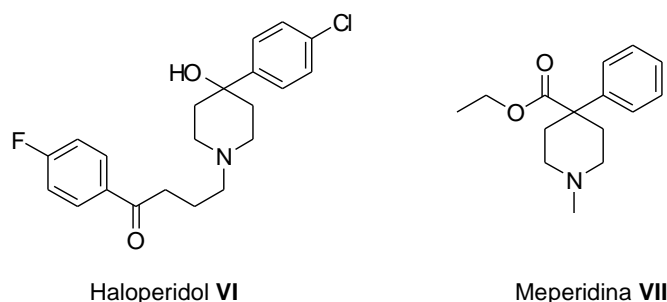
El anillo de la piperidina **I** es una subunidad estructural muy común en los productos naturales,⁹⁴ como se ejemplifica en los compuestos **II-V**.



Esquema 1.1

Los alcaloides piperidínicos y sus análogos sintéticos poseen un elevado interés para la industria farmacéutica debido a que exhiben un elevado grado de actividad biológica. Las rutas esteroquímicas cortas y versátiles para la obtención de piperidinas sustituidas son herramientas de elevado potencial sintético.⁹⁵

Entre las diferentes posibilidades de sustitución en el anillo de piperidina, los derivados 1,4-disustituidos han sido los más utilizados, debido a la facilidad y a la ausencia de complicaciones estereoquímicas en su preparación. Dentro de este patrón, las 4-arilpiperidinas son importantes elementos estructurales en un elevado número de compuestos que poseen actividad biológica, debido a su similitud con la arilalquilamina farmacófora común en neurotransmisores como la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), la dopamina (DA), la noradrenalina (NA) y antagonistas de receptores de narcóticos. Ejemplos de ello son el haloperidol **VI**, antagonista de la dopamina y la meperidina **VII**, antagonista de analgésicos opiáceos.⁹⁶



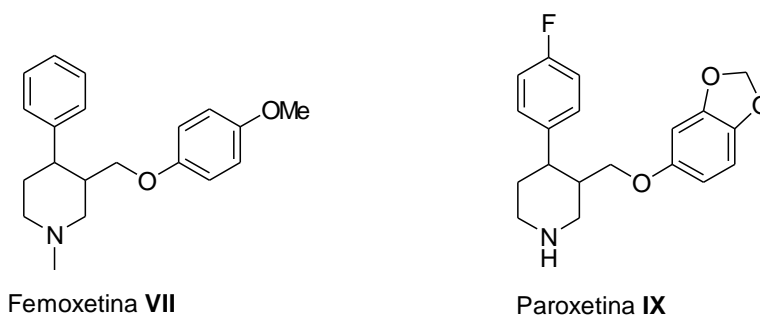
Esquema 1.2.

⁹⁴ (a) H. Takahata, T. Momose, "The Alkaloids", (Ed. G. A. Cordell), Academic Press, San Diego, **1993**, Vol. 44, p. 189-256. (b) M. J. Schneider, "Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives", Ed. S. W. Pelletier, Pergamon; Oxford, **1996**, Vol. 10, p. 155-299.

⁹⁵ (a) P. D. Bailey, P. A. Millwood, P. D. Smith, *Chem. Commun.* **1998**, 633-640. (b) P. S. Watson, B. Jang, B. Scott, *Org. Lett.* **2000**, 2, 3679-3681.

⁹⁶ H. Annoura, K. Nakanishi, M. Uesugi, A. Fukunaga, S. Imajo, A. Miyajima, Y. Tamura-Horikawa, S. Tamura, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 10, 371-383.

Así como las 4-arilpiperidinas rara vez discriminan entre los diferentes receptores, la introducción de un sustituyente en la posición 3 conduce a compuestos altamente selectivos. El inconveniente estriba en que con esta sustitución introducimos un nuevo centro quiral, con todas las complicaciones sintéticas que ello presenta. Ejemplos de piperidinas 3,4-disustituídas son los antidepresivos femoxetina **VII** y la paroxetina **IX**. La resolución de diferentes intermedios mediante métodos biocatalíticos para la preparación del compuesto **IX** es uno de los principales objetivos de esta Memoria.



Esquema 1.3.

1.1.2 PAROXETINA

El hemiclорhidrato de paroxetina actúa en el sistema nervioso central como un potente y selectivo inhibidor de la recaptación de la serotonina en el cuerpo humano.⁹⁷

Los medicamentos que modulan la actividad fisiológica y fisiopatológica de la serotonina son muy útiles en el tratamiento de una gran variedad de enfermedades como depresión, ansiedad, alcoholismo, desórdenes obsesivo-compulsivos, desórdenes alimenticios como obesidad y bulimia, ataques de pánico, etc.⁹⁸

Como otras piperidinas 3,4-disustituídas, la paroxetina también posee actividad frente a la enfermedad de Parkinson y puede actuar como bloqueante de los canales de calcio neuronales.⁹⁹

A diferencia de otros antidepresivos tricíclicos y tetracíclicos como la imipramina, la desipramina y la doxepina, el tratamiento de estas enfermedades con paroxetina presenta la gran ventaja de no causar efectos secundarios en el organismo.¹⁰⁰

Su fórmula empírica es $C_{19}H_{20}FNO_3 \cdot HCl \cdot 1/2H_2O$. Tiene un peso molecular de 374.8 g/mol (329.4 g/mol como base libre) y una solubilidad de 5.4 mg/mL de agua. Su aspecto es el de un sólido blanco inoloro con un punto de fusión en el rango de 120-138 °C.

La paroxetina es comercializada con diferentes nombres como Paxil[®], Seroxat[®] o Deroxat[®] en forma enantioméricamente pura, pues el diastereoisómero (-)-*trans*-(3*S*, 4*R*) es el que presenta la actividad biológica. Por ello, en los últimos años se han desarrollado un gran número de síntesis estereocontroladas de (-)-paroxetina.

1.1.2.1 Métodos químicos de preparación de (-)-paroxetina.

En la primera preparación de (-)-paroxetina descrita por Christensen y col.¹⁰¹ (esquema 1.4), se forma en primer lugar el éster de piperidina **XI** por reacción entre la arecolina **X** (1,2,5,6-tetrahidro-3-piridincarboxilato de metilo) con bromuro de *p*-

⁹⁷ K. L. Dechant, S. P. Clisold, *Drugs*, **1991**, *41*, 225.

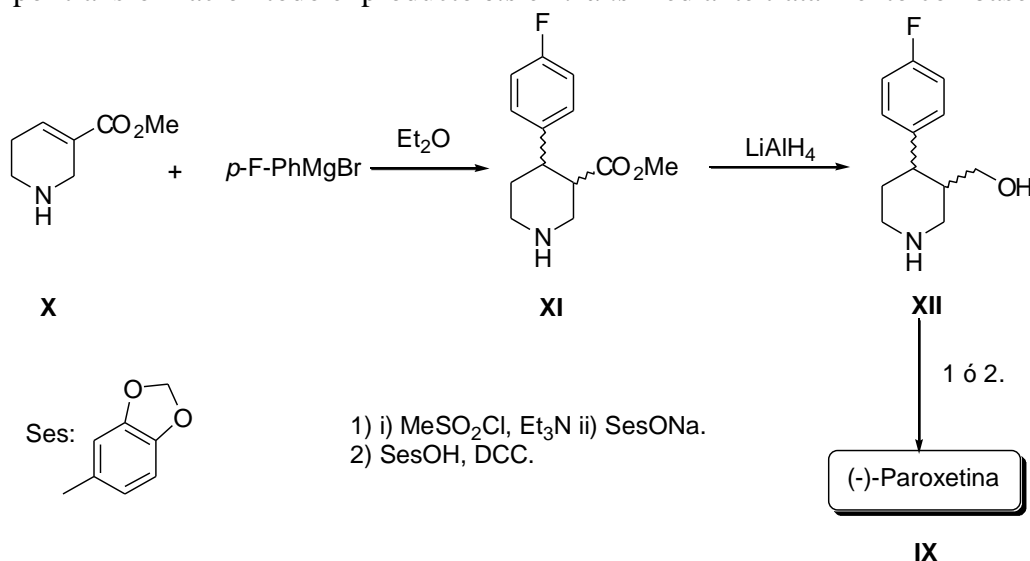
⁹⁸ D. W. Robertson, J. H. Krushinski, R. W. Fuller, J. D. Leander, *J. Med. Chem.* **1988**, *31*, 1412-1417.

⁹⁹ F. C. Barone, W. J. Price, P. Jakobsen, M. J. Sheardown, G. Feuerstein, *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1994**, *48*, 77.

¹⁰⁰ N. S. Gunasekara, S. Noble, P. Benfield, *Drugs*, **1988**, *55*, 85-120.

¹⁰¹ J. A. Christensen, R. F. Squires, U. S. Patent 4,007,196, 1977; *Chem. Abstr.* **1974**, *81*, 152011q.

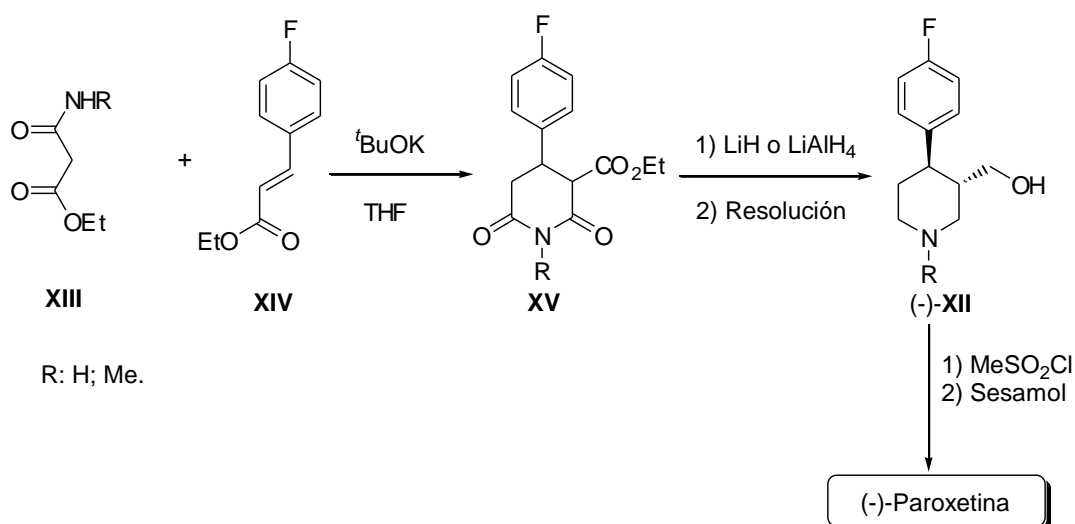
fluorofenilmagnesio. La reducción del éster con hidruro de litio y aluminio genera el correspondiente piperidincarbinol **XII**, sobre el que se pueden aplicar dos métodos para completar la síntesis de paroxetina **IX**. Se puede introducir el fragmento restante bien; por conversión del piperidincarbinol en un éster sulfónico y posterior ataque nucleófilo del 3,4-metilendioxfenóxido de sodio, o bien por una reacción de condensación entre el piperidincarbinol y el 3,4-metilendioxfenol (sesamol) en presencia de diciclohexilcarbodiimida (DCC). El proceso de resolución destinado a la obtención del enantiómero activo se realiza mediante recristalización selectiva de sales diastereoméricas bien del éster, del piperidincarbinol o del producto final. El problema de esta síntesis estriba tanto en la toxicidad de la arecolina, como en la formación de una mezcla de isómeros *cis/trans* del éster **XII**, que es necesario separar por cromatografía, o bien por transformación todo el producto *cis* en *trans* mediante tratamiento con base.



Esquema 1.4.

Posteriormente, Faruk y col.¹⁰² desarrollaron una síntesis de paroxetina con elevado rendimiento empleando como productos de partida amidomalonato de etilo **XIII** y 4-fluorocinamato de etilo **XIV** (esquema 1.5), con lo que se evita el uso de arecolina. Su condensación en medio básico genera un imidoéster **XV**, que posteriormente es reducido con diferentes hidruros metálicos para formar el correspondiente piperidincarbinol **XII**. Con esta metodología, sólo se obtiene la configuración *trans* como mezcla de enantiómeros, que pueden ser resueltos por cristalización selectiva en presencia de ácido (+)-2'-nitrotartranílico o (-)-di-*p*-toluilitartárico. Una vez resuelto, el (-)-*trans*-piperidincarbinol es tratado con cloruro de tionilo o de bencenosulfonilo en presencia 3,4-metilendioxfenóxido de sodio para generar (-)-paroxetina. En este trabajo, también se realizó la síntesis completa con la piperidina *N*-metilada. El grupo metilo es fácilmente eliminado al final del proceso por tratamiento con cloroformiato de fenilo y posterior deacilación con hidróxido potásico.

¹⁰² E. A. Faruk, R. T. Martin, Eur. Patent 223334, 1986; *Chem. Abstr.* **1987**, 107, 96594y.



Esquema 1.5.

La cristalización selectiva de diastereoisómeros ha sido frecuentemente utilizada para la resolución de precursores de paroxetina. En la mayoría de las metodologías desarrolladas, el procedimiento sintético es muy similar, formándose en la primera etapa bien un éster, un amidoéster o un imidoéster de piperidina análogos a los compuestos **XI** y **XV**. Este intermedio es reducido selectivamente para generar el piperdincarbinol **XII**, cuya reacción de eterificación con sesamol genera el producto final. Algunas modificaciones de este método consisten en utilizar diferentes productos de partida. Se han descrito síntesis que emplean como precursores la arecolina o el α -metilestireno,¹⁰³ la condensación entre cinamatos y cianoacetatos de alquilo en medio básico¹⁰⁴ o la hidroximetilación de 4-(4-fluorofenil)1-metil-1,2,5,6-tetrahidropiperidina con formaldehído en medio ácido.¹⁰⁵

Ciertos derivados de *trans*-3,4-piperidinas racémicas sustituidas no se pueden resolver con facilidad debido a que sus sales diastereoméricas no forman suficientes cristales para ser cristalizadas selectivamente. Por ello, se han desarrollado otros métodos de preparación de (-)-paroxetina empleando auxiliares quirales para su obtención en forma enantiopura.

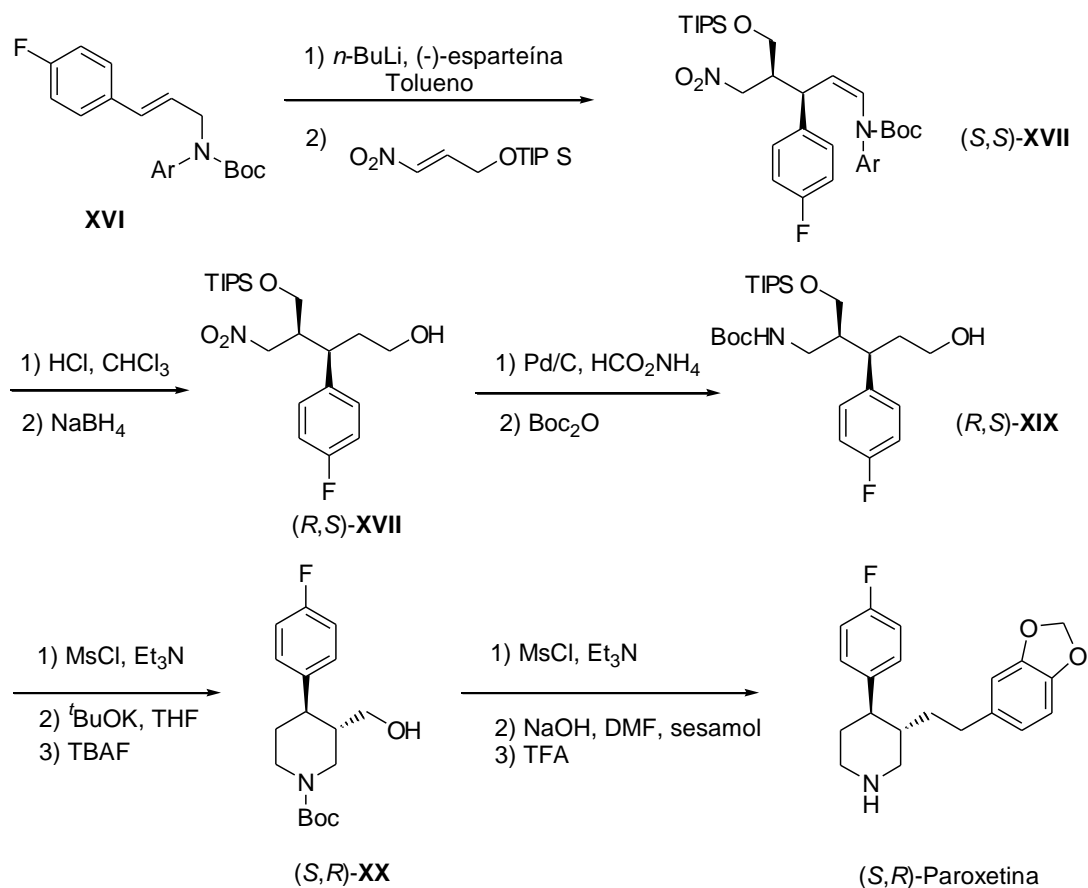
Johnson y col.¹⁰⁶ han descrito una síntesis a partir de una *N*-Boc-*N*-(*p*-metoxifenil)alilamina **XVI**, como se muestra en el esquema 1.6. Por tratamiento con *n*-BuLi en presencia del auxiliar quiral (-)-esparteína se genera un intermedio litiado que se adiciona sobre un nitroalqueno para obtener el compuesto **XVII** con elevada diastereoselectividad. Su hidrólisis y la reducción del aldehído formado generan el nitroalcohol **XVIII**. Posteriormente, se realiza la reducción de la función nitro y la protección con el grupo *tert*-butoxicarbonilo de la amina generada. La hidrólisis y ciclación de este intermedio **XIX** conduce al piperidincarbinol **XX**, cuya mesilación seguida del desplazamiento con el sesamol genera la (-)-paroxetina con un rendimiento global del 41 % y un exceso enantiomérico del 94 %.

¹⁰³ M. Engelstoft, J. B. Hansen, *Acta. Chem. Scand.* **1996**, *50*, 164-169.

¹⁰⁴ K. Sugi, N. Itaya, T. Katsura, M. Igi, S. Yamazaki, T. Ishibashi, T. Yamaoka, Y. Kawada, Y. Tagami, Eur. Patent 0812827A1, 1998; *Chem. Abstr.* **1998**, *128*, 127941.

¹⁰⁵ K. Willcocks, R. D. Barnes, D. C. Rustidge, D. J. D. Tidy, *J. Label. Compds. and Radiopharm.* **1993**, *33*, 783-794.

¹⁰⁶ T. A. Johnson, M. D. Curtis, P. Beak, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1004-1005.



Esquema 1.6.

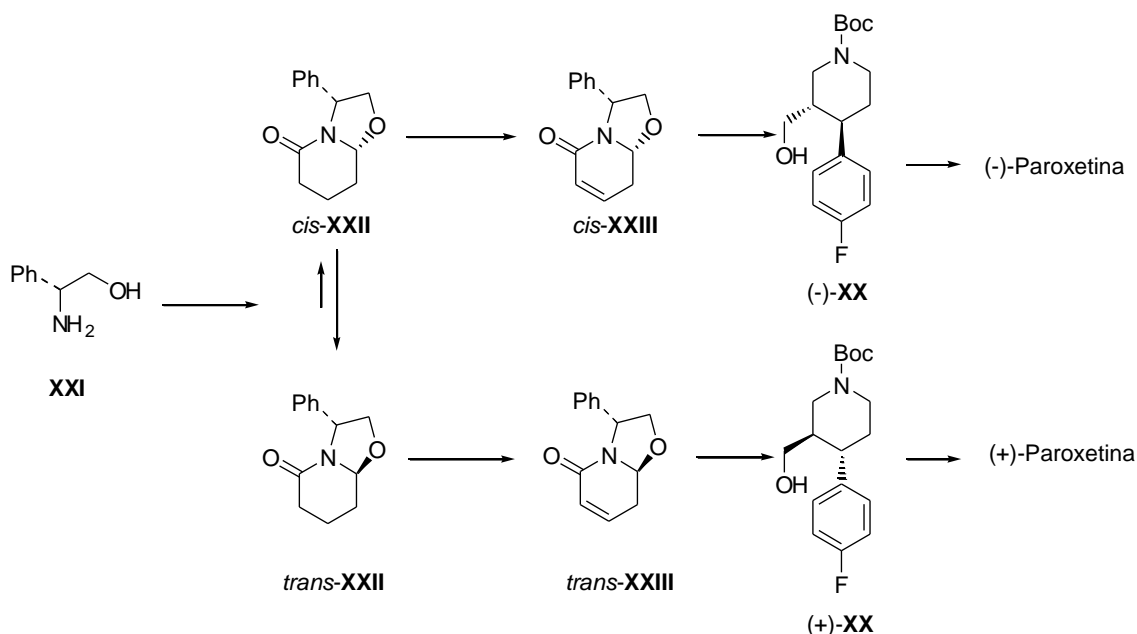
La (*S*)-metilbencilamina ha sido empleada como auxiliar quiral con diastereoselectividades superiores al 95 % en la síntesis de (-)-paroxetina a partir de 4-fluorofenilcinamato de metilo.¹⁰⁷ El uso como inductores quirales de alcoholes bíclicos genera gran estereoselectividad en la preparación de este medicamento a partir de la *N*-Boc- δ -valerolactama, en un proceso de 6 pasos con un rendimiento global del 21 %.¹⁰⁸

El (*R*)-fenilglicinol **XXI** ha sido utilizado como producto de partida en la formación de paroxetina (esquema 1.7). Su reacción con 5-oxopentanoato de metilo genera dos lactamas bíclicas *cis*- y *trans*-**XXII**, donde la *trans* es la más estable. La adición conjugada de un organocuprato asistida por un auxiliar quiral a las lactamas bíclicas α,β -insaturadas **XXIII** conduce, tras varios pasos de reacción, a los dos diastereoisómeros de la *trans*-piperidina 3,4-disustituida **XX** en forma enantiopura. Su posterior tratamiento con cloruro de mesilo y sesamol y la correspondiente desprotección del nitrógeno de la piperidina conduce a la formación tanto de (+)- como (-)-paroxetina, en función del auxiliar quiral utilizado.¹⁰⁹

¹⁰⁷ L. T. Liu, P.-C. Hong, H.-L. Huang, S.-F. Chen, C.-L. Jeff Wang, Y.-S. Wen, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, *12*, 419-426.

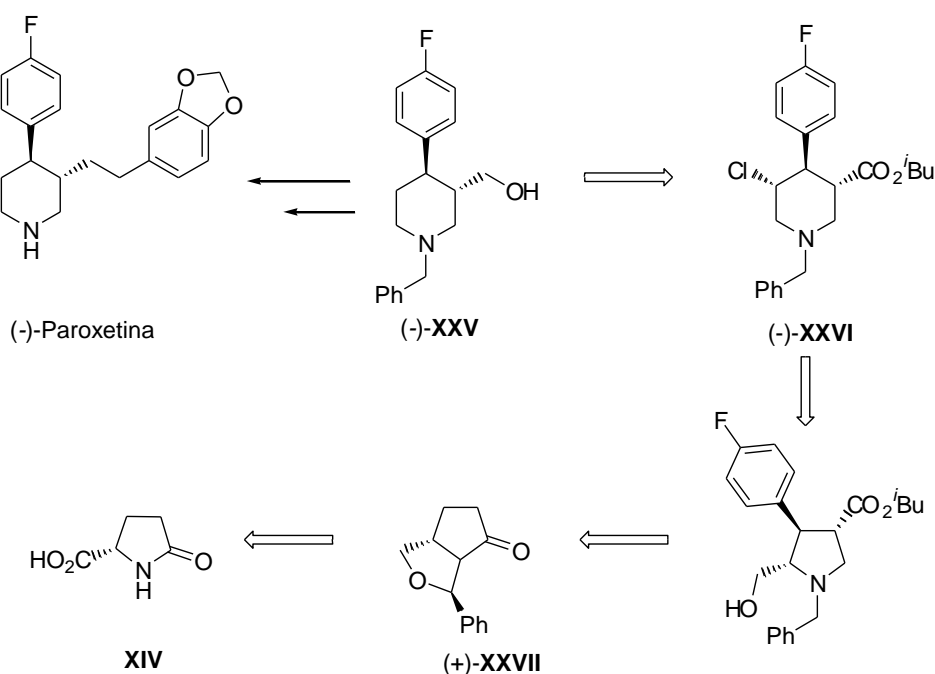
¹⁰⁸ J. Cossy, O. Mirguet, D. Gómez Pardo, J.-R. Desmurs, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 7805-7807.

¹⁰⁹ (a) M. Amat, J. Hidalgo, J. Bosch, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, *7*, 1591-1594. (b) M. Amat, J. Bosch, J. Hidalgo, M. Cantó, M. Pérez, N. Llor, E. Molins, C. Miratvilles, M. Orozco, J. Luque, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3074-3084.



Esquema 1.7.

Cossy y col.¹¹⁰ han propuesto la formación de este antidepresivo a partir de ácido (L)-piroglutámico **XIV** mediante una reacción de expansión del anillo, como se observa en el esquema 1.8. El análisis retrosintético de este proceso muestra que el piperidincarbinol **XXV**, precursor de la paroxetina, es preparado a partir de la 3-cloropiperidina sustituida ópticamente pura **XXVI**, que deriva de la lactama bicíclica **XXVII** preparada en una síntesis de tres pasos a partir del ácido (L)-piroglutámico. El rendimiento global de este proceso de diez etapas es del 13.9 %, consiguiéndose el diastereoisómero (3*S*,4*R*) de la paroxetina con elevado exceso enantiomérico.



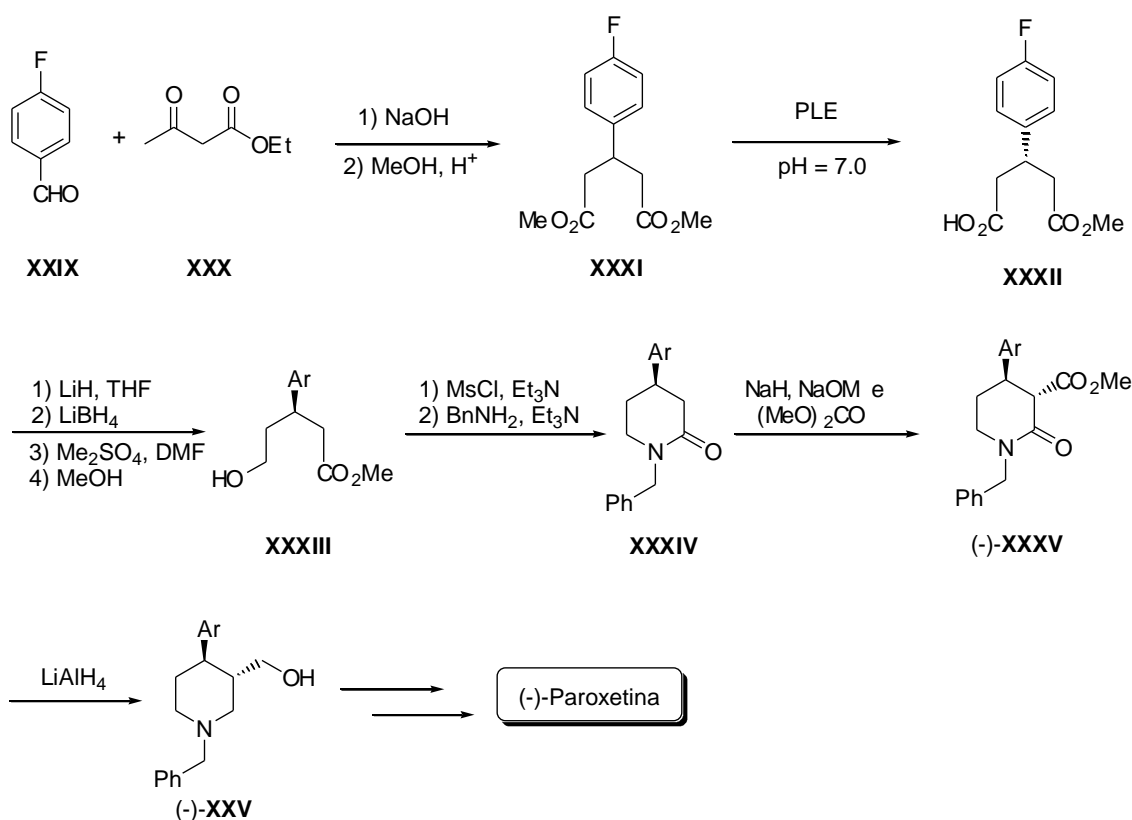
Esquema 1.8.

¹¹⁰ (a) J. Cossy, O. Mirguet, D. Gómez Pardo, J.-R. Desmurs, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 5705-5707. (b) J. Cossy, O. Mirguet, D. Gómez Pardo, J.-R. Desmurs, *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 3543-3551.

la hidrólisis en presencia de una disolución 0.1 M de NaHPO₄ de pH 7.0, obteniéndose los mejores resultados con el *Achromobacter sp.*

En un trabajo posterior, se estudia con detalle este proceso de resolución realizando un amplio *screening* de esterasas de microorganismos, tanto en forma de células enteras, extractos libres, células permeables o enzimas aisladas de los mismos. A pesar de que no se detallan los resultados, las mejores condiciones para la hidrólisis enzimáticas se consiguen a 30 °C con un pH 5.5, siendo especialmente adecuado el microorganismo NCIMB 40700.¹¹²

Curzons y col.¹¹³ emplean una serie de enzimas aisladas para la hidrólisis del imidoéster metilado **XXV** en diferentes condiciones de reacción. Los mejores resultados se obtienen con las esterasas de hígado de cerdo (PLE) y de hígado de oveja (BLE).



Esquema 1.10.

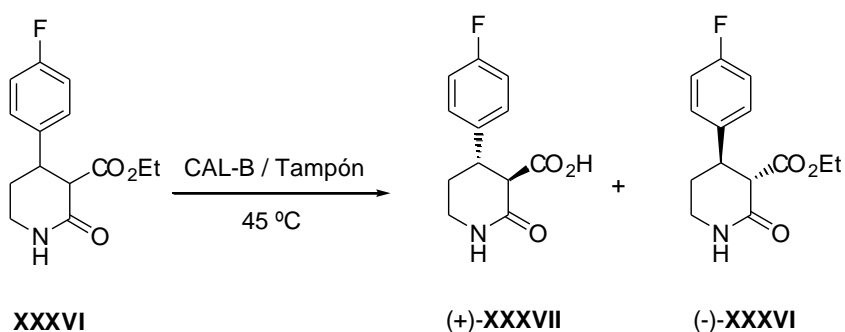
La desimetrización enzimática de glutaratos proquirales también ha servido como un método eficaz para la preparación de paroxetina (esquema 1.10). En este procedimiento, la condensación inicial de *p*-fluorobenzaldehído **XXIX** con acetoacetato de etilo **XXX** en medio básico, seguida de esterificación genera el glutarato proquiral **XXXI**. Este intermedio es hidrolizado selectivamente por la PLE a temperatura ambiente en una mezcla acetona/ agua al 10 % de pH 7.0, obteniéndose el correspondiente monoéster **XXXII** con un exceso enantiomérico del 95 % y un rendimiento del 84 %. Desafortunadamente, el enantiómero obtenido mediante este procedimiento conduce a la formación de (+)-paroxetina una vez completada la síntesis, por lo que es necesario realizar una inversión de la configuración de su centro activo. Para ello, se protege el grupo ácido por tratamiento con LiH en THF y se reduce el grupo éster con LiBH₄. El

¹¹² L. Gledhill, C. M. Kell, WO Patent 9802556, 1998; *Chem. Abstr.* **1998**, 128, 151093v.

¹¹³ A. D. Curzons, L. W. Powell, A. M. Keavy, WO Patent 9322284, 1993; *Chem. Abstr.* **1993**, 10, 163991j.

intermedio generado reacciona con sulfato de dimetilo en DMF para generar el hidroxiéster **XXXIII**, que posee la configuración deseada. Este producto se mesila y se trata con bencilamina para generar la lactama **XXXIV**, con un exceso enantiomérico del 99 % tras cristalización. A continuación, la lactama se acila y se reduce para formar el aminoalcohol (-)-**XXXV**, cuya eterificación con sesamol e hidrogenólisis del grupo bencilo genera la (-)-paroxetina.¹¹⁴

Recientemente, se ha estudiado la hidrólisis enzimática del (\pm)-*trans*-4-(4'-fluorofenil)-6-oxo-3-piperidincarboxilato de etilo **XXXVI** con la lipasa de *Candida antarctica* B (CAL-B) inmovilizada sobre diferentes soportes (esquema 1.11). Las resoluciones se llevaron a cabo a 45 °C, empleando una disolución tampón de NaHPO₄ 25 mM de pH 7.0 y utilizando como cosolvente una mezcla de dioxano y diglima. Mientras que la lipasa comercial (Novozym SP-435) y la variedad soportada sobre octadecilo no discriminan entre los dos enantiómeros, es posible conseguir enantioselectividades mayores de 100 empleando esta lipasa sobre un soporte de tipo glioxilo. Cuando la lipasa se inmoviliza sobre glutaraldehído se obtienen razones enantioméricas del orden de 30. En todos los casos se hidroliza el enantiómero (3*R*,4*S*), presentado el sustrato remanente la configuración correcta para completar la síntesis de paroxetina mediante su reducción con hidruro metálico y posterior eterificación.¹¹⁵



Esquema 1.11.

Este mismo grupo describe en un trabajo muy similar la hidrólisis enzimática del éster **XXXVI**, utilizando una esterasa contaminante que aparece en la lipasa comercial de *Candida antarctica* A. Su separación, purificación e inmovilización sobre un soporte de agarosa, permite utilizar la esterasa con elevadas enantioselectividades en la resolución de este precursor de (-)-paroxetina, empleando un sistema bifásico formado por una disolución tampón de fosfato de pH 7.0 con un 25 % de diglima, a 45 °C.¹¹⁶

1.1.3. REACCIONES DE RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA SOBRE ALCOHOLES.

La resolución enzimática de alcoholes racémicos es un procedimiento que proporciona excelentes resultados desde el punto de vista de rendimientos como de excesos enantioméricos.

Estas resoluciones se pueden llevar a cabo mediante reacciones de hidrólisis enzimática, en las que un éster racémico puede ser hidrolizado selectivamente por un enzima en presencia de agua como nucleófilo para la formación del correspondiente

¹¹⁴ M. S. Yu, I. Lantos, Z.-Q. Peng, J. Yu, T. Cacchio, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5647-5651.

¹¹⁵ J. M. Palomo, G. Fernández-Lorente, C. Mateo, R. Fernández-Lafuente, J. M. Guisán, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**, *13*, 2375-2381.

¹¹⁶ J. M. Palomo, G. Fernández-Lorente, C. Mateo, M. Fuentes, J. M. Guisán, R. Fernández-Lafuente, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**, *13*, 2653-2659.

alcohol ópticamente puro. Generalmente, las hidrólisis se han descrito en medio acuoso, aunque debido a la aplicabilidad de los biocatalizadores en medio orgánico, se han desarrollado procedimientos en mezclas agua-cosolvente orgánico, en disolventes orgánicos saturados de fase acuosa y en medios mayoritariamente orgánicos.

Las reacciones de esterificación enzimática hacen referencia a la resolución de alcoholes racémicos con ácidos carboxílicos. Las esterificaciones presentan numerosas aplicaciones en síntesis orgánica, a pesar de que se producen en competencia con la reacción inversa de hidrólisis, por lo que se realizan principalmente en disolventes orgánicos.

Finalmente, las reacciones de transesterificación entre alcoholes y ésteres constituyen la metodología más utilizada para la resolución de alcoholes en medio orgánico. Mediante el uso de lipasas es posible conseguir la transferencia selectiva de grupos acilo a una gran variedad de alcoholes.

1.1.4. REACCIÓN DE ACILACIÓN ENZIMÁTICA.

La reacción de acilación enzimática es un proceso en el cual un alcohol racémico es resuelto en presencia de una lipasa mediante su reacción selectiva con un éster.¹¹⁷ Este proceso ha sido aplicado fundamentalmente a la resolución de alcoholes secundarios tanto lineales como cíclicos, de manera que en la actualidad se han establecido reglas empíricas generales para la predicción de la configuración del éster obtenido y del alcohol no reactivo.

Una de las más importantes es la *Regla de Kazlauskas*¹¹⁸ (figura 1.1), la cual predice con elevada exactitud para un gran número de alcoholes secundarios qué enantiómero reacciona más rápidamente con las lipasas de *Candida rugosa* y *Pseudomonas cepacea* y la esterasa de colesterol. Esta regla está basada en la diferencia de tamaños de los sustituyentes del alcohol, estableciendo que a mayor diferencia entre éstos, mayor será la selectividad enzimática (figura 1.1). Cuando el enantiómero del alcohol más reactivo se une a la lipasa, el grupo más voluminoso (G) se aloja en el hueco de mayor tamaño, mientras que el grupo mediano (M) se acomoda en el hueco más pequeño. Para el enantiómero menos reactivo la situación es la opuesta, ya que su grupo voluminoso debería acoplarse en el hueco pequeño, estando por ello desfavorecido.

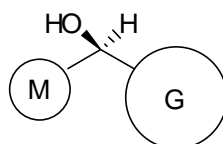


Figura 1.1.

La similitud estructural que presentan la mayoría de las lipasas en el hueco nucleófilo del centro activo, permite extender esta regla a la gran mayoría de ellas. Sin embargo, las diferencias en la secuencia de aminoácidos de cada lipasa resultan en una serie de particularidades que determinan su especificidad de sustrato.

Los alcoholes primarios también han sido resueltos por acilaciones enzimáticas, aunque en la literatura existen menos ejemplos, debido a que generalmente las enantioselectividades obtenidas son mucho menores que en el caso de los alcoholes

¹¹⁷ E. Santaniello, S. Reza-Elahi, P. Ferraboschi, "Chiral Synthons by Enzymatic Acylation and Esterification Reactions" en *Stereoselective Biocatalysis*. R. N. Patel, Ed. Marcel Dekker, Nueva York, **2000**, 415-460.

¹¹⁸ R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656-2665.

secundarios. Kazlauskas y col.¹¹⁹ propusieron una regla empírica que establece la enantiopreferencia de los alcoholes primarios en procesos catalizados por la lipasa de *Pseudomonas cepacea*. Esta regla es opuesta a la descrita para los alcoholes secundarios y su fiabilidad es mucho menor. Para los alcoholes primarios, la enantioselectividad requiere un control de la conformación a lo largo del enlace C1-C2, siendo C1 el carbono hidroxílico y C2 el carbono estereogénico.

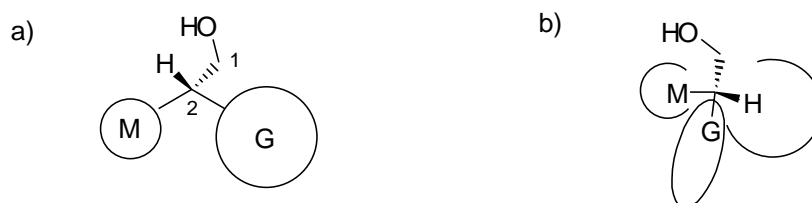


Figura 1.2.

En una primera hipótesis, Kazlauskas propone que los sustituyentes grande y mediano se acomodan en los mismos huecos que los alcoholes secundarios, orientándose el grupo CH₂OH de manera que el hidroxilo se coloca en una posición similar al grupo OH de alcoholes secundarios. El grupo CH₂ se debe acomodar como un pliegue entre el oxígeno y el centro estereogénico, causando el cambio de enantiopreferencia (figura 1.2, a). La flexibilidad del enlace C1-C2 permite a los enantiómeros de un alcohol primario adoptar conformaciones similares para los sustituyentes M y G. La estabilización a lo largo de este enlace puede ser la causante de la enantiopreferencia opuesta.

Posteriormente, estos autores utilizaron la modelización molecular para analizar la distinta enantiopreferencia de alcoholes primarios y secundarios.¹²⁰ En dichos estudios, se observó que el sustituyente G de los alcoholes primarios no se une al hueco más voluminoso de la lipasa, sino que se acopla a un hueco en la base del centro activo, denominado hueco hidrofóbico alternativo (figura 1.2, b), provocando el cambio de preferencia estereoquímica. Sin embargo, en este trabajo sólo un tercio de los alcoholes analizados cumplen la regla empírica, presentando el resto la preferencia opuesta.

Según otros estudios, este hueco hidrofóbico está constituido por una secuencia de aminoácidos, entre los que se incluyen algunos aromáticos. Las resoluciones de alcoholes primarios con grupos aromáticos en la posición 3 respecto al centro estereogénico en presencia de la lipasa de *Pseudomonas cepacea* son muy selectivas, debido a la formación de interacciones de tipo π - π entre el sustrato y el hueco alternativo que favorecen al enantiómero más reactivo.¹²¹

Es posible también realizar reacciones de acilación selectiva sobre dioles racémicos, proquirales y de tipo *meso*. Finalmente, bajo una serie de condiciones adecuadas se han descrito incluso procesos de resolución sobre sustratos muy poco reactivos, como son alcoholes terciarios impedidos estéricamente.¹²²

A diferencia de las reacciones hidrolíticas, donde el nucleófilo (agua) está siempre en exceso, la concentración de nucleófilo en las transesterificaciones está limitada. El paso clave para la selectividad del proceso es la competencia alrededor del intermedio acil-enzima, que incluye los dos enantiómeros del alcohol, el grupo saliente del donador de acilo y el agua presente en el medio. Como resultado, las reacciones de acilación con ésteres “normales” son generalmente procesos reversibles, en contraste

¹¹⁹ A. N. E. Weissfloch, R. J. Kazlauskas, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6959-6969.

¹²⁰ W. V. Tuomi, R. J. Kazlauskas, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2638-2647.

¹²¹ O. Nordin, B.-V. Nguyen, C. Vörde, E. Hedenström, H.-E. Högberg, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2000**, 367-376.

¹²² M. Pogorevc, K. Faber, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2000**, *10*, 357-376.

con la naturaleza irreversible de las hidrólisis. Esta reversibilidad va a provocar una importante disminución en los excesos enantioméricos de los productos, lo que conduce a bajas enantioselectividades.

Una solución eficaz para evitar este inconveniente consiste en el desarrollo de procesos cuasi-irreversibles utilizando dadores de acilo con grupos salientes poco nucleófilos. Algunos compuestos frecuentemente utilizados incluyen ésteres de 2-haloetilo o de cianometilo,¹²³ ésteres de oxima¹²⁴ y tioésteres.¹²⁵

Los ésteres enólicos como ésteres de vinilo o isopropenilo liberan enoles inestables como subproductos, que se tautomerizan fácilmente para formar acetaldehído y acetona, respectivamente.¹²⁶ El proceso de acilación es así totalmente irreversible, por lo que las reacciones en las que participan son del orden de 10^2 veces más rápidas que cuando se emplean otros ésteres activados. Debido a razones estéricas, los ésteres de vinilo provocan reacciones más rápidas que los de isopropenilo, por lo que su utilización es mucho mayor, sin embargo, presentan el inconveniente de que el acetaldehído liberado puede formar bases de Schiff con grupos amino terminales del aminoácido lisina, lo que puede provocar la inactivación del enzima en determinados casos.¹²⁷ Por ello, recientemente se han empezado a estudiar acetatos de etoxivinilo, donde el grupo saliente se tautomeriza a acetato de etilo.¹²⁸

1.1.4.1. Factores que influyen en la selectividad de las acilaciones enzimáticas.

Las enantioselectividades obtenidas en las reacciones de acilación enzimática pueden incrementarse por la modificación de los diferentes parámetros que intervienen en el proceso de resolución.

En primer lugar, distintas modificaciones del sustrato, como la introducción de grupos protectores o la presencia de heteroátomos alrededor del centro estereogénico pueden variar sustancialmente la selectividad de las acilaciones.¹²¹

El contenido en agua del medio de reacción, representado como actividad del agua (a_w) va a modificar la selectividad del enzima, ya que esta agua puede actuar como nucleófilo de la reacción, compitiendo con el sustrato en el intermedio acil-enzima o bien puede actuar hidrolizando el agente acilante.¹²⁹ Por lo tanto, debe realizarse un control exhaustivo del agua presente en el medio, si bien en la actualidad no está aún muy claro cómo se ve afectada la enantioselectividad de la resolución en función del contenido de agua.

En general, está establecido que los enzimas exhiben su mayor selectividad a bajas temperaturas. Sin embargo, recientemente se han propuesto modelos para entender el efecto de la temperatura, basados en el concepto de *temperatura rácemica* (T_{rac}), a la

¹²³ G. Kirchner, M. P. Scollar, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7072-7076.

¹²⁴ (a) A. Ghogare, G. S. Kumar, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, 1533-1535. (b) V. Athawale, N. Manjrekar, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2000**, *10*, 551-554.

¹²⁵ H. Frykman, N. Öhrner, T. Norin, K. Hult, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *34*, 1367-1370.

¹²⁶ Y.-F. Wang, J. J. Lalonde, M. Momongan, D. E. Bergbreiter, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7200-7205.

¹²⁷ B. Berger, K. Faber, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 1198-1200.

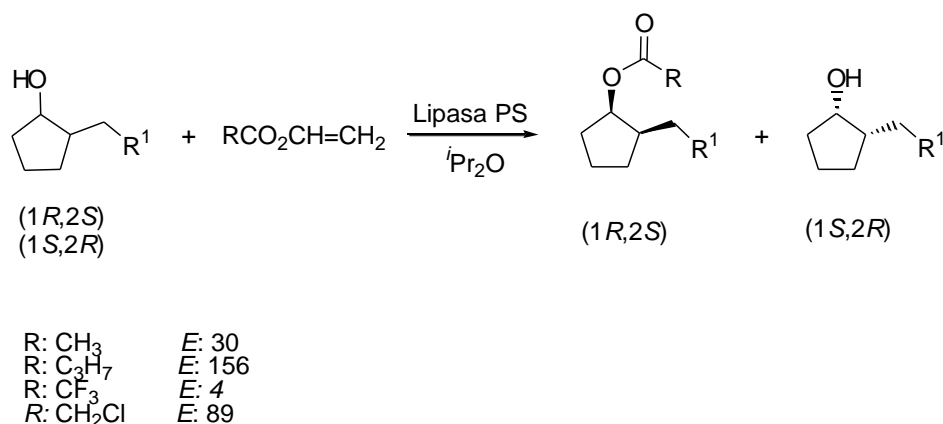
¹²⁸ Y. Kita, T. Takebe, K. Murata, T. Naka, S. Akai, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 7369-7372.

¹²⁹ (a) O. Nordin, E. Hedenström, H.-E. Högberg, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1994**, *5*, 785-788. (b) C. Orrenius, T. Norin, K. Hult, G. Carrea, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, *6*, 3023-3030. (c) H. K. Weber, H. Weber, R. J. Kazlauskas, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, *10*, 2635-2638.

que un enzima no es capaz de discriminar entre los dos enantiómeros de una mezcla racémica.¹³⁰

El disolvente orgánico es también un parámetro fundamental en las reacciones de acilación. La modificación del disolvente (ingeniería del medio) puede provocar cambios sustanciales en la enantioselectividad del proceso, e incluso la inversión de la enantiopreferencia del enzima. La hidrofobicidad de un disolvente se caracteriza mediante el log P, el logaritmo de su coeficiente de partición entre agua y octanol. Parece ser que los mejores resultados se consiguen con los disolventes más hidrofóbicos (log P>1), aunque los estudios realizados presentan numerosas excepciones, por lo que no se puede establecer una correlación muy correcta.¹³¹ La relación entre la enantioselectividad y otras propiedades físico-químicas de los disolventes, como su polaridad o su estructura, también ha sido estudiada. Sin embargo, no se puede postular una relación entre estos parámetros.¹³²

El agente acilante interacciona con el complejo acil-enzima, por lo que la variación de su estructura modifica la enantioselectividad de los procesos de acilación. En el esquema 1.12 se muestran las diferentes selectividades obtenidas en la acilación enzimática de 3-ciclopenten-1-oles 2-sustituidos con la lipasa PS al emplear diferentes ésteres alifáticos de vinilo.¹³³



Esquema 1.12.

Posteriores intentos de racionalizar los resultados han establecido que la presencia de un anillo aromático, en especial en la posición β al grupo carbonilo, conduce a elevadas enantioselectividades.¹³⁴

Otros parámetros sobre los que se puede actuar son el empleo de aditivos, la utilización de microondas¹³⁵ o diferentes modificaciones en el biocatalizador.^{47a}

1.1.4.2. Reacciones de acilación sobre alcoholes primarios

En general, las enantioselectividades de las reacciones de acilación de alcoholes primarios catalizadas por lipasas son relativamente bajas. No obstante, la modificación

¹³⁰(a) T. Sakai, I. Kawabata, T. Kishimoto, T. Ema, M. Utaka, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 4906-4907. (b) P. L. Antoine Overbeeke, J. Ottoson, K. Hult, J. A. Jongejan, J. A. Duine, *Biocatal. Biotrans.* **1999**, *17*, 61-79.

¹³¹(a) K. Nakamura, M. Kinoshita, A. Ohno, *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 4681-4690. (c) A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3366-3374.

¹³² K. Nakamura, M. Kinoshita, A. Ohno, *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 8799-8808.

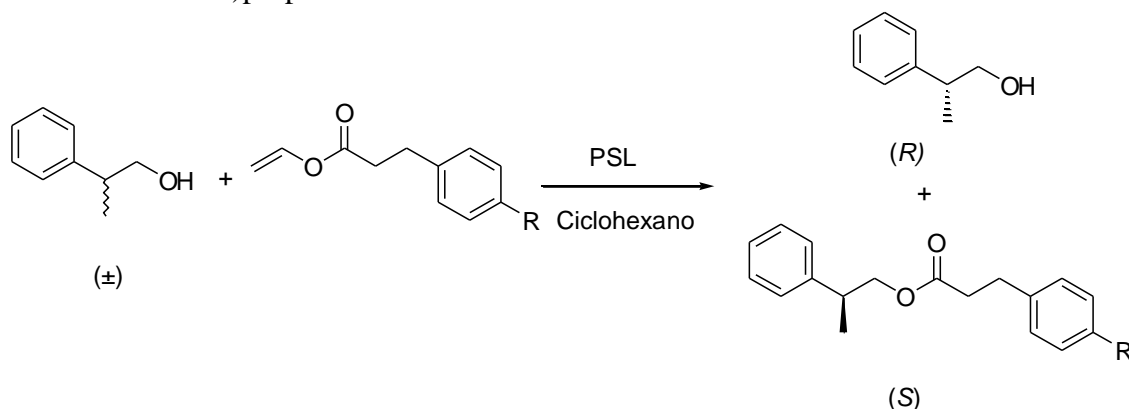
¹³³ T. Ema, S. Maeno, Y. Takaya, T. Sakai, M. Utaka, *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 8610-8616.

¹³⁴ M. Kawasaki, M. Goto, S. Kawabata, T. Kodama, T. Kometani, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 5223-5226.

¹³⁵ G. Lin, W.-Y. Lin, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 4333-4336.

de los parámetros anteriormente descritos permiten conseguir en muchos casos una alta enantioselectividad.

Los 2-metil-1-alcóholes son excelentes sustratos para la transesterificación enzimática con ésteres de vinilo.¹³⁶ Se han descrito muchos ejemplos de la resolución de estos sustratos donde siempre se obtiene el alcohol de partida de configuración *R* y el éster de configuración *S*. Por ejemplo, Kawasaki y col.¹³⁷ (esquema 1.13) han desarrollado la resolución del 2-fenil-propanol con diferentes ésteres de vinilo en presencia de la lipasa de *Pseudomonas cepacea* (PSL) consiguiendo selectividades superiores a 100 empleando 3-(*p*-iodofenil)propanoato de vinilo y 3-(*p*-trifluorometilfenil)propanoato de vinilo en ciclohexano.



Esquema 1.13.

Sin embargo, existen muchos menos estudios sobre la resolución de 2-etil-1-alcóholes. La acetilación enzimática del 2-etil-1-hexanol catalizada por la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) en THF transcurre con moderadas razones enantioméricas.¹³⁸ Por el contrario, el 2-etilhex-5-en-1-ol puede ser resuelto por la PSL y acetato de vinilo en CH₂Cl₂ con elevadas selectividades.¹³⁹ En ambos casos, se acetila el enantiómero de configuración *S*.

También se han estudiado acilaciones enzimáticas sobre 1-alcóholes 2-sustituidos por heteroátomos. Sin embargo, la resolución del 2-azido-4-fenil-3-buten-1-ol con varias lipasas no conduce a procesos selectivos.¹⁴⁰

Es posible resolver alcoholes primarios que posean un carbono cuaternario en la posición β. Así, ha sido descrita la acetilación de los alcoholes mostrados en el esquema 1.14 con la lipasa AK-20 y acetato de vinilo en benceno, consiguiéndose elevadas enantioselectividades dependiendo del resto R empleado.¹⁴¹

¹³⁶ (a) S. Barth, F. Effenberger, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, *4*, 823-833. (b) T. Konegawa, Y. Ohtsuka, H. Ikeda, T. Sugai, H. Ohta, *Synlett*, **1997**, 1297-1299. (c) K. Hirose, H. Naka, M. Yano, S. Onashi, K. Naemura, Y. Tobe, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, *11*, 1199-1210.

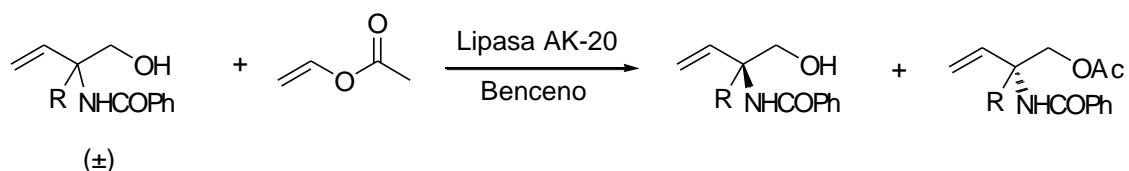
¹³⁷ M. Kawasaki, M. Goto, S. Kawabata, T. Kometani, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, 585-596.

¹³⁸ (a) M. Majeric, V. Sunjic, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, *7*, 815-824.

¹³⁹ K. Baczko, C. Larpent, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2000**, 521-526.

¹⁴⁰ T. Ziegler, C. Jurish, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, *11*, 3403-3408.

¹⁴¹ D. B. Berkowitz, J. A. Pumphrey, Q. Sen, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8743-8746.

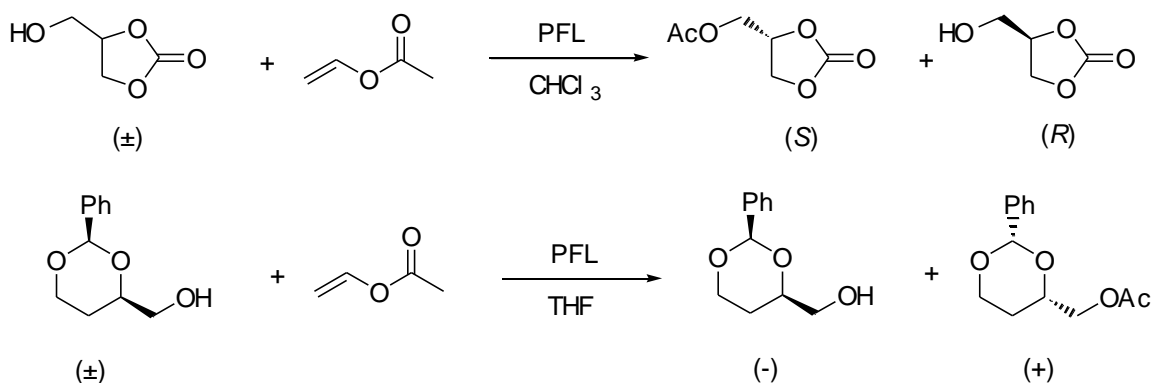


R: Me; Bz; ArCH₂; Me₂CH.

Esquema 1.14.

La acilación enzimática puede aplicarse también a alcoholes primarios monocíclicos, siendo obtenidos generalmente elevados excesos enantioméricos tanto del sustrato como del producto. Diferentes hidroximetiloxiranos β-sustituidos han sido resueltos con excelentes resultados por tratamiento con acetato de vinilo en presencia de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.¹⁴² Asimismo, se han desarrollado reacciones de acilación enzimática sobre derivados de 2-hidroximetil-2,5-dihidrofuranos y pirroles, obteniéndose bajas o moderadas enantioselectividades en función del biocatalizador empleado. En estos sustratos se acetila preferentemente el enantiómero de configuración *R*.¹⁴³

Un caso interesante lo constituye la resolución de hidroximetildioxolanos e hidroximetildioxanos (esquema 1.15), precursores de una gran variedad de compuestos de interés biológico, ya que son análogos enmascarados de glicerol. Su resolución enzimática por acilación constituye un excelente método para la preparación de estos sintones quirales.¹⁴⁴



Esquema 1.15.

También se han descrito procedimientos de resolución para alcoholes bicíclicos con un grupo hidroxilo primario¹⁴⁵ y para compuestos organometálicos, como alcoholes derivados de ferrocenos y de compuestos de cromo.¹⁴⁶

Por último, ciertas reacciones de transesterificación han sido llevadas a cabo con buenas enantioselectividades sobre alcoholes primarios con un centro estereogénico en la posición 3 (esquema 1.16).¹⁴⁷

¹⁴² (a) P. Ferraboschi, D. Brembilla, P. Grisenti, E. Santaniello, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 5478-5480. (b) P. Ferraboschi, S. Casati, P. Grisenti, E. Santaniello, *Synlett*, **1994**, 754-756.

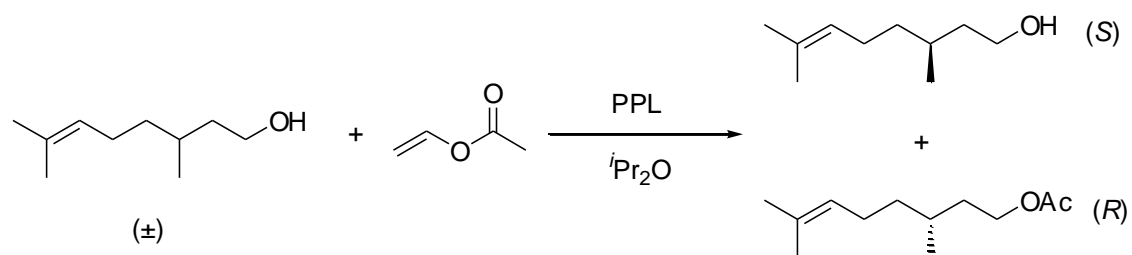
¹⁴³ F. Schieweck, H.-J. Altenbach, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, *9*, 403-406.

¹⁴⁴ (a) M. Pallavicini, E. Valoti, L. Villa, O. Piccolo, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1751-1754. (b) B. Herradon, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2891-2893.

¹⁴⁵ H. Tanimoto, T. Oritani, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, *7*, 1695-1704.

¹⁴⁶ (a) G. Nicolosi, A. Patti, R. Morrone, M. Piattelli, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1994**, *5*, 1275-1280. (b) J. H. Rigby, P. Sugathapala, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 5293-5296.

¹⁴⁷ A. Sharma, S. Chattopadhyay, *Liebigs Ann.* **1996**, 529-531.



Esquema 1.16.

En este capítulo se ha pretendido desarrollar una serie de procedimientos enzimáticos con el fin de obtener precursores ópticamente puros de (-)-paroxetina. Para ello se emplearán fundamentalmente reacciones de acilación enimáticas sobre alcoholes primarios, una metodología que ha sido empleada con gran éxito en la síntesis de un gran número de productos de alto valor añadido.

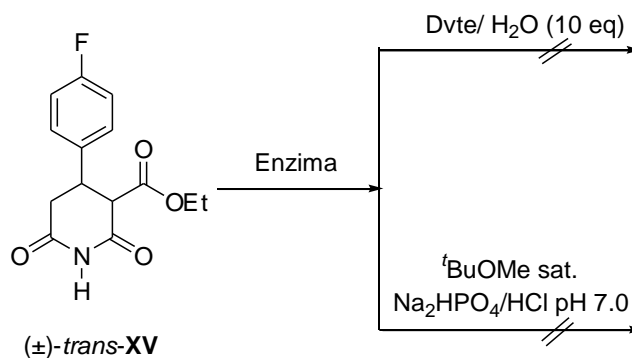
Para el desarrollo de la hidrólisis sobre el éster (\pm)-*trans*-**XV** se han empleado dos medios de reacción diferentes (esquema 1.18): disolvente orgánico con 10 equivalentes de agua y disolvente orgánico saturado de un tampón fosfato de pH 7.0:

1.2.1.1.- Hidrólisis en disolvente orgánico.

En primer lugar se realizó un *screening* de diferentes lipasas y esterases para el proceso de hidrólisis empleando ^tBuOMe como disolvente, 10 equivalentes de agua y una temperatura de 30°C. Se estudiaron las lipasas de *Candida antarctica* B (CAL-B), *Pseudomonas cepacea* (PSL y PS-C), *Mucor miehei* (MML), *Candida rugosa* (CRL), *Rhizopus niveus* (RNL), *Thermomyces lanuginosa* (TLL), la lipasa de páncreas de cerdo (PPL), y la esterasa de *Rhizomucor miehei* (esterasa RM). En ninguna de las pruebas se observó formación del producto de hidrólisis aún a tiempos de reacción de 168 horas. Se realizaron a continuación otras reacciones variando otros parámetros como el disolvente (1,4-dioxano, ^tPr₂O), la cantidad de agua (50 y 100 equivalentes) y la temperatura (40 y 60 °C), pero en ninguna de las pruebas se apreció la aparición del correspondiente ácido carboxílico después de analizar los crudos de reacción por ¹H-RMN.

1.2.1.2. Hidrólisis en disolvente orgánico saturado de tampón.

La utilización de disolventes orgánicos saturados con disoluciones tampón ha sido descrita con éxito en la hidrólisis de derivados de glicerole.¹⁴⁸ Dada la nula reactividad de las hidrólisis enzimáticas en medio orgánico, se llevaron a cabo una serie de reacciones empleando una disolución de ^tBuOMe saturada de un tampón de fosfato 1.0 N de pH 7.0. El uso de disoluciones tampón está muy extendido en los procesos de hidrólisis enzimática, para evitar que el significativo descenso del pH del medio producido por la formación de ácido carboxílico, afecte negativamente a la actividad del enzima. Sobre el sustrato (\pm)-*trans*-**XV** se realizaron una serie de pruebas con las lipasas de CAL-B, PSC y CRL a diferentes temperaturas, pero en ninguno de los casos se produjo la reacción esperada, recuperándose únicamente el imidoéster de partida.



Esquema 1.18.

1.2.1.3. Reacciones de aminólisis y amonólisis enzimática sobre (\pm)-*trans*-**XV**

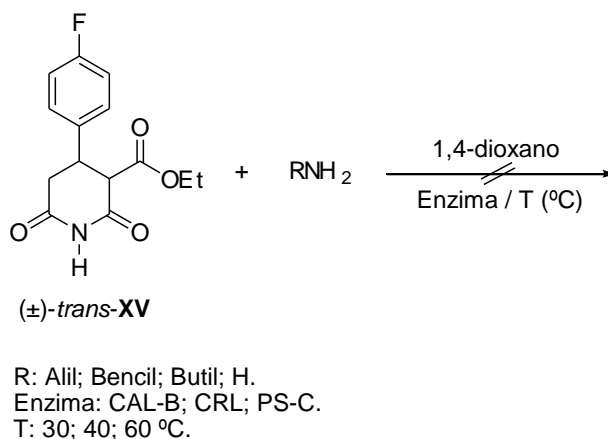
Debido a los resultados obtenidos en los procesos de hidrólisis del imidoéster (\pm)-*trans*-**XV**, decidimos estudiar su reactividad en presencia de nucleófilos nitrogenados, como aminas y amoníaco. Las reacciones de aminólisis y amonólisis enzimática han sido desarrolladas con éxito en nuestro grupo de investigación para la obtención de amidas ópticamente activas y para la resolución de aminas racémicas.¹⁴⁹ En primer lugar se estudió la reacción de aminólisis enzimática de (\pm)-*trans*-**XV** en presencia de una serie de aminas (esquema 1.19), como butilamina, alilamina y

¹⁴⁸ R. Chenevert, R. Gagnon, *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 1054-1057.

¹⁴⁹ V. Gotor, *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, 2189-2197.

bencilamina, en 1,4-dioxano seco, un disolvente especialmente adecuado para este tipo de procesos. Los biocatalizadores empleados fueron las lipasas de PS-C, CAL-B y CRL. También se modificaron otros parámetros de reacción, como la temperatura (30, 40 y 60 °C) o el número de equivalentes de la amina (1, 5 y 10 equivalentes), pero en ninguno de los procesos se obtuvo una cantidad apreciable de la amida final por la técnica de determinación empleada (¹H-RMN).

En el caso de la reacción de amonólisis enzimática (esquema 1.19), se realizaron pruebas con la lipasa de CAL-B en 1,4-dioxano a 30 y 40 °C. Tras saturar el disolvente con amoníaco gaseoso, la adición del sustrato y el biocatalizador no generó ningún producto de reacción a las 168 horas.



Esquema 1.19.

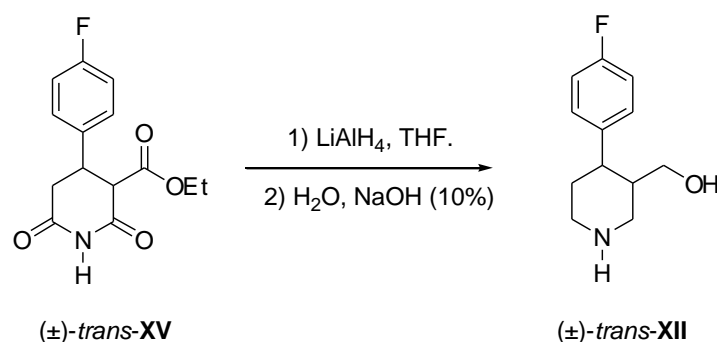
1.2.1.4. Reacción de transesterificación enzimática sobre (±)-*trans*-**XV**.

La última prueba que se llevó a cabo sobre el imidoéster **XV** consistió en la transesterificación enzimática con alcoholes. Para este proceso se empleó un alcohol alifático (butanol) y otro aromático (2-feniletanol). Se probaron varias combinaciones de disolventes y lipasas ya descritas, pero en ningún caso se observó el correspondiente producto de alcoholólisis después de 168 horas de reacción.

1.2.2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA SOBRE (±)-*trans*-3-ACETOXIMETIL-*N*-BENCILOXICARBONIL-4-(4'-FLUOROFENIL)PIPERIDINA, (±)-*trans*-**2a**.

Una vez concluidos los intentos de resolución sobre el primer precursor de (-)-paroxetina, se decidió realizar la síntesis del aminoalcohol **XII** y sus análogos *N*-protegidos, para poder así desarrollar reacciones de resolución sobre éstos. En la literatura están descritas diversas metodologías para la reducción del imidoéster (±)-*trans*-**XV** empleando diferentes hidruros metálicos.^{102, 150} En este caso la utilización de LiAlH₄ como agente de reducción permite la obtención del aminoalcohol (±)-*trans*-**XII** con buenos rendimientos (esquema 1.20).

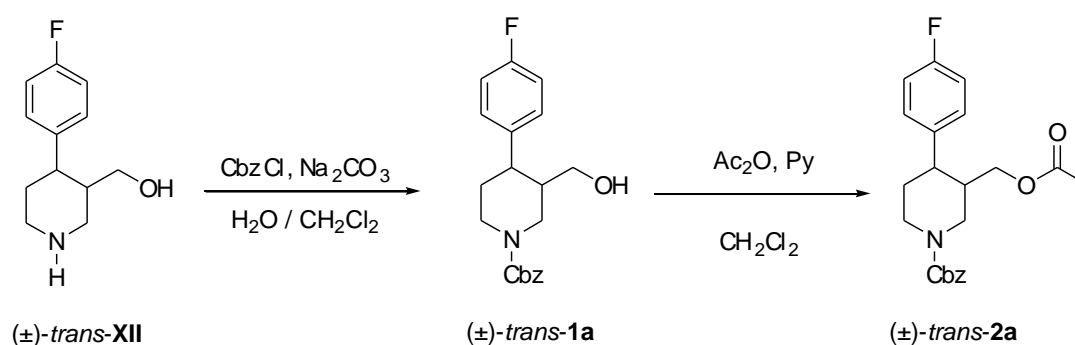
¹⁵⁰ S. E. Callander, U.S. Patent 5,681,962, 1997, *Chem. Abstr.* **1985**, 122, 9881.



Esquema 1.20.

En lugar de utilizar el aminoalcohol libre, se protegió el grupo amino con el fin de tener un solo centro reactivo en la molécula. Así, la única reacción posible será la *O*-acilación, evitando la competencia con procesos de *N*-acilación y posibles migraciones 1,3. Los carbamatos se eligieron como grupos protectores debido a su estabilidad, ya que pueden desprotegerse fácilmente bajo condiciones suaves.¹⁵¹ De este modo es posible desarrollar todas las reacciones para completar la preparación de (-)-paroxetina con el piperidincarbinol *N*-protegido y realizar la desprotección como el último paso de la síntesis.

El primer grupo protector seleccionado fue el benciloxicarbonilo (Cbz). El tratamiento del aminoalcohol libre con CbzCl genera el aminoalcohol $(\pm)\text{-trans-1a}$. Su posterior acetilación conduce a la formación del éster $(\pm)\text{-trans-2a}$, que será el sustrato empleado para la resolución del alcohol mediante la reacción de hidrólisis enzimática (esquema 1.21).



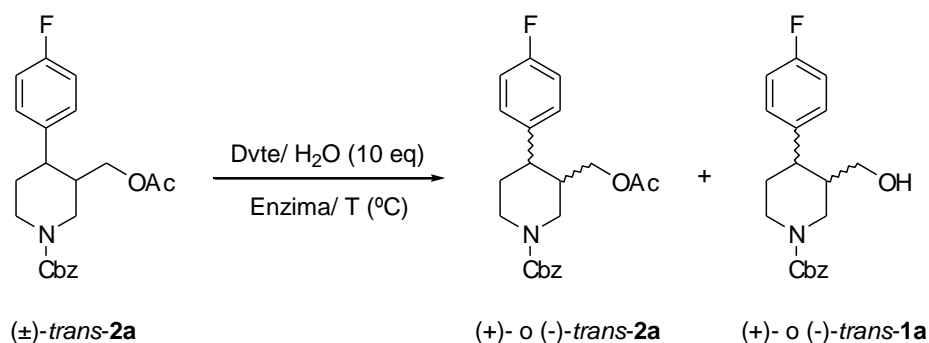
Esquema 1.21.

Cuando se realiza la hidrólisis en medio acuoso sobre el compuesto $(\pm)\text{-trans-2a}$ empleando una disolución reguladora de fosfato a pH 7.0 a 30°C, ninguna de las enzimas comerciales descritas anteriormente catalizaron el proceso, posiblemente debido a la baja solubilidad del sustrato en estas condiciones. Para solubilizar el sustrato se requiere la adición de un cosolvente miscible con el agua en elevada proporción (50%), lo que puede provocar una pérdida en la actividad enzimática. Así, en la hidrólisis catalizada por la CAL-B en la mezcla acetonitrilo/disolución tampón al 50% no se observa reacción a las 168 horas. Sin embargo, cuando la reacción se realiza en una mezcla 1,4-dioxano/disolución tampón al 50%, se obtiene un conversión del 9% a las 310 horas de reacción, siendo la enantioselectividad obtenida baja ($E=13$).

Posteriormente, se examinó la resolución del sustrato $(\pm)\text{-trans-2a}$ realizando la hidrólisis en disolvente orgánico a 30°C con 10 equivalentes de agua como nucleófilo

¹⁵¹ T.W. Greene, P. G. M. Wuts, *Protective groups in organic synthesis*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1997.

(esquema 1.22, tabla 1.1). En el *screening* enzimático desarrollado empleando ^tBuOMe como disolvente, únicamente tres de las lipasas probadas catalizaron el proceso. Con la lipasa de CAL-B se consigue una conversión del 27% a las 72 horas de reacción (entrada 1), aunque la resolución es muy poco selectiva ($E=6.2$). La isoenzima A de la *Candida antarctica* (CAL-A) cataliza la hidrólisis en menor grado, puesto que sólo se consigue un 2 % de conversión a las 240 horas de reacción, siendo la enantioselectividad del proceso insuficiente ($E=10$) (entrada 2). Finalmente, la reacción catalizada por la PPL es un proceso también muy lento (entrada 3) presentando una selectividad muy baja ($E=3.3$).



Esquema 1.22.

A la vista de los resultados obtenidos, se decidió modificar el disolvente de los procesos catalizados por la CAL-B y la CAL-A. En el caso de la CAL-B, la utilización de ^tPr₂O provoca una mayor conversión que con ^tBuOMe, siendo la enantioselectividad conseguida del mismo orden, tal como se observa en la entrada 4 de la tabla 1.1. Las hidrólisis realizadas en tolueno, CH₂Cl₂, 1,4-dioxano o THF son mucho más lentas y las enantioselectividades conseguidas son en todos los casos menores de 15, por lo que no son aceptables para nuestros fines sintéticos. Cuando se emplea hexano, debido a la baja solubilidad del sustrato a 30°C, es necesario recurrir a la disolución del aminoalcohol en el disolvente a 60°C, para luego llevar a cabo la reacción a 30°C. Sin embargo, no se observó hidrólisis a las 168 horas.

En el caso de CAL-A, es posible conseguir un proceso muy selectivo ($E=68$) utilizando hexano como disolvente (entrada 10) , a pesar de que la conversión obtenida es muy baja (4% en 230 horas de reacción). La reacción es muy rápida empleando ^tPr₂O, pero muy poco selectiva (entrada 9). Con el resto de los disolventes probados (1,4-dioxano, tolueno, CH₂Cl₂, THF) no se observa reacción alguna.

Los valores de enantioselectividad (E) y conversión (c) de las resoluciones se obtienen a partir de los excesos enantioméricos tanto del sustrato (ee_s) como del producto (ee_p), según se ha descrito en las ecuaciones 5 y 6 del apartado I.3.3, respectivamente.

En las resoluciones catalizadas por la CAL-A, se produce la hidrólisis del enantiómero de configuración (3*S*,4*R*)-(-), mientras que al utilizar la CAL-B y la PPL se hidroliza mayoritariamente el enantiómero cuya configuración es (3*R*,4*S*)-(+). De esta manera, mediante la variación del biocatalizador, es posible obtener los dos enantiómeros del alcohol *trans*-1a. En este caso es especialmente ventajoso el empleo de la CAL-A, puesto que obtendríamos como producto de hidrólisis el alcohol de la configuración adecuada para continuar con la síntesis de (-)-paroxetina.

Tabla 1.1. Reacciones de hidrólisis enzimática sobre (\pm)-*trans*-**2a** a 30°C en medio orgánico con 10 equiv. de H₂O.

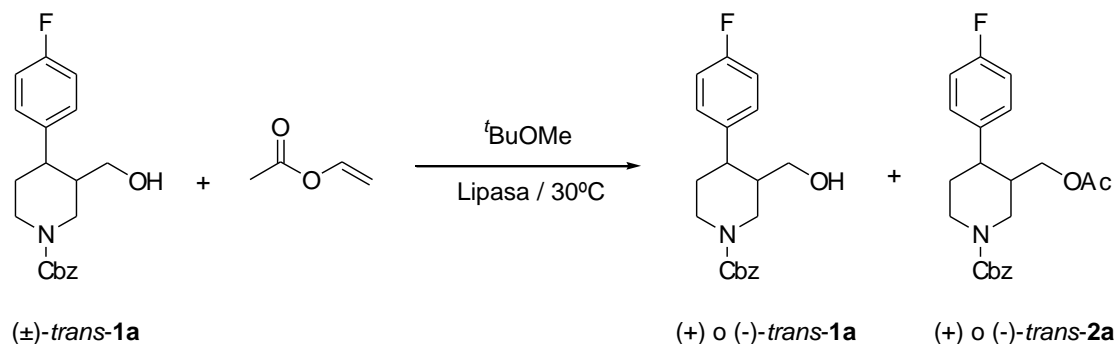
Entrada	Lipasa	Dvte	t (h)	c (%)	<i>trans</i> - 2a	<i>trans</i> - 1a	<i>E</i>
					<i>ee</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^a	
1	CAL-B	^t BuOMe	72	29	25	66	6.2
2	CAL-A	^t BuOMe	240	2	2	83	10
3	PPL	^t BuOMe	240	2	2	53	3.3
4	CAL-B	ⁱ Pr ₂ O	168	57	63	47	5.1
5	CAL-B	Tolueno	113	2	2	85	12
6	CAL-B	CH ₂ Cl ₂	168	1	1	85	12
7	CAL-B	1,4-dioxano	264	20	19	77	9.3
8	CAL-B	THF	168	9	5	50	5.1
9	CAL-B	Hexano	168	--	--	--	--
9	CAL-A	ⁱ Pr ₂ O	168	35	36	67	7.1
10	CAL-A	Hexano	230	4	4	97	68

^a Medidos mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

1.2.3. ACETILACIÓN ENZIMÁTICA DE (\pm)-*trans*-*N*-BENCILOXICARBONIL-4-(4'-FLUOROFENIL)-3-HIDROXIMETILPIPERIDINA, (\pm)-*trans*-**1a**.

Los resultados obtenidos en la hidrólisis enzimática del intermedio (\pm)-*trans*-**2a** no son satisfactorios. Variando las condiciones de reacción sólo es posible obtener un proceso de elevada selectividad, sin embargo, los tiempos de reacción son muy altos. Por ello, se decidió realizar otra aproximación muy común para la resolución de alcoholes racémicos, como es la reacción de transesterificación enzimática.

El estudio se inició sobre el aminoalcohol (\pm)-*trans*-**1a**, llevando a cabo su acilación en ^tBuOMe a 30°C con 10 equivalentes de acetato de vinilo como agente acilante (esquema 1.23, tabla 1.2). De esta manera, las reacciones son totalmente irreversibles, lo que revierte directamente en una mayor velocidad y en un aumento de la selectividad de los procesos.

**Esquema 1.23.**

Entre los diferentes biocatalizadores empleados, los mejores resultados se consiguieron con las dos isoenzimas de *Candida antarctica*. De acuerdo con el principio de reversibilidad microscópica, sus preferencias estereoquímicas son las mismas que las obtenidas para los procesos de hidrólisis. Así, mientras la lipasa CAL-A cataliza la acilación del enantiómero (3*S*,4*R*), con la CAL-B se consigue la formación del producto de configuración (3*R*,4*S*).

La acilación catalizada por la CAL-A de (\pm)-*trans*-**1a** es mucho más rápida y selectiva que el correspondiente proceso de hidrólisis. Así, es posible obtener una

conversión mayor del 50% a las 2 horas de reacción con una alta enantioselectividad ($E=39$) como se observa en la entrada 1. Este hecho no sucede para la CAL-B, puesto que la enantioselectividad conseguida es del mismo orden que para la hidrólisis, siendo sin embargo la reacción de acilación mucho más rápida (entrada 2). Cuando se analizan otras lipasas, como las de *Pseudomonas cepacea* en sus variedades PSL y PS-C, la MML y la CRL, también se acetila preferentemente el enantiómero (3*R*,4*S*), pero en estos casos se observan bajas velocidades de reacción y enantioselectividades. La lipasa RN, la PPL y la lipasa de *Thermomyces lanuginosa* no catalizan la acilación de (±)-*trans-1a* incluso a largos tiempos de reacción, recuperándose únicamente el aminoalcohol de partida.

Tabla 1.2. Reacciones de acetilación enzimática sobre (±)-*trans-1a* en ^tBuOMe, 30°C y acetato de vinilo (10 equiv.).

Entrada	Lipasa	t (h)	c (%)	<i>trans-1a</i>	<i>trans-2a</i>	<i>E</i>
				<i>ee</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^a	
1	CAL-A	2	54	97	81	39
2	CAL-B	2	57	85	65	12
3	PS-C	50	39	45	70	8.8
4	PSL	184	16	10	53	3.6
5	MML	144	13	13	66	5.5
6	CRL	144	40	2	3	1.1

^a Determinados mediante HPLC.

A la vista de los prometedores resultados registrados en este proceso de acilación enzimática, se modificaron ciertos parámetros de reacción con el fin de mejorar las enantioselectividades obtenidas.

1.2.3.1. Influencia del disolvente.

El tipo de disolvente utilizado desempeña un papel fundamental tanto en la velocidad como en la enantioselectividad de las reacciones de transesterificación enzimática. Por lo tanto, se modificó éste en los procesos de resolución de (±)-*trans-1a* manteniendo la temperatura de reacción a 30°C y utilizando como agente acilante 10 equivalentes de acetato de vinilo (tabla 1.3), excepto cuando se utiliza como disolvente y donador de acilo en la transesterificación.

En las reacciones catalizadas con la CAL-A, los mejores resultados se consiguen en tolueno. Después de 6 horas de reacción, se alcanza una conversión del 49%, con una excelente enantioselectividad ($E=102$), por lo que es posible conseguir tanto el alcohol (3*R*,4*S*)-*trans-1a* como el éster (3*S*,4*R*)-*trans-2a* con elevados excesos enantioméricos deteniendo la reacción a la conversión adecuada (entrada 1). Cuando se emplea el propio acetato de vinilo o ^tPr₂O (entradas 2 y 3), las reacciones son mucho más rápidas que en tolueno. Sin embargo, sólo se alcanzan selectividades moderadas ($E=17-28$). Con otros disolventes como 1,4-dioxano, acetona, CH₂Cl₂, THF o *tert*-butanol las velocidades de reacción y las enantioselectividades son bajas o muy bajas, excepto en el caso de emplear CH₂Cl₂ ($E=40$) (entrada 6). Parece que la acilación en acetato de etilo presenta cierta reversibilidad debido a la posible actuación del disolvente como agente acilante en competencia con el acetato de vinilo, como se aprecia en la entrada 8. Cuando la reacción se detiene a las 10 horas, se consigue una conversión del 10%. A mayores tiempos, las conversiones logradas son iguales o inferiores al 10% y las enantioselectividades obtenidas son menores.

El empleo de aminas terciarias como aditivos en las reacciones de transesterificación sobre alcoholes mejora en algunos casos la velocidad y selectividad

de la reacción. En la actualidad no está muy claro su efecto, aunque se especula que una de las funciones de estas aminas es la formación de pares iónicos con impurezas o productos secundarios ácidos, lo que impide la desactivación enzimática.¹⁵² Sin embargo, también han sido descritos ejemplos en los que estos aditivos provocan el efecto contrario, reduciendo las propiedades del biocatalizador.¹⁵³ En nuestro caso, decidimos realizar la resolución enzimática del (\pm)-*trans*-**1a** con la CAL-A y tolueno en presencia de acetato de vinilo y 0.7 equivalentes de trietilamina (NEt₃). La reacción es ligeramente más rápida que en ausencia de aditivo (entrada 9), aunque se produce un importante descenso en la enantioselectividad del proceso. Esta disminución no se debe a la acilación química no enzimática, pues en la prueba en blanco realizada en estas condiciones no se observa reacción alguna a las 6 horas.

También se estudió la influencia de la concentración de acetato de vinilo para la resolución en tolueno a 30°C. Cuando se utilizan 4 equivalentes de este agente acilante, la enantioselectividad se mantiene prácticamente constante (entrada 10), aunque se produce un descenso en la velocidad del proceso, ya que para alcanzar el 50 % de conversión son necesarias 8 horas de reacción.

Tabla 1.3. Reacciones de acetilación enzimática sobre (\pm)-*trans*-**1a** con CAL-A, 30°C y acetato de vinilo (10 equiv.).

Entrada	Dvte	t (h)	c (%)	<i>trans</i> - 1a / <i>trans</i> - 2a		<i>E</i>
				<i>ee</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^a	
1	Tolueno	6	49	91	94	102
2	ⁱ Pr ₂ O	2	64	99	56	17
3	Ac. vinilo ^b	2	34	53	89	24
4	1,4-dioxano	294	4	3	79	8.8
5	Acetona	170	5	3	54	3.4
6	CH ₂ Cl ₂	48	5	5	95	40
7	THF	48	7	7	92	25
8	AcOEt	19	10	6	90	20
9	Tol/NEt ₃ ^c	6	57	55	97	35
10 ^e	Tolueno ^d	8	50	93	93	94

^a Medidos mediante HPLC. ^b El agente acilante se emplea como disolvente de la reacción. ^c La resolución se lleva a cabo con 0.7 equiv. de NEt₃. ^d Acetilación con 4 equiv. de acetato de vinilo.

En el estudio de la acilación biocatalítica del intermedio (\pm)-*trans*-**1a** catalizada por la CAL-A a 30°C, se intentaron correlacionar los valores de enantioselectividad obtenidos con la hidrofobicidad de los disolventes empleados en las resoluciones. El carácter hidrofóbico de un disolvente se representa mediante el log P, como ya se ha comentado en los antecedentes del presente capítulo. En la tabla 1.4 se muestran los resultados obtenidos, ordenados en valores de *E* creciente.

¹⁵² N. W. Boaz, R. L. Zimmerman, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1994**, 5, 153-156.

¹⁵³ F. Theil, J. Weidner, S. Ballschuh, H. Schick, *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 388-393.

Tabla 1.4. Relación entre enantioselectividad y propiedades de los disolventes empleados en la acetilación de (\pm)-*trans*-**1a** catalizada por la CAL-A a 30°C.

Entrada	Dvte	<i>E</i>	log P
1	Acetona	3	-0.23
2	^t BuOH	4	0.80
3	Dioxano	9	-1.1
4	ⁱ Pr ₂ O	17	1.9
5	AcOEt	20	0.68
6	THF	25	0.49
7	Ac. Vinilo	28	0.31
8	^t BuOMe	39	1.35
9	CH ₂ Cl ₂	40	1.25
10	Tolueno	102	2.5

Los compuestos con valores de log P cercanos a 0 o negativos son los más hidrofílicos, mientras que al aumentar el valor de este parámetro, los disolventes presentan un mayor carácter hidrofóbico. Como puede observarse en el gráfico 1.1 y en las entradas 1 y 3 de la tabla 1.4, con los dos disolventes más hidrofílicos (acetona y 1,4-dioxano) se consiguen muy bajas enantioselectividades. En general, el empleo de disolventes hidrofóbicos (log P > 1.0), como ^tBuOMe, CH₂Cl₂ y tolueno (entradas 8, 9 y 10) permite conseguir las mayores selectividades, con lo que parece establecerse la tendencia de que a mayor hidrofobicidad del disolvente más selectiva es la resolución. Sin embargo, existen varias excepciones, como en el caso del ^tBuOH y del ⁱPr₂O (entradas 2 y 4), que a pesar de tener un carácter más hidrofóbico que otros compuestos empleados, presentan bajas enantioselectividades. La reacción en acetato de vinilo (entrada 7) es uno de los procesos más selectivos, siendo por el contrario un disolvente con carácter hidrofílico.

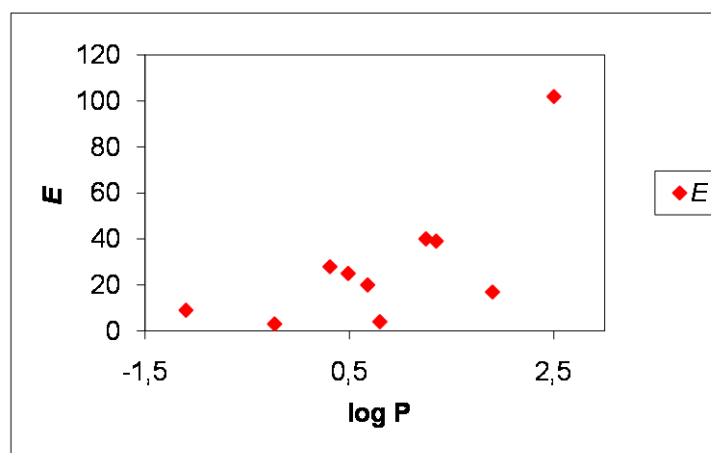


Gráfico 1.1. Relación entre *E* y log P en la reacción de acilación enzimática sobre (\pm)-*trans*-**1a** a 30°C catalizada por la CAL-A.

Cuando el catalizador empleado es la CAL-B (tabla 1.5), la mayor enantioselectividad se obtiene con tolueno ($E=35$), como muestra la entrada 1, presentando la reacción una velocidad menor que con ^tBuOMe. A pesar de que la enantioselectividad en tolueno con esta lipasa es mucho menor que la conseguida con la CAL-A, es posible conseguir el enantiómero adecuado para la síntesis de paroxetina, (3*S*,4*R*)-**1a** con un $ee=94\%$ para una conversión del 55%. Empleando acetato de vinilo como disolvente, la selectividad obtenida es muy similar a la conseguida con tolueno

(entrada 2), siendo la resolución más rápida. El empleo de $i\text{Pr}_2\text{O}$ o hexano (entradas 3 y 4) conduce a elevadas velocidades de reacción, aunque los procesos presentan bajas selectividades ($E=12-18$). Otros disolventes probados como 1,4-dioxano o THF (entradas 5 y 6) no son adecuados para esta resolución, debido a las bajas velocidades y enantioselectividades conseguidas. La adición de 0.7 equivalentes de NEt_3 en la reacción realizada en tolueno provoca, al igual que con la CAL-A, un aumento en la velocidad del proceso a costa de un importante descenso en su selectividad (entrada 7).

La utilización de tolueno o acetato de vinilo en la acetilación catalizada por la PS-C conduce a un ligero aumento de la selectividad, a costa de un descenso en la velocidad del proceso (entrada 8). Cuando la reacción catalizada por la MML se realiza en tolueno, la lipasa presenta una menor conversión que en $t\text{BuOMe}$, siendo la enantiodiscriminación en ambos casos muy similar.

Tabla 1.5. Reacciones de acetilación enzimática sobre (\pm)-*trans*-1a a 30°C en diferentes disolventes empelando acetato de vinilo (10 equivalentes)

Entrada	Lipasa	Dvte	t (h)	c (%) ^a	<i>trans</i> -1a	<i>trans</i> -2a	E
					ee (%) ^a	ee (%) ^a	
1	CAL-B	Tolueno	6	55	95	82	35
2	CAL-B	Ac.vinilo ^b	2	40	63	89	32
3	CAL-B	$i\text{Pr}_2\text{O}$	2	60	97	64	18
4	CAL-B	Hexano	4	71	99	47	12
5	CAL-B	1,4-dioxano	24	47	68	76	14
6	CAL-B	THF	6	16	15	81	11
7	CAL-B	Tol/ NEt_3 ^c	4	67	99	40	10
8	PS-C	Tolueno	55	18	18	88	18
9	PS-C	Ac. Vinilo	46	25	23	82	12
10	MML	Tolueno	170	10	4	56	3.7

^a Determinados por HPLC. ^b En este caso el agente acilante se usa como disolvente. ^c La resolución se lleva a cabo con 0.7 equiv. de NEt_3 .

1.2.3.2. Efecto de la temperatura.

Teniendo en cuenta que la temperatura influye de una manera notable en las acilaciones enzimáticas, decidimos desarrollar una serie de resoluciones a 15°C con acetato de vinilo en las mejores condiciones conseguidas en los estudios de biocatalizador y disolvente (tabla 1.6). La enantioselectividad se incrementó de manera notable en los procesos catalizados por la CAL-A ($E=143$) y la CAL-B ($E=76$) en tolueno (entradas 1 y 2), con sólo un ligero descenso de la actividad de los enzimas. Contrariamente, en el caso de la PS-C, junto con el esperado descenso en la velocidad de reacción se produce también una ligera disminución de la selectividad. La enantioselectividad de la acilación también aumenta de manera importante empleando la CAL-B, a 15°C, en $t\text{BuOMe}$ y en tolueno con 0.7 equivalentes de NEt_3 (entradas 4 y 5), permaneciendo inalterada en la reacción realizada en acetato de vinilo (entrada 6).

Tabla 1.6. Reacciones de acetilación enzimática sobre (\pm)-*trans*-**1a** a 15°C en diferentes disolventes empleando acetato de vinilo (10 equivalentes)

Entrada	Lipasa	Dvte	t (h)	c (%)	<i>trans</i> - 1a	<i>trans</i> - 2a	<i>E</i>
					<i>ee</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^a	
1	CAL-A	Tolueno	10	48	88	96	143
2	CAL-B	Tolueno	8	47	78	94	76
3	PS-C	Tolueno	72	8	6	84	12
4	CAL-B	^t BuOMe	12	54	93	83	36
5	CAL-B	Tol/ NEt ₃ ^b	7	54	99	73	32
6	CAL-B	Ac. vinilo	5	25	30	92	32

^a Medidos mediante HPLC. ^b La resolución se lleva a cabo con 0.7 equiv. de NEt₃.

1.2.3.3. Efecto del agente acilante.

El agente de acilación utilizado en los procesos de transesterificación enzimática puede modificarse bien en el grupo saliente o bien en la cadena del acilo. Las alteraciones en cualquiera de las dos posiciones pueden conducir a cambios en la enantioselectividad y en la velocidad de los procesos biocatalíticos.

1.2.3.3.1. Modificaciones en el grupo saliente (esquema 1.24, tabla 1.7).

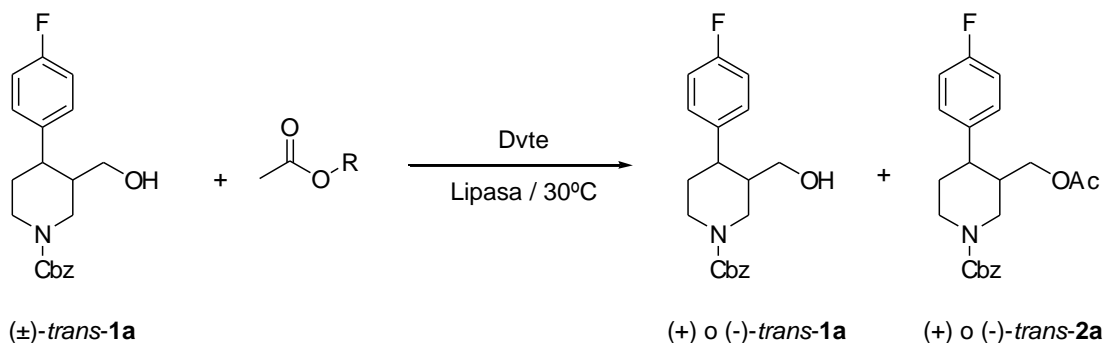
En primer lugar, se estudió la reacción de transesterificación sobre el aminoalcohol (\pm)-*trans*-**1a** empleando un éster no activado como el acetato de etilo (10 equivalentes). Como es de esperar, las resoluciones son mucho más lentas que sus análogas con acetato de vinilo. En los procesos llevados a cabo en tolueno a 30°C, con la CAL-A es posible conseguir un proceso altamente selectivo ($E=81$), a pesar de obtener únicamente un 18% de conversión a las 80 horas de reacción (entrada 1). Con la CAL-B, sin embargo, la reacción es muy poco selectiva ($E=10$), siendo mucho más rápida que con la CAL-A como se observa en la entrada 2. La PS-C no cataliza la reacción con este agente de acilación. En las reacciones realizadas con la CAL-A, la utilización de otros disolventes como ^tBuOMe o el propio acetato de etilo conduce a procesos mucho menos selectivos, con escasa variación de la velocidad de reacción. El aumento de temperatura a 50°C en tolueno permite conseguir una conversión del 23% a las 8 horas de reacción (entrada 6), sin embargo se observa un descenso en la razón enantiomérica ($E=51$).

Cuando la acilación se realiza con un éster activado como el acetato de acetonoxima, a 30°C y con tolueno como disolvente, se produce un comportamiento diferente de las dos isoenzimas de *Candida antarctica*. Mientras que con la forma A, la reacción es mucho más lenta que con acetato de vinilo, con la variedad B el proceso es ligeramente más rápido, llegándose a una conversión superior al 50% a las 4 horas de reacción. Con ambas enzimas (entradas 7 y 8), las resoluciones presentan moderadas enantioselectividades ($E=29-34$). Al disminuir la temperatura a 15°C en la reacción catalizada por la CAL-B es posible conseguir una buena enantioselectividad ($E=65$) con una menor velocidad de reacción que en el proceso realizado a 30°C, como se aprecia en la entrada 9.

El empleo del acetato de isopropenilo genera como subproducto final un enol que se tautomeriza en acetona, lo que provoca acilaciones irreversibles. Las reacciones con este agente acilante son más lentas que cuando se emplea acetato de vinilo. Se desarrollaron varias acilaciones sobre el sustrato (\pm)-*trans*-**1a** en tolueno, 30°C, con 10 equivalentes de acetato de isopropenilo. Con la CAL-A es posible conseguir el producto de acilación con un $ee=96\%$ a las 6 horas de reacción ($c=36\%$), siendo la enantioselectividad obtenida ligeramente inferior a la conseguida con acetato de vinilo (entrada 10). En el caso de la CAL-B y la PS-C, se consiguen resoluciones con

selectividades prácticamente iguales a las obtenidas en acetato de vinilo, produciéndose un descenso en la velocidad de reacción.

Cuando se llevan a cabo las resoluciones con acetato de isopropenilo a 15°C en tolueno, se consigue una apreciable mejora en el proceso catalizado por la CAL-A ($E=127$), pudiendo obtenerse el éster (3*S*,4*R*)-**2a** prácticamente enantiopuro a una conversión del 40% (entrada 13). Con la CAL-B, por el contrario, la selectividad del proceso ($E=45$) es la misma que la conseguida a 30°C.



R: Et; -N=C(Me)₂; *i*-Propenil.

Esquema 1.24.

Tabla 1.7. Reacciones de acetilación enzimática sobre (±)-*trans*-**1a** con diferentes acetatos.

Entrada	Lipasa	Dvte	R	T (°C)	t (h)	c (%)	<i>trans</i> -	<i>trans</i> -	<i>E</i>	
							1a	2a		
							<i>ee</i>	<i>ee</i>		
							(%) ^a	(%) ^a		
1	CAL-A	Tolueno	Et	30	80	16	21	97	81	
2	CAL-B	Tolueno	Et	30	48	38	42	76	10	
3	PS-C	Tolueno	Et	30	--	--	--	--	--	
4	CAL-A	^t BuOMe	Et	30	30	11	12	93	31	
5	CAL-A	AcOEt ^b	Et	30	96	18	21	93	35	
6	CAL-A	Tolueno	Et	50	8	23	28	95	51	
7	CAL-A	Tolueno	N=CMe ₂	30	30	16	18	92	29	
8	CAL-B	Tolueno	N=CMe ₂	30	4	53	92	83	34	
9	CAL-B	Tolueno	N=CMe ₂	15	7	46	78	93	65	
10	CAL-A	Tolueno	ⁱ Propenilo	30	6	38	58	96	88	
11	CAL-B	Tolueno	ⁱ Propenilo	30	8	58	99	79	43	
12	PS-C	Tolueno	ⁱ Propenilo	30	55	9	9	88	17	
13	CAL-A	Tolueno	ⁱ Propenilo	15	24	40	64	97	127	
14	CAL-B	Tolueno	ⁱ Propenilo	15	10	47	79	90	45	

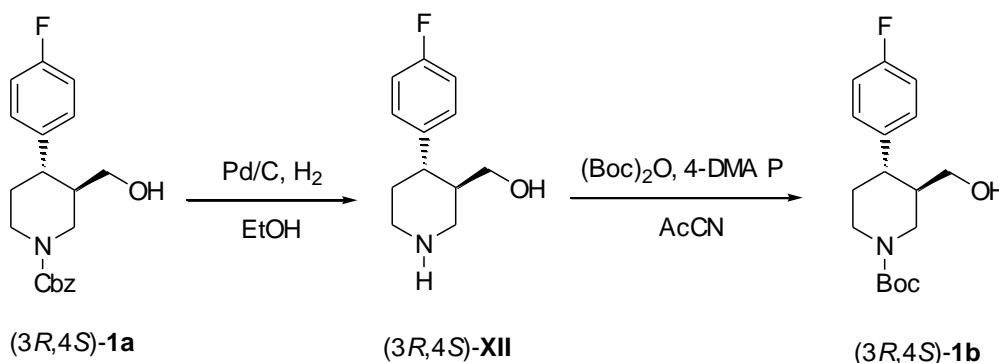
^a Determinados por análisis de HPLC. ^b El agente acilante actúa como disolvente de la reacción.

1.2.3.3.2. Modificaciones en la cadena del acilo (esquema 1.25, tabla 1.8).

El grupo acilo de un agente de transesterificación interacciona con el centro activo del enzima durante el transcurso de la acilación enzimática, por lo que la variación de éste repercute en el desarrollo de la resolución. La utilización de grupos aromáticos dentro de cadena del acilo ha servido en determinados casos para mejorar de forma notable la selectividad de las acilaciones biocatalíticas.¹³⁴

literatura para el aminoalcohol **XII**¹⁵⁴ $[\alpha]_D^{18} = -38.1$ (c 0.5, EtOH (95), 99% *ee*, 3*S*,4*R*), por lo que en estas condiciones se consigue el piperidincarbinol de configuración (3*R*,4*S*). Una vez asignada la configuración del piperidincarbinol *trans*-**1a**, queda asignada la configuración de los ésteres *trans*-**2a** y *trans*-**3a**.

También se preparó a partir del aminoalcohol libre el correspondiente derivado *N*-protegido con el grupo *tert*-butoxicarbonilo (Boc), comparándose el signo de la rotación específica de *trans*-**1d** $[\alpha]_D^{25} = +4.2$ (c 0.74, MeOH, 91% *ee*) con el descrito en la literatura:^{109b} $[\alpha]_D^{22} = +5.8$ (c 1.75, MeOH, 99% *ee*) para el derivado (3*R*,4*S*)-*trans*-**1d** y $[\alpha]_D^{22} = -6.8$ (c 1.75, MeOH, 99% *ee*) para el derivado (3*S*,4*R*)-*trans*-**1d**.



Esquema 1.26.

1.2.5. DETERMINACIÓN DE LOS EXCESOS ENANTIOMÉRICOS.

Los excesos enantioméricos de los sustratos y los productos se determinaron mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) utilizando una columna de relleno quiral (Chiralcel OD) a una longitud de onda (λ) de 215 nm. Tanto el sustrato *trans*-**1a** como los productos de las acilaciones *trans*-**2a** y *trans*-**3a** pudieron analizarse satisfactoriamente sin necesidad alguna de derivatización. Los derivados racémicos *O*-acetilado (\pm)-*trans*-**2a** y *O*-benzoilado (\pm)-*trans*-**3a** se preparan por tratamiento del piperidincarbinol (\pm)-*trans*-**1a** con anhídrido acético o cloruro de benzoílo en presencia de piridina utilizando como disolvente CH_2Cl_2 .

La optimización del proceso cromatográfico se consiguió después de haber ensayado diferentes condiciones de composición de eluyente, temperatura y flujo. Para los compuestos (\pm)-*trans*-**1a** y (\pm)-*trans*-**2a** se consigue una buena separación con una mezcla hexano: isopropanol (90:10) a un flujo de 0.8 mL/min y una temperatura de 28°C. En el caso del derivado benzoilado (\pm)-*trans*-**3a**, la separación se lleva a cabo con una mezcla hexano: isopropanol (92:8) a un flujo de 0.4 mL/min y una temperatura de 35°C. En todos los casos, la inyección de la muestra se realiza con 20 μL de una disolución en la misma mezcla de elución a concentraciones de 0.25-1.0 mg/mL.

En la figura 1.3 se observa el cromatograma del piperidincarbinol (\pm)-*trans*-**1a**, con dos picos (t_R 19.63 y 22.87 minutos) bien resueltos (R_S 1.9).

¹⁵⁴ K. Sugi, N. Itaya, T. Katsura, M. Igi, S. Yamazaki, T. Ishibashi, T. Yamaoka, Y. Kawada; Y. Tagami, M. Otsukim T. Ohshima, *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, 48, 529-536.

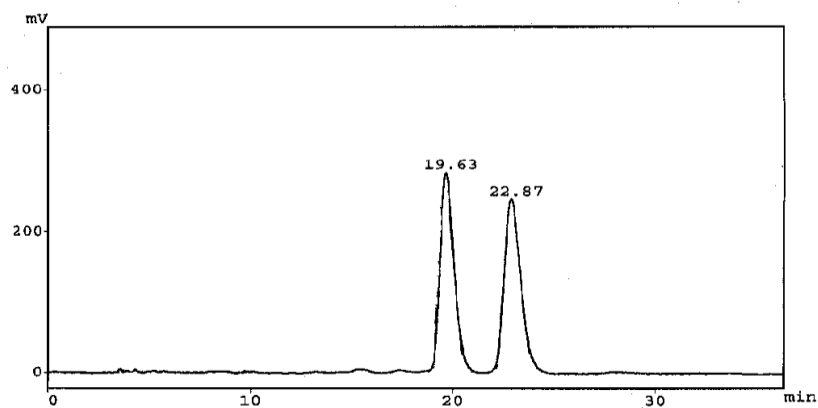


Figura 1.3.

La figura 1.4, muestra el cromatograma del compuesto $(3R,4S)$ -*trans*-**1a**, obtenido en las condiciones descritas en la tabla 1.3, entrada 1, con un $ee=91\%$. Se observan dos picos a 19.02 y 23.71 minutos.

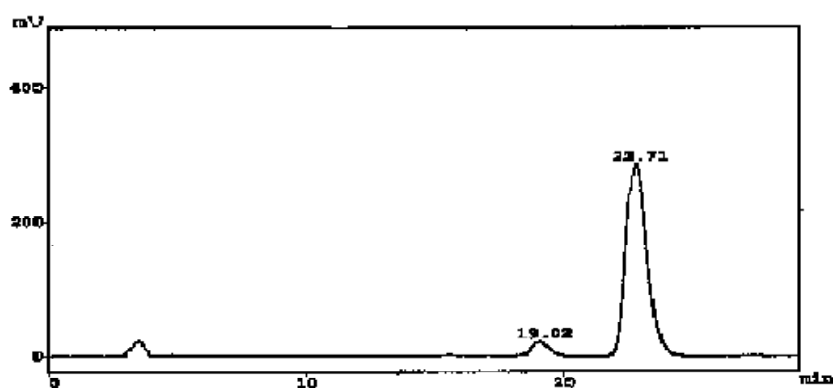


Figura 1.4.

El cromatograma del piperidincarbinol *O*-acetilado (\pm) -*trans*-**2a** presenta dos picos (t_R 14.13 y 16.82 minutos), bien resueltos (R_S 2.4). En la figura 1.5 se observa el cromatograma del compuesto $(3S,4R)$ -*trans*-**2a**, obtenido en las condiciones descritas en la tabla 1.3, entrada 1, con un $ee=94\%$. En él, aparecen dos picos a 19.02 y 17.02 minutos.

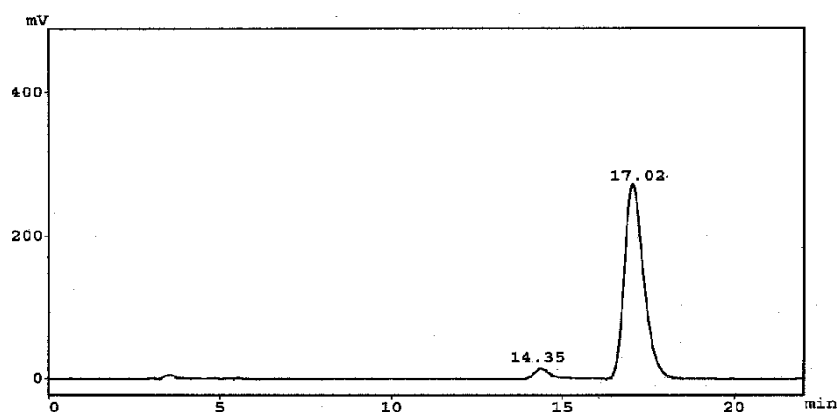


Figura 1.5.

El piperidincarbinol *O*-benzoilado racémico (\pm)-*trans*-**3a** presenta dos picos resueltos (R_S 2.2) a 26.50 y 30.90 minutos. Su cromatograma se muestra en la figura 1.7. El cromatograma del compuesto quiral (*3R,4S*)-*trans*-**3a**, obtenido en las condiciones de la tabla 1.8, entrada 6, con un $ee=98\%$, aparece en la figura 1.8. Se observan dos picos a tiempos de retención de 26.56 y 30.11 minutos.

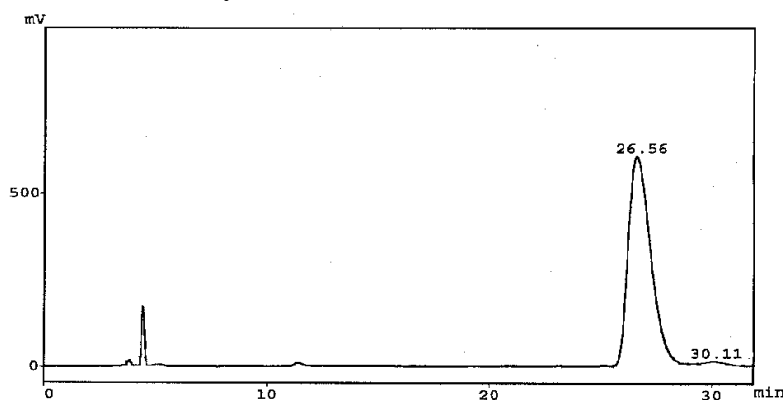


Figura 1.6.

1.2.6. REACCIÓN DE ACILACIÓN ENZIMÁTICA SOBRE OTROS PIPERINCARBINOLES *N*-SUSTITUIDOS

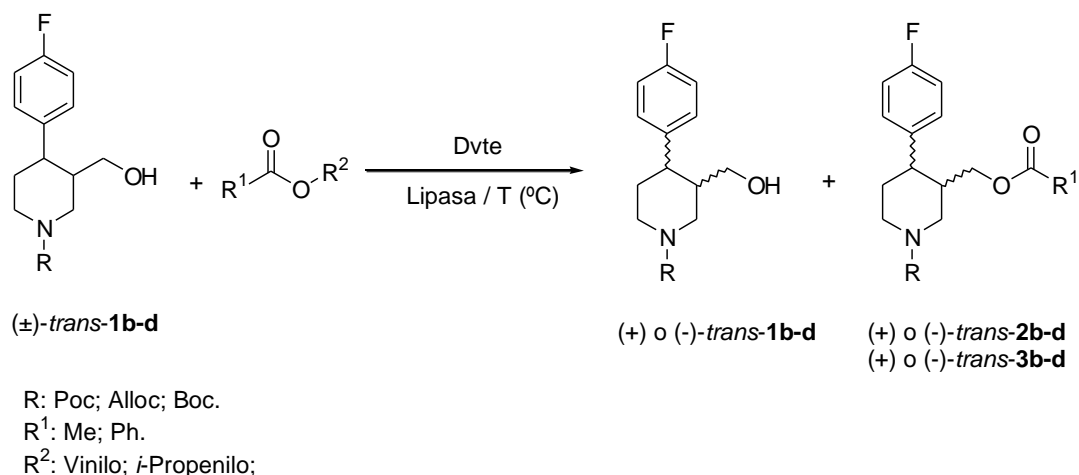
Una vez conseguidas las mejores condiciones para la resolución enzimática de (\pm)-*trans*-**1a**, éstas se aplicaron a la resolución de otros piperidincarbinos *N*-protegidos, examinando así la influencia de la estructura del sustrato en el proceso enzimático (esquema 1.27, tabla 1.9).

Para ello, se decidió proteger el aminoalcohol libre (\pm)-*trans*-**XII** con diferentes grupos carbamatos, como el feniloxycarbonilo (Poc) [(\pm)-*trans*-**1b**], el aliloxycarbonilo (Alloc) [(\pm)-*trans*-**1c**] y el *tert*-butoxycarbonilo (Boc) [(\pm)-*trans*-**1d**]. El piperidincarbinol (\pm)-*trans*-**XII** se hizo reaccionar con el correspondiente cloroformiato o dicarbonato (en el caso del grupo Boc).

Estos derivados son resueltos por reacciones de acilación con acetato de vinilo catalizadas por la CAL-A en tolueno, tanto a 15°C como a 30°C con excelentes enantioselectividades y velocidades de reacción. El uso de acetato de isopropenilo en tolueno a 30°C provoca una significativa disminución tanto de la velocidad de reacción como de las razones enantioméricas obtenidas. Cuando se utiliza benzoato de vinilo en tolueno a 30°C, la CAL-A cataliza las reacciones de benzoilación con muy bajas enantioselectividades y velocidades de reacción.

La lipasa CAL-B presenta una menor enantiodiscriminación con acetato de vinilo a 30°C, a pesar de que las reacciones transcurren a mayores velocidades de reacción que sus análogos con la CAL-A. Sin embargo, es especialmente ventajoso llevar a cabo las resoluciones con benzoato de vinilo (10 equivalentes) en tolueno a 30 °C, pues en todos los casos se consiguen elevadas razones enantioméricas que permiten recuperar el aminoalcohol de la configuración deseada (*3S,4R*)-**1b-d** prácticamente enantiopuro a conversiones cercanas al 50%.

Se debe destacar la mayor velocidad de reacción para la acilación en el caso del derivado aliloxycarbonil (\pm)-*trans*-**1c** en todas las condiciones probadas. La menor demanda estérica de este grupo protector permitiría a la molécula enlazarse más fácilmente al centro activo del enzima, generando por tanto procesos más rápidos que con los restantes grupos protectores.



Esquema 1.27.

Tabla 1.9. Reacciones de acetilación enzimática sobre (±)-*trans*-**1b-d** a diferentes condiciones de reacción con 10 equivalentes de agente acilante.

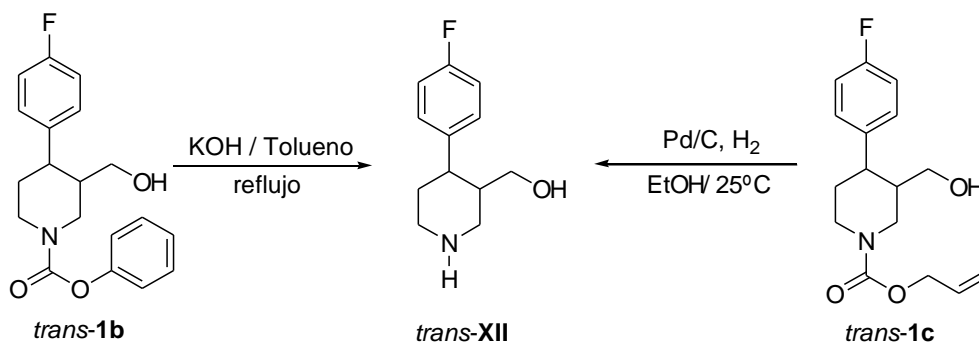
Entrada	Lipasa	R	R ¹	R ²	T (°C)	t (h)	c (%)	<i>trans</i> -	<i>trans</i> -	E
								1b-d	2,3b-d	
								<i>ee</i>	<i>ee</i>	
								(%) ^a	(%) ^a	
1	CAL-A	Poc	Me	Vinilo	30	6	51	97	92	101
2	CAL-A	Poc	Me	Vinilo	15	10	47	84	96	131
3	CAL-A	Poc	Me	<i>i</i> propenilo	30	6	40	64	95	76
4	CAL-B	Poc	Me	Vinilo	30	6	55	99	80	46
5	CAL-B	Poc	Ph	Vinilo	30	9	48	88	95	114
6	CAL-A	Alloc	Me	Vinilo	30	1	45	77	94	75
7	CAL-A	Alloc	Me	Vinilo	15	2	32	46	97	103
8	CAL-A	Alloc	Me	<i>i</i> propenilo	30	2	27	35	93	38
9	CAL-B	Alloc	Me	Vinilo	30	1	57	91	68	16
10	CAL-B	Alloc	Ph	Vinilo	30	2	45	37	98	142
11	CAL-A	Boc	Me	Vinilo	30	2	38	59	96	89
12	CAL-A	Boc	Me	Vinilo	15	5	22	28	98	130
13	CAL-A	Boc	Me	<i>i</i> propenilo	30	5	25	36	95	55
14	CAL-B	Boc	Me	Vinilo	30	1	34	48	93	44
15	CAL-B	Boc	Ph	Vinilo	30	7	45	78	96	116

^a Excesos enantioméricos determinados mediante HPLC.

1.2.6.1. Asignación de las configuraciones absolutas.

La metodología empleada para determinar las configuraciones absolutas de los piperidincarbinolos *trans*-**1b** y *trans*-**1c** es la misma que la utilizada en el apartado 1.2.4 del presente capítulo, consistente en la desprotección de los piperidincarbinolos *N*-protegidos para generar el aminoalcohol libre *trans*-**XII** y la comparación de los signos de rotación específica medidos con el descrito en la literatura para este compuesto.

El grupo feniloxicarbonilo es fácilmente eliminado por tratamiento del compuesto *trans*-**1b** con KOH en tolueno a reflujo, con un rendimiento del 64%. El derivado *trans*-**1c** se desprotege por hidrogenólisis catalizada por Pd/C, al igual que el derivado *trans*-**1a** (esquema 1.28). En este caso el rendimiento fue del 80%.



Esquema 1.28.

La configuración absoluta del aminoalcohol *trans-1d* se asigna por la comparación de su signo de rotación específica con el descrito en la bibliografía para este compuesto.

En la tabla 1.10 se muestra la comparación entre las rotaciones específicas para los piperidincarbinolos.

Tabla 1.10. Comparación entre las rotaciones específicas halladas y publicadas para los piperidincarbinolos.

Compuesto	$[\alpha]_D^{25}$	$[\alpha]_D^{20-22}$ publicado
<i>trans-XII</i> (1b) ^a	+ 32.4 (c 0.8, EtOH (95), 97% <i>ee</i> , 3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)	-38.1 (c 0.5, EtOH (95), 99% <i>ee</i> , 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>) ¹⁵⁴
<i>trans-XII</i> (1c) ^b	+ 26.9 (c 0.5, EtOH (95), 77% <i>ee</i> , 3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)	-38.1 (c 0.5, EtOH (95), 99% <i>ee</i> , 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>) ¹⁵⁴
<i>trans-1d</i> ^c	-5.2 (c 0.91, MeOH, 98% <i>ee</i> , 3 <i>S</i> , 4 <i>R</i>)	-6.8 (c 1.75, MeOH, 99% <i>ee</i> , 3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>) ^{109b}

^a Compuesto *trans-1b* obtenido en el proceso descrito en tabla 1.9 (entrada 1). ^b *trans-1c* obtenido en la resolución de la tabla 1.9 (entrada 6). ^c *trans-1d* obtenido en las condiciones de la entrada 15 de la tabla 1.9 a conversiones mayores del 51%.

Una vez establecida la configuración de los piperidincarbinolos *trans-1b-d*, queda asignada la configuración absoluta de los acetatos *trans-2b-d* y los benzoatos *trans-3b-d*.

1.2.6.2. Determinación de los excesos enantioméricos.

Para la determinación de los excesos enantioméricos de los sustratos y los productos tanto de acetilación como de benzoilación se determinaron mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En primer lugar, se realizó el análisis con los correspondientes compuestos racémicos empleando una columna de relleno quiral (Chiralcel OD) a una longitud de onda (λ) de 215 nm. Los acetatos racémicos (\pm)-*trans-2b-d* se preparan por tratamiento de los correspondientes alcoholes (\pm)-*trans-1b-d* con anhídrido acético y piridina en CH_2Cl_2 . Los racematos *O*-benzoilados (\pm)-*trans-3b-d* se sintetizan por reacción de los piperidincarbinolos con cloruro de benzoilo y piridina en CH_2Cl_2 . En todos los casos, se obtuvieron resoluciones (R_S) mayores de 1.6. En la tabla 1.11 se muestran las condiciones experimentales de los análisis.

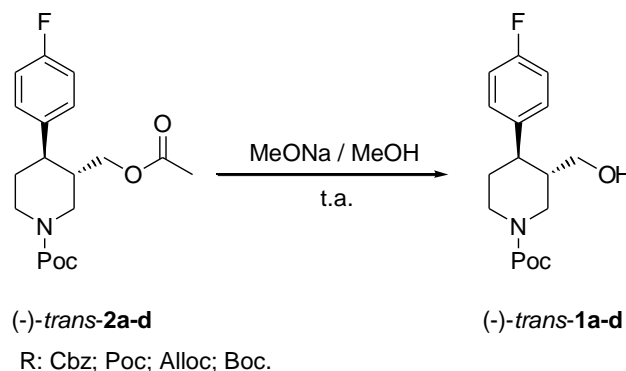
Tabla 1.11. Condiciones experimentales de los análisis mediante HPLC para la determinación de los *ees*.

Compuesto	Condiciones ^a	<i>t_R1</i>	<i>t_R2</i>	<i>R_S</i>
<i>trans</i> - 1b	<i>n</i> -Hex/IPA (90:10) 0.8 mL/min	28.36 (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)	44.33 (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)	5.9
<i>trans</i> - 1c	<i>n</i> -Hex/IPA (95:5) 0.8 mL/min 28°C	33.49 (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)	42.50 (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)	3.6
<i>trans</i> - 1d	<i>n</i> -Hex/IPA (97:3) 0.5 mL/min	39.00 (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)	43.38 (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)	2.3
<i>trans</i> - 2b	<i>n</i> -Hex/IPA (90:10) 0.8 mL/min	23.45 (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)	33.34 (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)	5.7
<i>trans</i> - 2c	<i>n</i> -Hex/IPA (95:5) 0.8 mL/min	16.48 (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)	19.70 (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)	2.2
<i>trans</i> - 2d	<i>n</i> -Hex/IPA (97:3) 0.5 mL/min	16.29 (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)	18.78 (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)	2.4
<i>trans</i> - 3b	<i>n</i> -Hex/IPA (90:10) 0.6 mL/min	33.43 (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)	41.52 (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)	1.9
<i>trans</i> - 3c	<i>n</i> -Hex/IPA (95:5) 0.8 mL/min	16.45 (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)	18.74 (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)	2.3
<i>trans</i> - 3d	<i>n</i> -Hex/IPA (99:1) 0.3 mL/min	58.34 (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)	63.00 (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)	1.7

^a En todos los casos la concentración de las muestras es de 0.25 a 1.0 mg/mL y la temperatura de análisis de 28°C.

1.2.7. OBTENCIÓN DE LOS (3*S*,4*R*)-PIPERIDINCARBINOLES *N*-PROTEGIDOS Y ESTUDIO CINÉTICO.

Como ya se ha comentado, la lipasa de CAL-A acila preferentemente el enantiómero de configuración (3*S*,4*R*), que es el de configuración adecuada para completar la síntesis de (-)-paroxetina. Por lo tanto, es necesario un paso adicional de síntesis para hidrolizar los *O*-acetatos (3*S*,4*R*)-**2a-d** y los *O*-benzoatos (3*S*,4*R*)-**3a-d** y convertirlos en los correspondientes alcoholes (3*S*,4*R*)-**1a-d**. Esta hidrólisis se realiza por tratamiento de los ésteres en una mezcla metóxido de sodio/ metanol con elevados rendimientos.

**Esquema 1.29.**

Para las resoluciones desarrolladas con la CAL-B y el resto de lipasas, no es necesario este paso adicional, pues estos enzimas catalizan la acilación de los enantiómeros (3*R*,4*S*)-**2a-d** y (3*R*,4*S*)-**3a-d**, aislando los sustratos de la configuración adecuada (3*S*,4*R*)-**1a-d**.

En las resoluciones cinéticas, es necesario determinar cual es el momento más adecuado para detener la reacción, de manera que se puedan obtener tanto el sustrato como el producto con elevados excesos enantioméricos. Para ello, se ha analizado el transcurso de las acilaciones sobre el derivado protegido con el grupo feniloxicarbonilo (\pm)-*trans*-**1b** con las dos lipasas con las que se obtienen los mejores resultados. Por un lado, la transesterificación con acetato de vinilo en tolueno a 15°C catalizada por la CAL-A y por otro, la acilación con benzoato de vinilo en tolueno a 30°C catalizada por la CAL-B. En ambos casos, se tomaron muestras del crudo de reacción a diferentes tiempos de reacción para la determinación de los excesos enantioméricos de sustrato y producto mediante HPLC. En la tabla 1.12 se muestran los resultados para la acetilación enzimática catalizada por la CAL-A.

Tabla 1.12. Estudio de la cinética de la reacción catalizada por CAL-A, en tolueno a 15°C con 10 equivalentes de acetato de vinilo.

Entrada	t (h)	c (%)	(+)- <i>trans</i> - 1b	(-)- <i>trans</i> - 2b	E
			<i>ee</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^a	
1	0.5	10	10.1	98.3	130
2	1	19	23.0	98.0	124
3	2	31	43.2	97.6	126
4	4	39	57.6	97.1	121
5	6	42	72.0	96.5	121
6	8	46	82.4	95.9	123

^a Medidos mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

En esta resolución, nos interesa conocer sobre todo la evolución del exceso enantiomérico del producto (*3S,4R*)-**2b** con la conversión, ya que éste es el que presenta la configuración deseada. Como se observa en la tabla 1.10 y en el gráfico 1.3, es posible conseguir dicho producto con un *ee*=97% si detenemos la reacción a las 4 horas, con una conversión del 39%.

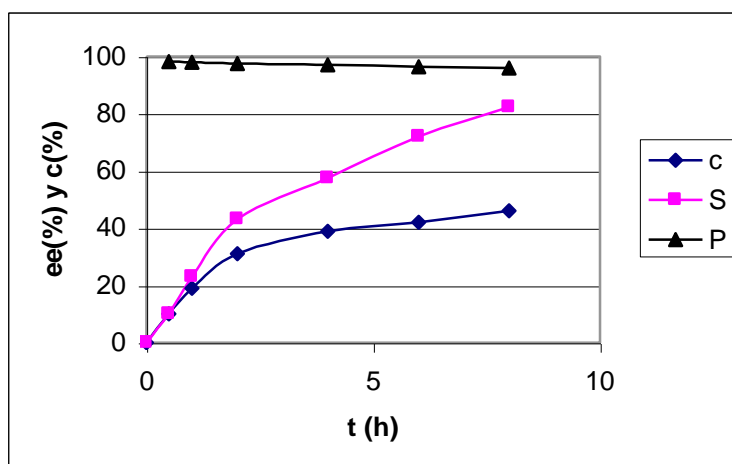


Gráfico 1.2. Variación a lo largo del tiempo de los excesos enantioméricos de sustrato y producto y de la conversión en la resolución de (\pm)-*trans*-**1b** con 10 equiv. de acetato de vinilo, en tolueno a 15°C, catalizada por la CAL-A.

Para la reacción de acilación con la CAL-B con benzoato de vinilo, los resultados del estudio se describen en la tabla 1.13.

Tabla 1.13. Estudio cinético de la acilación catalizada por CAL-B en tolueno a 30°C con 10 equivalentes de benzoato de vinilo.

Entrada	t (h)	c (%)	(-)- <i>trans</i> - 1b	(+)- <i>trans</i> - 3b	<i>E</i>
			<i>ee</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^b	
1	1	19	23.5	97.9	119
2	2	30	42.1	97.4	115
3	4	38	58.8	96.8	112
4	6	44	76.4	96.0	113
5	9	48	88.2	94.9	112
6	12	51	97.9	92.6	118

^a Determinados mediante HPLC.

Cuando se utiliza la CAL-B para la resolución, es importante conocer a que conversión es necesario detener la reacción para conseguir el sustrato (3*S*,4*R*)-**1b** con elevada pureza óptica. Según los resultados obtenidos, a las 12 horas de reacción es posible aislar este sustrato con un exceso enantiomérico del 97.9%, con una conversión del 51% (gráfico 1.4). A partir de conversiones del 53%, se puede obtener el sustrato prácticamente enantiopuro (*ee*>99%).

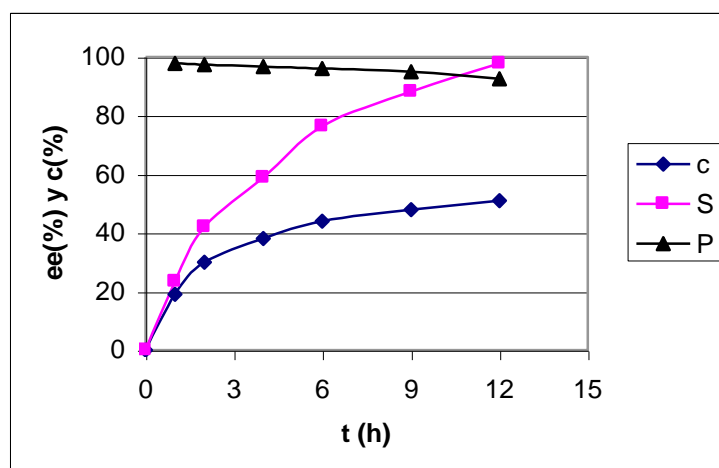
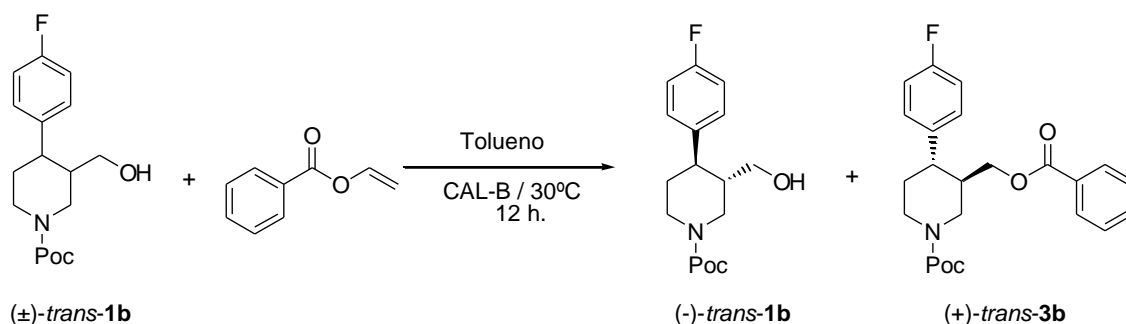


Gráfico 1.3. Variación con el tiempo de los excesos enantioméricos de sustrato y producto y de la conversión en la resolución de (±)-*trans*-**1b** con 10 equiv. de benzoato de vinilo, en tolueno a 30°C, catalizada por la CAL-B.

1.2.8. ESTUDIOS DE REUTILIZACIÓN DEL BIOCATALIZADOR.

El objetivo final de los estudios realizados consiste en desarrollar el proceso biocatalítico a escala industrial. Es necesario conocer como se va a modificar la actividad y la selectividad del biocatalizador a lo largo de sucesivos ciclos de reacción para aprovechar su máxima capacidad.

El estudio del reciclaje enzimático se realiza con la lipasa de CAL-B en tolueno a 30°C, empleando como agente de acilación benzoato de vinilo (esquema 1.30). En este proceso, que presenta una elevada enantioselectividad, es posible conseguir el sustrato remanente (3*S*,4*R*)-**1b** con excesos enantioméricos mayores del 97% deteniendo la reacción a conversiones cercanas al 50%.



Esquema 1.30.

En primer lugar se analiza la influencia de la concentración de benzoato de vinilo en la resolución, puesto que el subproducto formado por el grupo saliente de éste (acetaldehído), puede interaccionar con determinados aminoácidos de la lipasa, provocando una importante pérdida en sus propiedades biocatalíticas. Se realizaron dos acilaciones en las condiciones ya descritas, empleando 2 y 5 equivalentes de benzoato de vinilo y deteniendo las reacciones a las 12 horas (tabla 1.14). En ambos casos, los procesos transcurren con las mismas enantioselectividades que cuando se emplean 10 equivalentes, aunque se produce un importante descenso en la velocidad de la acilación.

Tabla 1.14. Reacciones de acilación enzimática sobre (\pm) -*trans*-**1b** en tolueno a 30°C con diferentes cantidades de benzoato de vinilo.

Entrada	nº eq.	<i>c</i> (%)	<i>(-)</i> - <i>trans</i> - 1b	<i>(+)</i> - <i>trans</i> - 3b	<i>E</i>
			<i>ee</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^a	
1	2	11	98	10	111
2	5	33	97	49	107

^a Análisis de los excesos enantioméricos mediante HPLC.

Una vez decidida la mejor concentración de benzoato de vinilo (10 equivalentes), se inicia el estudio de la reutilización del biocatalizador. Las reacciones se detienen a las 12 horas y la lipasa se filtra y se lava con tolueno seco para ser utilizada en un nuevo proceso de acilación. Los resultados se recogen en la tabla 1.15.

Tabla 1.15. Reciclaje enzimático en la reacción catalizada por CAL-B en tolueno a 30°C con 10 equivalentes de benzoato de vinilo.

Entrada	Ciclo	<i>c</i> (%)	<i>(-)</i> - <i>trans</i> - 1b	<i>(+)</i> - <i>trans</i> - 3b	<i>E</i>
			<i>ee</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^a	
1	1º	51	97.9	92.6	118
2	2º	48	87.7	95.1	115
3	3º	44	75.6	95.9	109
4	4º	37	56.7	96.4	97
5	5º	28	37.6	96.3	77

^a Medidos mediante HPLC.

Como puede observarse en el gráfico 1.5, la lipasa va perdiendo con los sucesivos usos su actividad, inicialmente de un modo más suave y después más pronunciadamente hasta que en el quinto ciclo catalítico se consigue una conversión bastante inferior a la obtenida en el primer ciclo. En cuanto a la selectividad del biocatalizador, en los tres primeros ciclos ésta se mantiene sin variaciones muy significativas, mientras que en los dos reciclados posteriores se produce un descenso en la razón enantiomérica de la acilación. A pesar de ello, la enantioselectividad obtenida en el quinto ciclo es suficiente para conseguir el sustrato (3*S*,4*R*)-**1b** con *ee*>97% para

conversiones mayores del 52%, con lo que aún podría utilizarse esta lipasa para nuestros fines sintéticos.

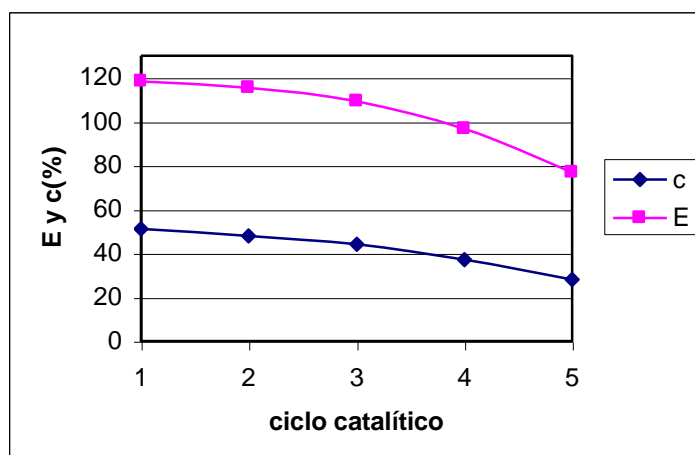


Gráfico 1.4. Efecto de la reutilización del biocatalizador en la enantioselectividad y en la conversión en la benzoilación enzimática de (\pm)-*trans*-**1b** con 10 equiv. de benzoato de vinilo, en tolueno a 30°C, catalizada por la CAL-B

Por lo tanto, tras un estudio minucioso de ciertos factores que influyen en las reacciones de acilación enzimática de alcoholes, hemos conseguido desarrollar una serie de metodologías escalables a nivel industrial, que permiten obtener los piperidincarbinos (*3S,4R*)-**1a-d**, precursores de (-)-paroxetina, con elevados excesos enantioméricos.

1.3. CONCLUSIONES

En el presente capítulo se ha desarrollado el estudio de la resolución enzimática de dos precursores del antidepresivo (-)-paroxetina.

En el caso del imidoéster (\pm)-trans-3-etoxicarbonil-4-(4'-fluorfenil)piperidin-2,6-diona, la resolución no resultó eficaz a pesar de haber realizado un exhaustivo estudio de diferentes procesos de resolución enzimática como hidrólisis, aminólisis, amonólisis y alcoholólisis, empleando diferentes biocatalizadores e incluso variando parámetros de reacción tales como disolvente, temperatura y concentración de nucleófilo.

Los resultados obtenidos en la hidrólisis en medio orgánico de (\pm)-trans-3-acetoxi-N-benciloxicarbonil-4-(4'-fluorfenil)piperidina utilizando varias lipasas son poco satisfactorios, puesto que variando las condiciones de reacción sólo es posible obtener elevadas enantioselectividades empleando hexano como disolvente en la resolución catalizada por la CAL-A. Sin embargo, los tiempos de reacción son muy largos.

En cambio, la modificación de los diversos parámetros que influyen en la selectividad de las reacciones de acilación enzimática catalizadas por lipasas, como el biocatalizador, el disolvente, la temperatura y el agente acilante, permiten obtener de manera enantiopura las (3S,4R)-trans-4-(4'-fluorfenil)-3-hidroximetilpiperidinas N-sustituídas, precursoras de (-)-paroxetina. En general, las mejores condiciones para las resoluciones catalizadas por la CAL-A se logran en tolueno, a 15°C, con acetato de vinilo como agente acilante. En las acilaciones catalizadas por la CAL-B, las mayores selectividades se obtienen empleando tolueno como disolvente, 30°C y benzoato de vinilo como donador de acilo.

Es interesante destacar que ambas lipasas presentan una enantiodiscriminación opuesta. Así, con la CAL-A se acila preferentemente el (3S,4R), por lo que es necesario un paso adicional de hidrólisis para obtener los (3S,4R)-piperidincarbinoles N-protegidos.

La modificación del grupo protector de los piperidincarbinoles no afecta de manera significativa a la selectividad de las resoluciones. Sin embargo, los procesos de acilación son mucho más rápidos con el grupo aliloxicarbonilo que con el resto de grupos protectores, posiblemente debido a su menor demanda estérica.

También ha sido comprobada la influencia de la reutilización del enzima en la selectividad de la resolución de la (\pm)-trans-N-feniloxicarbonil-4-(4'-fluorfenil)-3-hidroximetilpiperidina con CAL-B en tolueno a 30°C y 10 equivalentes de benzoato de vinilo. El enzima se puede emplear durante cuatro ciclos catalíticos sin una pérdida apreciable de sus propiedades biocatalíticas.

1.4. PARTE EXPERIMENTAL

1.4.1 REACTIVOS Y DISOLVENTES.

La lipasa de *Candida antarctica* B (CAL-B, Novozym 435) y la lipasa de *Mucor miehei* (MML, LIPOZYME IM-20) fueron donadas por Novo Nordisk Co. Las lipasas de *Pseudomonas Cepacia* (PSL, CHIRAZYME L-1), de *Candida rugosa* (CRL, CHIRAZYME L-3), de *Candida antarctica* A (CAL-A, CHIRAZYME L-5) y de *Thermomyces lanuginosa* (TLL, CHIRAZYME L-8) son comercializadas por Roche Molecular Biochemicals. La lipasa de páncreas de cerdo (PPL) fue adquirida a Sigma. La lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada (PS-C, Amano II) es un producto de Amano Pharmaceutical Co., mientras que la lipasa de *Rhizopus niveus* (RNL) y la esterase de *Rhizomucor miehei* (esterasa RM) son productos de Jülich Fine Chemicals.¹⁵⁵

Todos los reactivos empleados fueron adquiridos a Aldrich, Sigma, Merck, Fluka o Panreac y se utilizaron sin tratamientos previos.

Los disolventes utilizados, de grado técnico, se secaron antes de ser usados, se recogieron y se almacenaron bajo atmósfera inerte. Los disolventes de grado HPLC *n*-hexano e isopropanol fueron adquiridos a Romil Co.

1.4.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS.

Cromatografía en gel de sílice

Para la cromatografía en capa fina se utilizaron cromatofolios de gel de sílice POLYGRAM SIL G/UV₂₅₄ (0.25 mm de espesor), comercializados por Merck. Se empleó como revelador una disolución acuosa de 1% (p/v) de KMnO₄, 5% de K₂CO₃ y 5% de KOH, Como eluyentes se emplearon las mezclas descritas en los apartados correspondientes a los procedimientos generales de preparación de compuestos. La cromatografía en columna¹⁵⁶ se realizó usando gel de sílice 60 (230-400 mesh) adquirido a Merck.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La determinación de los excesos enantioméricos de sustratos y productos de las resoluciones enzimáticas se realizó mediante HPLC empleando un Shimadzu LC-10AD equipado con una columna de relleno quiral CHIRALCEL OD (25 x 0.46 cm; Daicel). Para su cuantificación se empleó un detector de fotodiodos SPD-M10A en el canal de 215 nm.

Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN), carbono (¹³C-RMN), así como las secuencias de pulsos DEPT se realizaron con los espectrómetros Bruker AC 200 (¹H 200.13 MHz y ¹³C 50.3 MHz), Bruker AC 300 (¹H 300.13 MHz y ¹³C 75.4 MHz) y DPX 300 (¹H 300.13 MHz y ¹³C 75.4 MHz). Los desplazamientos químicos se dan en valores de δ , en partes por millón (ppm) referidas al desplazamiento químico de tetrametilsilano (TMS) cuando el espectro ha sido registrado en CDCl₃.

¹⁵⁵ Actividad de los enzimas, A: CAL-B (A> 7000 U/g), MML (A= 27.9 U/mg), PSL (A> 10 KU/g), CRL (A> 250 U/mg), CAL-A (A> 1 KU/g), PPL (A= 46 U/mg), PS-C (A> 1000 U/g), RNL (A=30.1 U/mg) y esterase RM (A= 25 KU/mL).

¹⁵⁶ W. C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.* **1978**, 43, 2923-2925.

Espectroscopia de infrarrojo (IR)

Los espectros de IR fueron realizados en un Perkin-Elmer 1720-X FT o bien en un ATI Mattson Genesis serie FTIR. Las muestras se prepararon en pastillas de KBr. Las bandas de tensión se indican en valores de $\nu_{\text{máxima}}$ y se expresan en cm^{-1} .

Espectroscopia de masas (EM)

Los espectros de masas se realizaron en un equipo MAT 95 de Finnigan cuando se realizaron mediante la técnica de impacto electrónico (IE) a 70 eV. Para los experimentos de electroespray (ESI^+) se empleó un equipo Hewlett-Packard modelo 1100, LC/MSD. Los valores están referidos a unidades de masa atómica (uma).

Rotación específica $[\alpha]_{\text{D}}^{\text{T}}$

La rotación específica de los compuestos quirales fue medida en un polarímetro “Perkin-Elmer 241” (unidades: $10^{-1} \text{ deg.cm}^2.\text{g}^{-1}$).

Puntos de fusión (P_f)

Los puntos de fusión de los compuestos sólidos se midieron en tubos capilares abiertos, en un aparato Gallenkamp y no fueron corregidos.

1.4.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS Y DATOS EXPERIMENTALES.

1.4.3.1. Procedimiento general para la hidrólisis enzimática de (\pm)-*trans*-3-etoxicarbonil-4-(4'-fluorofenil)piperidin-2,6-diona, (\pm)-*trans*-XV.

Método 1

Sobre una disolución de (\pm)-*trans*-XV (0.36 mmol, 1 equiv.) en 6 mL del disolvente correspondiente, se adiciona agua (10, 50 ó 100 equiv.) y el biocatalizador.¹⁵⁷ La reacción se agita bajo agitación orbital de 250 r.p.m. a la temperatura correspondiente.

Método 2

En un embudo de extracción se lavan 5 mL de *t*BuOMe con una disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{HCl}$ 1.0 N de pH 7 (4 x 15 mL). Sobre la suspensión formada por la fase orgánica saturada y el enzima se adiciona el imidoéster (\pm)-*trans*-XV (0.18 mmol, 1 equiv.). El sistema se agita orbitalmente a 250 r.p.m. a la temperatura seleccionada.

1.4.3.2. Procedimiento general para la aminólisis enzimática de (\pm)-*trans*-3-etoxicarbonil-4-(4'-fluorofenil)piperidin-2,6-diona, (\pm)-*trans*-XV.

En un erlenmeyer bajo atmósfera inerte se adiciona (\pm)-*trans*-XV (0.18 mmol, 1 equiv.) sobre una suspensión del disolvente (6 mL), la lipasa y la amina correspondiente (1, 5 ó 10 equiv.). La mezcla se deja reaccionar a la temperatura seleccionada mediante agitación orbital de 250 r.p.m.

1.4.3.3. Reacción de alcoholisis enzimática sobre (\pm)-*trans*-XV.

El procedimiento empleado es análogo al descrito para la reacción de aminólisis enzimática, empleando en este caso 5 ó 10 equivalentes de butanol o 2-feniletanol.

¹⁵⁷ La cantidad de enzima añadida en cada resolución ha sido optimizada en nuestro grupo de investigación: PS-C (110 mg); CAL-A, CAL-B, CRL (125 mg); PSL (160 mg), TLL (200 mg); PPL, RNL (500 mg), MML (600 mg), esterasa RM (50 μL).

1.4.3.4. Síntesis de (\pm)-*trans*-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxi metilpiperidina, (\pm)-*trans*-XII.

Bajo atmósfera de nitrógeno, se adiciona una disolución de (\pm)-*trans*-3-etoxicarbonil-4-(4'-fluorofenil)piperidin-2,6-diona, (\pm)-*trans*-XV (17.9 mmoles, 1 equiv.) en 50 mL de THF seco sobre una suspensión de LiAlH₄ (179 mmoles, 10 equiv.) en 100 mL de THF seco. El sistema se calienta a reflujo y se agita durante 6 horas. A continuación, se lleva a temperatura ambiente y se añaden 20 mL de H₂O y 5 mL de una disolución acuosa de NaOH al 10 %. La mezcla formada se agita por espacio de 12 horas. Transcurrido este tiempo, se filtra la reacción sobre celita y se extrae la fase acuosa con AcOEt (5 x 100 mL). Las fracciones orgánicas se unen, se secan sobre Na₂SO₄, se filtran y se evapora el disolvente a presión reducida, obteniendo así el piperidincarbinol como un sólido blanco que puede ser utilizado en posteriores reacciones sin purificación alguna.

1.4.3.5. Protección de (\pm)-*trans*-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxi metilpiperidina, (\pm)-*trans*-XII. Procedimiento general para los derivados benciloxicarbonilo, (\pm)-*trans*-1a, feniloxicarbonilo, (\pm)-*trans*-1b y aliloxicarbonilo, (\pm)-*trans*-1c.

Sobre una disolución de (\pm)-*trans*-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxi metilpiperidina, (\pm)-*trans*-XII (4.78 mmoles, 1 equiv.) en CH₂Cl₂ (15 mL), se añade agua destilada (15 mL) y Na₂CO₃ (19.12 mmoles, 4 equiv.). La mezcla resultante se enfría a 0 °C con baño de hielo y se adiciona el correspondiente cloroformiato (bencilo y fenilo: 9.56 mmoles, 2 equiv., alilo: 5.74 mmoles, 1.2 equiv.), agitando la reacción durante 1 hora. Posteriormente, la mezcla se extrae con CH₂Cl₂ (3 x 50 mL). Las fracciones orgánicas se lavan con una disolución acuosa de NaHCO₃ al 5 %, se secan con Na₂SO₄, se filtran y se evapora el disolvente a presión reducida. El sólido obtenido se purifica por cromatografía en columna utilizando hexano/acetato de etilo 1:1 como eluyente, para obtener los correspondientes derivados *N*-protegidos.

1.4.3.6. Síntesis de (\pm)-*trans*-*N*-*tert*-butoxicarbonil-4-(4'-fluorofenil)-hidroxi metilpiperidina, (\pm)-*trans*-1d.

Sobre una disolución de (\pm)-*trans*-XII (4.78 mmoles, 1 equiv.) en 30 mL de acetonitrilo, se añaden 25 mg de 4-DMAP y dicarbonato de *ditert*-butilo (7.17 mmoles, 1.5 equiv.). La reacción se agita durante 8 horas a temperatura ambiente. Una vez concluido el proceso, se evapora el acetonitrilo, se adiciona CH₂Cl₂ y se lava con una disolución acuosa de NaHCO₃ al 5 %. La fase orgánica se seca con Na₂SO₄, se filtra y se evapora el disolvente a presión reducida. El sólido obtenido se purifica por cromatografía en columna utilizando hexano/acetato de etilo 1:1 como eluyente.

1.4.3.7. Procedimiento general para la acetilación química de los piperidincarbinos *N*-protegidos, (\pm)-*trans*-1a-d.

Sobre una disolución del correspondiente piperidincarbinol (\pm)-*trans*-1a-d (0.3 mmol, 1 equiv.) en CH₂Cl₂ seco (5 mL), se añaden, bajo atmósfera de nitrógeno, piridina (0.6 mmol, 2 equiv.) y anhídrido acético (0.6 mmol, 2 equiv.). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Una vez transcurrida, se adiciona más CH₂Cl₂ y se lava la mezcla de reacción con una disolución de HCl 1.0 N (3 x 15 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ y se evaporan disolventes. El éster obtenido (\pm)-*trans*-2a-d se purifica por cromatografía en columna utilizando hexano/acetato de etilo 1:1 como eluyente.

1.4.3.8. Reacción de benzoilación química de los aminoalcoholes *N*-protegidos, (\pm)-*trans*-1a-d.

El procedimiento a seguir es similar al descrito en la sección 1.4.3.7. Como agente de benzoilación se utiliza cloruro de benzoilo (0.6 mmol, 2 equiv.). Los productos obtenidos (\pm)-*trans*-3a-d se purifican por cromatografía en columna utilizando hexano/acetato de etilo 7:3 como eluyente.

1.4.3.9. Procedimiento general para la hidrólisis enzimática de (\pm)-*trans*-3-acetoximetil-*N*-benciloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)piperidina, (\pm)-*trans*-2a.

La mezcla de reacción formada por el piperidincarbinol acetilado (\pm)-*trans*-2a (0.25 mmol, 1 equiv.), H₂O (2.5 mmol, 10 equiv.) y la lipasa en el disolvente orgánico correspondiente, se agita a 30 °C y 250 r.p.m. en un agitador orbital. La reacción se sigue por TLC utilizando hexano/acetato de etilo 1:1. Una vez obtenida la conversión deseada, se filtra el enzima sobre placa, lavando con acetato de etilo y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, usando hexano/acetato de etilo 1:1 como eluyente.

1.4.3.10. Acilación enzimática de las (\pm)-*trans*-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxiacetilpiperidinas *N*-sustituidas, (\pm)-*trans*-1a-d.

A una disolución del alcohol correspondiente (\pm)-*trans*-1a-d (0.3 mmol, 1 equiv.) en 15 mL de disolvente orgánico se adiciona el agente acilante (3.0 mmol, 10 equiv., salvo que se especifique otra cantidad), y la lipasa correspondiente. La mezcla de reacción se incuba a la temperatura deseada con agitación orbital de 250 r.p.m.. La reacción se sigue por cromatografía de capa fina usando como eluyente hexano/acetato de etilo 1:1, hasta conseguir la conversión deseada. Una vez finalizada, se separa el enzima por filtración, lavando con acetato de etilo. El disolvente se evapora a presión reducida y el crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente una mezcla hexano/acetato de etilo 1:1.

1.4.3.11. Benzoilación enzimática de las (\pm)-*trans*-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxiacetilpiperidinas *N*-sustituidas, (\pm)-*trans*-1a-d.

El procedimiento a seguir es similar al descrito anteriormente. Como agente de acilación se utiliza benzoato de vinilo (10 eq, salvo que se describan otras cantidades). El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla de hexano/acetato de etilo 7:3.

1.4.3.12. Desprotección de (\pm)-*trans*-*N*-benciloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxiacetilpiperidina, (\pm)-*trans*-1a.

A una disolución de (\pm)-*trans*-1a. (2.91 mmol, 1 equiv.) en etanol (37 mL), se le adiciona el catalizador de Pd/C (300 mg) bajo atmósfera de hidrógeno. La reacción se sigue por TLC, utilizando hexano/acetato de etilo 1:1 como eluyente. Después de 24 horas, la mezcla resultante se filtra sobre celita y el disolvente se evapora a presión reducida para obtener el aminoalcohol libre como un sólido blanco.

1.4.3.13. Desprotección de (\pm)-*trans*-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxiacetil-*N*-feniloxycarbonilpiperidina, (\pm)-*trans*-1b.

A una disolución del compuesto (\pm)-*trans*-1b (3.04 mmol, 1 equiv.) en tolueno (30 mL) se le añade hidróxido potásico (13.68 mmol, 4.5 equiv.). El sistema se lleva a reflujo durante 24 horas y luego se enfría hasta temperatura ambiente. La mezcla resultante se lava con H₂O (2 x 15 mL) y una disolución saturada de NaHCO₃ (2 x 15

mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 y el disolvente se evapora a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, usando como eluyente una mezcla MeOH/NH_3 (ac) 99:1 para obtener el aminoalcohol como un sólido blanco.

1.4.3.14. Desprotección de (\pm)-*trans*-*N*-aliloxicarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxi metilpiperidina, (\pm)-*trans*-1c.

El procedimiento de reacción es el mismo al descrito en la sección 1.4.3.12 para el grupo benciloxicarbonilo. Después de 48 horas, la mezcla de reacción se filtra sobre celita, se lava con etanol y el disolvente se evapora a presión reducida para obtener el aminoalcohol libre como sólido blanco.

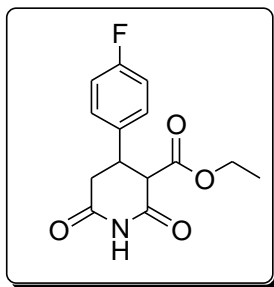
1.4.3.16. Hidrólisis química de los derivados acetilados, (\pm)-*trans*-2a-d.

Sobre una disolución de las correspondientes acetoximetilpiperidinas, (\pm)-*trans*-2a-d (2.6 mmoles, 1 equiv.) en metanol seco (60 mL) se adicionan a 0 °C 100 mL de una disolución de metóxido de sodio en metanol 0.2 M. La reacción se agita durante 1 hora a esta temperatura y a continuación se calienta hasta temperatura ambiente. Posteriormente, se añade la resina Dowex 50 x 4-400 hasta que el pH se sitúe entre 6-7. La resina se filtra, lavando con metanol y el disolvente se evapora a presión reducida para conseguir el correspondiente piperidincarbinol (\pm)-*trans*-1a-d con rendimientos del 78-88%.

1.4.3.17. Reciclaje enzimático en la resolución de (\pm)-*trans*-*N*-feniloxicarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxi metilpiperidina, (\pm)-*trans*-1b con benzoato de vinilo.

Se disuelve el alcohol (\pm)-*trans*-1b (0.3 mmol, 1 equiv.) en una suspensión de 12 mL de tolueno seco (12 mL), la lipasa CAL-B (120 mg) y el benzoato de vinilo (3.0 mmol, 10 equiv.). El sistema se incuba por agitación orbital de 250 r.p.m. a 30°C durante 12 horas. Una vez concluida la reacción, se filtra el enzima, lavándola varias veces con tolueno seco. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla hexano/acetato de etilo 7:3. La enzima se seca a vacío y se reutiliza en un nuevo proceso enzimática, siendo pesada para ajustar las cantidades de reactivos a las posibles pérdidas originadas en el proceso de reciclaje.

(±)-*trans*-3-Etoxicarbonil-4-(4'-fluorofenil)piperidin-2,6-diona, (±)-*trans*-**XV**



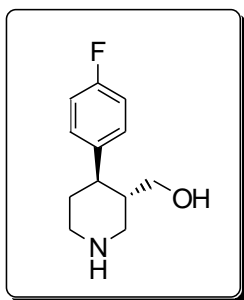
Fórmula molecular: C₁₄H₁₄FNO₄

Peso molecular (g/mol): 279.

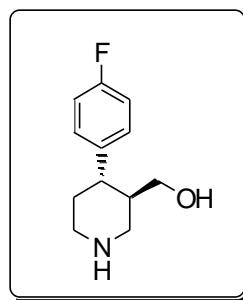
¹H-RMN (MeOD, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.26 (t, 3H, CH₃, ³*J*_{HH} 11.0), 2.88-3.19 (m, 2H, CH₂), 3.84 (td, 1H, CH, ³*J*_{HH} 4.8, ³*J*_{HH} 12.5), 4.16-4.27 (m, 3H, CH+CH₂), 7.25 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.7, ³*J*_{HFH} 8.7), 7.53 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.7, ⁴*J*_{HF} 5.4).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 13.8 (CH₃), 38.1 (CH₂), 38.5 (CH), 55.1 (CH), 61.9 (CH₂O), 116.1 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 21.6), 128.4 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 8.5), 133.9 (C_{arom}), 162.1 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 243.0 Hz), 167.0 (CO_{imida}), 168.2 (CO_{imida}), 170.1 (CO_{éster}).

 (±)-*trans*-4-(4'-Fluorofenil)-3-hidroximetilpiperidina, (±)-*trans*-**XII**

(3*S*,4*R*)-**XII**

Exceso enantiomérico: 95%

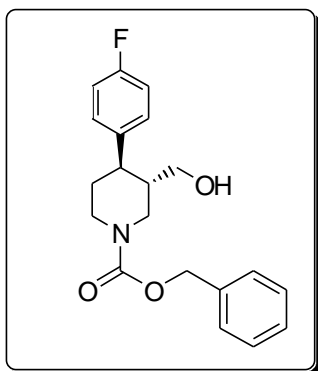
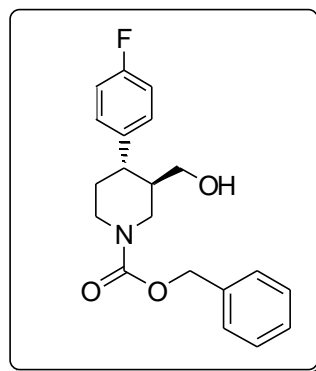
[α]_D²⁵ = -24.3 (c=0.46, MeOH)(3*R*,4*S*)-**XII**

Exceso enantiomérico: 98%

[α]_D²⁵ = +27.8 (c=0.64, MeOH)**Rendimiento:** 69 %.**Fórmula molecular:** C₁₂H₁₆FNO**Peso molecular** (g/mol): 209.

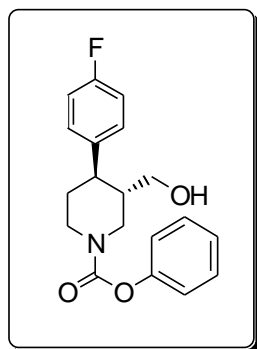
¹H-RMN (MeOD, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 2.15-2.22 (m, 2H, CH₂), 2.34-2.43 (m, 1H, CH), 2.96 (td, 1H, CH, ²*J*_{HH} 11.0, ³*J*_{HH} 5.5), 3.15-3.21 (m, 1H, CHHN), 3.28 (dd, 1H, CHHN, ²*J*_{HH} 5.0, ³*J*_{HH} 12.6), 3.38 (dd, 1H, CHHOH, ²*J*_{HH} 11.4, ³*J*_{HH} 7.0), 3.48 (dd, 1H, CHHOH, ²*J*_{HH} 11.4, ³*J*_{HH} 3.4), 3.64-3.69 (m, 1H, CHHN), 3.79-3.83 (m, 1H, CHHN), 7.25 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.6, ³*J*_{HF} 8.6), 7.50 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.6, ⁴*J*_{HF} 5.6).

¹³C-RMN (MeOD, 75.4 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 36.5 (CH₂), 45.8 (CH), 46.0 (CH), 47.8 (CH₂), 51.0 (CH₂), 64.1 (CH₂O), 116.6 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 21.0), 130.6 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 8.1), 142.3 (C_{arom}), 163.4 (d, CH_{arom}, ¹*J*_{CF} 242.0).

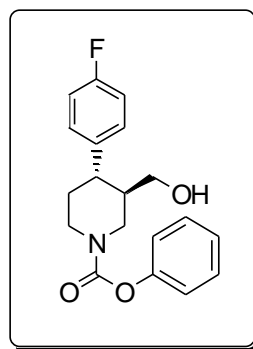
(±)-trans-N-Benciloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxi metilpiperidina, trans-1a**(3*S*,4*R*)-1a****Exceso enantiomérico:** 96%**[α]_D²⁵** = -3.5 (c=1.12, MeOH)**(3*R*,4*S*)-1a****Exceso enantiomérico:** 98%**[α]_D²⁵** = +3.5 (c=0.90, MeOH)**Rendimiento:** 56 %.**Fórmula molecular:** C₂₀H₂₂FNO₃**Peso molecular (g/mol):** 343.

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm) *J* (Hz): 1.40-1.50 (sa, 1H, OH), 1.70-1.90 (m, 3H, CH+CH₂), 2.58 (td, 1H, CH, ³*J*_{HH} 4.4, ³*J*_{HH} 11.6), 2.74-2.89 (m, 2H, 2CHHN), 3.27 (dd, 1H, CHHOH, ²*J*_{HH} 10.8, ³*J*_{HH} 6.4), 3.45 (dd, 1H, CHHOH, ²*J*_{HH} 10.8, ³*J*_{HH} 3.1), 4.27-4.33 (m, 1H, CHHN), 4.42-4.51 (m, 1H, CHHN), 5.18 (s, 2H, CH₂benc), 7.00 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.7, ³*J*_{HF} 8.7), 7.14 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.7, ⁴*J*_{HF} 5.4), 7.32-7.41 (m, 5H, 5CH_{arom}).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 33.9 (CH₂), 43.6 (CH), 43.7 (CH), 44.3 (CH₂), 47.0 (CH₂), 62.5 (CH₂benc), 67.0 (CH₂O), 115.3 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 20.3), 127.7 (CH_{arom}), 128.3 (CH_{arom}), 128.6 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 8.1), 128.7 (CH_{arom}), 136.5 (C_{arom}), 138.4 (C_{arom}), 155.2 (CO), 161.3 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 243.5).

(±)-trans-N-Feniloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxi metilpiperidina, (±)-trans-1b**(3*S*,4*R*)-1b**

Exceso enantiomérico= 96%.
 $[\alpha]_D^{25} = -3.5$ ($c = 0.71$, MeOH).

**(3*R*,4*S*)-1b**

Exceso enantiomérico= 98%.
 $[\alpha]_D^{25} = +3.9$ ($c = 1.36$, MeOH).

Sólido blanco.

Rendimiento (%): 68 %.

Fórmula molecular: C₁₉H₂₀FNO₃

Peso molecular (g/mol): 329.

Punto de fusión (°C): 129.5-130.4.

IR (KBr, cm⁻¹): 3435, 3015, 2948, 1704, 1604, 1509, 1476, 1215.

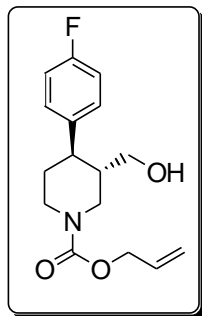
E.M. (ESI⁺) *m/z* (%): 368 [(M+K)⁺, 100], 352 [(M+Na)⁺, 62] and 330 [(M+H)⁺, 40].

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.64 (bs, 1H, OH), 1.71-1.96 (m, 3H, CH+CH₂), 2.56-2.71 (m, 1H, CH), 2.83-3.09 (m, 2H, 2CHHN), 3.25 (dd, 1H, CHHOH, ²*J*_{HH} 11.0, ³*J*_{HH} 6.5), 3.43 (dd, 1H, 1CHHOH, ²*J*_{HH} 11.0, ³*J*_{HH} 3.3), 4.39-4.61 (m, 2H, 2CHHN), 7.01 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.7, ³*J*_{HF} 8.7), 7.13-7.23 (m, 5H, 5CH_{arom}) and 7.37 (t, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.7).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 33.7 (CH₂), 43.5 (CH), 43.8 (CH), 44.7 (CH₂), 47.4 (CH₂), 62.4 (CH₂), 115.3 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 21.5), 121.5 (CH_{arom}, 125.1 (CH_{arom}), 128.5 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 7.9), 129.0 (CH_{arom}), 138.8 (C_{arom}), 151.0 (C_{arom}), 153.5 (CO) and 161.3 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 243.9 Hz).

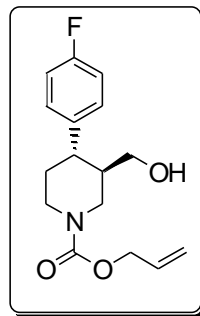
Anal. Elemental (%). Calculado para C₁₉H₂₀FNO₃: C, 69.29; H, 6.12; N, 4.25. Encontrado: C, 69.5; H, 6.0; N, 4.5.

(±)-*trans*-*N*-Aliloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroximetilpiperidina, (±)-*trans*-**1c**

(3*S*,4*R*)-**1c**

Exceso enantiomérico= 98%.

$[\alpha]_D^{25} = -7.5$ ($c = 1.14$, MeOH)

(3*R*,4*S*)-**1c**

Exceso enantiomérico= 98%.

$[\alpha]_D^{25} = +7.6$ ($c = 1.35$, MeOH).

Aceite incoloro.

Rendimiento (%): 63 %.

Fórmula molecular: C₁₆H₂₀FNO₃

Peso molecular (g/mol): 293.

IR (KBr, cm⁻¹): 3445, 3011, 2948, 1699, 1651, 1605, 1510, 1471, 1222.

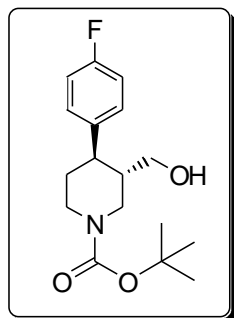
E.M. (ESI⁺) m/z (%): 316 [(M+Na)⁺, 100] and 294 [(M+H)⁺, 68]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), J (Hz): 1.60-1.85 (m, 4H, CH+CH₂+OH), 2.56 (td, 1H, CH, ³ J_{HH} 4.0, ³ J_{HH} 11.0), 2.72-2.91 (m, 2H, 2CHHN), 3.25 (dd, 1H, CHHOH, ² J_{HH} 11.2, ³ J_{HH} 6.8), 3.44 (dd, 1H, CHHOH, ² J_{HH} 11.2, ³ J_{HH} 3.3), 4.24-4.31 (m, 1H, CHHN), 4.40-4.49 (m, 1H, CHHN), 4.63 (d, 2H, CH₂alil, ³ J_{HH} 5.4), 5.23 (dd, 1H, CH_{vin}, ² J_{HH} 1.4, ³ J_{HH} 10.5), 5.33 (dd, 1H, CH_{vin}, ² J_{HH} 1.4, ³ J_{HH} 17.5), 5.97 (ddd, 1H, CH_{vin}, ³ J_{HH} 5.4, ³ J_{HH} 10.5, ³ J_{HH} 17.5), 7.00 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³ J_{HH} 8.7, ³ J_{HF} 8.7), 7.15 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³ J_{HH} 8.7, ⁴ J_{HF} 5.3).

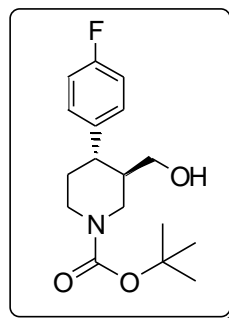
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm), J (Hz) : 33.8 (CH₂), 43.6 (CH), 43.7 (CH), 44.2 (CH₂), 46.9 (CH₂), 62.6 (CH₂), 65.9 (CH₂alil), 115.3 (d, CH_{arom}, ² J_{CF} 21.4), 117.2 (CH₂vin), 128.5 (d, CH_{arom}, ³ J_{CF} 8.5 Hz), 132.8 (CH_{vin}), 139.0 (C_{arom}), 155.0 (CO), 161.4 (d, C_{arom}, ¹ J_{CF} 243.5 Hz).

Anal. Elemental (%). Calculado para C₁₆H₂₀FNO₃: C, 65.51; H, 6.87; N, 4.77.
Encontrado: C, 65.4; H, 6.7; N, 4.9.

(±)-*trans*-*N*-*tert*-Butoxicarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxi metilpiperidina, (±)-*trans*-**1d**

(3*S*,4*R*)-**1d**

Exceso enantiomérico: 98%
 $[\alpha]_{\text{D}}^{18} = -5.2$ (c=0.91, MeOH)

(3*R*,4*S*)-**1d**

Exceso enantiomérico: 97%
 $[\alpha]_{\text{D}}^{18} = +5.1$ (c=1.13 MeOH)

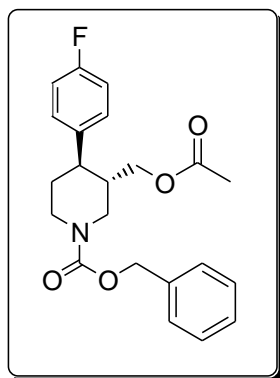
Rendimiento: 68 %.

Fórmula molecular: C₁₇H₂₄FNO₃

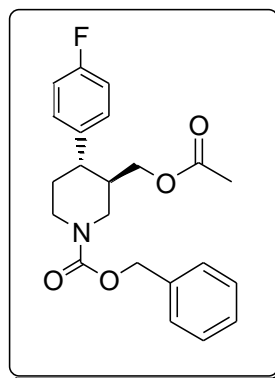
Peso molecular (g/mol): 309.

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.47 (s, 9H, 3CH₃), 1.53-1.81 (m, 4H, CH+CH₂+OH), 2.50 (td, 1H, CH, ³*J*_{HH} 4.2, ³*J*_{HH} 11.5), 2.64-2.81 (m, 2H, 2CHHN), 3.21 (dd, 1H, CHHOH, ²*J*_{HH} 11.1, ³*J*_{HH} 6.5), 3.41 (dd, 1H, CHHOH, ²*J*_{HH} 11.1 ³*J*_{HH} 3.2), 4.16-4.20 (m, 1H, CHHN), 4.33-4.37 (m, 1H, CHHN), 6.97 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.5, ³*J*_{HF} 8.5), 7.14 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.5, ⁴*J*_{HF} 5.4).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 28.3 (3CH₃), 33.9 (CH₂), 43.7 (CH), 43.9 (CH), 44.1 (CH₂), 46.7 (CH₂), 62.9 (CH₂), 79.6 (C), 115.4 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 20.8), 128.6 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 7.7), 139.4 (C_{arom}), 154.8 (CO), 161.4 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 243.5).

(±)-trans-3-Acetoximetil-N-benciloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)piperidina, (±)-trans-2a**(3S,4R)-2a**

Exceso enantiomérico: 98%
 $[\alpha]_D^{18} = -5.1$ (c=0.50, MeOH)

**(3R,4S)-2a**

Exceso enantiomérico: 96%
 $[\alpha]_D^{18} = +5.0$ (c=0.61, MeOH)

Sólido blanco.

Rendimiento: 93%.

Fórmula molecular: C₂₂H₂₄FNO₄

Peso molecular (g/mol): 387.

Punto de fusión (°C): 113.8-114.6.

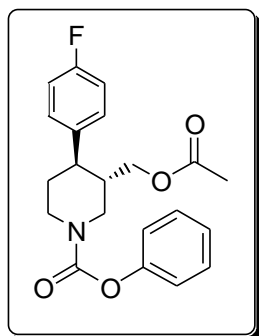
I.R. (KBr, cm⁻¹): 3014, 2943, 1732, 1691, 1651, 1605, 1510, 1470, 1222.

E.M. (ESI⁺) m/z (%): 424 [(M+K)⁺, 40], 408 [(M+Na)⁺, 100], 386 [(M+H)⁺, 5]

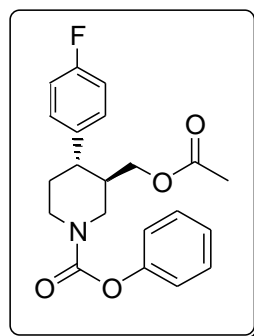
¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.65-1.83 (m, 2H, CH₂), 2.00-2.10 (m, 4H, CH+CH₃), 2.51 (td, 1H, CH, ³*J*_{HH} 4.0, ³*J*_{HH} 11.7), 2.62-2.74 (m, 1H, CHHN), 2.82-2.93 (m, 1H, CHHN), 3.65 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 11.5, ³*J*_{HH} 7.7), 3.85 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 11.5, ³*J*_{HH} 3.6), 4.29-4.44 (m, 2H, 2CHH-N), 5.18 (s, 2H, CH₂benc), 7.01 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.8, ³*J*_{HF} 8.8), 7.13 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.8, ⁴*J*_{HF} 5.4), 7.33-7.41 (m, 5H, 5CH_{arom}).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 20.7 (CH₃), 33.8 (CH₂), 40.5 (CH), 44.4 (CH), 44.5 (CH₂), 47.1 (CH₂), 64.5 (CH₂O), 67.2 (CH₂benc), 115.6 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 21.0), 127.7 (CH_{arom}), 128.1 (CH_{arom}), 128.5 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 8.1), 128.7 (CH_{arom}), 136.5 (C_{arom}), 138.2 (C_{arom}), 155.0 (CO_{carbamato}), 161.6 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 244.6), 170.8 (CO_{éster}).

Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₂H₂₄FNO₄: C, 68.56; H, 6.28; N, 3.63.
 Encontrado: C, 68.8; H, 6.4; N, 3.5.

(±)-trans-3-Acetoximetil-N-feniloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)piperidina, (±)-trans-2b**(3S,4R)-2b**

Exceso enantiomérico: 98%
 $[\alpha]_D^{18} = -5.0$ (c=0.73, MeOH)

**(3R,4S)-2b**

Exceso enantiomérico: 98%
 $[\alpha]_D^{18} = +5.0$ (c=0.73, MeOH)

Aceite incoloro

Rendimiento: 87%.

Fórmula molecular: C₂₁H₂₂FNO₄

Peso molecular (g/mol): 371.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3017, 2940, 1733, 1702, 1605, 1509, 1373, 1224.

E.M. (ESI⁺) m/z (%): 410 [(M+K)⁺, 100], 394 [(M+Na)⁺, 100], 372 [(M+H)⁺,

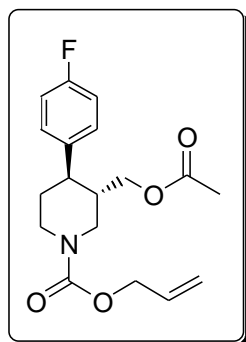
15]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.62-1.89 (m, 2H, CH₂), 2.02 (s, 3H, CH₃), 2.10-2.19 (m, 1H, CH), 2.58 (td, 1H, CH, ³*J*_{HH} 4.4, ³*J*_{HH} 11.3), 2.70-2.94 (m, 2H, 2CHHN), 3.70 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 11.5, ³*J*_{HH} 7.7), 3.85-3.92 (m, 1H, CHHO), 4.42-4.56 (m, 2H, 2CHH-N), 7.02 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.7, ³*J*_{HF} 8.7), 7.09-7.23 (m, 5H, 5CH_{arom}), 7.40 (t, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.6).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 20.4 (CH₃), 33.8 (CH₂), 40.7 (CH), 44.3 (CH), 44.7 (CH₂), 47.4 (CH₂), 64.3 (CH₂O), 115.3 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 21.4), 121.5 (CH_{arom}), 125.2 (CH_{arom}), 128.5 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 8.2), 129.1 (CH_{arom}), 137.9 (C_{arom}), 150.9 (C_{arom}), 153.3 (CO_{carbamato}), 161.3 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 245.0), 170.7 (CO_{éster})

Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₁H₂₂FNO₄: C, 67.91; H, 5.97; N, 3.77.
 Encontrado: C, 68.1; H, 5.8; N, 3.9.

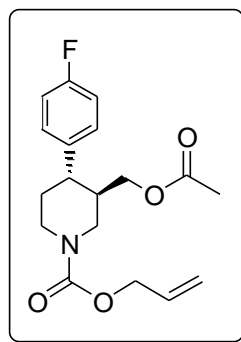
(±)-*trans*-3-Acetoximetil-*N*-aliloxicarbonil-4-(4'-fluorofenil)piperidina, (±)-*trans*-2c



(3*S*,4*R*)-2c

Exceso enantiomérico= 99%.

$[\alpha]_D^{25} = -9.5$ ($c = 0.98$, MeOH)



(3*R*,4*S*)-2c

Exceso enantiomérico= 98%.

$[\alpha]_D^{25} = +9.5$ ($c = 1.00$, MeOH).

Aceite incoloro.

Rendimiento (%): 89 %.

Fórmula molecular: C₁₈H₂₂FNO₄

Peso molecular (g/mol): 335.

IR (KBr, cm⁻¹): 3071, 2945, 1733, 1693, 1650, 1604, 1511, 1471, 1221.

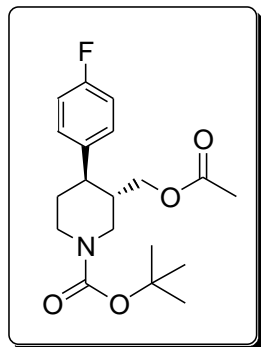
E.M. (ESI⁺) *m/z* (%): 316 [(M+Na)⁺, 100] and 294 [(M+H)⁺, 68]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.63-1.84 (m, 2H, CH₂), 2.00-2.10 (m, 4H, CH+CH₃), 2.50 (td, 1H, CH, ³*J*_{HH} 4.1, ³*J*_{HH} 11.5), 2.61-2.73 (m, 1H, CHHN), 2.79-2.93 (m, 1H, CHHN), 3.64 (dd, 1H, CHHOH, ²*J*_{HH} 11.5, ³*J*_{HH} 7.6), 3.84 (dd, 1H, CHHOH, ²*J*_{HH} 11.5, ³*J*_{HH} 3.3), 4.26-4.33 (m, 1H, CHHN), 4.35-4.44 (m, 1H, CHHN), 4.64 (d, 2H, CH₂alil, ³*J*_{HH} 5.5), 5.23 (dd, 1H, CH_{vin}, ²*J*_{HH} 1.4, ³*J*_{HH} 10.4), 5.34 (dd, 1H, CH_{vin}, ²*J*_{HH} 1.4, ³*J*_{HH} 17.1), 5.97 (ddd, 1H, CH_{vin}, ³*J*_{HH} 5.5, ³*J*_{HH} 10.4, ³*J*_{HH} 17.1), 7.00 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.6, ³*J*_{HF} 8.6), 7.12 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.6, ⁴*J*_{HF} 5.4).

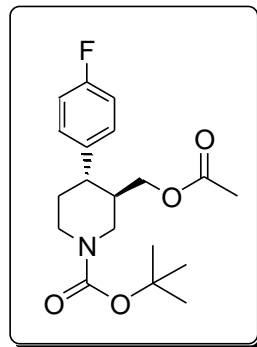
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm), *J* (Hz) : 20.9 (CH₃), 33.9 (CH₂), 40.7 (CH), 44.2 (CH₂), 44.5 (CH), 47.1 (CH₂), 64.5 (CH₂), 66.0 (CH₂alil), 115.5 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 21.4), 117.2 (CH₂vin), 128.5 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 7.9 Hz), 132.9 (CH_{vin}), 138.4 (C_{arom}), 154.9 (CO_{carbamato}), 161.5 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 244.7 Hz), 170.7 (CO_{éster}).

Anal. Elemental (%). Calculado para C₁₈H₂₂FNO₄: C, 64.46; H, 6.61; N, 4.18. Encontrado: C, 64.3; H, 6.8; N, 4.0.

(±)-*trans*-3-Acetoximetil-*N*-*tert*-butoxicarbonil-4-(4'-fluorofenil)piperidina, (±)-*trans*-**2d**

(3*S*,4*R*)-**2d**

Exceso enantiomérico: 98%
 $[\alpha]_{\text{D}}^{18} = -8.0$ (c=0.50, MeOH)

(3*R*,4*S*)-**2d**

Exceso enantiomérico: 96%
 $[\alpha]_{\text{D}}^{18} = +7.8$ (c=0.61, MeOH)

Sólido blanco

Rendimiento: 83 %.

Fórmula molecular: C₁₉H₂₆FNO₄

Peso molecular (g/mol): 351.

Punto de fusión (°C): 112.8-114.5.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3018, 2938, 1732, 1682, 1605, 1510, 1472, 1215.

E.M. (ESI⁺) m/z (%): 390 [(M+K)⁺, 19], 374 [(M+Na)⁺, 100], 352 [(M+H)⁺, 2]

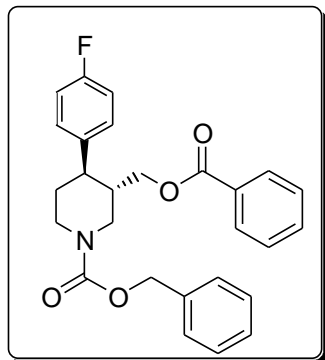
¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.50 (s, 9H, 3CH₃) 1.63-1.81 (m, 2H, CH₂), 2.00-2.09 (m, 1H, CH), 2.47 (td, 1H, CH, ³*J*_{HH} 4.3, ³*J*_{HH} 11.3 Hz), 2.52-2.54 (m, 1H, CHHN), 2.72-2.85 (m, 1H, CHHN) 3.64 (dd, 1H, CHHO, ³*J*_{HH} 7.8, ²*J*_{HH} 11.3), 3.84 (dd, 1H, CHHO, ³*J*_{HH} 3.5, ²*J*_{HH} 11.3), 4.19-4.24 (m, 1H, CHHN), 4.33-4.40 (m, 1H, CHHN), 7.00 (dd, 2H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.7, ³*J*_{HF} 8.7), 7.13 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.7, ⁴*J*_{HF} 5.2).

¹³C-RMN (CDCl₃, 50.3 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 20.7 (CH₃), 28.3 (3CH₃), 34.1 (CH₂), 40.7 (CH), 44.3 (CH), 44.6 (CH₂), 46.9 (CH₂), 64.6 (CH₂), 79.7 (C), 115.5 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 21.2), 128.5 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 7.8), 138.6 (C_{arom}), 154.6 (CO_{carbamato}), 161.6 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 244.7), 170.8 (CO_{éster})

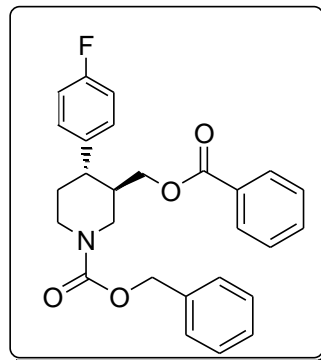
Anal. Elemental (%). Calculado para C₁₉H₂₆FNO₄: C, 64.94; H, 7.46; N, 3.99.

Encontrado: C, 64.7; H, 7.7; N, 4.1.

(±)-*trans*-*N*-Benciloxicarbonil-3-benzoiloxicarbonil-4-(4'-fluorofenil)piperidina, (±)-*trans*-**3a**

(3*S*,4*R*)-**3a**

Exceso enantiomérico: 98%
 $[\alpha]_{\text{D}}^{18} = +6.21$ (c=0.97, MeOH)

(3*R*,4*S*)-**3a**

Exceso enantiomérico: 98%
 $[\alpha]_{\text{D}}^{18} = -6.24$ (c=1.03, MeOH)

Sólido higroscópico

Rendimiento: 70%.

Fórmula molecular: C₂₇H₂₆FNO₄

Peso molecular (g/mol): 447.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3013, 2943, 1716, 1698, 1602, 1510, 1455, 1220.

E.M. (ESI⁺) m/z (%): 486 [(M+K)⁺, 72], 470 [(M+Na)⁺, 100], 448 [(M+H)⁺, 6]

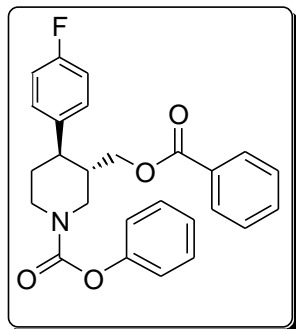
¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.67-1.89 (m, 2H, CH₂), 2.09-2.27 (m, 1H, CH), 2.63 (td, 1H, CH, ³*J*_{HH} 4.3, ³*J*_{HH} 11.5), 2.76-3.00 (m, 2H, 2CHHN), 3.91 (dd, 1H, CHHO, ³*J*_{HH} 7.4, ²*J*_{HH} 11.3), 4.12 (dd, 1H, CHHO, ³*J*_{HH} 3.5, ²*J*_{HH} 11.3), 4.34-4.42 (m, H, CHHN), 4.53-4.64 (m, 1H, CHHN), 7.01 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.8, ³*J*_{HF} 8.8), 7.17 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.8, ⁴*J*_{HF} 5.4), 7.40-7.47 (m, 7H, 7CH_{arom}), 7.54-7.60 (m, 1H, CH_{arom}), 7.97 (d, 2H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.2).

¹³C-RMN (CDCl₃, 50.3 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 33.9 (CH₂), 41.1 (CH), 44.3 (CH₂), 44.6 (CH), 47.2 (CH₂), 64.8 (CH₂O), 67.2 (CH₂benc), 115.6 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 21.2), 127.7 (CH_{arom}), 127.9 (CH_{arom}), 128.3 (CH_{arom}), 128.4 (CH_{arom}), 128.5 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 8.2), 129.3 (CH_{arom}), 129.6 (C_{arom}), 132.9 (CH_{arom}), 136.5 (C_{arom}), 138.4 (C_{arom}), 155.0 (CO_{carbamato}), 161.6 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 245.2), 166.1 (CO_{éster})

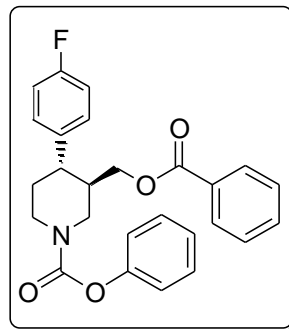
Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₇H₂₆FNO₄: C, 72.47; H, 5.86; N, 3.13.

Encontrado: C, 72.7; H, 5.7; N, 3.3.

(±)-*trans*-3-Benzoiloximetil-*N*-feniloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)piperidina, (±)-*trans*-**3b**

(3*S*,4*R*)-**3b**

Exceso enantiomérico: 98%
 $[\alpha]_D^{18} = +8.6$ (c=1.30, MeOH)

(3*R*,4*S*)-**3b**

Exceso enantiomérico: 98%
 $[\alpha]_D^{18} = -8.6$ (c=1.49, MeOH)

Sólido higroscópico

Rendimiento: 54%.

Fórmula molecular: C₂₆H₂₄FNO₄

Peso molecular (g/mol): 433.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3018, 2946, 1718, 1703, 1601, 1510, 1455, 1215.

E.M. (ESI⁺) m/z (%): 456 [(M+Na)⁺, 100], 434 [(M+H)⁺, 22]

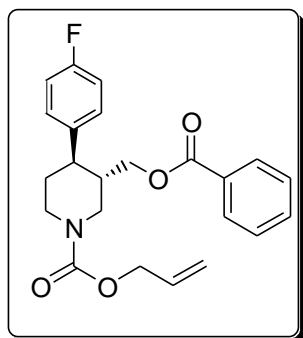
¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.82-2.00 (m, 2H, CH₂), 2.24-2.39 (m, 1H, CH), 2.62-2.78 (m, 1H, CH), 2.86-3.15 (m, 2H, 2CHHN), 3.96 (dd, 1H, CHHO, ³*J*_{HH} 7.4, ²*J*_{HH} 11.5), 4.12 (m, 1H, CHHO), 4.45-4.51 (m, H, CHHN), 4.63-4.71 (m, 1H, CHHN), 7.04 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.7, ³*J*_{HF} 8.7), 7.14-7.23 (m, 5H, CH_{arom}), 7.36-7.48 (m, 2H, 2CH_{arom}), 7.57 (t, 1H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.2), 8.00 (dd, 2H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.2, ⁴*J*_{HH} 1.5).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 33.8 (CH₂), 41.0 (CH), 44.4 (CH), 44.8 (CH₂), 47.4 (CH₂), 64.7 (CH₂O), 115.6 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 20.9), 121.5 (CH_{arom}), 125.1 (CH_{arom}), 128.2 (CH_{arom}), 128.5 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 7.7), 129.1 (CH_{arom}), 129.2 (CH_{arom}), 129.5 (C_{arom}), 132.9 (CH_{arom}), 138.1 (C_{arom}), 151.0 (C_{arom}), 153.4 (CO_{carbamato}), 161.6 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 244.3), 166.0 (CO_{éster})

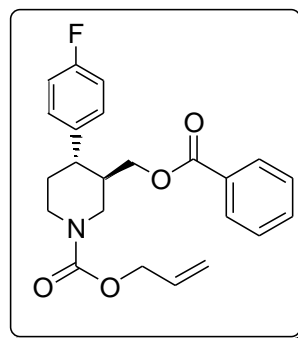
Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₆H₂₄FNO₄: C, 72.04; H, 5.58; N, 3.23.

Encontrado: C, 71.8; H, 5.8; N, 3.0.

(±)-*trans*-*N*-Aliloxycarbonil-3-benzoiloximetil-4-(4'-fluorofenil)piperidina, (±)-*trans*-**3c**

(3*S*,4*R*)-**3c**

Exceso enantiomérico: 97%
 $[\alpha]_D^{18} = +8.7$ (c=1.0, MeOH)

(3*R*,4*S*)-**3c**

Exceso enantiomérico: 99%
 $[\alpha]_D^{18} = -9.0$ (c=0.59, MeOH)

Aceite incoloro

Rendimiento: 58%.

Fórmula molecular: C₂₃H₂₄FNO₄

Peso molecular (g/mol): 397.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3069, 2940, 1703, 1647, 1602, 1510, 1467, 1222.

E.M. (ESI⁺) m/z (%): 436 [(M+K)⁺, 28], 420 [(M+Na)⁺, 100], 398 [(M+H)⁺, 6]

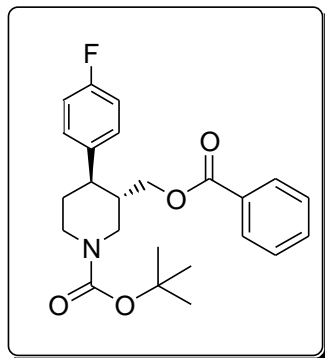
¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.70-1.89 (m, 2H, CH₂), 2.16-2.22 (m, 1H, CH), 2.63 (td, 1H, CH, ³*J*_{HH} 4.3, ³*J*_{HH} 11.5), 2.75-2.93 (m, 2H, 2CHHN), 3.91 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 11.4, ³*J*_{HH} 7.3), 4.13 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 11.4, ³*J*_{HH} 3.4), 4.29-4.36 (m, H, CHHN), 4.51-4.62 (m, 1H, CHHN), 4.64 (d, 2H, CH₂alil, ³*J*_{HH} 5.4), 5.23 (dd, 1H, CH_{vin}, ²*J*_{HH} 1.5, ³*J*_{HH} 10.2), 5.33 (dd, 1H, CH_{vin}, ²*J*_{HH} 1.5, ³*J*_{HH} 17.2), 5.98 (ddd, 1H, CH_{vin}, ³*J*_{HH} 5.4, ³*J*_{HH} 10.2, ³*J*_{HH} 17.2), 7.00 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.6, ³*J*_{HF} 8.6), 7.17 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.6, ⁴*J*_{HF} 5.4), 7.44 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 6.9), 7.56 (t, 1H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 6.9), 7.97 (dd, 2H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 6.9, ⁴*J*_{HH} 1.5).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 34.0 (CH₂), 41.0 (CH), 44.3 (CH₂), 44.6 (CH), 47.2 (CH₂), 64.9 (CH₂O), 66.0 (CH₂alil), 115.6 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 20.3), 117.3 (CH₂vin), 128.3 (CH_{arom}), 128.6 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 8.3), 129.4 (CH_{arom}), 129.7 (C_{arom}), 133.0 (CH_{vin}+CH_{arom}), 138.5 (C_{arom}), 154.9 (CO_{carbamato}), 161.6 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 244.7), 166.1 (CO_{éster})

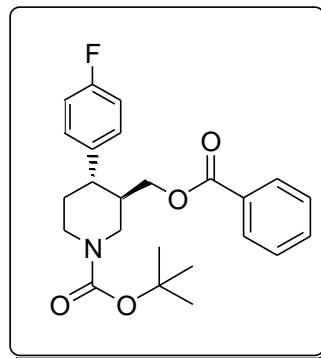
Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₃H₂₄FNO₄: C, 69.51; H, 6.09; N, 3.52.

Encontrado: C, 69.7; H, 6.3; N, 3.6.

(±)-*trans*-3-Benzoiloximetil-*N*-*tert*-butoxicarbonil-4-(4'-fluorofenil)piperidina, (±)-*trans*-**3d**

(3*S*,4*R*)-**3d**

Exceso enantiomérico: 98%
 $[\alpha]_{\text{D}}^{18} = +6.4$ (c=1.00, MeOH)

(3*R*,4*S*)-**3d**

Exceso enantiomérico: 97%
 $[\alpha]_{\text{D}}^{18} = -6.4$ (c=1.17, MeOH)

Sólido blanco

Rendimiento: 55%.

Fórmula molecular: C₂₄H₂₈FNO₄

Peso molecular (g/mol): 413.

Punto de fusión (°C): 96.0-96.7.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3019, 2977, 1716, 1682, 1603, 1510, 1429, 1217.

E.M. (ESI⁺) m/z (%): 452 [(M+K)⁺, 40], 436 [(M+Na)⁺, 100], 414 [(M+H)⁺, 2]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.50 (s, 9H, 3CH₃), 1.67-1.81 (m, 2H, CH₂), 2.21-2.24 (m, 1H, CH), 2.57 (td, 1H, CH, ³*J*_{HH} 4.6, ³*J*_{HH} 11.5), 2.66-2.88 (m, 2H, 2CHHN), 3.87 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 11.4, ³*J*_{HH} 7.6), 4.12 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 11.4, ³*J*_{HH} 3.6), 4.25-4.32 (m, 1H, CHHN), 4.46-4.53 (m, 1H, CHHN), 7.02 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.8, ³*J*_{HF} 8.8), 7.17 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.8, ⁴*J*_{HF} 5.4), 7.44 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.2), 7.58 (t, 1H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.2), 7.97 (dd, 2H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.2, ⁴*J*_{HH} 1.5).

¹³C-RMN (CDCl₃, 50.3 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 28.4 (3CH₃), 34.2 (CH₂), 41.2 (CH), 44.4 (CH₂), 44.9 (CH), 47.3 (CH₂), 65.2 (CH₂O), 79.8 (C), 115.7 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 21.2), 128.4 (CH_{arom}), 128.6 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 7.8), 129.5 (CH_{arom}), 129.9 (C_{arom}), 133.1 (CH_{arom}), 138.7 (C_{arom}), 154.7 (CO_{carbamato}), 161.7 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 245.2), 166.2 (CO_{éster})

Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₄H₂₈FNO₄: C, 69.71; H, 6.82; N, 3.39.
 Encontrado: C, 69.5; H, 7.0; N, 3.2.

Capítulo 2

Alcoxicarbonilaciones enzimáticas sobre el precursor de (-)-paroxetina, (±)-trans-N-benciloxicarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxi metilpiperidina

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1 CARBONATOS

Los carbonatos orgánicos son compuestos de elevada importancia dentro del campo de la química orgánica, siendo utilizados en numerosas aplicaciones, entre las que destacan:¹⁵⁸

1) Aplicaciones en polímeros como precursores de policarbonatos, cuyo uso está muy extendido en la preparación de CD's y DVD's, en películas resistentes a la abrasión, en el campo de la electrónica, etc.

2) Aplicaciones a escala industrial. Los carbonatos han sido empleados como aditivos de gasolinas y como aceites lubricantes en refrigeradores. Si poseen una elevada constante dieléctrica pueden emplearse en condensadores y baterías. También son útiles como disolventes para la preparación de fenoles y ciclohexanonas.

3) Aplicaciones biológicas: Numerosos carbonatos han sido estudiados como posibles precursores de fármacos. Así por ejemplo, ciertos carbonatos de 3-dimetilamino-1-propanoles *O*-sustituidos presentan utilidad como antidepresivos.

4) Aplicaciones en la síntesis orgánica: Los carbonatos suelen ser utilizados como grupos protectores de alcoholes y aminas.

En la actualidad, existen numerosos métodos de síntesis de carbonatos,¹⁵⁹ siendo los más importantes:

1) Preparación a partir de equivalentes del grupo carbonilo: Las metodologías más comunes son la reacción de dioles con fosgeno y el acoplamiento de haloformatos con alcoholes o fenoles. Estas técnicas presentan el inconveniente de emplear productos de partida tóxicos y costosos, por lo que se han desarrollado técnicas como la carbonilación oxidativa de alcoholes a partir de CO₂.

2) Preparación a partir de carbonatos de metales alcalinos o de plata, haciéndolos reaccionar con halogenuros de alquilo. Son reacciones que requieren de condiciones drásticas, como elevadas temperaturas.

3) Síntesis por reacciones de intercambio de carbonatos. En estos procesos se produce el intercambio por el ataque nucleófilo de alcóxidos sobre carbonatos para generar nuevos carbonatos.

2.1.2. REACCIÓN DE ALCOXICARBONILACIÓN ENZIMÁTICA.

Los procesos de protección de alcoholes y aminas con carbonatos tienen como gran inconveniente la utilización de haloformatos. Estos compuestos, generados principalmente a partir de fosgeno, presentan una elevada toxicidad. Por ello, es posible realizar la introducción de grupos alcoxycarbonilo empleando procesos biocatalíticos de gran selectividad.

La reacción de alcoxycarbonilación enzimática ha sido mucho menos estudiada que la correspondiente reacción de acilación. Sin embargo, es de gran utilidad sintética ya que además de permitir la introducción de grupos protectores, es posible llevar a cabo también su activación.

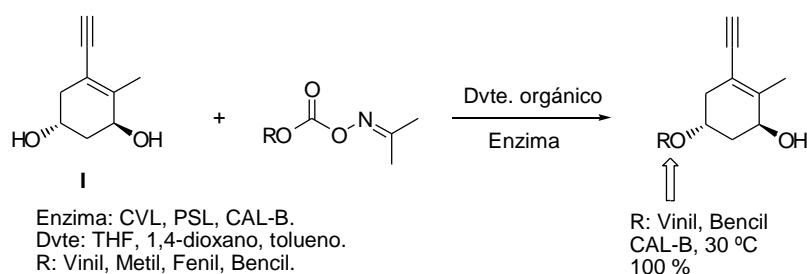
Esta metodología ha sido aplicada con gran éxito en nuestro grupo de investigación en el desarrollo de la química de los productos naturales.¹⁶⁰ Así, la

¹⁵⁸ J. P. Parrish, R. N. Salvatore, K. W. Jung, *Tetrahedron*, **2000**, 56, 8207-8237.

¹⁵⁹ A. A. G. Shaikh, S. Sivaram, *Chem. Rev.* **1996**, 951-976.

carbonatación selectiva de distintas pentosas y hexosas en el alcohol primario ha sido posible empleando carbonatos mixtos de oxima y alquilo en disolventes orgánicos polares, usando la CAL-B como catalizador.¹⁶¹

En el campo de la vitamina D, se ha estudiado la alcoxicarbonilación enzimática regioselectiva del isómero natural del anillo A de la 1 α , 25-dihidroxitamina D₃ (I) con diferentes agentes de alcoxicarbonilación (esquema 2.1). Los mejores resultados se consiguieron empleando carbonatos de oxima y bencilo o vinilo, aunque un exceso de carbonato en el proceso puede producir procesos de inhibición (esquema 2.1).¹⁶²



Esquema 2.1.

También han conseguido ser resueltos el resto de diastereoisómeros del anillo A mediante alcoxicarbonilaciones enzimáticas. Utilizando CAL-B como catalizador, se obtienen elevadas regioselectividades hacia la posición 5 en todos los casos. Se ha observado que el agente de alcoxicarbonilación ejerce una gran influencia en el proceso.¹⁶³

Este estudio se ha extendido también al sintón del anillo A de la 1 α ,25-dihidroxi-3-epi-19-nor-previtamina D₃, donde la diferencia con respecto a la vitamina estriba en la ausencia del grupo metilo en el anillo (esquema 2.2.). Cuando se empleó carbonato de vinilo y oxima (CVO), las regioselectividades conseguidas no fueron buenas, sin embargo se obtuvieron mejores resultados al utilizar carbonato de fenilo y oxima (CFO). En este proceso, la CAL-B muestra selectividad hacia la posición 5 en los estereoisómeros (3*S*, 5*R*) y (3*S*, 5*S*), y hacia la posición 3 para los estereoisómeros (3*R*, 5*S*) y (3*R*, 5*R*).¹⁶⁴

CVO	67%	20%	61%	33%
CFO	90%	10%	20%	80%
			31%	44%
			96%	4%
			5%	45%
				100%

Condiciones: CAL-B, 30 °C.

Esquema 2.2.

La introducción del grupo viniloxycarbonilo en los derivados de los anillos A de la vitamina y la previtamina, permite la preparación de nuevos derivados por reacción del carbonato generado con nucleófilos como aminas o amoníaco en ausencia de

¹⁶⁰ V. Gotor, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2001**, 19-20, 21-30.

¹⁶¹ R. Pulido, V. Gotor, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1993**, 589-592.

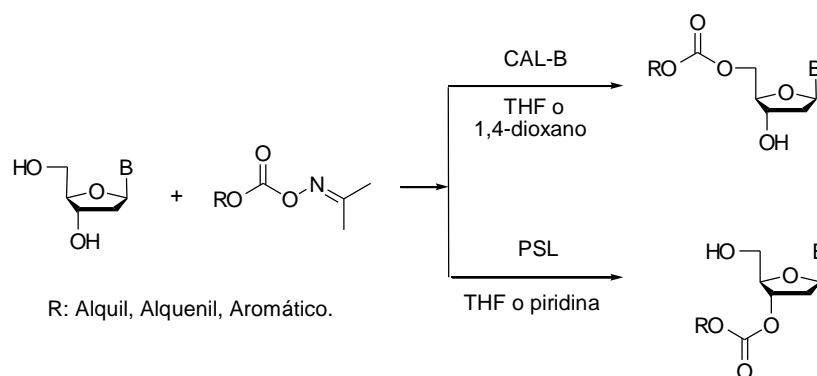
¹⁶² M. Ferrero, S. Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 4358-4363.

¹⁶³ V. Gotor-Fernández, M. Ferrero, S. Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 7504-7510.

¹⁶⁴ M. Díaz, V. Gotor-Fernández, M. Ferrero, S. Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 4227-4232.

catalizador. Así, se pueden obtener tras las etapas de síntesis necesarias, un amplia variedad de análogos de la vitamina D₃.

En el campo de los nucleósidos, también se han llevado a cabo alcoxicarbonilaciones enzimática selectivas sobre 2'-desoxinucleósidos, obteniéndose 5'-O-carbonatos o 3'-O-carbonatos, dependiendo de que la lipasa utilizada fuera CAL-B o PSL, respectivamente (esquema 2.3). La síntesis de los derivados 3' ha supuesto un gran avance, puesto que se evitan tediosos procesos de protección y desprotección para modificar de forma selectiva esta posición.¹⁶⁵



Esquema 2.3.

La naturaleza del carbonato es muy importante en la regioselectividad de las alcoxicarbonilaciones. Estudios enzimáticos de la CAL-B sobre la timidina con una amplia variedad de agentes de alcoxicarbonilación demuestran que diferentes carbonatos con el mismo grupo saliente conducen a diferentes selectividades, desde procesos no selectivos (caso del carbonato de alilo y oxima), hasta reacciones totalmente selectivas (carbonato de fenilo y oxima). Por el contrario, la variación del grupo saliente del carbonato modifica la velocidad de las reacciones, no influyendo en las regioselectividades de las mismas.¹⁶⁶

2.1.2.1. Resolución enzimática de alcoholes y aminas mediante alcoxicarbonilación.

La reacción de alcoxicarbonilación enzimática no sólo sirve para la protección y activación selectiva de biomoléculas, sino que ha sido utilizada en la resolución de alcoholes y aminas, para generar los correspondientes carbonatos y carbamatos, respectivamente. Los carbamatos son de gran interés en el área de la química médica¹⁶⁷ y a pesar de que existen numerosos métodos químicos para su generación, la alcoxicarbonilación enzimática de aminas es una metodología muy sencilla para su preparación.¹⁶⁸

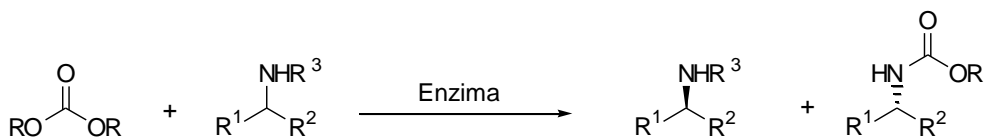
En nuestro grupo de investigación ha sido estudiada la resolución de una serie de alcoholes con carbonatos de vinilo en presencia de dos variedades de la CAL-B (SP 435 y SP 435A). En todos los casos, se produce la formación del carbonato de configuración *R* (esquema 2.4), siendo los tiempos de reacción y los excesos enantioméricos mayores con la variedad SP 435A. La enantioselectividad del proceso depende en buena medida

¹⁶⁵ (a) F. Moris, V. Gotor, *Tetrahedron*, **1992**, 48, 9869-9876; (b) F. Moris, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 2490-2492.

¹⁶⁶ L. F. Garcia-Alles, V. Gotor, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **1999**, 6, 407-410.

¹⁶⁷ V. G. Mataza, T. P. Maduskuie, H. S. Shapiro, B. Hesp, D. W. Zinder, D. Aharony, R. D. Krell, R. A. Reith, *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 1781-1790.

¹⁶⁸ V. Gotor, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, 7, 2189-2197.



R: Metil; Etil; Alil.

R³: H o alquilo

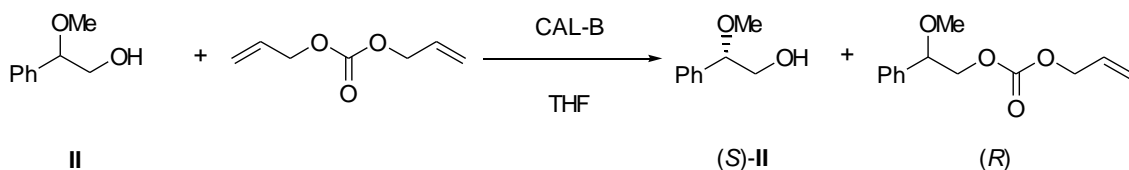
Esquema 2.6.

La alcoxicarbonilación enzimática del (\pm)-*trans*-2-aminociclohexanol catalizada por la CAL-B genera únicamente el producto de aminólisis en presencia de carbonato de dibencilo, sin que se observe producto de *O*-alcoxicarbonilación. Pero los rendimientos y las enantioselectividades obtenidos en esta resolución son bajos.¹⁷⁴

Sinisterra y col.¹⁷⁵ se ha estudiado la influencia de diferentes enzimas en la carbonatación de 1-feniletilaminas. El origen de la lipasa, la presencia de isoenzimas y la naturaleza del soporte que presenten desempeñan un papel decisivo en la selectividad de este proceso.

La resolución de alcoholes mediante alcoxicarbonilación no ha sido tan estudiada como la correspondiente resolución de amina, sin embargo en los últimos años esta metodología se ha aplicado a la resolución de un precursor de la (+)-zopiclona. Se realizaron pruebas con la CAL-B empleando varios carbonatos en diferentes condiciones de reacción, pero en todos los casos se recuperaba el producto de partida. Para conseguir finalmente la resolución, hubo de recurrirse a la formación del carbonato de vinilo racémico y realizar su posterior hidrólisis enzimática con excelente selectividad.¹⁷⁶

Recientemente, ha sido realizada la resolución del auxiliar quiral 2-metoxi-2-feniletanol (**II**) con carbonato de dialilo. Empleando THF como disolvente, se consiguen enantioselectividades moderadas, formándose el carbonato de configuración *R*. Sin embargo, la alcoxicarbonilación es mucho más lenta que el procedimiento análogo de acilación.¹⁷⁷



Esquema 2.7.

En base a los resultados obtenidos en la resolución de alcoholes y aminas mediante reacciones de alcoxicarbonilación enzimática, decidimos desarrollar esta metodología en la preparación de precursores ópticamente puros de (-)-paroxetina

¹⁷⁴ A. Maestro, C. Astorga, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, 8, 3153-3159.

¹⁷⁵ M. S. de Castro, P. Domínguez, J. V. Sinisterra, *Tetrahedron*, **2000**, 56, 1387-1391.

¹⁷⁶ V. Gotor, F. Limeres, R. García, M. Bayod, R. Brieva, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, 8, 995-997.

¹⁷⁷ M. I. Monterde, R. Brieva, V. M. Sánchez, M. Bayod, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**, 13, 1091-1096.

Posteriormente, se analizó el efecto de la temperatura en la alcoxicarbonilación (entradas 8 y 9). Cuando la reacción es catalizada por la CAL-B en tolueno con 10 equivalentes de carbonato, el descenso de la temperatura de reacción a 15°C provoca una importante reducción en la velocidad del proceso, permaneciendo la enantioselectividad inalterada. Al aumentar la temperatura a 50°C, como era de esperar, se produce un aumento en la velocidad de reacción pudiendo obtenerse conversiones cercanas al 50% a las 24 horas sin variación apreciable de la selectividad ($E=36$).

La adición de 0.7 equivalentes de NEt_3 conduce a menores velocidades de reacción y bajas enantioselectividades. Finalmente, se estudió como catalizador un preparado diferente de lipasa B de *Candida antarctica*, CAL-B L2.¹⁷⁸ Sin embargo, como se muestra en la entrada 11, la reacción es muy lenta, pues sólo se alcanza un 5% de conversión a las 48 horas. La enantioselectividad obtenida es también inferior a la conseguida con la CAL-B comercializada como Novozym 435. Cuando se utiliza la lipasa de *Pseudomonas cepacea* inmovilizada (PS-C), no se observa reacción alguna después de 168 horas.

Tabla 2.1. Reacciones de alcoxicarbonilación sobre (\pm)-*trans-1a* catalizada por la CAL-B con 10 equivalentes de carbonato de dialilo.

Entrada	Dvte	T (°C)	t (h)	c (%)	<i>trans-1a</i> <i>trans-4a</i>		<i>E</i>
					<i>ee</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^a	
1 ^b	Tolueno ^c	30	96	30	14	32	2.2
2	Tolueno ^c	30	96	15	17	94	38
3	Tolueno	30	48	23	28	94	42
4	^t BuOMe	30	30	27	31	84	15
5	Hexano	30	6	15	16	90	22
6	Dioxano	30	168	16	18	92	28
7	THF	30	168	4	4	92	24
8	Tolueno	15	96	10	10	95	43
9	Tolueno	50	24	46	76	88	36
10	Tol/ NEt_3 ^d	30	48	16	18	92	28
11 ^e	Tolueno	30	48	5	5	93	29

^a Medidos mediante HPLC. ^b Reacción catalizada por la CAL-A. ^c Alcoxicarbonilaciones con 4 equiv. de carbonato de dialilo. ^d Reacción en presencia de 0.7 equiv. de NEt_3 . ^e Proceso catalizado por la CAL-B L2.

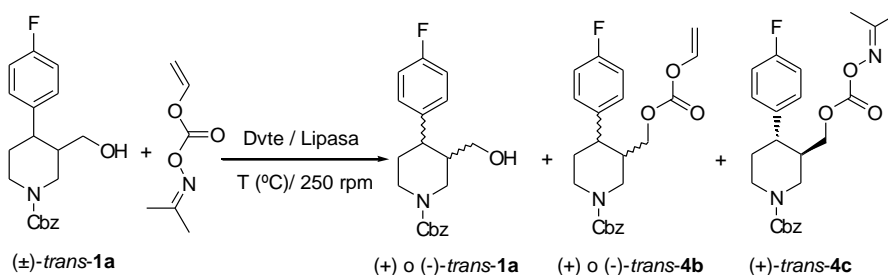
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y debido a que en las reacciones catalizadas por la CAL-B en tolueno se consiguen enantioselectividades alrededor de 40, es posible conseguir el piperidincarbinol (3*S*,4*R*)-*trans-1a* con elevados excesos enantioméricos a conversiones ligeramente superiores al 50%. Sin embargo, el problema que presenta el uso de este carbonato se debe a las bajas velocidades de reacción conseguidas.

2.2.2. ALCOXICARBONILACIÓN ENZIMÁTICA CON CARBONATO DE VINILO Y ACETONOXIMA.

Para intentar resolver los inconvenientes derivados de la baja reactividad del carbonato de dialilo, se utilizó posteriormente el carbonato mixto de vinilo y oxima¹⁷⁹ (esquema 2.9, tabla 2.2), en principio mucho más reactivo debido a la presencia de la función oxima, que es un excelente grupo saliente.

¹⁷⁸ CAL-B, Chirazyme L-2. Variedad de CAL-B inmovilizada no covalentemente en un polímero orgánico insoluble y comercializada por Roche Diagnostics.

¹⁷⁹ En el presente capítulo, la utilización del término oxima se refiere al grupo acetoxima.



Esquema 2.9.

En todas las pruebas realizadas, las velocidades de reacción conseguidas son mucho mayores que cuando se utiliza carbonato de dialilo. Así, en las reacciones catalizadas por las lipasas de CAL-A y CAL-B en tolueno a 30°C con 4 equivalentes de carbonato, después de 1 hora de reacción se obtienen conversiones mayores del 45% (entradas 1 y 2).

Sin embargo, la utilización de este carbonato presenta el inconveniente de generar dos productos de reacción, puesto que junto al carbonato de vinilo correspondiente (\pm)-*trans*-4b, se forma el carbonato de oxima (\pm)-*trans*-4c. En el caso de la CAL-A, tanto el sustrato como los dos productos de reacción muestran muy bajos excesos enantioméricos, siendo éstos moderados en el caso de la reacción catalizada por la CAL-B.

El descenso de la temperatura a 15 °C (entrada 3), provoca la disminución de la velocidad de reacción, siendo los resultados obtenidos muy similares a los conseguidos a 30°C. El empleo de 1,4-dioxano como disolvente en el proceso catalizado por la CAL-B a 30°C evita la formación del carbonato de oxima *trans*-4c, sin embargo, tanto la velocidad de reacción como su enantioselectividad son muy bajas ($E=10$), como se muestra en la entrada 4 de la tabla 2.2.

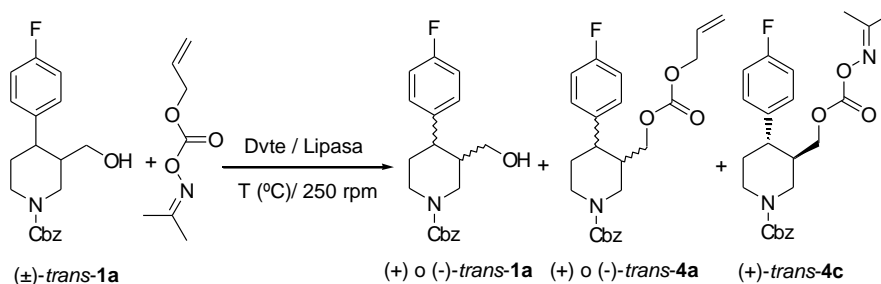
Tabla 2.2. Reacciones de alcoxycarbonilación sobre (\pm)-*trans*-1a catalizadas por CAL-B en tolueno con 4 equivalentes de carbonato de vinilo y oxima.

Ent.	T (°C)	t (h)	<i>trans</i> -1a		<i>trans</i> -4b		<i>trans</i> -4c		c (%)	E
			(%) ^a	ee(%) ^b	(%) ^a	ee(%) ^b	(%) ^a	ee(%) ^b		
1 ^c	30	1	35	1	34	29	31	23	--	--
2	30	1	53	75	14	80	33	79	--	--
3	15	2	57	71	12	89	31	79	--	--
4 ^d	30	72	--	10	--	81	--	--	11	10

^a Determinado por ¹H-RMN. ^b Análisis de los excesos enantioméricos mediante HPLC. ^c Reacción catalizada por la CAL-A. ^d Resolución llevada a cabo en 1,4-dioxano.

2.2.3. REACCIÓN DE ALCOXICARBONILACIÓN ENZIMÁTICA CON CARBONATO DE ALILO Y OXIMA.

Para intentar evitar la formación del carbonato de oxima *trans*-4c, se decidió emplear un carbonato de oxima menos reactivo que el de vinilo y oxima, como es el carbonato de alilo y oxima (esquema 2.10, tabla 2.3). En el proceso realizado con CAL-A en tolueno a 30°C, añadiendo 4 equivalentes de agente de alcoxycarbonilación, no se detecta la presencia del producto *trans*-4c, obteniéndose una conversión del 63% a las 2 horas de reacción (entrada 1). Sin embargo, la reacción no es selectiva ($E=2.3$).



Esquema 2.10.

En el caso de la lipasa de CAL-B, como se recoge en la entrada 2, se produce la formación del carbonato de oxima junto con el carbonato de alilo. A pesar de ello, el piperidincarbinol (3*S*,4*R*)-*trans*-**1a** se obtiene con un moderado *ee*. El descenso de la temperatura de reacción a 15°C permite conseguir dicho alcohol a las 7 horas con un elevado exceso enantiomérico (94% a una conversión del 56%). En este caso, el piperidincarbinol presenta la configuración correcta (3*S*,4*R*) para completar la síntesis de paroxetina (entrada 3).

La modificación del disolvente empleado en las reacciones catalizadas por la CAL-B a 30°C no mejora la selectividad de la alcoxycarbonilación, puesto que los excesos enantioméricos obtenidos de (3*S*,4*R*)-*trans*-**1a** son muy bajos, como se muestra en las entradas 4 y 5. En la reacción llevada a cabo en 1,4-dioxano (entrada 6) se consigue evitar la formación del carbonato de oxima. Sin embargo, la resolución es muy lenta y poco selectiva (*E*=13).

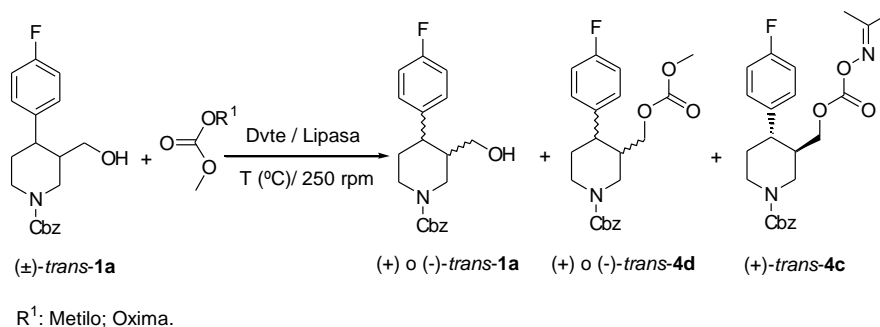
Tabla 2.3. Reacciones de alcoxycarbonilación sobre (±)-*trans*-**1a** con carbonato de alilo y oxima (4 equivalentes) catalizadas por la lipasa B de *Candida antarctica*.

Ent.	Dvte	t (h)	<i>trans</i> - 1a		<i>trans</i> - 4a		<i>trans</i> - 4c		<i>c</i>	<i>E</i>
			(%) ^a	<i>ee</i> (%) ^b	(%) ^a	<i>ee</i> (%) ^b	(%) ^a	<i>ee</i> (%) ^b		
1 ^c	Tolueno	2	--	40	--	24	--	--	63	2.3
2	Tolueno	6	39	82	7	83	54	44	--	--
3 ^d	Tolueno	7	44	94	10	92	46	67	--	--
4	^t BuOMe	2	72	23	16	64	12	51	--	--
5	THF	144	82	20	4	80	14	86	--	--
6	Dioxano	168	--	15	--	84	--	--	15	13

^a Determinado por ¹H-RMN. ^b Medidos por HPLC. ^c Reacción catalizada por la CAL-A. ^d Reacción realizada a 15°C.

2.2.4. REACCIONES DE ALCOXICARBONILACIÓN CON CARBONATOS DE METILO.

En nuestro intento por encontrar un proceso rentable, se abordó el estudio con otros agentes de alcoxycarbonilación alifáticos, como los carbonatos de metilo y oxima y de dimetilo (esquema 2.11).


Esquema 2.11.

En primer lugar, se analizó el comportamiento del carbonato de metilo y oxima (tabla 2.4), cuya reactividad resultó ser inferior a la del carbonato de alilo y oxima. En las resoluciones catalizadas por la CAL-A en tolueno y por la CAL-B en dioxano a 30°C con 4 equivalentes de carbonato, el único producto generado es el carbonato de metilo *trans-4d*. Las enantioselectividades conseguidas en ambas reacciones son, sin embargo, muy bajas (entradas 1 y 3).

La alcoxicarbonilación realizada en tolueno con la CAL-B a 30°C genera, por el contrario, los dos posibles productos de reacción (entrada 2). En este caso, el piperidincarbinol se obtiene con una baja pureza óptica ($ee=57\%$), cuando el proceso se detiene con una conversión del 33% en 2 horas de reacción.

Tabla 2.4. Reacciones de alcoxicarbonilación de $(\pm)\text{-trans-1a}$ con carbonato de metilo y oxima (4 equivalentes) catalizadas por la lipasa B de *Candida antarctica* a 30°C.

Ent.	Dvte	t (h)	<i>trans-1a</i>		<i>trans-4d</i>		<i>trans-4c</i>		c (%)	E
			(%) ^a	<i>ee</i> (%) ^b	(%) ^a	<i>ee</i> (%) ^b	(%) ^a	<i>ee</i> (%) ^b		
1 ^c	Tolueno	2	--	10	--	38	--	--	21	2.5
2	Tolueno	2	67	57	4	78	29	80	--	--
3	Dioxano	120	--	3	--	89	--	--	2	17

^a Determinado por ¹H-RMN. ^b Medidos mediante HPLC. ^c Reacción catalizada por la CAL-A.

Debido a los resultados obtenidos con el empleo de los carbonatos mixtos de oxima y a los problemas que se generan en la mayoría de los casos por la formación de más de un producto de reacción, se decidió comprobar otro carbonato simétrico, en este caso el carbonato de dimetilo, reactivo comercial que conduce a la formación del carbonato de metilo *trans-4d*.

Según las pruebas que se muestran en las entradas 1 y 2 de la tabla 2.5, la reactividad de este carbonato es muy baja, puesto que las reacciones con CAL-A y CAL-B, en tolueno a 30°C con 10 equivalentes de agente de alcoxicarbonilación presentan conversiones menores del 10% a las 168 horas de reacción. En el caso de la lipasa A de *Candida antarctica*, como sucede con el resto de carbonatos probados, la reacción es muy poco selectiva, mientras que con la CAL-B, la razón enantiomérica es ligeramente superior, pero insuficiente ($E=16$).

El aumento de temperatura en la reacción a 50°C provoca un significativo aumento de la velocidad de reacción, pues es posible alcanzar una conversión del 16% a las 72 horas de reacción en el proceso realizado en presencia de CAL-B (entrada 3). La enantioselectividad no varía con respecto a la prueba a 30°C.

En otros disolventes en los que las resoluciones son generalmente más rápidas que en tolueno, como ^tBuOMe y hexano, se consigue aumentar la velocidad del proceso (entradas 4 y 5), aunque las enantioselectividades continúan siendo muy bajas ($E=7-13$).

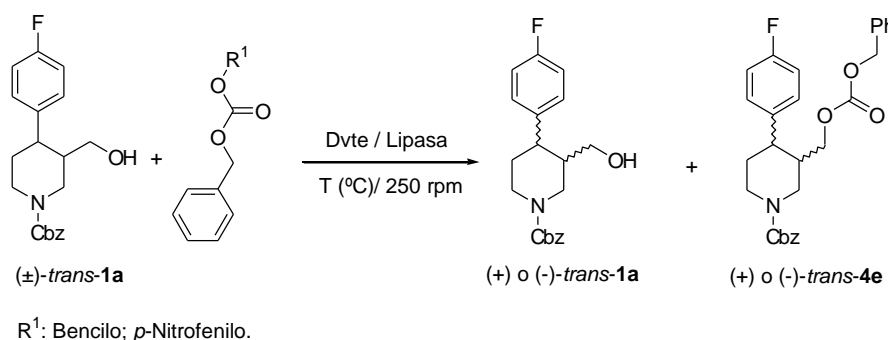
Tabla 2.5. Alcoxycarbonilación enzimática sobre (\pm)-*trans*-**1a** en presencia de carbonato de dimetilo (10 equivalentes) catalizada por la CAL-B.

Entrada	Dvte	T (°C)	t (h)	c (%)	<i>trans</i> -	<i>trans</i> -	<i>E</i>
					1a	4d	
					<i>ee</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^a	
1 ^b	Tolueno	30	168	9	3	32	2.0
2	Tolueno	30	168	3	3	88	16
3	Tolueno	50	72	16	16	86	15
4	^t BuOMe	30	168	27	26	69	7.0
5	Hexano	30	72	7	6	86	13

^a Analizados mediante HPLC. ^b Reacción catalizada por la CAL-A.

2.2.5. ALCOXICARBONILACIONES ENZIMÁTICAS CON CARBONATOS DE BENCILO.

La utilización de benzoato de vinilo produjo excelentes resultados en la acilación enzimática de (\pm)-*trans*-**1a** empleando la lipasa B de *Candida antarctica*, como se muestra en el apartado 1.2.3.3 del capítulo anterior. Por lo tanto, es interesante estudiar el efecto de agentes de alcoxycarbonilación aromáticos en la resolución de este piperidincarbinol (esquema 2.12).

**Esquema 2.12.**

En primer lugar, se estudió la reacción con carbonato de dibencilo (tabla 2.6), un homocarbonato comercial que sólo va a generar como producto de reacción (\pm)-*trans*-**4e**. En las pruebas realizadas en tolueno con las dos variedades de *Candida antarctica* a 30°C y con 10 equivalentes de agente de alcoxycarbonilación, ninguna de las lipasas catalizó la reacción a las 168 horas, como se muestra en las entradas 1 y 2. En un intento por aumentar la reactividad de la reacción catalizada por la CAL-B, se incrementó la temperatura de la misma a 50°C (entrada 3). En estas condiciones, es posible conseguir una conversión del 26% a las 48 horas de reacción, con una enantioselectividad moderada (*E*=33). Las resoluciones en ^tBuOMe o hexano a 30°C producen conversiones cercanas al 30% a las 48 horas de reacción (entradas 4 y 5), pero no se consiguen mejoras en la razón enantiomérica, siendo éstas insuficientes para un proceso selectivo (*E*=20-27).

Tabla 2.6. Alcoxicarbonilación enzimática sobre (\pm)-*trans*-**1a** en presencia de carbonato de dibencilo (10 equivalentes) catalizada por la CAL-B.

Ent.	Dvte	T (°C)	t (h)	c (%)	<i>trans</i> - 1a <i>trans</i> - 4e	
					<i>ee</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^a
1 ^b	Tolueno	30	168	0	--	--
2	Tolueno	30	168	0	--	--
3	Tolueno	50	48	26	33	92
4	^t BuOMe	30	48	35	48	89
5	Hexano	30	48	29	35	87

^a Determinados por HPLC. ^b Reacción catalizada por la CAL-A.

Con el objetivo de aumentar la velocidad de las alcoxicarbonilaciones, se utilizó el carbonato mixto de bencilo y *p*-nitrofenilo (tabla 2.7), mucho más reactivo debido a que el grupo *p*-nitrofenilo es un buen grupo saliente. Por este motivo, se realizaron las resoluciones con 4 equivalentes de este reactivo y en presencia de tamiz molecular de 4 Å. Con ello se evita la reacción enzimática de hidrólisis del carbonato, que se puede producir a pesar de trabajar en disolventes prácticamente secos. Los procesos con este carbonato mixto no presentan problemas de doble reactividad, por lo que únicamente se obtiene como producto de reacción el carbonato de bencilo (\pm)-*trans*-**4e**.

Como es de esperar, la velocidad de reacción es mayor que con el carbonato simétrico de dibencilo cuando se emplea como biocatalizador la CAL-B en tolueno a 30°C (entrada 1), sin embargo, se produce una disminución en la enantioselectividad ($E=20$). El uso de ^tBuOMe (entrada 2) permite obtener conversiones del 29% a las 24 horas de reacción con baja selectividad ($E=9$), mientras que en 1,4-dioxano, la resolución es muy lenta, presentando prácticamente la misma enantioselectividad que en tolueno ($E=24$), como se recoge en la entrada 3.

Tabla 2.7. Reacciones de alcoxicarbonilación enzimática catalizada por CAL-B sobre (\pm)-*trans*-**1a** en presencia de carbonato de bencilo y *p*-nitrofenilo (4 equivalentes) a 30°C.

Entrada	Dvte	t (h)	c (%)	<i>trans</i> - 1a <i>trans</i> - 4e		<i>E</i>
				<i>ee</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^a	
1 ^b	Tolueno	48	44	64	83	20
2	^t BuOMe	24	29	31	75	9
3	1,4-dioxano	168	26	32	89	24

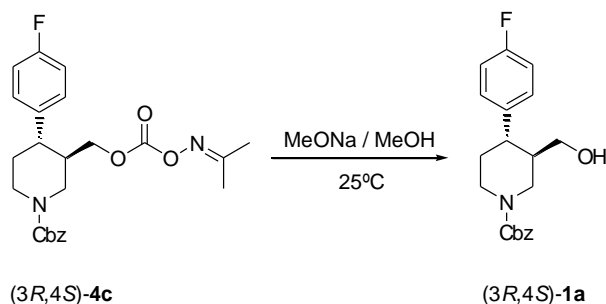
^a Medidos mediante HPLC. ^b Reacción catalizada por la CAL-A.

2.2.6. DETERMINACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA.

La configuración absoluta del piperidincarbinol *trans*-**1a** en los procesos de alcoxicarbonilación enzimática queda establecida por la comparación del signo de rotación específica con los descritos en la parte experimental del capítulo 1. De esta manera, se asignan las configuraciones absolutas de los carbonatos, *trans*-**4a**, **4b**, **4d** y **4e**.

La configuración absoluta del carbonato de oxima *trans*-**4c** fue asignada por comparación de la rotación específica del derivado *trans*-**1a**. Para ello, el carbonato *trans*-**4c** obtenido en las condiciones de la tabla 2.2 (entrada 2) es hidrolizado en presencia de metóxido de sodio en metanol con un rendimiento del 78% (esquema 2.13). El signo de rotación específica del piperidincarbinol *trans*-**1a** $[\alpha]_D^{18} = +3.2$ (c 0.85, MeOH, 79% *ee*) se compara con el medido para este piperidincarbinol.

Según los resultados obtenidos, la configuración del carbonato de oxima es la opuesta a la del alcohol remanente. Por lo tanto, en las reacciones catalizadas por la CAL-B, se obtiene el producto (3*R*,4*S*)-*trans*-**4c**, mientras que en las resoluciones desarrolladas en presencia de CAL-A, se forma el derivado (3*S*,4*R*)-*trans*-**4c**.



Esquema 2.13.

2.2.7. DETERMINACIÓN DE LA PUREZA ÓPTICA DE LOS CARBONATOS (±)-*trans*-**4a-e**.

Los excesos enantioméricos de los sustratos y productos se determinaron mediante HPLC empleando una columna de relleno quiral (Chiralcel OD) a una longitud de onda (λ) de 215 nm sin necesidad de derivatización alguna. Los carbonatos racémicos (±)-*trans*-**4a**, **4b**, **4d** y **4e** se prepararon por reacción entre el piperidincarbinol (±)-*trans*-**1a** con los correspondientes cloroformatos y piridina utilizando CH₂Cl₂ como disolvente. En el caso del carbonato de oxima no se pudo obtener el racemato (±)-*trans*-**4c**, por lo que en su lugar se utilizó una muestra de bajo exceso enantiomérico (*ee*=23%), aislada en la reacción enzimática con carbonato de vinilo y oxima catalizada por la CAL-A a 30°C (tabla 2.2, entrada 1)

En todos los casos los análisis se realizan empleando como eluyente una mezcla *n*-hexano : isopropanol (90:10) a un flujo de 0.8 mL/min y una temperatura de 28°C, consiguiéndose adecuadas resoluciones. La inyección se lleva a cabo con 20 μ L de una disolución de la muestra en la mezcla de elución. En la tabla 2.8 se muestran los resultados conseguidos.

Tabla 2.8. Análisis por HPLC de los productos de alcoxicarbonilación (±)-*trans*-**4a-e**.^a

Compuesto	<i>t</i> _{R1}	<i>t</i> _{R2}	<i>R</i> _S
<i>trans</i> - 4a	13.17 (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)	15.57 (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)	2.7
<i>trans</i> - 4b	13.31 (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)	16.95 (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)	3.4
<i>trans</i> - 4c	30.79 (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)	35.12 (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)	1.9
<i>trans</i> - 4d	15.14 (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)	18.24 (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)	3.0
<i>trans</i> - 4e	20.27 (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)	27.41 (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)	4.7

^a Concentraciones de muestra de 0.25 mg/mL a 1.0 mg/mL.

2.3. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha desarrollado el estudio de la alcoxicarbonilación enzimática sobre el piperidincarbinol (\pm)-trans-N-benciloxicarboni-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroximetilpiperidina, catalizada por diferentes lipasas.

Tanto la lipasa A como la lipasa B de Candida antarctica catalizan la carbonatación selectiva de este sustrato con varios homocarbonatos y carbonatos mixtos. Sin embargo, las enantioselectividades obtenidas son mucho menores que las conseguidas para los procesos análogos de acilación, estudiados en el capítulo 1 de la presente Memoria. Esta pérdida de selectividad es especialmente importante en las resoluciones catalizadas por la CAL-A.

A pesar de ello, variando las condiciones de reacción (disolvente, temperatura o agente de carbonatación), es posible conseguir procesos selectivos. Así, la reacción de alcoxicarbonilación catalizada por la CAL-B en tolueno, a 30°C, con carbonato de dialilo, presenta una $E=42$, con la que es posible obtener el (3S,4R)-piperidincarbinol prácticamente enantiopuro a conversiones mayores del 50%. Sin embargo, la resolución es muy lenta en comparación con los procesos de acilación, requiriéndose largos tiempos de reacción para alcanzar conversiones superiores al 20%. Este inconveniente se puede subsanar en parte aumentando temperatura del proceso, sin que se produzca una pérdida apreciable de la selectividad enzimática.

En nuestro intento por aumentar la velocidad de la alcoxicarbonilación enzimática, se desarrollaron una serie de reacciones utilizando carbonatos mixtos de acetoxima y alquilo. El problema que generan estos agentes de alcoxicarbonilación radica en la formación de los dos posibles productos de reacción, el carbonato de acetoxima y el carbonato de alquilo. Mediante el estudio de diferentes parámetros de reacción, es posible obtener el piperidincarbinol de la configuración deseada con un $ee=94\%$ a una conversión del 56%, en la resolución llevada a cabo con el carbonato mixto de alilo y oxima, a 15°C, en tolueno.

2.4. PARTE EXPERIMENTAL

2.4.1. TÉCNICAS INSTRUMENTALES Y REACTIVOS DE USO GENERAL.

En este capítulo se han realizado estudios enzimáticos con parte de las enzimas empleadas en el capítulo 1. Se ha introducido además el uso de la lipasa de *Candida antarctica B* en su variedad L-2 (CAL-B, CHIRAZYME L-2, c-f, C3) adquirida a Roche Molecular Biochemicals.¹⁸⁰

Para la determinación de los excesos enantioméricos se empleó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando una columna de relleno quiral Chiralcel OD (25 x 0.46 cm, Daicel) y un detector de fotodiodos SPD-M10A en el canal de 215 nm.

Las demás técnicas instrumentales de análisis y determinación estructural de los compuestos, al igual que los reactivos empleados en este capítulo, se encuentran descritos en la parte experimental del capítulo 1.

2.4.2. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS Y DATOS EXPERIMENTALES.

2.4.2.1. Procedimiento general para la alcoxicarbonilación química de (±)-*trans-N*-benciloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxi metilpiperidina, (±)-*trans-1a*.

En un bulbo bajo atmósfera de nitrógeno se disuelve el piperidincarbonil, (±)-*trans-1a* (0.29 mmol, 1 equiv.) en CH₂Cl₂ (6 mL). A continuación se adiciona piridina (0.58 mmol, 2 equiv.) y el correspondiente cloroformiato (0.58 mmol, 2 equiv.). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 12 horas. Una vez concluida la reacción, se lava varias veces con HCl 2.0 N. La fase orgánica resultante se seca sobre Na₂SO₄ y se evapora el disolvente a presión reducida. Los carbonatos obtenidos se purifican por cromatografía en columna de gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla hexano/acetato de etilo 7:3 para los compuestos (±)-*trans-4a*, **4d** y **4e**, y una mezcla hexano/acetato de etilo 8:2 para el carbonato (±)-*trans-4b*.

2.4.2.2. Reacción de alcoxicarbonilación enzimática sobre (±)-*trans-N*-benciloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxi metilpiperidina, (±)-*trans-1a*. Metodología general.

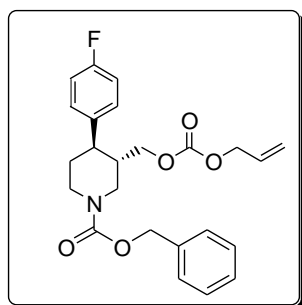
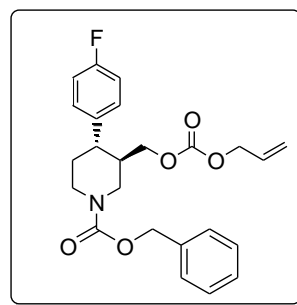
En un erlenmeyer se disuelve el piperidincarbonil (±)-*trans-1a* (0.29 mmol, 1 equiv.) en una suspensión del disolvente correspondiente (12 mL), el carbonato (4 ó 10 equiv.) y la lipasa (125 mg). La reacción se agita orbitalmente (250 r.p.m.) a la temperatura seleccionada, siguiendo su transcurso por cromatografía de capa fina. Una vez concluida, se filtra la enzima, lavando varias veces con CH₂Cl₂. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en capa fina para obtener el alcohol remanente *trans-1a* y los correspondientes carbonatos *trans-4a-e*. Como eluyente, se emplea una mezcla hexano/acetato de etilo 7:3 para las resoluciones con carbonato de dialilo, dimetilo y dibencilo; una mezcla CHCl₃/dietil éter 95:5 para las reacciones con los carbonatos de oxima y CH₂Cl₂/dietil éter 9:1 para la alcoxicarbonilación con carbonato de bencilo y *p*-nitrofenilo.

¹⁸⁰ Actividad de la lipasa CAL-B L2: 400 U/mg.

2.4.2.3. Hidrólisis química de *trans*-*N*-benciloxicarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-isopropilidenaminoxicarboniloximetilpiperidina, *trans*-4c.

Se disuelve el carbonato *trans*-4c (0.23 mmol, 1 equiv.) en metanol seco (4 mL). El sistema se lleva a 0°C y a continuación se adicionan 6 mL de una disolución de metóxido de sodio en metanol 0.2 M. La reacción se agita a esta temperatura durante 1 hora y posteriormente se lleva hasta temperatura ambiente. Tras 6 horas de reacción se añade la resina de intercambio Dowex 50 x 4-400 hasta que el pH alcance un valor cercano al neutro. La resina se filtra, lavando varias veces con metanol, evaporándose el disolvente se evapora a presión reducida para conseguir el correspondiente piperidincarbinol *trans*-1a.

(±)-*trans*-3-Aliloxycarboniloximetil-*N*-benciloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)piperidina,
(±)-*trans*-**4a**

(3*S*,4*R*)-**4a***ee* = 32%[α]_D¹⁸ = -0.7 (*c* = 0.50, MeOH)(3*R*,4*S*)-**4a***ee* = 94%[α]_D¹⁸ = +3.9 (*c* = 9.61, MeOH)

Sólido higroscópico

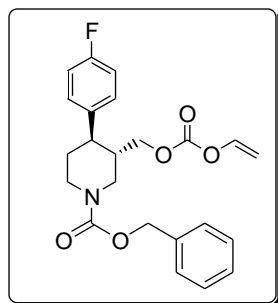
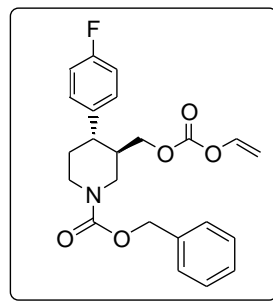
Rendimiento: 84 %.**Fórmula molecular:** C₂₄H₂₆FNO₅**Peso molecular** (g/mol): 427.**I.R.** (KBr, cm⁻¹): 3024, 2944, 1746, 1702, 1651, 1604, 1510, 1478, 1227.**E.M.** (ESI⁺) *m/z* (%): 466 [(M+K)⁺, 100], 450 [(M+Na)⁺, 90], 428 [(M+H)⁺, 7]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.64-1.82 (m, 2H, CH₂), 1.98-2.11 (m, 1H, CH), 2.57 (td, 1H, CH, ³*J*_{HH} 4.0, ³*J*_{HH} 11.7), 2.76-2.90 (m, 2H, 2CHHN), 3.72 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 11.9, ³*J*_{HH} 6.6), 3.93 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 11.9, ³*J*_{HH} 3.1), 4.24-4.30 (m, 1H, CHHN), 4.38-4.48 (m, 1H, CHHN), 4.56 (d, 2H, CH₂alil, ³*J*_{HH} 5.7), 5.17 (s, 2H, CH₂benc), 5.25 (dd, 1H, CH_{vin}, ²*J*_{HH} 2.6, ³*J*_{HH} 10.5), 5.34 (dd, 1H, CH_{vin}, ²*J*_{HH} 2.6, ³*J*_{HH} 15.9), 5.90 (ddd, 1H, CH_{vin}, ³*J*_{HH} 5.7, ³*J*_{HH} 10.5, ³*J*_{HH} 15.9), 6.99 (dd, 2H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.8, ³*J*_{HF} 8.8), 7.12 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.8, ⁴*J*_{HF} 5.5), 7.31-7.40 (m, 5H, 5CH_{arom}).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 33.9 (CH₂), 40.9 (CH), 43.8 (CH), 44.3 (CH₂), 46.8 (CH₂), 67.1 (CH₂), 67.7 (CH₂), 68.4 (CH₂), 115.6 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 20.9), 118.9 (CH₂), 127.8 (CH), 127.9 (CH), 128.4 (CH), 128.5 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 7.6), 131.3 (CH), 136.6 (C), 138.2 (C), 154.6 (C=O), 155.1 (C=O), 161.6 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 244.9)

Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₄H₂₆FNO₅: C, 67.43; H, 6.13; N, 3.28.
Encontrado: C, 67.2; H, 5.9; N, 3.5.

(±)-*trans*-*N*-Benciloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-viniloxycarboniloximetilpiperidina,
(±)-*trans*-**4b**

(3*S*,4*R*)-**4b***ee* = 23% $[\alpha]_D^{18} = -0.4$ (*c* = 0.55, MeOH)(3*R*,4*S*)-**4b***ee* = 80% $[\alpha]_D^{18} = +2.7$ (*c* = 0.64, MeOH)

Sólido higroscópico

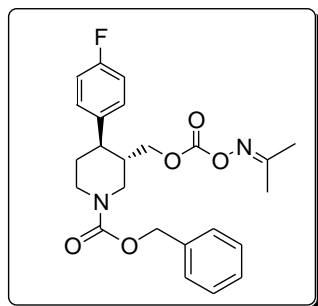
Rendimiento: 79%.**Fórmula molecular:** C₂₃H₂₄FNO₅**Peso molecular** (g/mol): 413.**I.R.** (KBr, cm⁻¹): 3022, 2951, 1759, 1699, 1628, 1605, 1510, 1474, 1218.**E.M.** (ESI⁺) *m/z* (%): 452 [(M+K)⁺, 31], 436 [(M+Na)⁺, 100], 414 [(M+H)⁺, 2]

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.62-1.80 (m, 2H, CH₂), 2.00-2.10 (m, 1H, CH), 2.59 (td, 1H, CH, ³*J*_{HH} 4.1, ³*J*_{HH} 11.3), 2.71-2.90 (m, 2H, 2CHHN), 3.77 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 11.3, ³*J*_{HH} 6.9), 3.99 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 11.3, ³*J*_{HH} 3.1), 4.26-4.53 (m, 2H, 2CHHN), 4.57 (dd, 1H, CH_{vin}, ²*J*_{HH} 2.3, ³*J*_{HH} 5.7), 4.91 (dd, 1H, CH_{vin}, ²*J*_{HH} 2.3, ³*J*_{HH} 14.0), 5.17 (s, 2H, CH₂benc), 6.97-7.06 (m, 3H, 2CH_{arom}+ CH_{vin}), 7.13 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.7, ⁴*J*_{HF} 5.3), 7.36-7.42 (m, 5H, 5CH_{arom}).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 34.0 (CH₂), 41.0 (CH), 43.9 (CH), 44.4 (CH₂), 46.8 (CH₂), 67.2 (CH₂), 68.3 (CH₂), 97.9 (CH₂_{vin}), 115.7 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 21.4), 127.9 (CH), 128.0 (CH), 128.5 (CH), 128.7 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 7.7), 136.6 (C), 138.1 (C), 142.5 (CH), 152.4 (C=O), 155.1 (C=O), 161.7 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 243.9)

Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₃H₂₄FNO₅: C, 66.82; H, 5.85; N, 3.39. Encontrado: C, 67.0; H, 5.8; N, 3.3.

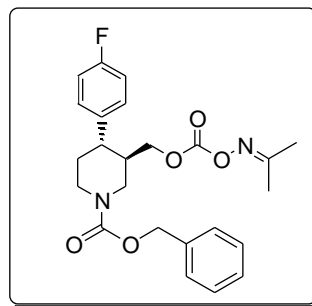
(±)-*trans*-*N*-Benciloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-isopropilidenaminoxicarboximetilpiperidina, *trans*-**4c**



(3*S*,4*R*)-**4c**

ee = 23%

$[\alpha]_D^{18} = -0.4$ (*c* = 0.56, MeOH)



(3*R*,4*S*)-**4c**

ee = 86%

$[\alpha]_D^{18} = +3.9$ (*c* = 0.98, MeOH)

Aceite incoloro

Rendimiento: 84% (obtenido en la entrada 2 de la tabla 2.3).

Fórmula molecular: C₂₄H₂₇FN₂O₅

Peso molecular (g/mol): 442.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3017, 2945, 1766, 1695, 1664, 1605, 1510, 1471, 1228.

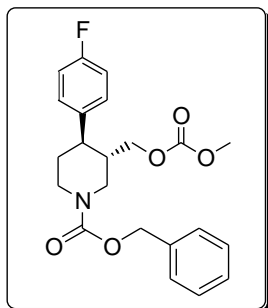
E.M. (ESI⁺) *m/z* (%): 481 [(M+K)⁺, 28], 465 [(M+Na)⁺, 100], 443 [(M+H)⁺, 5]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.63-1.91 (m, 2H, CH₂), 2.02-2.09 (m, 7H, 2CH₃+CH), 2.56 (td, 1H, CH, ³*J*_{HH} 4.1, ³*J*_{HH} 11.5), 2.76-2.94 (m, 2H, 2CHHN), 3.83 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 11.0, ³*J*_{HH} 7.2), 4.02 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 11.0, ³*J*_{HH} 3.3), 4.28-4.36 (m, 1H, CHHN), 4.43-4.52 (m, 1H, CHHN), 5.18 (s, 2H, CH₂_{benc}), 7.00 (dd, 2H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.7, ³*J*_{HF} 8.7), 7.14 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.7, ⁴*J*_{HF} 5.4), 7.34-7.42 (m, 5H, 5CH_{arom}).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 16.8 (CH₃), 21.7 (CH₃), 34.0 (CH₂), 40.9 (CH), 44.0 (CH), 44.3 (CH₂), 46.9 (CH₂), 67.2 (CH₂), 68.1 (CH₂), 115.6 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 20.9), 127.8 (CH), 127.9 (CH), 128.4 (CH), 128.5 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 8.1), 136.6 (C), 138.2 (C), 153.8 (C=O), 155.1 (C=O), 161.5 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 244.9)

Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₄H₂₇FN₂O₅: C, 65.15; H, 6.15; N, 6.33.
Encontrado: C, 65.4; H, 5.9; N, 6.1.

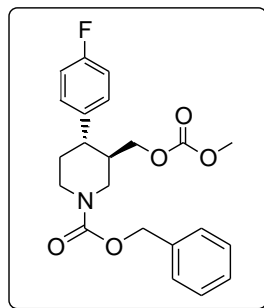
(±)-*trans*-*N*-Benciloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-metoxicarboniloximetilpiperidina,
(±)-*trans*-**4d**



(3*S*,4*R*)-**4d**

ee = 32%

$[\alpha]_D^{25} = -0.9$ (*c* = 1.15, MeOH)



(3*R*,4*S*)-**4d**

ee = 88%

$[\alpha]_D^{25} = +3.4$ (*c* = 0.57, MeOH)

Aceite incoloro

Rendimiento: 87%.

Fórmula molecular: C₂₂H₂₄FNO₅

Peso molecular (g/mol): 401.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3011, 2955, 1749, 1703, 1605, 1510, 1475, 1221.

E.M. (ESI⁺) *m/z* (%): 440 [(M+K)⁺, 32], 424 [(M+Na)⁺, 100], 402 [(M+H)⁺, 8]

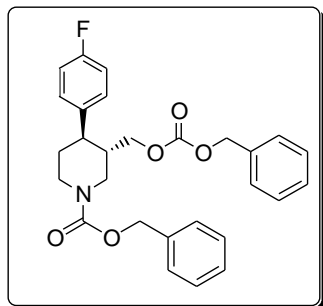
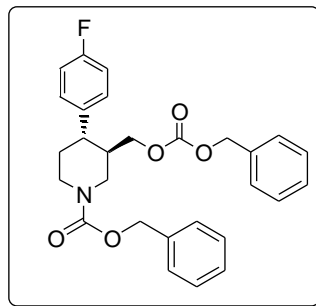
¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.60-1.75 (m, 2H, CH₂), 2.00-2.09 (m, 1H, CH), 2.56 (td, 1H, CH, ³*J*_{HH} 4.0, ³*J*_{HH} 11.7), 2.75-2.89 (m, 2H, 2CHHN), 3.67-3.73 (m, 4H, CHHO+CH₃), 3.93 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 11.1, ³*J*_{HH} 2.8), 4.25-4.32 (m, 1H, CHHN), 4.38-4.44 (m, 1H, CHHN), 5.16 (s, 2H, CH₂_{benc}), 6.99 (dd, 2H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.2, ³*J*_{HF} 8.2), 7.11 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.2, ⁴*J*_{HF} 5.4), 7.28-7.38 (m, 5H, 5CH_{arom}).

¹³C-RMN (CDCl₃, 50.3 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 33.9 (CH₂), 40.9 (CH), 43.9 (CH), 44.4 (CH₂), 46.8 (CH₂), 54.8 (CH₃), 67.2 (CH₂), 67.8 (CH₂), 115.6 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 21.5), 127.8 (CH), 127.9 (CH), 128.4 (CH), 128.5 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 7.6), 136.6 (C), 138.2 (C), 155.1 (C=O), 155.4 (C=O), 161.5 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 244.1)

Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₂H₂₄FNO₅: C, 65.82; H, 6.03; N, 3.49.

Encontrado: C, 65.6; H, 6.3; N, 3.7.

(±)-*trans*-*N*-Benciloxycarbonil-3-benzoiloxycarboniloximetil-4-(4'-fluorofenil)piperidina, (±)-*trans*-**4e**

(3*S*,4*R*)-**4e***ee* = 41%[α]_D¹⁸ = -0.7 (*c* = 1.00, MeOH)(3*R*,4*S*)-**4e***ee* = 92%[α]_D¹⁸ = +2.9 (*c* = 0.74, MeOH)

Sólido higroscópico

Rendimiento: 42%.**Fórmula molecular:** C₂₈H₂₈FNO₅**Peso molecular** (g/mol): 477.**I.R.** (KBr, cm⁻¹): 3065, 3033, 2946, 1748, 1699, 1604, 1507, 1473, 1262.**E.M.** (ESI⁺) *m/z* (%): 516 [(M+K)⁺, 63], 500 [(M+Na)⁺, 100], 478 [(M+H)⁺, 2]

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.60-1.75 (m, 2H, CH₂), 1.98-2.07 (m, 1H, CH), 2.57 (td, 1H, CH, ³*J*_{HH} 4.0, ³*J*_{HH} 12.0), 2.72-2.84 (m, 2H, 2CHHN), 3.73 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 10.8, ³*J*_{HH} 6.5), 3.94 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 10.8, ³*J*_{HH} 2.81), 4.23-4.31 (m, 1H, CHHN), 4.37-4.46 (m, 1H, CHHN), 5.11 (s, 2H, CH₂benc), 5.17 (s, 2H, CH₂benc), 6.97 (dd, 2H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.8, ³*J*_{HF} 8.8), 7.07 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.8, ⁴*J*_{HF} 5.4), 7.31-7.40 (m, 10H, 10CH_{arom}).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 33.8 (CH₂), 40.9 (CH), 43.7 (CH), 44.3 (CH₂), 46.8 (CH₂), 67.1 (CH₂), 67.7 (CH₂), 115.7 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 20.9), 127.8 (CH), 127.9 (CH), 128.2 (CH), 128.4 (CH), 128.5 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 7.6), 134.9 (C), 136.6 (C), 138.2 (C), 154.7 (C=O), 155.0 (C=O), 161.7 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 244.9)

Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₈H₂₈FNO₅: C, 70.43; H, 5.91; N, 2.93.

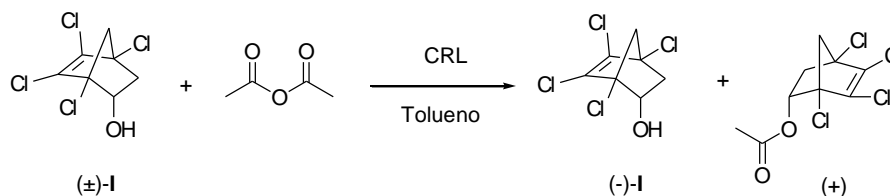
Encontrado: C, 70.7; H, 5.7; N, 3.1.

Capítulo 3

Acilaciones enzimáticas sobre un intermediario en la síntesis de (-)-paroxetina utilizando anhídridos cíclicos

formado o bien inmovilizar el enzima sobre soportes sólidos para intentar minimizar la acción del ácido en su estructura.

Así, en la resolución del 1,4,5,6-tetraclorobiciclo[2.2.1]-hept-5-en-2-ol **I** (utilizado en la síntesis de antibióticos y fitotoxinas) con anhídrido acético catalizada por la CRL (esquema 3.2), se consiguen mejoras notables en la selectividad de la acetilación mediante la adición de bases como KHCO_3 o 2,6-lutidina o mediante la inmovilización del enzima sobre Celite.²⁷⁶



Esquema 3.2.

Tabla 3.1. Efecto de bases e inmovilización en la resolución con anhídridos.

Soporte	Base	<i>c</i> (%)	<i>E</i>
No	No	54	19
No	KHCO_3	45	180
No	2,6-lutidina	47	240
Celita	No	45	490

En los últimos años se están desarrollando otras metodologías para evitar que la formación de ácido en el medio de reacción altere de forma drástica la actividad del enzima. Consisten en la utilización de reguladoras orgánicas en estado sólido y han sido empleadas con éxito en resoluciones enzimáticas donde se generan ácidos carboxílicos. En la actualidad, la utilización de bases orgánicas sólidas no ha sido aplicada de forma directa a las resoluciones enzimáticas con anhídridos de ácidos.²⁷⁷

Philips y col.²⁷⁸ han desarrollado la resolución de (±)-mentol con la lipasas AY-30 y PS en presencia de diversos anhídridos como agentes acilantes. Sin embargo, en todos los casos, las enantioselectividades obtenidas son inferiores a 20.

Las mezclas de anhídridos carboxílicos y carbónicos han sido también utilizadas como agentes de acilación, ya que no generan como subproducto un ácido carboxílico, con lo cual se evitan los problemas derivados de su presencia en el medio.²⁷⁹ Estos reactivos están formados por un ácido carboxílico de cadena lineal y un éster carbónico que preferentemente esté unido a un resto secundario.

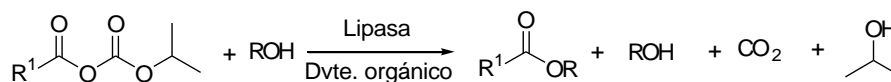
Cuando se emplean en reacciones de acilación, la serina de la lipasa reacciona sobre el resto del ácido carboxílico para generar el intermedio acil-enzima, liberando un hemiacetal inestable que rápidamente se descarboxila para generar CO_2 y un alcohol secundario, con lo que el proceso es totalmente irreversible (esquema 3.3).

²⁷⁶ B. Berger, C. G. Rabiller, K. Königsberger, K. Faber, H. Griengl, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1990**, *1*, 541-546.

²⁷⁷ (a) J. Partridge, P. J. Halling, B. D. Moore, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **2000**, 465-471. (b) M. Quiros, M. C. Parker, N. J. Turner, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 5074-5079.

²⁷⁸ W.-H. Wu, C. C. Akoh, R. S. Philips, *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, *18*, 536-539.

²⁷⁹ E. Guibé-Jampe, Z. Chalecki, M. Bassir, M. Gelo-Pujic, *Tetrahedron*, **1996**, *52*, 4397-4402.



Esquema 3.3

Estos dadores de acilo no son accesibles comercialmente, preparándose a partir de los correspondientes ácidos carboxílicos y cloroformatos de acilo. Por ello, su uso no está muy extendido en la actualidad.

3.1.2. REACCIONES DE ACILACIÓN CON ANHÍDRIDOS CÍCLICOS.

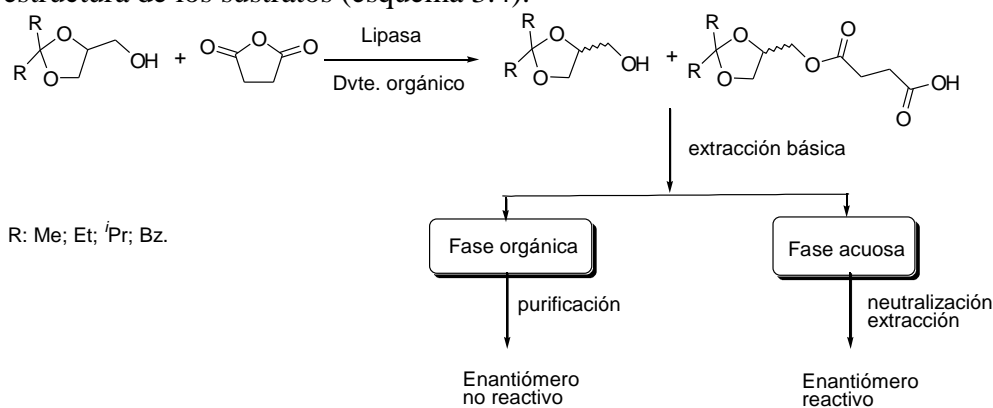
Uno de los mayores inconvenientes prácticos que presentan las resoluciones enzimáticas se encuentra en la costosa separación del enantiómero no deseado del medio de reacción, bien para desecharse o bien para su reutilización en posteriores resoluciones (técnica muy empleada en procesos industriales).

En el caso de reacciones de acilación enzimáticas, los componentes a separar son el alcohol que no reacciona y el éster formado como producto. En muchos casos, ambos presentan puntos de ebullición similares, lo que entorpece su separación por destilación, debiendo emplear métodos cromatográficos para su separación. Estas técnicas son tediosas y requieren grandes cantidades de disolventes, lo que dificulta su aplicación a gran escala.

El problema puede solucionarse empleando como agente de acilación un anhídrido cíclico. Así, la resolución enzimática convertirá un enantiómero del alcohol en un ácido carboxílico, que podrá ser fácilmente separado del enantiómero no reactivo por una simple extracción en medio básico, con lo que se evitan costosos procesos de separación.

Posteriormente, puede recuperarse el alcohol del enantiómero reactivo mediante una simple hidrólisis del ácido y posterior extracción con disolvente orgánico.

Terao y col.²⁸⁰ desarrollaron por primera vez la resolución de alcoholes primarios y secundarios con anhídrido succínico empleando la lipasa P de *Pseudomonas fluorescens* (PFL) y la lipasa B de *Pseudomonas fragi*. En estas reacciones se consiguieron selectividades de moderadas a buenas, siendo este parámetro dependiente de la estructura de los sustratos (esquema 3.4).



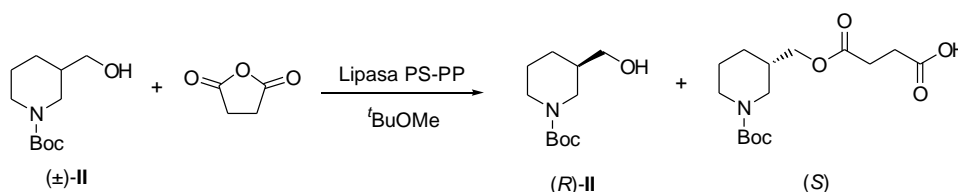
Esquema 3.4

El anhídrido succínico ha sido utilizado para la resolución de una serie de alcoholes bencílicos catalizada por las lipasas PS y Sam 2. En la mayoría de los casos se

²⁸⁰ Y. Terao, K. Tsuji, M. Murata, K. Achiwa, T. Nishio, N. Watanabe, K. Seto, *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37, 1653-1655.

obtuvo una alta enantioselectividad.²⁸¹ Sin embargo, en la resolución de ciclobutilidenetanolos sustituidos con anhídrido succínico empleando las lipasas CCL, PPL y PFL en diferentes disolventes y condiciones de reacción las selectividades obtenidas fueron muy bajas.²⁸²

Recientemente, se ha aplicado esta metodología en la resolución de la *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-3-hidroxi-1-metilpiperidina **II** (esquema 3.5), intermedio clave en la síntesis de un potente inhibidor de la triptasa.²⁸³ Las mejores condiciones de reacción se obtuvieron empleando la lipasa PS-PP (variedad de la lipasa PS soportada sobre propileno), *tert*-butimetiléter y 5 equivalentes de anhídrido succínico, pues con esta cantidad se conseguían mayores velocidades de reacción sin efecto alguno en la selectividad del proceso.



Esquema 3.5.

Otro modo de utilizar anhídridos cíclicos en resoluciones enzimáticas es emplearlos como agentes de derivatización posteriores a la resolución enzimática. Así, el alcohol puede separarse del éster por reacción con anhídrido succínico y extracción en medio básico, procedimiento aplicado por Wirz y col.²⁸⁴ en las resoluciones de una serie de hidroxipiperidinas precursoras de inhibidores de bajo peso molecular de la trombina. El inconveniente de este método estriba en la necesidad de un paso adicional de reacción.

A la vista del gran interés práctico que presentan las reacciones de acilación con anhídridos cíclicos, en este capítulo se estudiará la resolución enzimática de uno de los precursores de (-)-paroxetina en presencia de una serie de anhídridos de ácido de diferente reactividad. Empleando estos agentes acilantes, la separación entre el sustrato remanente y el producto de reacción será fácilmente realizada por extracción en medio básico, con lo que se facilita su aplicación a escala industrial.

²⁸¹ A. L. Gutman, D. Brenner, A. Boltanski, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, 4, 839-844.

²⁸² J. C. Fiaud, R. Gil, J. Y. Legros, L. Aribi-Zouiouche, W. A. König, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 6967-6970.

²⁸³ A. Goswami, J. M. Howell, E. Y. Hua, D. Mirfakhrae, M. C. Soumeillant, S. Swaminathan, X. Quian, F. A. Quiroz, T. C. Vu, X. Wang, B. Zheng, D. R. Kronenthal, R. N. Patel. *Org. Process Res. Dev.* **2001**, 5, 415-420.

²⁸⁴ B. Wirz, W. Walther, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1992**, 3, 1044-1049.

3.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

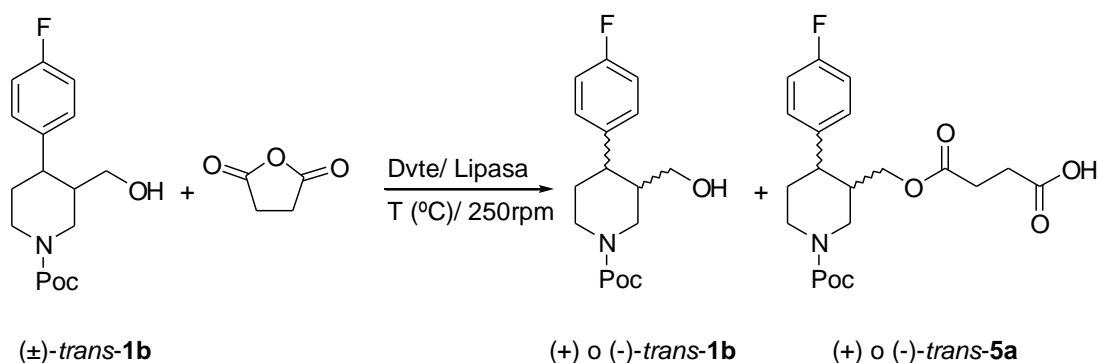
En los capítulos precedentes de la presente Memoria, ha sido descrita la resolución de 4-(4'-fluorofenil)-3-hidroximetilpiperidinas *N*-protegidas empleando reacciones de acilación o alcoxicarbonilación enzimáticas. Modificando determinadas condiciones de reacción, como agente acilante, temperatura, disolvente, etc., es posible conseguir procesos altamente selectivos en los que se obtiene el enantiómero deseado para completar la síntesis de (-)-paroxetina con elevados excesos enantioméricos.

Estos métodos presentan numerosas ventajas para la preparación a escala industrial de (-)-paroxetina debido a su fácil disponibilidad, bajo coste, condiciones de reacción suaves y prácticamente nulo impacto medioambiental. Sin embargo, su mayor inconveniente estriba en la necesidad de emplear procesos cromatográficos para proceder a la separación entre el sustrato remanente y el producto de las resoluciones.

La utilización de anhídridos cíclicos como agentes de acilación facilita de manera considerable el desarrollo de los procesos sintéticos gran escala. La formación como producto de reacción de un ácido carboxílico permite la separación entre sustrato y producto mediante un proceso de extracción. Por ello, decidimos aplicar esta metodología a la resolución del piperidincarbinol protegido con el grupo feniloxycarbonilo, (\pm)-*trans*-**1b**.

3.2.1. REACCIONES DE RESOLUCIÓN CON ANHÍDRIDO SUCCÍNICO.

En los primeros experimentos realizados, se utilizaron diferentes lipasas en la esterificación de (\pm)-*trans*-**1b** con 2 equivalentes de anhídrido succínico en tolueno a 30°C (esquema 3.6). En la tabla 3.2 se muestran los resultados con las lipasas inmovilizadas de *Candida antarctica* (CAL-A, CAL-B y CAL-B L-2) y de *Pseudomonas cepacea* PSC. Con otras enzimas, como la PSL, la CRL y la PPL, únicamente se recupera el alcohol de partida a las 168 horas de reacción.



Esquema 3.6

Entre las lipasas probadas, la CAL-A presenta la mayor enantioselectividad ($E=51$, entrada 1), alcanzando el proceso una conversión del 40% a las 2 horas de reacción. La lipasa de CAL-B cataliza el proceso más lentamente (entrada 2), ya que son necesarias 7 horas de reacción para obtener una $c=33\%$, siendo la resolución menos selectiva que con la variedad A ($E=37$). El preparado CAL-B L-2 muestra una actividad similar a la Novozym 435, sin embargo, el proceso es mucho menos selectivo, como se muestra en la entrada 3, mientras que las lipasas PSC presenta muy baja velocidad de reacción y razón enantiomérica para la resolución con anhídrido succínico (entrada 4).

Para optimizar la reacción de acilación, decidimos estudiar el efecto de otros parámetros que afectan a la enantioselectividad de la resolución de (\pm)-*trans*-**1b** catalizada por la CAL-A. En primer lugar se analizó la influencia del disolvente orgánico. La reacción en *t*BuOMe (entrada 5) es más lenta y menos selectiva que en tolueno, mientras que con *i*Pr₂O (entrada 6) se consigue un importante aumento de la velocidad de reacción, pues en 1 hora se alcanza una conversión del 45%, pero se pierde prácticamente toda la selectividad en la acilación ($E=6.0$). En otros disolventes como 1,4-dioxano, acetona, *tert*-butanol o acetonitrilo no se observa reacción incluso en tiempos de 168 horas.

Posteriormente se realizó una prueba en tolueno a 15°C (entrada 7). Como es de esperar, se produce un descenso en la velocidad de la resolución. La enantioselectividad en estas condiciones no se ve afectada ($E=55$).

Finalmente, se estudió la influencia de la cantidad de anhídrido presente en el medio de reacción, puesto que la formación de un ácido carboxílico como subproducto de la reacción puede afectar a las propiedades del biocatalizador. Como se observa en las entradas 8 y 9, cuando se emplea 1 equivalente de anhídrido, se produce un descenso en la velocidad de reacción, mientras que ésta no se modifica en el proceso con 4 equivalentes. En ambos experimentos, las enantioselectividades obtenidas son menores que en la reacción con 2 equivalentes.

Tabla 3.2. Reacciones de acilación de (\pm)-*trans*-**1b** con 2 equivalentes de anhídrido succínico a 30°C.

Entrada	Lipasa	Dvte	t (h)	c (%)	<i>trans</i> - 1b	<i>trans</i> - 5a	E
					<i>ee</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^a	
1	CAL-A	Tolueno	2	40	61	93	51
2	CAL-B	Tolueno	7	33	46	92	37
3	PSC	Tolueno	168	7	3	40	2.4
4	L-2	Tolueno	7	30	37	85	17
5	CAL-A	<i>t</i> BuOMe	2	24	29	91	28
6	CAL-A	<i>i</i> Pr ₂ O	1	47	51	57	6.0
7	CAL-A ^b	Tolueno	5	42	67	93	55
8	CAL-A ^c	Tolueno	2	26	32	94	44
9	CAL-A ^d	Tolueno	2	42	59	91	38

^a Determinados mediante HPLC. ^b Reacción realizada a 15°C. ^c Resolución empleando 1 equiv. de anhídrido succínico. ^d Reacción empleando 4 equiv. de anhídrido.

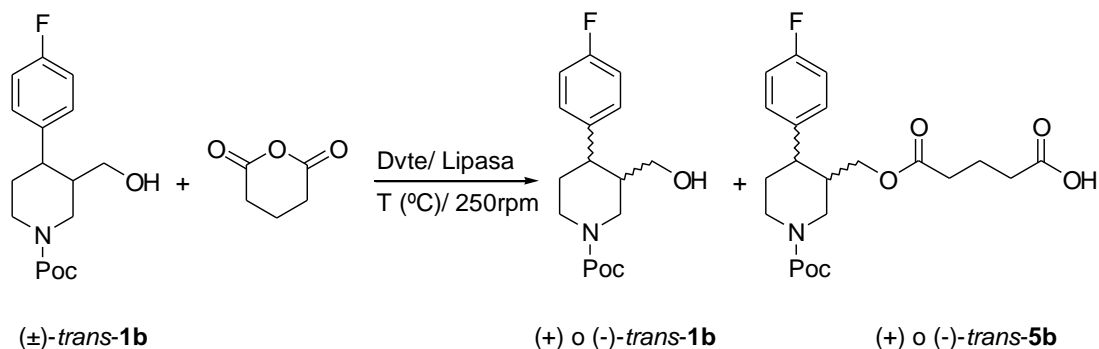
La separación entre el sustrato y el producto de las resoluciones aquí comentadas, se realiza mediante el tratamiento del crudo de reacción en CHCl₃ y posterior extracción en medio básico (disolución al 5% de NaHCO₃). En la fase orgánica permanece el alcohol *trans*-**1b** mientras que a la fase acuosa se transfiere el carboxilato del ácido *trans*-**5a**, que por posterior acidificación y extracción con *t*BuOMe permite recuperar el ácido carboxílico.

Al igual que en los procesos de acilación ya comentados en los capítulos anteriores, la CAL-A muestra una preferencia estereoquímica opuesta al resto de las lipasas empleadas. Así, mientras esta lipasa acila preferentemente el enantiómero (3*S*,4*R*), con el resto de biocatalizadores se acila mayoritariamente el isómero (3*R*,4*S*).

Por lo tanto, en los procesos catalizados por la CAL-A es necesaria la hidrólisis en medio básico del ácido (3*S*,4*R*)-**5a** para conseguir el alcohol (3*S*,4*R*)-**1b** y llevar a cabo la síntesis de (-)-paroxetina.

3.2.2. REACCIONES DE RESOLUCIÓN CON ANHÍDRIDO GLUTÁRICO.

Debido a que los mejores resultados empleando anhídrido succínico se consiguen con la CAL-A, lo que implica un mayor número de etapas para obtener el enantiómero (3*S*,4*R*)-**1b** y a que con el mayor valor de *E* obtenido sólo es posible obtener el producto (3*S*,4*R*)-**5a** con elevados excesos enantioméricos a bajas conversiones, se estudiaron otros anhídridos cíclicos en los procesos de resolución.



Esquema 3.7.

El empleo de anhídrido glutárico (esquema 3.7, tabla 3.3) provoca efectos diferentes en la selectividad de las resoluciones catalizadas por las dos lipasas de *Candida antarctica*. En el caso de la lipasa A (entrada 1) hay una importante reducción en la selectividad de la acilación ($E=9.0$), sin embargo, la reacción catalizada por la CAL-B es mucho más enantioselectiva ($E=84$) cuando se emplea como disolvente tolueno, 30°C y 2 equivalentes de anhídrido (entrada 2). Así, en el proceso catalizado por la lipasa B de *Candida antarctica* es posible conseguir (3*S*,4*R*)-**1b** con excesos enantioméricos mayores del 97% a conversiones superiores al 52%. Se ha podido comprobar, que en el caso de utilizar anhídrido glutárico, las velocidades de reacción son menores con ambas lipasas. En la resolución catalizada por CAL-B son necesarias 20 horas de reacción para alcanzar una conversión del 44%. A la vista del excelente resultado conseguido, se estudió el efecto de la modificación del disolvente (entradas 3 y 4). El empleo de ^tBuOMe provoca velocidades de reacción más altas, alcanzándose una conversión del 52% a las 10 horas de reacción, pero la resolución, a pesar de presentar una buena enantioselectividad, es mucho menos selectiva ($E=37$). Con ⁱPr₂O, se consigue una mayor velocidad de reacción, pero se observa una significativa reducción en la enantioselectividad ($E=11$).

Tabla 3.3. Reacciones de resolución con 2 equivalentes de anhídrido glutárico a 30°C.

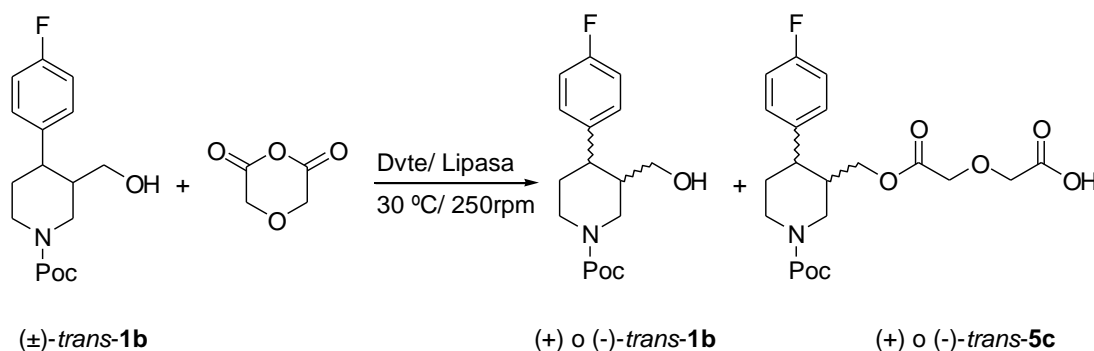
Entrada	Lipasa	Dvte	t (h)	c (%)	<i>trans</i> - 1b / <i>trans</i> - 5b		<i>E</i>
					<i>ee</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^a	
1	CAL-A	Tolueno	2	32	35	73	9.0
2	CAL-B	Tolueno	20	44	75	95	84
3	CAL-B	^t BuOMe	10	53	93	83	37
4	CAL-B	ⁱ Pr ₂ O	6	51	69	71	11
5 ^b	CAL-B	Tolueno	20	34	50	96	80
6 ^c	CAL-B	Tolueno	20	36	54	96	80
7 ^d	CAL-B	Tolueno	20	44	70	89	36

^a Determinados por HPLC. ^b Reacción realizada a 15°C. ^c Resolución empleando 1 equiv. de anhídrido glutárico. ^d Reacción empleando 4 equiv. de anhídrido.

El descenso en la temperatura de la resolución en tolueno hasta los 15°C no produce ninguna mejora en la enantioselectividad, como se observa en la entrada 5. Finalmente, con la variación de la cantidad de anhídrido glutárico se consiguen resultados similares a los obtenidos en el caso del anhídrido succínico (entradas 6 y 7). Con 1 equivalente de glutárico se obtienen menores velocidades de reacción y la misma enantioselectividad, mientras que con 4 equivalentes la velocidad de la resolución es la misma que con 2 equivalentes, pero se produce una importante reducción en la razón enantiomérica conseguida ($E=36$), lo que parece indicar una cierta inhibición enzimática a esas concentraciones del agente de acilación.

3.2.3. RESOLUCIONES CON ANHÍDRIDO DIGLICÓLICO.

La resolución del piperidincarbinol (\pm)-*trans*-**1b** se consigue con una excelente selectividad empleando tolueno, 30°C y 2 equivalentes de anhídrido glutárico en una resolución catalizada por la CAL-B. Con el objetivo de aumentar la velocidad de la reacción, decidimos estudiar este proceso utilizando un anhídrido muy similar al glutárico, como es el anhídrido diglicólico (esquema 3.8). Se podría pensar que la presencia de un átomo de oxígeno en su estructura implica una mayor reactividad, con lo que en principio se podrían conseguir resoluciones más rápidas sin variación apreciable en la enantioselectividad.



Esquema 3.8.

Sorprendentemente, en las resoluciones realizadas a 30°C con las dos lipasas de *Candida antarctica* en tolueno y ^tBuOMe en presencia de 2 equivalentes de anhídrido diglicólico se obtienen velocidades de reacción y razones enantioméricas mucho menores que las conseguidas con anhídrido glutárico (tabla 3.4, entradas 1-4). Dentro de estas resoluciones, la CAL-B presenta mayor actividad que la CAL-A, siendo las reacciones en ^tBuOMe considerablemente más rápidas que en tolueno.

Tabla 3.4. Resoluciones enzimáticas sobre (\pm)-*trans*-**1b** con 2 equivalentes de anhídrido diglicólico a 30°C.

Entrada	Lipasa	Dvte	t (h)	c (%)	<i>trans</i> - 1b	<i>trans</i> - 5c	<i>E</i>
					<i>ee</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^a	
1	CAL-A	Tolueno	168	12	3	43	2.6
2	CAL-B	Tolueno	168	51	30	28	2.4
3	CAL-A	^t BuOMe	96	6	2	37	2.2
4	CAL-B	^t BuOMe	96	52	33	30	2.5

^a Determinados mediante HPLC.

Estos resultados se pueden explicar por la inhibición del enzima debida a las variaciones del pH del medio durante la reacción, puesto que los productos generados son los ácidos carboxílicos *trans*-**5a-f**. Por comparación entre los valores de pK_a de la

primera ionización de los diácidos correspondientes (ácido diglicólico, pK_a 4.15²⁸⁵ y ácido glutárico pK_a 5.27)²⁸⁶, se puede asumir que el producto *trans*-**5c** es más ácido que el *trans*-**5b**. Como consecuencia de esta mayor acidez, el producto *trans*-**5c** puede protonar ciertas posiciones claves del centro activo del enzima, causando su inhibición.

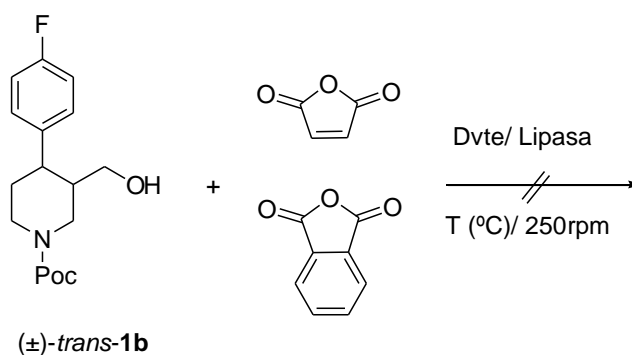
Para probar esta hipótesis, y tomando como referencia la resolución descrita en la entrada 2 de la tabla 3.3, se llevó a cabo una reacción catalizada por la CAL-B en tolueno a 30°C con 1 equivalente de anhídrido diglicólico y 1 equivalente de anhídrido glutárico. Después de 20 horas, los dos posibles productos de reacción se obtuvieron (mayoritariamente el ácido *trans*-**5b**) con una conversión del 18%, frente al 46% obtenido con 2 equivalentes de glutárico. El enzima usado en esta reacción se lavó con tolueno seco y fue reutilizado para una nueva reacción en presencia de dos equivalentes de anhídrido glutárico, para generar el producto con una conversión del 44% a las 20 horas y una $E=83$, lo que significa que la actividad y selectividad enzimática se recuperaron por completo. También se realizó una prueba con enzima nueva y 2 equivalentes de anhídrido glutárico en presencia de 0.1 equivalentes de ácido diglicólico. La conversión en este caso (25%) fue menor que en ausencia de ácido (46%), indicando inhibición por el ácido diglicólico.

Como ya se ha descrito en los antecedentes de este capítulo, la adición de base puede compensar este cambio en la acidez del medio de reacción. Desafortunadamente, no se pudo probar el efecto de una pequeña cantidad de NEt_3 en la resolución realizada con anhídrido diglicólico como donador de acilo, debido a que en estas condiciones, se produce la reacción espontánea no enzimática en competencia con el proceso biocatalítico.

Se puede concluir por los resultados obtenidos que la inhibición es reversible y debida al producto formado en la reacción. Tampoco se puede descartar cierto grado de inhibición por el propio anhídrido diglicólico.

3.2.4. REACCIONES DE ACILACIÓN CON ANHÍDRIDO FTÁLICO Y ANHÍDRIDO MALEÍCO.

Dentro de las reacciones de resolución con anhídridos cíclicos, también se estudió el comportamiento de dos anhídridos α,β -insaturados, como son el anhídrido maleico y el ftálico (esquema 3.9). En principio, por la estabilidad que presentan al ser sistemas conjugados, van a ser mucho menos reactivos que los anhídridos estudiados hasta ahora.



Esquema 3.9.

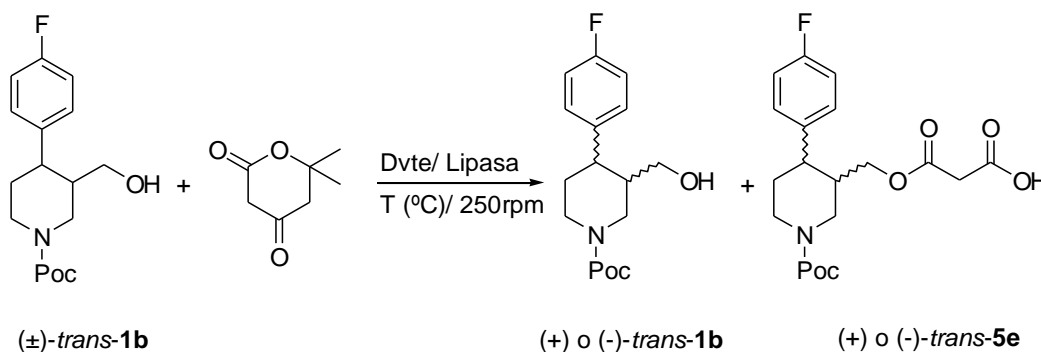
²⁸⁵ S. N. Dubey, R. K. Baweia, D. M. Puri, *J. Indian Chem. Soc.*, **1982**, 59, 1133-1135.

²⁸⁶ Y. Kiso, T. Hirokawa, *Chem. Lett.*, **1980**, 323-326.

En ninguna de las reacciones realizadas con las lipasas CAL-A y CAL-B en tolueno y *t*BuOMe a 30 y 50°C se observa la formación de los productos de reacción *trans*-5d o *trans*-5e después de 168 horas de reacción.

3.2.5. REACCIONES DE RESOLUCIÓN CON EL ÁCIDO DE MELDRUM.

Finalmente, el ácido de Meldrum fue utilizado como donador de acilo (esquema 3.10, tabla 3.5). Puesto que este reactivo es el equivalente sintético del anhídrido malónico, es posible generar el correspondiente malonato *trans*-5f a través de las correspondientes acilaciones enzimáticas.



Esquema 3.10.

En las resoluciones desarrolladas en tolueno a 30°C con 2 equivalentes de ácido de Meldrum, ninguna de las dos isoenzimas de *Candida antarctica* cataliza la reacción a las 168 horas (entradas 1 y 2).

La modificación del disolvente de reacción (entradas 3-6) o el incremento de la temperatura de reacción hasta los 50°C (entradas 7 y 8) permite obtener el producto *trans*-5f con conversiones bajas o moderadas a largos tiempos de reacción, siendo mucho más lentas las resoluciones catalizadas por la CAL-A. Sin embargo, las enantioselectividades obtenidas en todos los casos son demasiado bajas para que el proceso presente alguna utilidad sintética.

La adición de 0.7 equivalentes de NEt₃ en los procesos realizados en tolueno a 30°C provoca un aumento en la reactividad de las acilaciones, debido fundamentalmente a que tiene lugar la reacción química sin la intervención del biocatalizador.

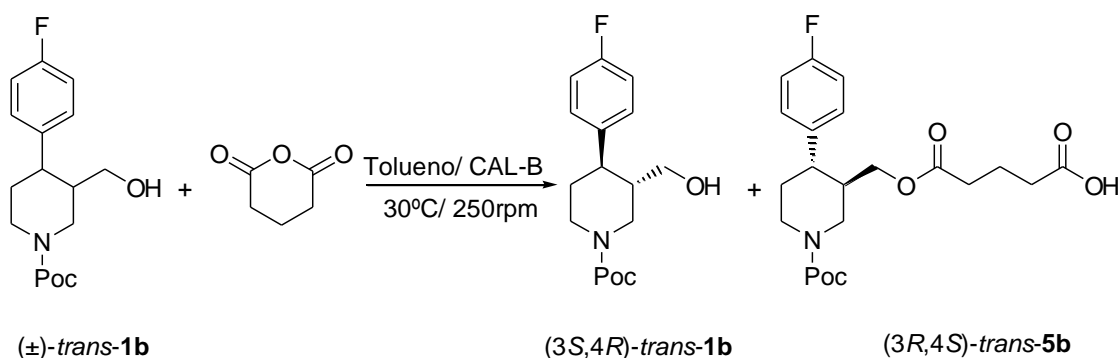
Tabla 3.5. Resoluciones enzimáticas sobre (±)-*trans*-1b con 2 equivalentes del ácido de Meldrum a 30°C.

Entrada	Lipasa	Dvte	t (h)	c (%)	<i>trans</i> -1b / <i>trans</i> -5b		E
					ee (%) ^a	ee (%) ^a	
1	CAL-A	Tolueno	168	≤3	--	--	--
2	CAL-B	Tolueno	168	≤3	--	--	--
3 ^b	CAL-A	Tolueno	168	10	2	19	1.4
4 ^b	CAL-B	Tolueno	168	38	1	2	1.1
5	CAL-A	<i>t</i> BuOMe	144	19	1	6	1.1
6	CAL-B	<i>t</i> BuOMe	144	44	48	31	2.7
7	CAL-A	<i>i</i> Pr ₂ O	120	29	16	39	2.6
8	CAL-B	<i>i</i> Pr ₂ O	120	40	23	34	2.5

^a Determinados por HPLC. ^b Reacciones llevadas a cabo a 50°C.

3.2.6. ESTUDIO DE RECILAJE ENZIMÁTICO.

Para analizar la eficacia de las acilaciones catalizadas por anhídridos cíclicos sobre (\pm)-*trans*-**1b**, se realizó el estudio de la reutilización enzimática en la reacción catalizada por la CAL-B con 1 equivalente de anhídrido glutárico en tolueno a 30°C ($E=80$), como se muestra en el esquema 3.11. Deteniendo el proceso a las 20 horas de reacción, es posible conseguir una conversión del 36%. Una vez completado un ciclo catalítico, la enzima se lava con tolueno seco, se seca bajo atmósfera inerte y se utiliza en la siguiente reacción.



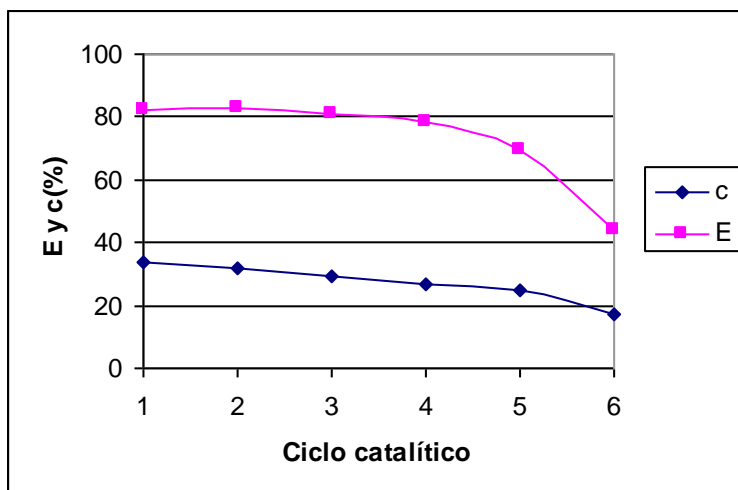
Esquema 3.11.

Como se puede observar en la tabla 3.6 y en la gráfica 3.1, la reutilización de la lipasa de *Candida antarctica* B permite obtener la misma enantioselectividad en el segundo y tercer ciclo biocatalítico, con sólo un ligero descenso en la velocidad de reacción. En el cuarto y quinto ciclo se observa una moderada pérdida de la actividad enzimática, tal como indican las menores conversiones y enantioselectividades obtenidas. En el sexto ciclo, el descenso en la actividad del biocatalizador ya es apreciable, puesto que se consigue una conversión del 17% a las 20 horas de reacción, mientras que la enantioselectividad es prácticamente el 50% de la mostrada inicialmente por el enzima. Con esta razón enantiomérica, serían necesarias conversiones mayores del 54% para obtener (3*S*,4*R*)-**1b** con excesos enantioméricos superiores al 97%.

Tabla 3.6. Estudio de reutilización enzimática en la acilación de (\pm)-*trans*-**1b** con 1 equivalente de anhídrido glutárico en tolueno a 30°C.

Entrada	Ciclo	<i>c</i> (%)	<i>(-)</i> - <i>trans</i> - 1b <i>(+)</i> - <i>trans</i> - 5b		<i>E</i>
			<i>ee</i> (%) ^a	<i>ee</i> (%) ^a	
1	1°	34	49.1	96.1	82
2	2°	32	44.9	96.3	82
3	3°	29	40.4	96.4	81
4	4°	27	37.0	96.4	78
5	5°	25	32.8	96.1	69
6	6°	17	20.2	94.6	43

^a Determinados por HPLC.



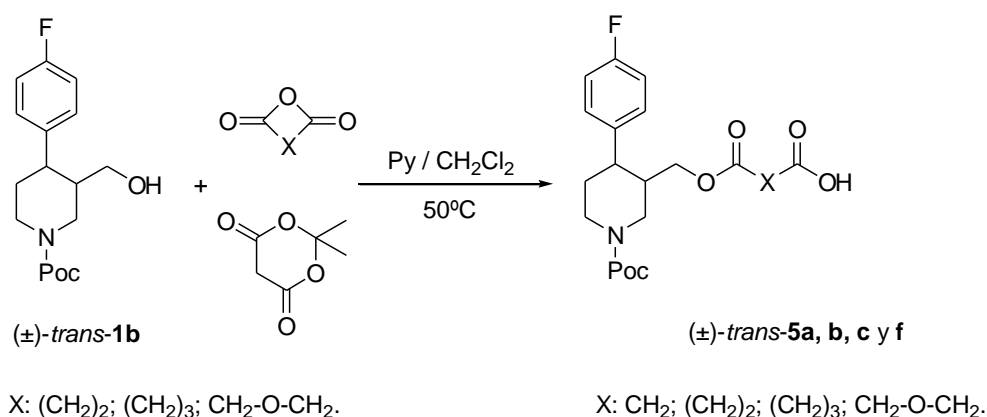
Gráfica 3.1.

3.2.7. ASIGNACIÓN DE LAS CONFIGURACIONES ABSOLUTAS.

La configuración absoluta del piperidincarbinol *trans*-**1b** fue asignada según la metodología descrita en el capítulo 1 (apartado 1.2.6.1). Una vez obtenida la configuración del sustrato, queda asignada la de los ácidos carboxílicos *trans*-**5a, b, c** y **f**.

3.2.8. DETERMINACIÓN DE LOS EXCESOS ENANTIOMÉRICOS.

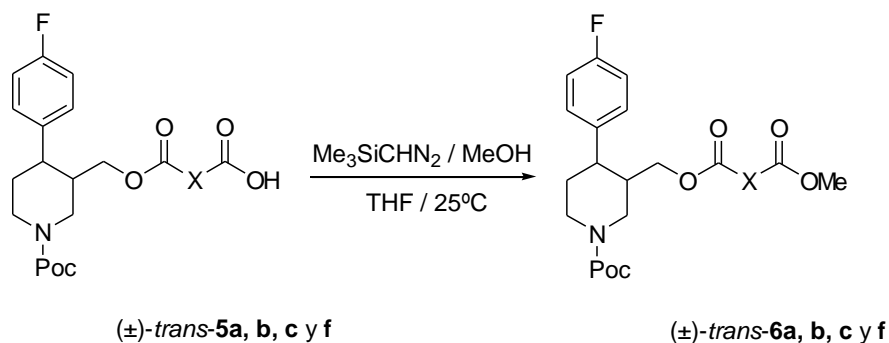
Los excesos enantioméricos del sustrato y de los productos se determinaron mediante HPLC. El sustrato de la reacción *trans*-**1b** se analiza en las condiciones descritas en el capítulo 1. Los ácidos carboxílicos racémicos (\pm)-*trans*-**5a, b, c** y **f** se prepararon a partir de (\pm)-*trans*-**1b** por reacción con los correspondientes anhídridos cíclicos o el ácido de Meldrum y piridina en CH_2Cl_2 como disolvente (esquema 3.12).



Esquema 3.12.

Sin embargo, estos compuestos no pudieron ser analizados directamente por HPLC, por lo que hubieron de derivatizarse mediante una reacción de esterificación con trimetilsilildiazometano (TMSCHN_2) en metanol y THF para obtener los

correspondientes derivados metilados (\pm)-*trans*-**6a**, **b**, **c** y **f** (esquema 3.13).²⁸⁷ El análisis de estos derivados por HPLC se realizó empleando la columna de relleno quiral Chiralcel OD a una longitud de onda (λ) de 215 nm, obteniéndose en todos los casos resoluciones mayores de 1.6. En la tabla 3.7 se muestran las condiciones experimentales requeridas.



X: CH₂; (CH₂)₂; (CH₂)₃; CH₂-O-CH₂.

Esquema 3.13.

Tabla 3.7. Condiciones empleadas para la determinación de los *ees* de los ácidos carboxílicos metilados *trans*-**6**.^a

Compuesto	Condiciones ^a	t_{R1}	t_{R2}	R_S
<i>trans</i> - 6a	<i>n</i> -Hex/IPA (80:20)	25.89	35.75	4.4
	0.8 mL/min T=30°C	(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)	(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)	
<i>trans</i> - 6b	<i>n</i> -Hex/IPA (80:20)	17.77	30.70	5.9
	0.8 mL/min T=30°C	(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)	(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)	
<i>trans</i> - 6c	<i>n</i> -Hex/IPA (70:30)	19.54	54.30	9.2
	0.9 mL/min T=35°C	(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)	(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)	
<i>trans</i> - 6f	<i>n</i> -Hex/IPA (80:20)	19.27	38.45	5.5
	0.8 mL/min T=35°C	(3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)	(3 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)	

^a Concentración de las muestras de 0.25 a 1 mg/mL.

²⁸⁷ S. C. Fields, W. H. Dent III, F. R. Green III, E. G. Tromiczak, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 1967-1970.

3.3. CONCLUSIONES

En este capítulo se ha realizado la resolución del precursor de (-)-paroxetina (\pm)-trans-N-feniloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroximetilpiperidina a través de reacciones de acilación enzimática con diferentes anhídridos cíclicos.

Tras una optimización de los diversos parámetros que influyen en la selectividad de las acilaciones enzimáticas, como biocatalizador, disolvente, temperatura, anhídrido y su concentración en el medio, es posible obtener procesos de elevada selectividad con las dos variedades de la lipasa de Candida antarctica. Así, la CAL-A cataliza la acilación con anhídrido succínico en tolueno a 30°C con una $E=51$, mientras que con la CAL-B se consiguen excelentes enantioselectividades en los procesos con anhídrido glutárico en tolueno a 30°C. En ambos casos, los valores óptimos de actividad y selectividad enzimática se consiguen con dos equivalentes de anhídrido. La enantiodiscriminación en las resoluciones es la misma que la obtenida en las acilaciones con ésteres.

El empleo de anhídrido diglicólico en las resoluciones conduce a bajas selectividades, debido a procesos de inhibición reversible del enzima causados por el producto de reacción. No se debe descartar la propia inhibición por el anhídrido.

Con otros anhídridos empleados, como maleico, ftálico y el ácido de Meldrum (precursor sintético del anhídrido malónico), o bien no se produce catálisis o bien ésta es muy lenta y muy poco selectiva.

En el estudio de reciclaje enzimática en el proceso catalizado por la CAL-B en tolueno con anhídrido glutárico a 30°C, se observa que es posible mantener las propiedades del biocatalizador durante cinco ciclos catalíticos, sin una pérdida muy apreciable en la enantioselectividad de la acilación.

3.4. PARTE EXPERIMENTAL

3.4.1. TÉCNICAS INSTRUMENTALES Y REACTIVOS DE USO GENERAL

Las enzimas utilizadas en las resoluciones enzimáticas realizadas en este capítulo han sido empleadas en los capítulos 1 y 2, con la excepción de la lipasa de *Chromobacterium viscosum* (CVL) adquirida a Genzyme.

Para la determinación de los excesos enantioméricos se empleó HPLC, utilizando una columna Chiralcel OD (25 x 0.46 cm, Daicel). La detección se llevó a cabo por un detector de fotodiodos SPD-M10A en el canal de 215 nm.

El resto de métodos generales empleados en este capítulo se encuentran descritos en la parte experimental del capítulo 1.

3.4.2. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS Y DATOS EXPERIMENTALES.

3.4.2.1. Procedimiento general para la síntesis de los derivados monoácidos racémicos, (\pm)-*trans*-5a-f.

Se disuelve bajo atmósfera de nitrógeno la (\pm)-*trans*-*N*-feniloxicarbonil-4-(4'fluorofenil)-3-hidroximetilpiperidina, (\pm)-*trans*-**1b** (0.3 mmol, 1 equiv.) en 10 mL de CH₂Cl₂. A continuación se adiciona piridina (1.2 mmol, 4 equiv.) y el correspondiente anhídrido cíclico o el ácido de Meldrum (1.2 mmol, 4 equiv.). El sistema se calienta a 50°C durante 24 horas. A continuación se añade sobre la reacción resina de intercambio Dowex 50 x 4-400 hasta pH ligeramente ácido. La resina se filtra, lavando varias veces con CH₂Cl₂. La fase orgánica se extrae varias veces con una disolución acuosa de NaHCO₃ al 5% (3 x 15 mL). La fase acuosa resultante se acidifica con HCl 1.0 N y se extrae con *tert*-butilmetiléter (4 x 25 mL). Esta fase orgánica obtenida se lava con una disolución acuosa de NaCl al 10 % (3 x 25 mL), se seca sobre Na₂SO₄ y se evapora el disolvente bajo presión reducida para obtener el correspondiente ácido carboxílico, (\pm)-*trans*-**5a-f**.

3.4.2.2. Reacción de resolución enzimática de (\pm)-*trans*-*N*-feniloxicarbonil-4-(4'fluorofenil)-3-hidroximetilpiperidina, (\pm)-*trans*-**1b** con anhídridos cíclicos o el ácido de Meldrum. Metodología general.

En un erlenmeyer se disuelve la hidroximetilpiperidina, (\pm)-*trans*-**1b** (0.3 mmol, 1 equiv.) en una suspensión del disolvente correspondiente (12 mL), el anhídrido cíclico o el ácido de Meldrum (1,2 ó 4 equiv.) y la lipasa seleccionada. La reacción se coloca bajo agitación orbital (250 r.p.m.) a la temperatura elegida y se sigue su transcurso mediante cromatografía en capa fina. Una vez concluida, se filtra la enzima, lavando varias veces con CH₂Cl₂ y se concentra a sequedad. El aceite se disuelve en CH₂Cl₂ (10 mL) y se extrae varias veces con una disolución acuosa de NaHCO₃ al 5% (3 x 15 mL). La fase orgánica se evapora para obtener el alcohol (+) o (-)-*trans*-**1b**. La fase acuosa resultante se acidifica con HCl 1.0 N y se extrae con *t*BuOMe (4 x 25 mL). Esta fase orgánica obtenida se lava con una disolución acuosa de NaCl al 10 % (3 x 25 mL), se seca sobre Na₂SO₄ y se evapora el disolvente bajo presión reducida para obtener el correspondiente ácido carboxílico (+) o (-)-*trans*-**5a**, **5b**, **5c** ó **5f**.

3.4.2.3. Procedimiento general para la metilación de los ácidos carboxílicos con objeto de determinar su exceso enantiomérico mediante HPLC.

En un bulbo bajo atmósfera inerte se disuelve el correspondiente ácido carboxílico (\pm)-*trans*-**5a**, **5b**, **5c** ó **5f** (0.15 mmol, 1 equiv.) en 1 mL de THF seco. A continuación se añaden lentamente 200 μ L de metanol seco y 200 μ L de una disolución de trimetilsilildiazometano 2.0 M en hexano. La reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas y a continuación se evapora el disolvente hasta sequedad. El aceite resultante se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla hexano/acetato de etilo 7:3 para los compuestos (\pm)-*trans*-**6a**, **6b** y **6f** o una mezcla CH₂Cl₂/diel éter 8:2 para el éster (\pm)-*trans*-**6f**.

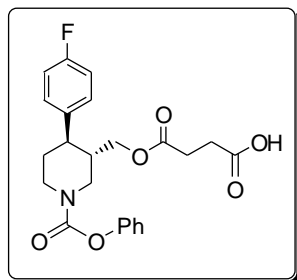
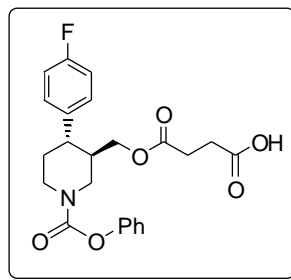
3.4.2.4. Hidrólisis química de (3*S*,4*R*)-3-[(3-carboxipropanoil)oximetil]-*N*-feniloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)piperidina, (3*S*,4*R*)-**5a**.

Sobre una disolución bajo atmósfera inerte de (3*S*,4*R*)-**5a** (0.23 mmol, 1 equiv.) en metanol seco (5 mL) se adicionan 9 mL de una disolución de metóxido de sodio 2.0 M. La reacción se agita durante 4 horas a temperatura ambiente y se extrae con tolueno (3 x 25 mL). La fase orgánica se lava con una disolución de NaCl al 10 % (2 x 15 mL), se seca sobre Na₂SO₄ y se concentra a sequedad para obtener el piperidincarbinol (3*S*,4*R*)-**1b**.

3.4.2.5. Reciclaje enzimático en la reacción de resolución enzimática de (\pm)-*trans*-*N*-feniloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxiometilpiperidina, (\pm)-*trans*-**1b** con anhídrido glutárico.

En un erlenmeyer se disuelve la (\pm)-*trans*-*N*-feniloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-hidroxiometilpiperidina, (\pm)-*trans*-**1b** (0.3 mmol, 1 equiv.) en una suspensión de lipasa CAL-B (125 mg) en 12 mL de tolueno seco. A continuación se adiciona anhídrido glutárico (0.3 mmol, 1 equiv.) y el sistema se deja reaccionar durante 20 horas a 30°C bajo agitación orbital (250 r.p.m.). La reacción se trabaja de la misma manera a la descrita en el apartado 3.4.2.2. La lipasa filtrada se lava varias veces con tolueno seco y se guarda a vacío para utilizarse en una nueva resolución con anhídrido glutárico. El enzima se pesa antes de realizar un nuevo ciclo catalítico para ajustar las cantidades de reactivos y disolvente a la cantidad de enzima que hayamos obtenidos, pues en el proceso de filtrado y lavado pueden haberse originado pérdidas.

(±)-*trans*-3-[(3-Carboxipropanoil)oximetil]-*N*-feniloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)piperidina, (±)-*trans*-5a

(3*S*,4*R*)-5a*ee* = 93%[α]_D¹⁸ = -3.1 (*c* = 0.64, MeOH)(3*R*,4*S*)-5a*ee* = 92%[α]_D¹⁸ = +3.2 (*c* = 0.75, MeOH)

Sólido higroscópico

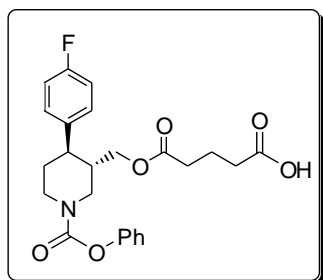
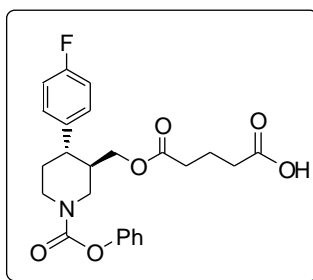
Rendimiento: 80 %.**Fórmula molecular:** C₂₃H₂₄FNO₆**Peso molecular** (g/mol): 429.**I.R.** (KBr, cm⁻¹): 3500-2600, 1734, 1717, 1605, 1510, 1436, 1216.**E.M.** (ESI⁺) *m/z* (%): 468 [(M+K)⁺, 48], 452 [(M+Na)⁺, 100], 430 [(M+H)⁺, 7]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.78-1.92 (m, 2H, CH₂), 2.06-2.14 (m, 1H, CH), 2.45-2.62 (m, 5H, CH+2CH₂), 2.82-3.16 (m, 2H, 2CHHN), 3.71 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 10.8, ³*J*_{HH} 7.9), 3.90-3.97 (m, 1H, CHHO), 4.43-4.56 (m, 2H, 2CHHN), 5.24 (sa, 1H, COOH), 7.03 (dd, 2H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.7, ³*J*_{HF} 8.7), 7.13-7.25 (m, 5H, 5CH_{arom}), 7.40 (t, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.2).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 28.7 (2C, 2CH₂), 34.1 (CH₂), 40.8 (CH), 44.3 (CH), 44.9 (CH₂), 47.4 (CH₂), 64.6 (CH₂), 115.6 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 21.4), 121.6 (CH), 125.3 (CH), 128.5 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 8.2), 129.2 (CH), 138.1 (C), 151.2 (C), 153.7 (C=O_{carbamato}), 161.6 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 244.0), 171.6 (C=O_{éster}), 176.9 (C=O_{ácido}).

Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₃H₂₄FNO₆: C, 64.33; H, 5.63; N, 3.26.
Encontrado: C, 64.1; H, 5.8; N, 3.3.

(±)-*trans*-3-[(4-Carboxibutanoil)oximetil]-*N*-feniloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)piperidina, (±)-*trans*-**5b**

(3*S*,4*R*)-**5b***ee* = 73%[α]_D¹⁸ = -2.5 (*c* = 0.84, MeOH)(3*R*,4*S*)-**5b***ee* = 95%[α]_D¹⁸ = +2.8 (*c* = 0.56, MeOH)

Sólido higroscópico

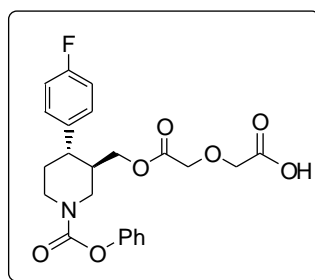
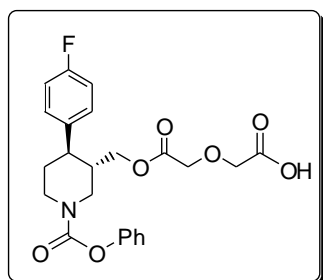
Rendimiento: 74 %.**Fórmula molecular:** C₂₄H₂₆FNO₆**Peso molecular** (g/mol): 443.**I.R.** (KBr, cm⁻¹): 3400-2600, 1738, 1712, 1604, 1510, 1425, 1214.**E.M.** (ESI⁺) *m/z* (%): 482 [(M+K)⁺, 34], 466 [(M+Na)⁺, 100], 444 [(M+H)⁺, 2]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.76-1.92 (m, 4H, 2CH₂), 2.11-2.22 (m, 1H, CH), 2.34 (t, 4H, 2CH₂, ³*J*_{HH} 6.2), 2.49-2.59 (m, 1H, CH), 2.72-3.06 (m, 2H, 2CHHN), 3.69 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 11.3, ³*J*_{HH} 7.9), 3.82-3.92 (m, 1H, CHHO), 4.43-4.56 (m, 2H, 2CHHN), 7.03 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.7, ³*J*_{HF} 8.7), 7.12-7.24 (m, 5H, 5CH_{arom}), 7.38 (t, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.2), 7.63 (sa, 1H, COOH).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 19.8 (CH₂), 32.8 (2C, 2CH₂) 33.8 (CH₂), 40.6 (CH), 44.2 (CH), 44.6 (CH₂), 47.3 (CH₂), 64.2 (CH₂), 115.4 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 21.1), 121.5 (CH), 125.3 (CH), 128.5 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 7.4), 129.1 (CH), 138.1 (C), 151.0 (C), 153.6 (C=O_{carbamato}), 161.4 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 244.6), 172.8 (C=O_{éster}), 177.4 (C=O_{ácido}).

Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₄H₂₆FNO₆: C, 65.00; H, 5.91; N, 3.16.
Encontrado: C, 65.2; H, 5.8; N, 3.0.

(±)-*trans*-3-[(4-Carboxi-3-oxabutanoil)oximetil]-*N*-feniloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)piperidina, (±)-*trans*-5c



(3*S*,4*R*)-5c

ee = 43%

$[\alpha]_D^{18} = -0.9$ ($c=1.12$, MeOH)

(3*R*,4*S*)-5c

ee = 28%

$[\alpha]_D^{18} = +0.7$ ($c=1.40$, MeOH)

Sólido blanco

Rendimiento: 68 %.

Fórmula molecular: C₂₃H₂₄FNO₇

Peso molecular (g/mol): 445.

Punto de fusión (°C): 144.5-146.3

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3480-2500, 1751, 1716, 1603, 1510, 1432, 1214.

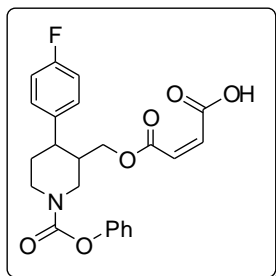
E.M. (ESI⁺) *m/z* (%): 484 [(M+K)⁺, 100], 468 [(M+Na)⁺, 100], 446 [(M+H)⁺, 7]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.74-1.92 (m, 2H, CH₂), 2.15-2.23 (m, 1H, CH), 2.56 (td, 1H, CH, ³*J*_{HH} 4.6, ³*J*_{HH} 11.4), 2.69-3.10 (m, 2H, 2CHHN), 3.79 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 11.3, ³*J*_{HH} 7.7), 3.95-4.23 (m, 5H, CHHO+2CH₂), 4.32-4.53 (m, 2H, 2CHHN), 7.01 (dd, 2H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.5, ³*J*_{HF} 8.5), 7.09-7.25 (m, 5H, 5CH_{arom}), 7.37 (t, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.5), 8.49 (sa, 1H, COOH)

¹³C-RMN (CDCl₃, 50.3 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 34.2 (CH₂), 40.6 (CH), 44.4 (CH), 44.9 (CH₂), 47.3 (CH₂), 65.3 (CH₂), 68.2 (CH₂), 68.5 (CH₂), 115.7 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 21.2), 121.6 (CH), 125.4 (CH), 128.5 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 7.8), 129.2 (CH), 137.9 (C), 151.1 (C), 153.6 (C=O_{carbanto}), 161.6 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 244.9), 169.8 (C=O_{éster}), 172.4 (C=O_{ácido}).

Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₃H₂₄FNO₇: C, 62.02; H, 5.43; N, 3.14.
Encontrado: C, 62.2; H, 5.2; N, 3.3.

(±)-*trans*-3-[(3-Carboxiprop-2-enoil)oximetil]-*N*-feniloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)piperidina, (±)-*trans*-**5d**



Sólido higroscópico

Rendimiento: 69 %.

Fórmula molecular: C₂₃H₂₂FNO₆

Peso molecular (g/mol): 427.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3400-2500, 1748, 1714, 1648, 1604, 1510, 1434, 1202.

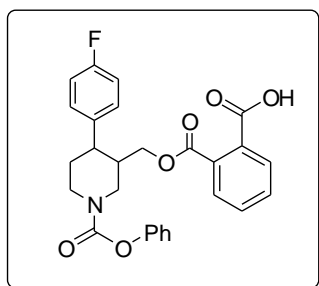
E.M. (ESI⁺) m/z (%): 466 [(M+K)⁺, 45], 450 [(M+Na)⁺, 100], 428 [(M+H)⁺, 12]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.78-1.96 (m, 2H, CH₂), 2.18-2.32 (m, 1H, CH), 2.61 (td, 1H, CH, ³*J*_{HH} 4.5, ³*J*_{HH} 11.6z), 2.72-3.04 (m, 2H, 2CHHN), 3.85 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 11.3, ³*J*_{HH} 7.6), 4.03-4.09 (m, 1H, CHHO), 4.42-4.59 (m, 2H, 2CHHN), 6.39 (sa, 1H, COOH), 6.73-6.93 (m, 2H, 2CH_{vin}), 7.04 (dd, 2H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.5, ³*J*_{HF} 8.5), 7.13-7.26 (m, 5H, 5CH_{arom}), 7.39 (t, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.5).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 34.2 (CH₂), 40.9 (CH), 44.4 (CH), 44.9 (CH₂), 47.4 (CH₂), 65.4 (CH₂), 115.6 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 21.6), 121.6 (CH), 125.4 (CH), 128.5 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 7.8), 129.2 (CH), 133.2 (CH), 134.4 (CH), 138.0 (C), 151.2 (C), 153.8 (C=O_{carbamato}), 161.7 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 244.9), 164.3 (C=O_{éster}), 168.4 (C=O_{ácido}).

Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₃H₂₂FNO₆: C, 64.63; H, 5.19; N, 3.28.
Encontrado: C, 64.7; H, 5.3; N, 3.1.

(±)-*trans*-3-[(2-Carboxibenzoil)oximetil]-*N*-feniloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)piperidina, (±)-*trans*-**5e**



Sólido blanco

Rendimiento: 64 %.

Fórmula molecular: C₂₇H₂₄FNO₆

Peso molecular (g/mol): 477.

Punto de fusión (°C): 148.9-151.2

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3445-2500, 1764, 1718, 1600, 1581, 1514, 1431, 1222.

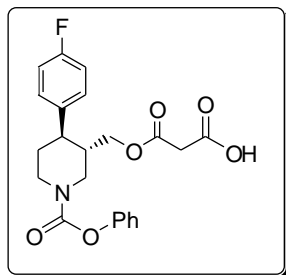
E.M. (ESI⁺) m/z (%): 516 [(M+K)⁺, 15], 500 [(M+Na)⁺, 100], 478 [(M+H)⁺, 2]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.75-1.92 (m, 2H, CH₂), 2.23-2.27 (m, 1H, CH), 2.45-2.60 (m, 1H, CH), 2.69-2.84 (m, 1H, CHHN), 3.01-3.12 (m, 1H, CHHN), 3.70-3.77 (m, 1H, CHHO), 4.12-4.16 (m, 1H, CHHO), 4.36-4.44 (m, 1H, CHHN), 4.63-4.71 (m, 1H, CHHN), 6.21 (sa, 1H, COOH), 7.01 (dd, 2H, CH_{arom}, ³J_{HH} 8.0, ³J_{HF} 8.0), 7.009-7.25 (m, 5H, 5CH_{arom}), 7.31 (t, 2H, 2CH_{arom}, ³J_{HH} 7.7 Hz), 7.41-7.50 (m, 2H, 2CH_{arom}), 7.61-7.69 (m, 2H, 2CH_{arom}).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 34.6 (CH₂), 40.7 (CH), 44.5 (CH), 45.2 (CH₂), 48.1 (CH₂), 65.5 (CH₂), 115.6 (d, CH_{arom}, ²J_{CF} 21.0), 121.6 (CH₂), 125.4 (CH), 128.2 (CH), 128.6 (d, CH_{arom}, ³J_{CF} 7.6), 129.2 (CH), 130.0 (CH), 130.4 (CH), 131.2 (CH), 137.9 (C), 150.9 (C), 154.0 (C=O_{carbamato}), 161.7 (d, C_{arom}, ¹J_{CF} 245.3), 167.5 (C=O_{éster}), 171.2 (C=O_{ácido}).

Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₇H₂₄FNO₆: C, 67.92; H, 5.07; N, 2.93.
Encontrado: C, 68.1; H, 5.0; N, 3.1.

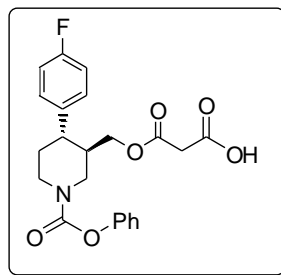
(±)-*trans*-3-[Carboxietanoiloximetil]-*N*-feniloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)piperidina,
(±)-*trans*-**5f**



(3*S*,4*R*)-**5f**

ee = 39%

$[\alpha]_D^{18} = -1.1$ (*c* = 1.30, MeOH)



(3*R*,4*S*)-**5f**

ee = 34%

$[\alpha]_D^{18} = +1.0$ (*c* = 0.95, MeOH)

Sólido higroscópico

Rendimiento: 52 %.

Fórmula molecular: C₂₂H₂₂FNO₆

Peso molecular (g/mol): 415.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3450-2700, 1742, 1715, 1605, 1510, 1427, 1221.

E.M. (ESI⁺) *m/z* (%): 454 [(M+K)⁺, 30], 438 [(M+Na)⁺, 100], 416 [(M+H)⁺, 7]

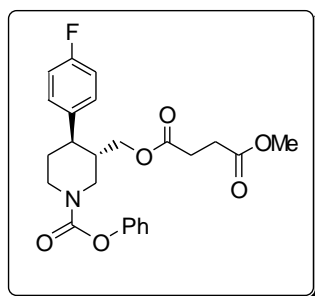
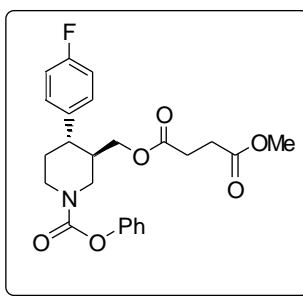
¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.73-1.96 (m, 2H, CH₂), 2.09-2.25 (m, 1H, CH), 2.59 (td, 1H, CH, ³*J*_{HH} 4.6, ³*J*_{HH} 11.7), 2.73-3.06 (m, 2H, 2CHHN), 3.36 (s, 2H, CH₂), 3.74 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 11.2, ³*J*_{HH} 7.5), 3.96-4.05 (m, 1H, CHHO), 4.38-4.59 (m, 2H, 2CHHN), 7.02 (dd, 2H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.4, ³*J*_{HF} 8.4), 7.08-7.24 (m, 5H, 5CH_{arom}), 7.39 (t, 2H, 2CH_{arom}).

¹³C-RMN (CDCl₃, 50.3 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 33.9 (CH₂), 40.6 (CH), 40.9 (CH₂), 44.1 (CH), 44.3 (CH₂), 47.5 (CH₂), 65.3 (CH₂), 115.5 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 21.4), 121.2 (CH₂), 125.6 (CH), 128.5 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 8.0), 129.0 (CH), 138.1 (C), 151.4 (C), 153.6 (C=O_{carbamato}), 161.2 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 244.6), 166.0 (C=O_{éster}), 168.7 (C=O_{ácido}).

Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₂H₂₂FNO₅: C, 63.61; H, 5.34; N, 3.37.

Encontrado: C, 63.5; H, 5.5; N, 3.2

(±)-*trans*-*N*-Feniloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-[(3-metoxicarbonilpropanoil)oximetil]piperidina, (±)-*trans*-**6a**

(3*S*,4*R*)-**6a***ee* = 93%[α]_D¹⁸ = -3.9 (*c* = 0.78, MeOH)(3*R*,4*S*)-**6a***ee* = 92%[α]_D¹⁸ = +4.0 (*c* = 0.90, MeOH)

Aceite incoloro

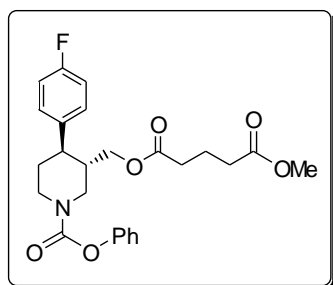
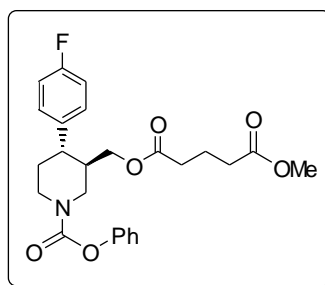
Rendimiento: 79 %.**Fórmula molecular:** C₂₄H₂₆FNO₆**Peso molecular** (g/mol): 443.**I.R.** (KBr, cm⁻¹): 3018, 2965, 1734, 1714, 1605, 1510, 1435, 1215.**E.M.** (ESI⁺) *m/z* (%): 482 [(M+K)⁺, 53], 466 [(M+Na)⁺, 100], 444 [(M+H)⁺, 18]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.78-1.89 (m, 2H, CH₂), 2.09-2.22 (m, 1H, CH), 2.52-2.66 (m, 5H, CH+2CH₂), 2.81-3.11 (m, 2H, 2CHHN), 3.69-3.78 (m, 4H, CHHO+CH₃), 3.93-3.97 (m, 1H, CHHO), 4.41-4.56 (m, 2H, 2CHHN), 7.03 (dd, 2H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.7, ³*J*_{HF} 8.7), 7.07-7.24 (m, 5H, 5CH_{arom}), 7.42 (t, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.7).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 28.6 (C, CH₂), 28.8 (CH₂), 34.1 (CH₂), 40.8 (CH), 44.3 (CH), 44.7 (CH₂), 47.6 (CH₂), 51.8 (CH₃), 64.6 (CH₂), 115.6 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 21.5), 121.6 (CH), 125.2 (CH), 128.5 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 8.1), 129.2 (CH), 138.2 (C), 151.2 (C), 153.5 (C=O_{carbamato}), 161.6 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 245.0), 171.8 (C=O_{éster}), 172.5 (C=O_{éster}).

Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₄H₂₆FNO₆: C, 65.00; H, 5.91; N, 3.16.
Encontrado: C, 64.9; H, 6.0; N, 3.1.

(±)-*trans*-*N*-Feniloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-[(4-metoxicarbonilbutanoil)oximetil]piperidina, (±)-*trans*-**6b**

(3*S*,4*R*)-**6b***ee* = 73%[α]_D¹⁸ = -3.1 (*c* = 1.10, MeOH)(3*R*,4*S*)-**6b***ee* = 95%[α]_D¹⁸ = +3.4 (*c* = 0.75, MeOH)

Aceite

Rendimiento: 73 %.**Fórmula molecular:** C₂₅H₂₈FNO₆**Peso molecular** (g/mol): 457.**I.R.** (KBr, cm⁻¹): 3010, 2950, 1742, 1717, 1600, 1508, 1420, 1212.**E.M.** (ESI⁺) *m/z* (%): 496 [(M+K)⁺, 30], 480 [(M+Na)⁺, 100], 458 [(M+H)⁺, 10]

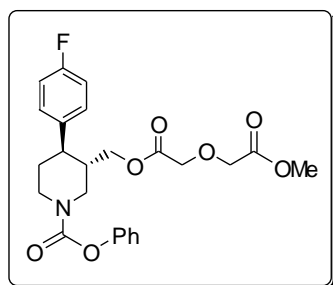
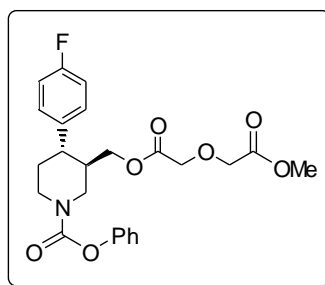
¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.83-1.99 (m, 4H, 2CH₂), 2.13-2.19 (m, 1H, CH), 2.35 (t, 4H, 2CH₂, ³*J*_{HH} 6.9 Hz), 2.51-2.60 (m, 1H, CH), 2.74-3.10 (m, 2H, 2CHHN), 3.66-3.78 (m, 3H, CHHO+CH₃), 3.90-3.97 (m, 1H, CHHO), 4.33-4.55 (m, 2H, 2CHHN), 7.03 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.7, ³*J*_{HF} 8.7), 7.14-7.25 (m, 5H, 5CH_{arom}), 7.39 (t, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.2).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 19.9 (CH₂), 32.8 (2C, 2CH₂), 32.9 (CH₂), 33.4 (CH₂), 40.8 (CH), 44.4 (CH), 44.7 (CH₂), 47.9 (CH₂), 51.5 (CH₃), 64.4 (CH₂), 115.6 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 21.2), 121.6 (CH), 125.3 (CH), 128.6 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 7.8), 129.2 (CH), 138.2 (C), 151.2 (C), 153.5 (C=O_{carbamato}), 161.7 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 246.0), 172.5 (C=O_{éster}), 173.9 (C=O_{éster}).

Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₅H₂₈FNO₆: C, 65.63; H, 6.17; N, 3.06.

Encontrado: C, 65.7; H, 6.3; N, 3.2.

(±)-*trans*-*N*-Feniloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-[(4-metoxicarbonil-3-oxabutanil)oximetil]piperidina, (±)-*trans*-**6c**

(3*S*,4*R*)-**6c***ee* = 43%[α]_D¹⁸ = -1.1 (*c* = 1.05, MeOH)(3*R*,4*S*)-**6c***ee* = 28%[α]_D¹⁸ = +1.0 (*c* = 0.96, MeOH)

Sólido higroscópico

Rendimiento: 81 %.**Fórmula molecular:** C₂₄H₂₆FNO₇**Peso molecular** (g/mol): 459.**I.R.** (KBr, cm⁻¹): 3012, 2920, 1746, 1714, 1605, 1512, 1430, 1220.**E.M.** (ESI⁺) *m/z* (%): 498 [(M+K)⁺, 10], 482 [(M+Na)⁺, 100], 460 [(M+H)⁺, 2]

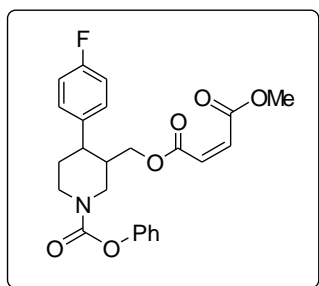
¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.70-1.89 (m, 2H, CH₂), 2.09-2.21 (m, 1H, CH), 2.54 (td, 1H, CH, ³*J*_{HH} 4.6, ³*J*_{HH} 11.3), 2.71-3.03 (m, 2H, 2CHHN), 3.72-3.82 (m, 4H, CHHO+CH₃), 3.95-4.02 (m, 1H, CHHO), 4.15-4.21 (m, 4H, 2CH₂), 4.37-4.51 (m, 2H, 2CHHN), 7.01 (dd, 2H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.5, ³*J*_{HF} 8.5), 7.13-7.23 (m, 5H, 5CH_{arom}), 7.37 (t, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 6.6).

¹³C-RMN (CDCl₃, 50.3 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 33.7 (CH₂), 40.7 (CH), 44.3 (CH), 44.7 (CH₂), 47.1 (CH₂), 51.8 (CH₃), 64.8 (CH₂), 67.7 (CH₂), 67.9 (CH₂), 115.6 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 21.2), 121.6 (CH), 125.2 (CH), 128.5 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 7.4), 129.2 (CH), 138.1 (C), 151.2 (C), 153.5 (C=O_{carbamato}), 161.6 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 246.0), 169.3 (C=O_{éster}), 169.8 (C=O_{éster}).

Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₄H₂₆FNO₇: C, 62.74; H, 5.70; N, 3.05.

Encontrado: C, 62.6; H, 5.9; N, 2.9.

(±)-*trans*-*N*-Feniloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-[(3-metoxicarbonilprop-2-enil)oximetil]piperidina, (±)-*trans*-**6d**



Aceite

Rendimiento: 71 %.

Fórmula molecular: C₂₄H₂₄FNO₆

Peso molecular (g/mol): 441.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3018, 2975, 1739, 1724, 1650, 1598, 1502, 1433, 1208.

E.M. (ESI⁺) m/z (%): 480 [(M+K)⁺, 23], 464 [(M+Na)⁺, 100], 442 [(M+H)⁺, 5]

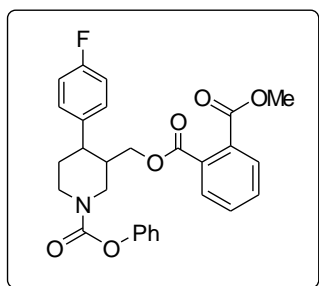
¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.83-2.02 (m, 2H, CH₂), 2.14-2.25 (m, 1H, CH), 2.60 (td, 1H, CH, ³*J*_{HH} 4.8, ³*J*_{HH} 11.5), 2.78-3.12 (m, 2H, 2CHHN), 3.76 (s, 3H, CH₃), 3.86 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 9.8, ³*J*_{HH} 3.8), 4.01-4.08 (m, 1H, CHHO), 4.40-4.59 (m, 2H, 2CHHN), 6.22-6.34 (m, 2H, 2CH_{vin}), 7.04 (dd, 2H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.4, ³*J*_{HF} 8.4), 7.13-7.26 (m, 5H, 5CH_{arom}), 7.39 (t, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.2).

¹³C-RMN (CDCl₃, 50.3 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 33.5 (CH₂), 40.4 (CH), 44.1 (CH), 44.6 (CH₂), 46.9 (CH₂), 51.7 (CH₃), 64.8 (CH₂), 115.2 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 21.4), 121.2 (CH), 124.8 (CH), 128.1 (CH), 128.2 (CH), 128.6 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 8.0), 129.2 (CH), 137.7 (C), 150.8 (C), 153.1 (C=O_{carbamato}), 161.2 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 241.3), 164.5 (C=O_{éster}), 164.9 (C=O_{éster}).

Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₄H₂₄FNO₆: C, 65.30; H, 5.48; N, 3.17.

Encontrado: C, 65.5; H, 5.4; N, 3.3.

(±)-*trans*-*N*-Feniloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-[(2-metoxicarbonilbenzoil)oximetil]piperidina, (±)-*trans*-**6e**



Sólido blanco

Rendimiento: 62 %.

Fórmula molecular: C₂₈H₂₆FNO₆

Peso molecular (g/mol): 491.

Punto de fusión (°C): 138.9-141.0

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3018, 2975, 1764, 1718, 1600, 1584, 1514, 1431, 1214.

E.M. (ESI⁺) m/z (%): 530 [(M+K)⁺, 23], 514 [(M+Na)⁺, 100], 492 [(M+H)⁺, 4]

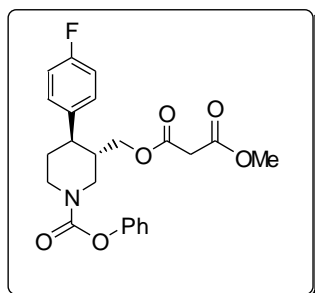
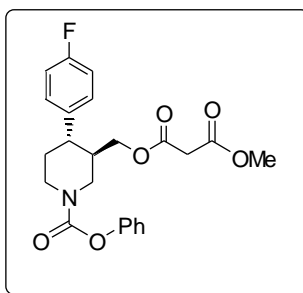
¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.84-1.99 (m, 2H, CH₂), 2.23-2.31 (m, 1H, CH), 2.66 (td, 1H, CH, ³*J*_{HH} 4.6, ³*J*_{HH} 11.3), 2.81-3.12 (m, 2H, 2CHHN), 3.86 (s, 3H, CH₃), 3.97 (dd, 1H, CHHO, ²*J*_{HH} 11.3, ³*J*_{HH} 4.6), 4.08-4.15 (m, 1H, CHHO), 4.39-4.48 (m, 1H, CHHN), 4.56-4.67 (m, 1H, CHHN), 7.05 (dd, 2H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.7, ³*J*_{HF} 8.7), 7.10-7.25 (m, 5H, 5CH_{arom}), 7.39 (t, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.5), 7.51-7.56 (m, 2H, 2CH_{arom}), 7.62-7.65 (m, 1H, CH_{arom}), 7.72-7.76 (m, 1H, CH_{arom}).

¹³C-RMN (CDCl₃, 50.4 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 34.2 (CH₂), 41.1 (CH), 44.3 (CH), 44.9 (CH₂), 47.4 (CH₂), 52.6 (CH₃), 65.6 (CH₂), 115.7 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 21.2), 121.6 (CH₂), 125.3 (CH), 128.4 (CH), 128.6 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 7.6), 128.9 (CH), 129.2 (CH), 131.1 (C), 131.2 (CH), 138.2 (C), 151.3 (C), 153.6 (C=O_{carbamato}), 161.7 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 245.6), 167.4 (C=O_{éster}), 167.7 (C=O_{éster}).

Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₈H₂₆FNO₆: C, 68.42; H, 5.33; N, 2.85.

Encontrado: C, 68.7; H, 5.1; N, 2.9.

(±)-*trans*-*N*-Feniloxycarbonil-4-(4'-fluorofenil)-3-[metoxicarboniletanoiloximetil]piperidina, (±)-*trans*-**6f**

(3*S*,4*R*)-**6f***ee* = 39%[α]_D¹⁸ = -1.3 (*c* = 1.40, MeOH)(3*R*,4*S*)-**6f***ee* = 34%[α]_D¹⁸ = +1.1 (*c* = 0.75, MeOH)

Aceite

Rendimiento: 76 %.**Fórmula molecular:** C₂₃H₂₄FNO₆**Peso molecular** (g/mol): 429.**I.R.** (KBr, cm⁻¹): 3012, 2952, 1733, 1717, 1603, 1509, 1430, 1201.**E.M.** (ESI⁺) *m/z* (%): 468 [(M+K)⁺, 72], 452 [(M+Na)⁺, 100], 430 [(M+H)⁺, 10]

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.79-1.92 (m, 2H, CH₂), 2.15-2.23 (m, 1H, CH), 2.59 (td, 1H, CH, ³*J*_{HH} 4.4, ³*J*_{HH} 11.8), 2.73-3.07 (m, 2H, 2CHHN), 3.37 (s, 2H, CH₂), 3.78-3.84 (m, 4H, CHHO+CH₃), 3.94-3.99 (m, 1H, CHHO), 4.45-4.62 (m, 2H, 2CHHN), 7.05 (dd, 2H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 8.6, ³*J*_{HF} 8.6), 7.12-7.24 (m, 5H, 5CH_{arom}), 7.40 (t, 2H, 2CH_{arom}).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 33.9 (CH₂), 40.6 (CH), 41.0 (CH₂), 44.2 (CH), 44.7 (CH₂), 47.2 (CH₂), 52.4 (CH₃), 65.3 (CH₂), 115.6 (d, CH_{arom}, ²*J*_{CF} 21.7), 121.6 (CH₂), 125.2 (CH), 128.5 (d, CH_{arom}, ³*J*_{CF} 8.1), 129.2 (CH), 138.1 (C), 151.2 (C), 153.5 (C=O_{carbamato}), 161.6 (d, C_{arom}, ¹*J*_{CF} 244.5), 166.0 (C=O_{éster}), 166.6 (C=O_{éster}).

Anal. Elemental (%). Calculado para C₂₃H₂₄FNO₅: C, 64.33; H, 5.63; N, 3.26.

Encontrado: C, 64.2; H, 5.7; N, 3.3.

PARTE B

Capítulo 4

Reacciones de transcianación sobre ω -hidroxialdehídos

4.1. ANTECEDENTES

4.1.1 CIANHIDRINAS

Las cianhidrinas o α -hidroxinitrilos son compuestos de carácter multifuncional, por lo que ofrecen una amplia variedad de posibilidades sintéticas, siendo precursores de un gran número de productos de alto valor añadido.

Podemos clasificar las transformaciones a efectuar en las cianhidrinas en cuatro grupos fundamentales.

- 1) Reacciones sobre el grupo hidroxilo (principalmente reacciones de protección).
- 2) Conversión del grupo hidroxilo en un buen grupo saliente, para el posterior ataque nucleófilo con inversión de la configuración.
- 3) Reacciones sobre el grupo nitrilo.
- 4) Reacciones en el grupo R de la cianhidrina. La presencia de insaturaciones permite realizar una serie de transformaciones en esta cadena.

4.1.1.1. Reacciones de protección sobre el grupo hidroxilo.

Para su aplicación como sintones quirales, las cianhidrinas ópticamente activas presentan la desventaja de su inestabilidad química. En muchos casos, métodos de purificación como destilación, cristalización o cromatografía producen una cierta degradación y racemización en estos compuestos. Este problema se puede evitar introduciendo un grupo protector en el oxígeno (esquema 4.1).

Las cianhidrinas quirales pueden esterificarse, principalmente para la determinación de sus excesos enantioméricos.^{83a} Sin embargo, debido a la reactividad del grupo éster, estas cianhidrinas no suelen ser utilizadas como productos de partida en posteriores reacciones sobre el grupo nitrilo.

Se han descrito protecciones de cianhidrinas como éteres de tetrahidropirano (THP),¹⁹⁵ por reacción con 3,4-dihidro-2H-pirano, catalizada por ácido *p*-toluensulfónico. El inconveniente de este grupo protector es que se produce la introducción de un nuevo centro quiral en la cianhidrina, lo que lleva a la formación de diastereoisómeros. Esto puede dificultar el trabajo de reacciones posteriores, por lo que se han llevado a cabo protecciones con éteres de 2-metoxi-*iso*-propilo (MIP)¹⁹⁶ o 2-fenoxi-*iso*-propilo (PIP).¹⁹⁷

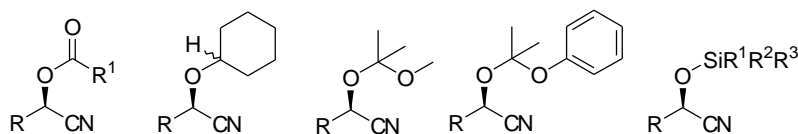
De un modo más frecuente, las cianhidrinas se protegen como éteres sililados.⁸⁶
¹⁹⁸ Las cianhidrinas *O*-sililadas se pueden obtener sin racemización alguna, por reacción con el cloruro de sililo correspondiente en presencia de imidazol. Los grupos protectores más empleados suelen ser el trimetilsilil, el *tert*-butildimetilsilil y el *tert*-butildifenilsilil. La desprotección de estas cianhidrinas se realiza fácilmente bien en medio ácido o bien en presencia de aniones fluoruro.

¹⁹⁵ Y.-F Wang, S.-T. Chen, K. K.-C. Liu, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1917-1920.

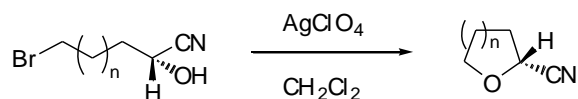
¹⁹⁶ P. Zandbergen, A. M. C. H. van den Nieuwendijk, J. Brussee, A. Van der Gen, C. G. Kruse, *Tetrahedron*, **1992**, 48, 3977-3982.

¹⁹⁷ P. Zandbergen, H. M. G. Willems, G. A. van der Marel, J. Brussee, A. van der Gen, *Synth. Commun.* **1992**, 22, 2781-2782.

¹⁹⁸ J. Brussee, W. T. Loos, C. G. Kruse, A. van der Gen, *Tetrahedron*, **1990**, 46, 979-986.


Esquema 4.1. Diferentes cianhidrinas *O*-protegidas.

Además de las reacciones de protección, es posible realizar otras modificaciones en el grupo hidroxilo de las cianhidrinas (esquema 4.2). De esta manera, en nuestro grupo de investigación se ha desarrollado la síntesis de 2-cianotetrahidrofurano y 2-cianotetrahidropirano por tratamiento de bromocianhidrinas ópticamente activas con AgClO_4 .⁹²

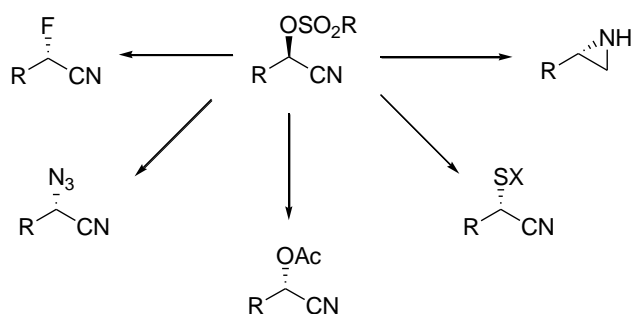

Esquema 4.2.

4.1.1.2 Inversión del centro estereogénico de las cianhidrinas por desplazamientos nucleófilos.

La conversión del grupo hidroxilo en un buen grupo saliente permite realizar reacciones de desplazamiento nucleófilo con inversión de la configuración en cianhidrinas ópticamente activas. Mientras que los α -halonitrilos se racemizan fácilmente en las reacciones de sustitución, la formación de α -sulfoniloxinitrilos es más adecuada,¹⁹⁹ ya que el grupo sulfonato es mucho menos nucleófilo.

La reducción de α -sulfoniloxinitrilos con LiAlH_4 genera aziridinas con elevados rendimientos y excesos enantioméricos.²⁰⁰ Las reacciones con azidas y ftalimidas ofrecen la posibilidad de sintetizar α -aminonitrilos, que son precursores de α -aminoácidos.²⁰¹ Es posible generar también α -fluoronitrilos, sintones de compuestos con actividad biológica y de β -fluoroaminas, utilizadas en cristales líquidos.²⁰² La reacción de α -sulfoniloxinitrilos con acetato potásico genera los correspondientes ésteres de cianhidrina.¹⁹⁸

Utilizando nucleófilos azufrados se consigue también la inversión nucleofílica del centro estereogénico, generando α -tionitrilos sin racemización.²⁰³ En el esquema 4.3 se resumen las principales sustituciones nucleofílicas llevadas a cabo sobre el grupo hidroxilo de las cianhidrinas.


Esquema 4.3.

¹⁹⁹ F. Effenberger, U. Stelzer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*, 873-874.

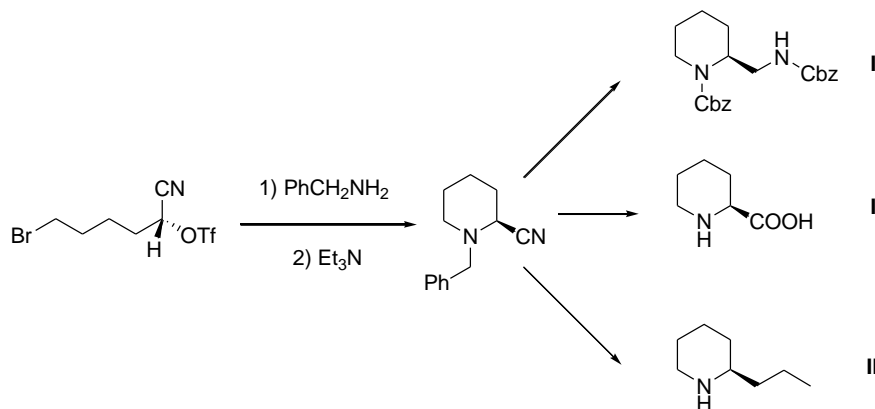
²⁰⁰ F. Effenberger, U. Stelzer, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, *6*, 283-286.

²⁰¹ F. Effenberger, A. Kremser, U. Stelzer, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, *7*, 607-618.

²⁰² U. Stelzer, F. Effenberger, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, *4*, 161-164.

²⁰³ F. Effenberger, S. Gaupp, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, *10*, 1765-1775.

En nuestro grupo de investigación se ha desarrollado la síntesis de (*S*)-2-cianopiperidina, precursora de (*S*)-2-aminometilpiperidina (**I**), ácido (*S*)-pípecólico (**II**) y (*R*)-coniina (**III**), productos de elevada actividad biológica empleados en química farmacéutica y como ligandos quirales en síntesis asimétrica (esquema 4.4). La sustitución nucleofílica de (*R*)-bromocianhidrininas protegidas con bencilamina y posterior ciclación intramolecular permite obtener estos sintones con elevados rendimientos y sin racemización alguna.²⁰⁴



Esquema 4.4

Las cianhidrininas alifáticas y bencílicas, que no presentan reactividad frente a sustituciones nucleófilas, pueden ser transformadas en sus respectivos ésteres de configuración opuesta mediante reacciones de tipo Mitsunobu.²⁰⁵ Para las cianhidrininas alifáticas, esta transformación ocurre con retención de la configuración.

4.1.1.3 Reacciones sobre el grupo nitrilo

Para llevar a cabo transformaciones sobre el grupo nitrilo, normalmente resulta imprescindible la protección del grupo hidroxilo de la cianhidrina por los métodos ya comentados anteriormente. Podemos clasificar estas modificaciones sobre el grupo nitrilo en:

4.1.1.3.1 Reacciones en condiciones ácidas.

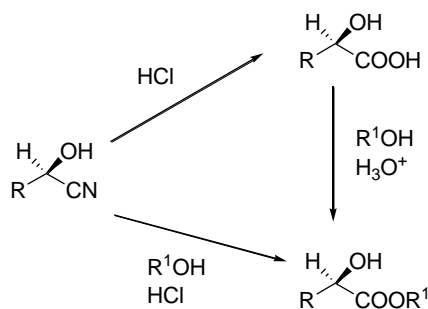
La hidrólisis en medio básico de cianhidrininas no protegidas genera α -hidroxiácidos. Al igual que con otras transformaciones de las cianhidrininas en medio básico, se produce con un alto grado de descomposición y racemización. Por ello, es mucho más aconsejable realizar la síntesis de α -hidroxiácidos catalizada por ácido (esquema 4.5).²⁰⁶

Los α -hidroxiésteres pueden ser obtenidos a partir de los correspondientes ácidos o bien pueden sintetizarse directamente a partir de las cianhidrininas por tratamiento con el correspondiente alcohol en presencia de cloruro de hidrógeno y posterior hidrólisis (esquema 4.5).^{205a}

²⁰⁴ S. Nazabadioko, R. J. Pérez, R. Brieva, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 9, 1597-1604.

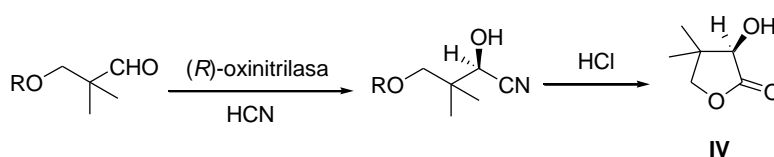
²⁰⁵ E. G. J. C. Warmerdam, J. Brussee, C. G. Kruse, A. van der Gen, *Tetrahedron*, **1993**, 49, 1063-1070.

²⁰⁶ (a) K. Tanaka, A. Mori, S. Inoue, *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 181-185. (b) T. Ziegler, B. Hörsch, F. Effenberger, *Synthesis*, **1990**, 575-578.



Esquema 4.5.

En la hidrólisis de (*R*)-cianhidrinas de pivaldehídos β-sustituidos, los α-hidroxiácidos formados se ciclan para generar la (*R*)-pantolactona (**IV**) (esquema 4.6), precursora de ácido (*R*)-pantoténico (constituyente del Coenzima A), (*R*)-pantenol (bactericida) y (*R*)-pantoteína (factor de crecimiento).²⁰⁷



Esquema 4.6.

4.1.1.3.2. Reacciones de adición nucleófila al grupo nitrilo

El hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL-H) es un reductor menos reactivo que el LiAlH_4 , por lo que es empleado en la reducción parcial de ésteres y nitrilos. La adición de DIBAL-H a cianhidrinas genera un complejo imínico que se descompone durante el trabajo de la reacción para generar los correspondientes α-hidroxi aldehídos.¹⁹⁵ Las cianhidrinas de partida deben estar protegidas para evitar procesos de dimerización y racemización (esquema 4.7, reacción 1). Otra manera de generar α-hidroxi aldehídos a partir de cianhidrinas consiste en la hidrogenación en presencia de Ni (esquema 4.7, reacción 1).²⁰⁸

La reacción de cianhidrinas protegidas con LiAlH_4 genera etanolaminas con altos rendimientos (esquema 4.7, reacción 2). En estas condiciones de reacción, se observa un alto grado de desprotección, por lo que es posible obtener las etanolaminas directamente desprotegidas.²⁰⁹ Si a la reducción con LiAlH_4 le sigue el tratamiento con un cloruro de ácido, se pueden conseguir β-hidroxi amidas (esquema 4.7, reacción 3).²¹⁰

Como agente reductor de cianhidrinas, también pueden emplearse boranos. Así, han conseguido sintetizarse azacicloalcan-3-oles por reducción de (*R*)-bromocianhidrinas y posterior ciclación intramolecular.²¹¹

La adición de reactivos de Grignard sobre cianhidrinas protegidas seguida de hidrólisis en medio ácido es utilizada para obtener α-hidroxi cetonas (esquema 4.7, reacción 4).²¹² Estas aciloínas son productos de partida para otras transformaciones. Su

²⁰⁷ F. Effenberger, J. Eichhorn, J. Roos, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 271-282.

²⁰⁸ B. R. Matthews, H. Gountzos, W. R. Jackson, K. G. Watson, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 5157-5158.

²⁰⁹ J. Brussee, F. Dofferhoff, C. G. Kruse, A. van der Gen, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1990**, 1, 1653-1658.

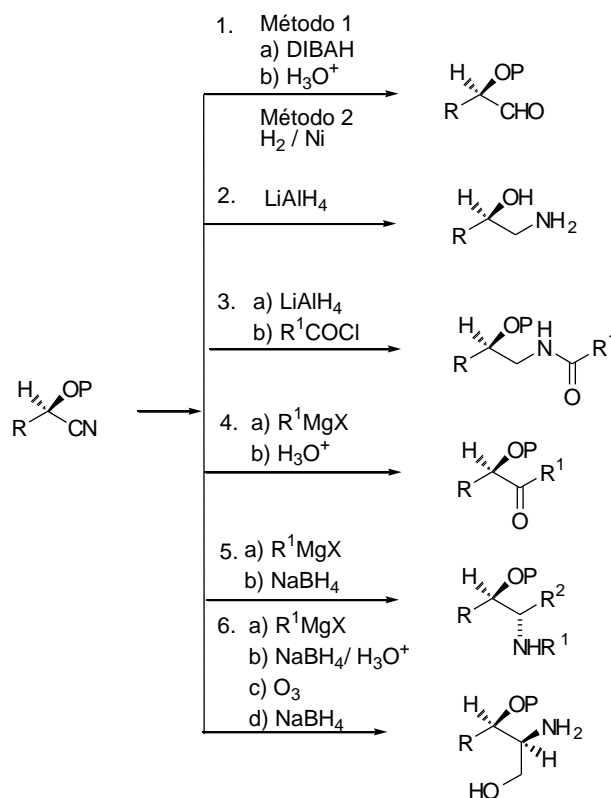
²¹⁰ R. F. Brown, A. C. Donohue, W. R. Jackson, T. D. McCarthy, *Tetrahedron*, **1994**, 50, 13739-13752.

²¹¹ M. I. Monterde, S. Nazabadioko, F. Rebolledo, R. Brieva, V. Gotor, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, 10, 3449-3455.

²¹² L. R. Krepski, K. M. Jensen, S. M. Heilmann, J. K. Rasmussen, *Synthesis*, **1986**, 301-303.

aminación reductiva en presencia de $Mg(ClO_4)_2$ genera etanolaminas con alta estereoselectividad.²¹³

La reducción diastereoselectiva del intermediario imínico generado en la adición de reactivos de Grignard a cianhidrinas permite obtener etanolaminas con dos centros estereogénicos (esquema 4.7, reacción 5). Esta metodología ha sido empleada en la obtención de análogos heterocíclicos de la efedrina (vasodilatador)^{72b} y de β -amino- γ -butirolactonas (componentes de antibióticos, alcaloides, inhibidores, etc.).²¹⁴ La síntesis de (2*S*,3*S*)- β -amino- α -hidroxiácidos a partir de 2-furaldehído también se realiza por una reducción diastereoselectiva de la imina generada.²¹⁵



Esquema 4.7

La preparación de 2-amino-1,3-dioles es posible utilizando compuestos organometálicos como reactivos de Grignard derivados de haloéteres, pero los intentos realizados conducen a la descomposición y racemización del material de partida. Una ruta alternativa con mejores resultados es la reacción de cianhidrinas con bromuro de vinilmagnesio seguida de un proceso de ozonólisis y reducción (esquema 4.7, reacción 6).²¹⁶

Los ácidos tetrónicos son compuesto de gran interés porque sus derivados están muy extendidos en productos naturales. La reacción de Blaise (adición de un organometálico de zinc de un α -bromoéster a un nitrilo) ha sido aplicada para su obtención a partir de cianhidrinas.²¹⁷

²¹³ J. Brussee, R. A. T. M. van Benthem, A. van der Gen, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1990**, *1*, 163-166.

²¹⁴ J. Roos, F. Effenberger, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**, *12*, 1855-1862.

²¹⁵ R. A. Tromp, M. van der Hoeven, A. Amore, J. Brussee, M. Overhand, G. A. van der Marel, A. van der Gen, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, *12*, 1109-1112.

²¹⁶ F. Effenberger, B. Guttere, J. Syed, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, *6*, 2933-2943.

²¹⁷ F. Effenberger, J. Syed, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, *9*, 817-825.

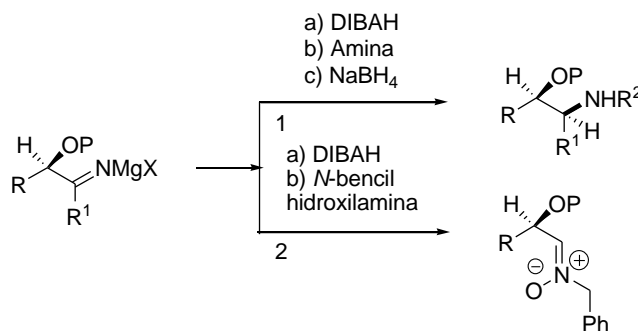
4.1.1.3.3. Reacciones de transiminación

Se denomina transiminación a la reacción de una imina con una amina primaria, de forma que se genera una imina de la amina inicial, mientras que se desprende una amina primaria o amoniaco. Este es un proceso simétrico y reversible, muy útil en la síntesis de compuestos de interés biológico a partir de cianhidrinas. Así, mediante la reacción de transiminación se puede realizar:

1) Preparación de etanolaminas *N*-sustituidas con dos centros estereogénicos (esquema 4.8, reacción 1). En esta reacción, la imina conseguida por reacción de la cianhidrina con un reactivo de Grignard se transimina con una amina primaria que por posterior reducción con NaBH_4 genera los correspondientes derivados de aminoalcoholes.²¹⁸

2) Si el proceso de transiminación va acompañado de la adición de cianuro de hidrógeno y una posterior hidrólisis, es posible obtener tras una serie de etapas (*2S,3R*)-*N*-alquil- β -hidroxi- α -aminoácidos con elevados rendimientos.²¹⁹

3) En el caso de que la transiminación se realice empleando hidroxilaminas en lugar de aminas primarias, se pueden sintetizar aldo- y cetonitrinas (esquema 4.8, reacción 2), empleadas en adiciones 1,3-dipolares.²²⁰



Esquema 4.8.

4.1.1.4. Reacciones sobre el resto R de cianhidrinas.

Muchos aldehídos α,β -insaturados son sustratos aceptados por las oxinitrilasas. Las cianhidrinas insaturadas generadas, una vez protegidas, pueden sufrir una serie de transformaciones por el doble enlace C-C, como rupturas oxidativas,²²¹ epoxidaciones,²²² reacciones de adición²²³ y reagrupamientos catalizados por metales.²²⁴

4.1.2. REACCIÓN DE TRANSCIANACIÓN ENZIMÁTICA.

Como ya se ha comentado en la introducción de la presente Memoria, la reacción de transcianación enzimática consiste en la utilización de la cianhidrina de la acetona como fuente de cianuro en la síntesis de cianhidrinas quirales catalizadas por oxinitrilasas.

²¹⁸ R. F. C. Brown, W. R. Jackson, T. McCarthy, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, 4, 2149-2150.

²¹⁹ P. Zandbergen, J. Brussee, A. van der Gen, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1992**, 3, 769-774.

²²⁰ E. Hulbos, J. Marcus, J. Brussee, A. van der Gen, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, 8, 1061-1067.

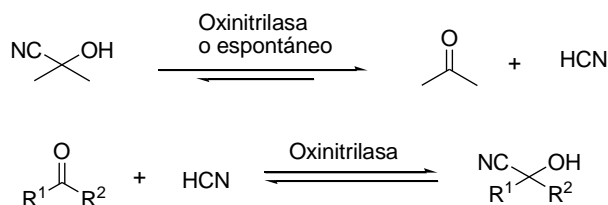
²²¹ D. V. Johnson, U. Felfler, H. Griengl, *Tetrahedron*, **2000**, 56, 781-790.

²²² E. G. J. C. Warmerdam, R. D. van Rijn, J. Brussee, C. G. Kruse, A. van der Gen, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, 7, 1723-1726.

²²³ E. G. J. C. Warmerdam, A. M. C. H. Van den Niewendijk, C. G. Kruse, J. Brussee, A. van der Gen, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1996**, 115, 20.

²²⁴ D. V. Johnson, H. Griengl, *Tetrahedron*, **1997**, 53, 617-624.

Esta reacción es un proceso reversible que consta de dos pasos. En el primero se produce la liberación de cianuro de hidrógeno desde la cianhidrina de la acetona y en el segundo, éste se consume en la formación de la cianhidrina ópticamente activa a partir del correspondiente aldehído.



Esquema 4.9.

En este equilibrio, la concentración de cianuro de hidrógeno es crítica. Debe ser lo suficientemente alta como para generar una reactividad razonable en el proceso, pero un gran exceso de cianuro de hidrógeno provocaría la adición espontánea no enzimática, con lo cual disminuiría la selectividad de la reacción e incluso podría producirse la inhibición del enzima.

La velocidad de formación de cianuro de hidrógeno a partir de la cianhidrina de la acetona se incrementa al aumentar el pH del medio, por lo que el control del pH va a ser fundamental para el desarrollo de las reacciones de transcianación.²²⁵ Para la descomposición de la cianhidrina de la acetona en agua a $\text{pH} \leq 6$, la formación de cianuro de hidrógeno sucede muy despacio. A partir de este pH la cianhidrina se va haciendo más lábil, pero la disociación completa de esta cianhidrina se consigue únicamente en condiciones fuertemente alcalinas.

El medio de reacción también es crucial en el proceso de transcianación. Cuando se utiliza éter diisopropílico conteniendo un 14 % (v/v) de tampón citrato 0.1 M a pH 3.75, el cianuro de hidrógeno generado puede conseguir la conversión de un 40 % del aldehído de partida en 24 horas, mientras que en éter diisopropílico seco, la cianhidrina de la acetona es prácticamente estable durante 48 horas. Como conclusión, concentraciones relativamente altas de agua junto a pHs suficientemente altos son necesarios para la descomposición de la cianhidrina de la acetona a una velocidad razonable.⁸⁰

En los sistemas bifásicos donde se llevan a cabo las reacciones de transcianación enzimática, tanto los sustratos como los productos van a estar repartidos entre la fase orgánica y la fase acuosa. Este reparto va a tener influencia en la pureza óptica de las cianhidrinas obtenidas. Experimentalmente es conocido que los excesos enantioméricos de las cianhidrinas son menores a mayor carácter hidrofílico del aldehído de partida, pues cuanto mayor sea el contacto con en la fase acuosa, mayor será la adición no enzimática de cianuro de hidrógeno. Así por ejemplo, la cianhidrina del nicotinaldehído se obtiene con un 2% de exceso enantiomérico, mientras que la del benzaldehído se consigue con un 92% en el proceso catalizado por la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus*.

Por lo tanto, es posible predecir las propiedades de solubilidad de un producto y a partir de éstas deducir su comportamiento en la transcianación. El parámetro a utilizar es el *coeficiente de reparto* (P), que es una medida de la distribución de un sustrato entre dos fases no miscibles.

²²⁵ (a) W. J. Svirbely, J. F. Roth, *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 3106-3111. (b) D. Selmar, F. J. P. Carvalho, E. E. Conn, *Anal. Biochem.* **1987**, 166, 208-211.

El proceso de transianación enzimática del benzaldehído ha sido estudiado cinéticamente. Para conocer los cambios de concentración de sustratos y productos a lo largo de la reacción, se han llevado a cabo experimentos de resonancia magnética nuclear de protón, empleando técnicas especiales que permiten eliminar el problema de las elevadas concentraciones de agua en el medio. Sin embargo, esta reacción presenta una cinética muy compleja, por lo que no se conoce aún con exactitud.²²⁶

4.1.3. HIDROXIALDEHÍDOS COMO SUSTRATOS DE OXINITRILASAS.

La existencia de grupos hidroxilo, libres o protegidos en los aldehídos empleados como sustratos de partida de las correspondientes cianhidrinas produce un importante efecto en la reacción de hidrocianación enzimática. Por un lado modifica de manera importante la selectividad del enzima. Por el otro, la introducción de una nueva funcionalidad aumenta de manera considerable la versatilidad de las cianhidrinas como síntones quirales.

En la bibliografía existen muy pocos antecedentes acerca de la síntesis enzimática de hidroxicianhidrinas. En la mayoría de los casos, la presencia de grupos hidroxilo libres suele conducir a bajos excesos enantioméricos, debido al mayor carácter hidrofílico que presentan los aldehídos de partida. Para evitarlo, han sido utilizados hidroxialdehídos *O*-protegidos como sustratos de las diferentes oxinitrilasas.

Otro modo de mejorar la selectividad de las reacciones de hidrocianación enzimática para estos sustratos “difíciles” consiste en la aplicación del principio de *limitación de transferencia de masa*, que establece que para conseguir una óptima pureza enantiomérica de la cianhidrina formada, la concentración de sustrato en la fase acuosa debe ser la menor posible. La aplicación de este principio se puede llevar a cabo mediante la reducción del pH o a través de la variación de la temperatura del medio, lo que minimiza la adición no enzimática de cianuro de hidrógeno. El inconveniente radica en que en estas condiciones se produce una cierta desactivación del enzima. El incremento de la cantidad de enzima, con el que la adición espontánea no varía mientras que la velocidad de la reacción enzimática aumenta considerablemente, suele ser otra solución muy eficaz.²²⁷

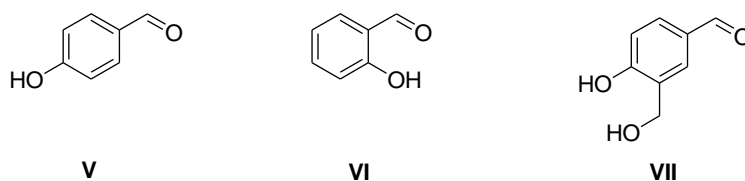
Los resultados conseguidos en la síntesis de (*R*)-cianhidrinas a partir de aldehídos aromáticos que contengan un sustituyente hidroxilo normalmente no son buenos (esquema 4.10). Sólo la sustitución en *meta* genera elevadas purezas ópticas empleando la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus* pura e inmovilizada sobre un soporte de Avicel en acetato de etilo.²²⁸ En la reacción de hidrocianación del *p*-hidroxibenzaldehído (**V**) realizada en un sistema bifásico éter diisopropílico / disolución tampón de tartratos de pH 5.4 a 5°C con la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus* en forma de crudo se obtiene la cianhidrina correspondiente con un 64 % de rendimiento y un bajo exceso enantiomérico, por lo que es necesario una etapa de cristalización.⁸⁰ Cuando se duplica la cantidad de enzima se consigue la formación de la cianhidrina con un 90 % de rendimiento y una pureza óptica del 91 %. En el caso del *o*-hidroxibenzaldehído (**VI**), empleando esta misma metodología se consigue su cianhidrina con un rendimiento cuantitativo y prácticamente enantiopura (*ee*=98%) sin necesidad de cristalización.

²²⁶ A. Hickel, G. Gradnig., H. Griengl, M. Schall, H. Sterk, *Spectrochim. Acta Part A*, **1996**, 52, 93-96.

²²⁷ P. J. Gerrits, J. Marcus, L. Birikaki, A. van der Gen, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2001**, 12, 971-974.

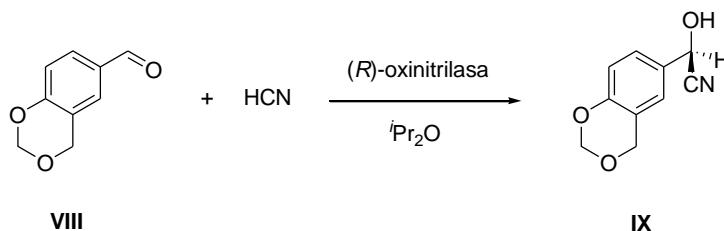
²²⁸ F. Effenberger., T. Ziegler, S. Förster, *Angew. Chem. Int. Ed.* . **1987**, 99, 591-492.

Effenberger y col.²²⁹ utilizaron el aldehído **VII** y sus análogos protegidos como intermedios en la síntesis de (*S*)-salbutamol (broncodilatador). En la reacción catalizada por la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus* se obtenían buenos rendimientos y excesos enantioméricos con algunos derivados protegidos, pero desafortunadamente, se producía la racemización cuando se intentaba eliminar el grupo protector correspondiente. Por su parte, el aldehído desprotegido **VII** sólo reaccionaba con esta (*R*)-oxinitrilasa empleando un gran exceso de enzima y realizando la hidrocianación durante largos períodos de tiempo. En estas condiciones, se consigue sintetizar la correspondiente cianhidrina con un 80 % de rendimiento y un *ee* del 58 %.



Esquema 4.10

En este mismo trabajo se estudia el efecto de diferentes grupos protectores en la hidrocianación enzimática; si bien se concluye que el tamaño de los mismos afecta a la velocidad del proceso, disminuyendo ésta a mayor tamaño del grupo protector, no está muy claro el efecto de este parámetro en la selectividad de la reacción. El mejor resultado se obtiene con el aldehído **VIII**, consiguiendo en 24 horas de reacción la cianhidrina **IX** con un rendimiento del 93 % y un *ee* del 97 % (esquema 4.11).



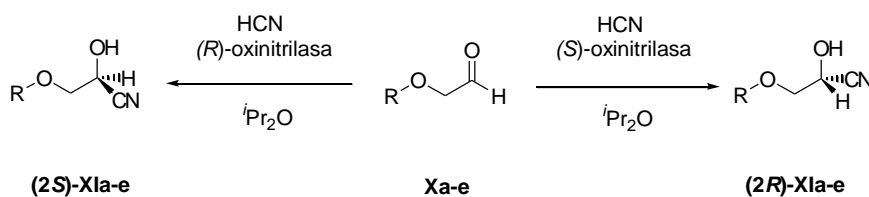
Esquema 4.11

En la síntesis de la (*R*)-pantolactona propuesta por estos mismos autores (esquema 4.6), se utilizaron diferentes β -hidroxialdehídos alifáticos para la formación de las correspondientes cianhidrinas.²⁰⁶ Cuando se emplea el hidroxipivaldehído, la cianhidrina obtenida presenta un bajo exceso enantiomérico (61 %). Sin embargo, al proteger el grupo hidroxilo en forma de metoxilo, se consigue una cianhidrina con un exceso enantiomérico del 96 %. Con otros grupos protectores en el oxígeno, las purezas ópticas conseguidas varían de moderadas a altas.

El estudio de los parámetros que influyen en la reacción de hidrocianación del hidroxipivaldehído conduce a la obtención de una cianhidrina con un exceso enantiomérico del 89 % mediante la utilización de una (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus* purificada.

²²⁹ F. Effenberger, J. Jäger, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 3867-3873.

Recientemente, se ha estudiado la influencia de diferentes grupos protectores en la reacción de hidrocianación enzimática sobre 2-hidroxialdehídos *O*-protegidos, catalizada por la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus* y la (*S*)-oxinitrilasa de *Manihot esculenta*.²³⁰



R: Bencilo; Alilo; 2-Metilalilo; Metoximetilo; *tert*-Butildimetilsililo

Esquema 4.12.

Existe una clara dependencia entre los excesos enantioméricos y el grupo protector. Así, la (*R*)-oxinitrilasa cataliza la formación de las cianhidrinas con los grupos protectores pequeños (alilo y metoximetilo) con elevada selectividad. Al introducir el grupo bencilo, el exceso enantiomérico desciende de forma drástica.

Sin embargo, para la (*S*)-oxinitrilasa, el mejor resultado se consigue empleando el 2-metilalilo como grupo protector, mientras que el resto de los grupos protectores presentan bajas selectividades. Para este enzima, la influencia del grupo protector es mucho menos acusada. Ninguno de los enzimas es capaz de catalizar la hidrocianación del derivado sililado, pero se han excluido procesos de inhibición, pues el benzaldehído, muy buen sustrato de ambos enzimas, reacciona en presencia de este aldehído.

4.1.3.1. Hidroxialdehídos con un centro quiral.

En el caso de que el aldehído presente un centro estereogénico cercano al grupo carbonílico, la configuración absoluta de éste influye de manera importante en la selectividad del enzima. En estudios sobre la reacción de transcianación de aldehídos con un resto alquilo en la posición α catalizada por la oxinitrilasa de *Prunus amygdalus*, se observó que si el centro quiral era *S*, el isómero (*2R,3S*) era mayoritario, mientras que si presentaba configuración *R*, la selectividad del enzima se perdía y se obtenían los diastereoisómeros (*2R,3S*) y (*2R,3R*) en la misma proporción. Si el estereocentro estuviera en la posición β , no hay un efecto tan drástico en la selectividad de la (*R*)-oxinitrilasa, obteniéndose los isómeros (*2R,4R*) y (*2R,4S*) cuando se parte del correspondiente racemato.²³¹

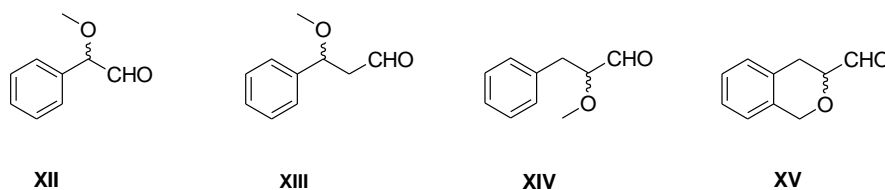
La introducción de sustituyentes de tipo alcoxi en los centros estereogénicos en α o β a la función aldehído provoca que las diastereoselectividades obtenidas sean por regla general menores que en los análogos no oxigenados. Roda y col.²³² analizaron el comportamiento de ciertos alcoxialdehídos (**XII-XV**) empleando la (*S*)-oxinitrilasa de *Hevea Brasiliensis*. Para este enzima, si el centro quiral es *S*, se obtiene la mezcla de diastereoisómeros (*2R,3S*) y (*2S,3S*), mientras que si es *R*, mayoritariamente se consigue el isómero (*2S,3R*), con lo que se logra una selectividad complementaria a la (*R*-

²³⁰ J. Roos, F. Effenberger, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, *10*, 2817-1828. La acción de las (*R*)- y (*S*)-oxinitrilasas genera las correspondientes (*R*)- y (*S*)-cianhidrinas, siendo producida la alteración de la selectividad por el distinto orden de preferencia de los sustituyentes respecto al sustrato natural de los enzimas.

²³¹ (a) B. Danieli, C. Barra, G. Carrea, S. Riva, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, *7*, 1675-1682. (b) B. Danieli, S. Frattini, G. Roda, G. Carrea, S. Riva, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **1998**, *5*, 223-228.

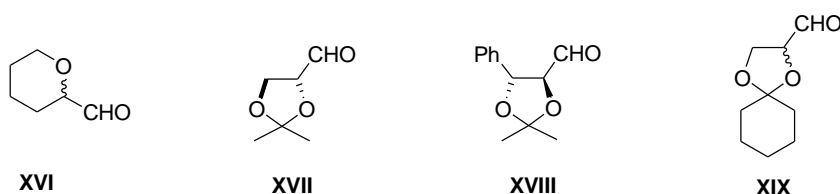
²³² G. Roda, S. Riva, B. Danieli, H. Griengl, U. Rinner, M. Schmidt, A. Zabelinskaja-Mackova, *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 2979-2983

oxinitrilasa de *Prunus amygdalus*. En este trabajo, los aldehídos oxigenados presentaron también menores selectividades que los correspondientes aldehídos alquilados (esquema 4.13).



Esquema 4.13.

Se han realizado recientemente estudios acerca de la selectividad de la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus* y la (*S*)-oxinitrilasa de *Manihot esculenta* en procesos de hidrocianación sobre α -alcoxi y α,β -dialcoxialdehídos (esquema 4.14).²³³ Como productos de reacción se han obtenido mezclas de cianhidrinas con diastereoselectividades menores siempre del 70 %, siendo especialmente bajas en el caso de aldehídos muy impedidos estéricamente (**XVIII**, **XIX**). En estas reacciones se produce un cierto grado de inducción asimétrica debida al estereocentro o los estereocentros presentes en el aldehído, por lo que en ausencia de enzima, las cianhidrinas pueden presentar un cierto exceso enantiomérico, lo que dificulta la explicación de los resultados.



Esquema 4.14

Dada la importancia de las cianhidrinas ópticamente activas como sintones quirales de una gran variedad de compuestos de interés biológico, en este capítulo desarrollaremos la preparación de (*R*)-hidroxicianhidrinas a partir de ω -hidroxialdehídos mediante reacciones enzimáticas de transcianación catalizadas por la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus*. La presencia de la función hidroxilo aumenta de forma sustancial las posibilidades sintéticas de las cianhidrinas obtenidas.

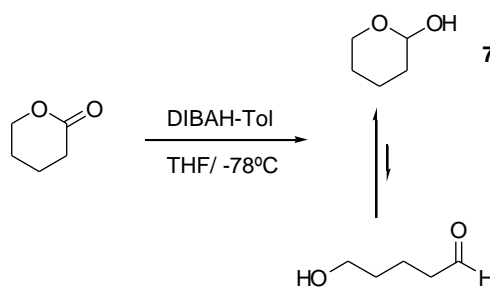
²³³ P. Bianchi, G. Roda, S. Riva, B. Danieli, A. Zabelinskaja-Mackova, H. Griengl, *Tetrahedron*, **2001**, 57, 2213-2220.

4.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente capítulo se ha aplicado la reacción de transianación enzimática catalizada por oxinitrilasas a la preparación de una serie de ω -hidroxicianhidrinas ópticamente activas. La formación de estos productos con elevados excesos enantioméricos nos permite obtener compuestos quirales con tres grupos funcionales, que se pueden utilizar para posteriores transformaciones. Así, a partir de procesos biocatalíticos es posible generar sintones quirales de un gran número de compuestos de alto valor añadido.

4.2.1. PREPARACIÓN DE LOS ω -HIDOXIALDEHÍDOS.

En primer lugar, se desarrolló la síntesis de los ω -hidroxialdehídos empleados como sustratos en la preparación de (*R*)-hidroxicianhidrinas catalizada por la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus*. El 5-hidroxipentanal fue obtenido a partir de la δ -valerolactona, por reducción en una disolución de hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL-H)²³⁴ en tolueno y THF a baja temperatura, seguida de una hidrólisis en medio ácido. Sin embargo, el producto mayoritario tras la reducción no es el compuesto carbonílico, sino el tautómero hemiacetalico 2-hidroxitetrahidropirano **7**, según se desprende de los análisis de ¹H-RMN (esquema 4.15).

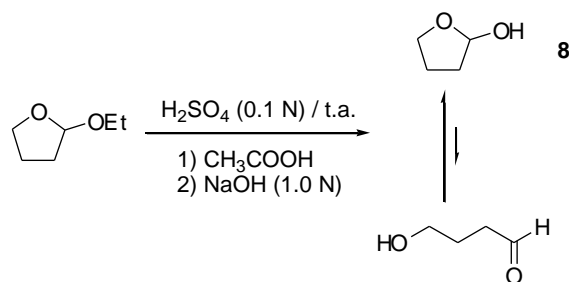


Esquema 4.15.

Cuando se intentó aplicar esta misma metodología a la formación del 4-hidroxibutanal, la reducción de la γ -butirolactona generó mezclas entre la lactona de partida y el producto final, que no pudieron ser separadas por ninguno de los métodos utilizados. Por lo tanto, se decidió realizar la síntesis a partir de 2-etoxitetrahydrofurano, producto comercial. Su hidrólisis genera el 2-hidroxitetrahydrofurano **8**, forma más estable termodinámicamente del 4-hidroxibutanal. Se utilizaron diversos métodos de hidrólisis de acetales descritos en la literatura, como el empleo de ácido trifluoroacético (CF₃COOH) en mezclas H₂O/CH₂Cl₂, resinas intercambiadoras (Amberlite IR-120) en THF o bien tratamiento con ácidos inorgánicos (disoluciones de HCl diluido en diferentes disolventes). En todos los intentos, se producía la descomposición del acetal de partida. Finalmente, el producto **8** pudo ser preparado con buenos rendimientos por tratamiento del 2-etoxitetrahydrofurano en H₂SO₄ diluido a temperatura ambiente, con posterior adición de ácido acético y neutralización con NaOH (esquema 4.16).²³⁵

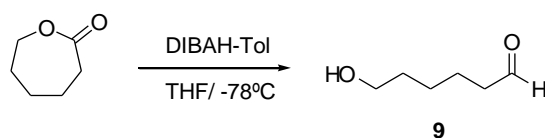
²³⁴ N. M. Yoon, Y. S. Gyoung, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 2243-2250. (b) S. Chandrasekhar, M. Suresh Kumar, B. Muralidhar, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 909-910.

²³⁵ J. March, “*Advanced Organic Chemistry*”, John Wiley & Sons, Nueva York, **1985**, 329-332 y referencias allí citadas.



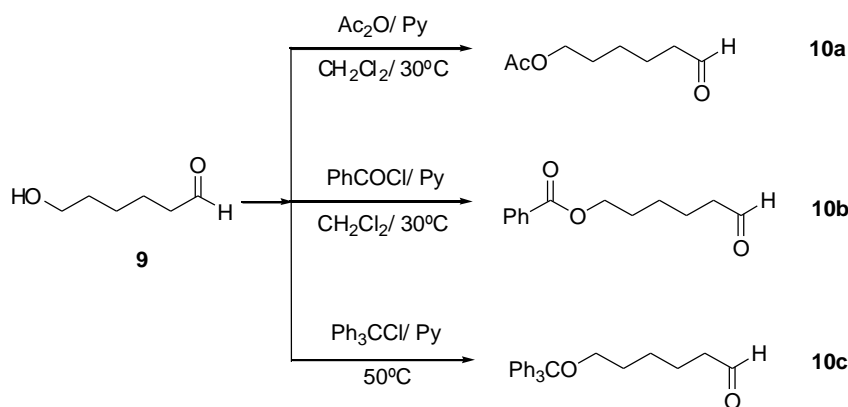
Esquema 4.16.

El 6-hidroxihexanal **9** se obtuvo por reducción con una disolución de DIBAL-H en tolueno y THF de la ϵ -caprolactona (esquema 4.17). En este caso, únicamente se observa el compuesto carbonílico como producto de reacción, puesto que la tautomerización a la forma hemiacetalica no está favorecida.



Esquema 4.17.

Sin embargo, el hidroxialdehído **9** es muy inestable y descompone rápidamente. Por ello, se realizó la protección de la función hidroxilo con varios grupos protectores de diferente tamaño, como el acetilo, el benzoilo y el tritilo (esquema 4.18). El 6-acetoxihexanal **10a** es preparado por reacción de **9** con anhídrido acético en piridina en CH_2Cl_2 , el 6-benciloxihexanal **10b** se forma por el tratamiento del aldehído **9** con cloruro de benzoilo y piridina en CH_2Cl_2 ; mientras que el 6-tritiloxihexanal **10c** es generado a partir del hidroxialdehído libre por reacción con cloruro de tritilo en piridina. Los tres hidroxialdehídos *O*-sustituidos son estables y serán los sustratos empleados en la preparación de las correspondientes (*R*)-cianhidrinas.



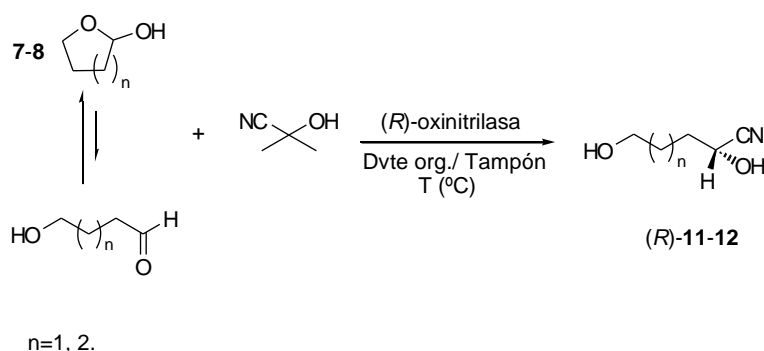
Esquema 4.18.

4.2.2. REACCIONES DE TRANSCIANACIÓN ENZIMÁTICA SOBRE LOS HEMIAETALES 7 Y 8.

Una vez obtenidos los aldehídos de partida, se llevó a cabo el estudio de la reactividad de los hidroxialdehídos **7-10** con la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus*, con el fin de preparar las correspondientes (*R*)-cianhidrinas con elevadas purzas ópticas.

Inicialmente, se analizó el comportamiento de los sustratos **7** y **8** frente a la reacción de transcianación enzimática, empleando un sistema bifásico disolvente orgánico/ disolución tampón de citratos ($250 \mu\text{L mmol}^{-1}$ de sustrato) 0.1 M de pH 5.4 (esquema 4.19, tabla 4.1). La cantidad de enzima utilizada fue de 200 mg mmol^{-1} de aldehído. En las reacciones a 30°C empleando como disolvente orgánico $i\text{Pr}_2\text{O}$ o AcOEt (entradas 1-4) puede observarse que ambos aldehídos son aceptados como sustratos por el enzima, a pesar de encontrarse mayoritariamente en forma hemiacetalica.

Sin embargo, los excesos enantioméricos obtenidos en todos los casos son muy bajos. La razón de la escasa pureza óptica de las cianhidrinas (*R*)-**11** y (*R*)-**12** se debe a la adición química no deseada de cianuro de hidrógeno, producida por el carácter hidrofílico que presentan los sustratos de la reacción. Como ya ha sido comentado en los antecedentes de este capítulo, a mayor grado de contacto con la fase acuosa por parte de los sustratos, mayor es la posibilidad de la reacción química espontánea y menores por tanto los *ees* conseguidos.



Esquema 4.19.

Tabla 4.1. Reacciones de transcianación sobre **7** y **8** en sistemas bifásicos a 30°C .

Entrada	Sustrato	Disolvente	t (h)	c^a (%)	ee^b (%)	c^c (%)
1	7	$i\text{Pr}_2\text{O}$	25	100	17	32
2	7	AcOEt	35	100	23	24
3	8	$i\text{Pr}_2\text{O}$	96	100	4	48
4	8	AcOEt	140	94	15	45

^a Conversión del proceso enzimático, calculada por $^1\text{H-RMN}$. ^b Determinado por GC tras acetilación. ^c Conversión de la reacción en ausencia de enzima, calculada por $^1\text{H-RMN}$.

Con el objetivo de minimizar la adición química que provoca el descenso de los excesos enantioméricos de los productos obtenidos, decidimos realizar un estudio de la transcianación en diferentes condiciones de reacción. Los disolventes utilizados van a ser en todos los casos $i\text{Pr}_2\text{O}$ o AcOEt. En general, la velocidad de reacción es mayor cuando utilizamos el primero, sin embargo los excesos enantioméricos de los productos pueden ser mejores en uno u otro dependiendo de las condiciones de reacción empleadas.

4.2.2.1. Efecto de la temperatura.

La temperatura a la cual se realizan los procesos enzimáticos tiene un importante efecto en las propiedades del biocatalizador. Por ello, se llevaron a cabo procesos de transcianación sobre el sustrato **7** en $i\text{Pr}_2\text{O}$ a diferentes temperaturas. Como se puede observar en la tabla 4.2 y en la gráfica 4.1, el incremento de la temperatura provoca un aumento en la conversión de los dos procesos que se dan en estas asimetrizaciones: la

reacción enzimática y la adición química no deseada. El resultado es un descenso en la pureza óptica de la cianhidrina (*R*)-**11**. El mejor exceso enantiomérico (entrada 3) se produce a 15°C, pudiendo obtenerse la hidroxicianhidrina con $ee=46\%$, a pesar de ser necesarios largos tiempos de reacción para conseguir la conversión total del sustrato **7**. A temperaturas inferiores (10°C, entrada 4), se consigue evitar en mayor medida la adición espontánea de cianuro, sin embargo, la actividad enzimática se reduce considerablemente, pues la hidroxicianhidrina se obtiene con un $ee=26\%$, inferior al logrado a 30°C.

Cuando se utiliza AcOEt como disolvente en la reacción a 15°C (entrada 5), también se consigue un incremento en la pureza óptica de (*R*)-**11**. Sin embargo, el exceso enantiomérico obtenido ($ee=30\%$) es menor que el conseguido con $i\text{Pr}_2\text{O}$.

Este comportamiento también es observado para el hidroxialdehído **8** (entradas 6 y 7). El descenso de la temperatura de la transcianación hasta los 15°C en $i\text{Pr}_2\text{O}$ provoca un importante aumento en el exceso enantiomérico de (*R*)-**12**. Esta mejora también se observa en el proceso realizado con AcOEt, siendo las purezas ópticas obtenidas a 15°C en ambos disolventes muy similares.

Tabla 4.2. Reacciones de transcianación sobre **7** y **8** en sistemas bifásicos a diferentes temperaturas.

Entrada	Sustrato	Disolvente	T (°C)	t (h)	c^a (%)	ee^b (%)	c^c (%)
1	7	$i\text{Pr}_2\text{O}$	40	15	100	13	41
2	7	$i\text{Pr}_2\text{O}$	20	96	100	32	24
3	7	$i\text{Pr}_2\text{O}$	15	168	100	46	21
4	7	$i\text{Pr}_2\text{O}$	10	278	90	26	17
5	7	AcOEt	15	168	90	30	20
6	8	$i\text{Pr}_2\text{O}$	15	240	97	25	38
7	8	AcOEt	15	240	85	27	40

^a Conversión del proceso enzimático, calculada por $^1\text{H-RMN}$. ^b Determinado por GC tras acetilación. ^c Conversión de la reacción en ausencia de enzima, calculada por $^1\text{H-RMN}$.

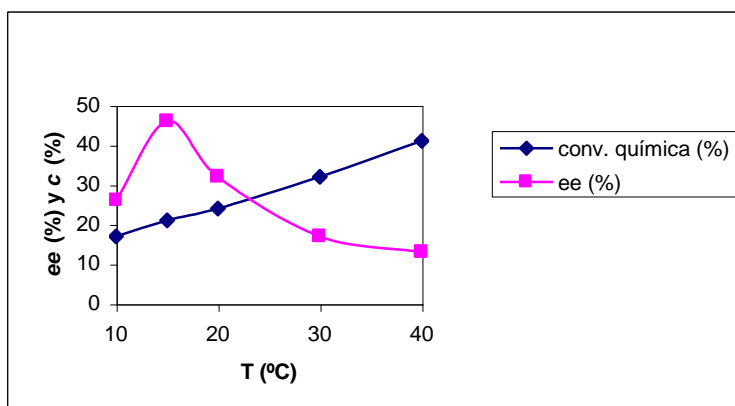


Gráfico 4.1. Efecto de la temperatura en el exceso enantiomérico y la conversión de la adición no enzimática en las transcianaciones enzimáticas sobre el sustrato **7**.

4.2.2.2. Efecto de la concentración de (*R*)-oxinitrilasa.

El incremento de la cantidad de enzima aumenta la velocidad de la reacción enzimática sin afectar a la adición química de cianuro, por lo que en principio pueden mejorarse las purezas ópticas de las cianhidrinas (*R*)-**11** y (*R*)-**12**. Así, para el sustrato **7**, se puede obtener una conversión total a las 16 horas de reacción con el doble de enzima (400 mg mmol^{-1}), en la reacción realizada en $i\text{Pr}_2\text{O}$ a 30°C. El exceso enantiomérico aumenta ligeramente de un 17 (entrada 1, tabla 4.1) a un 28%. En las mismas

condiciones, para el hidroxialdehído **8** se alcanza la conversión máxima a las 60 horas, mejorándose ligeramente la pureza óptica de (*R*)-**12**: de un 4 (entrada 3, tabla 4.1) a un 10%.

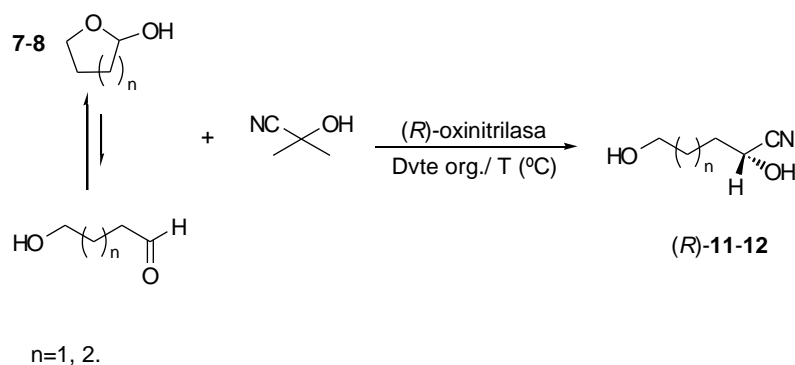
En conclusión, el aumento de la cantidad de (*R*)-oxinitrilasa en el medio de reacción permite mejorar los resultados en cuanto a velocidad de reacción y excesos enantioméricos de las cianhidrinas obtenidas, pero de un modo insuficiente para nuestros objetivos sintéticos.

4.2.2.3. Empleo de sistemas “micro-acuosos”.

El uso de una pequeña cantidad de disolución tampón (2-10%) en un disolvente orgánico inmisible es la metodología habitual para las reacciones catalizadas por las oxinitrilasas. Sin embargo, recientes trabajos han establecido que debido a que la adición química de cianuro de hidrógeno transcurre en la fase acuosa, este proceso puede ser suprimido utilizando únicamente el disolvente orgánico como medio de reacción.⁸¹

La utilización de sistemas “micro-acuosos” fue estudiada en los procesos realizados a 15 y 30°C con *i*Pr₂O y AcOEt (esquema 4.20, tabla 4.3). Los resultados en las entradas 1-4 muestran un aumento significativo de los excesos enantioméricos para el sustrato **7** frente a las reacciones realizadas en sistemas bifásicos, debido a la disminución de la adición no enzimática. Sin embargo, todas las reacciones de transcianación en medio orgánico son mucho más lentas que sus homólogas en medios bifásicos, por lo que se requieren tiempos de reacción largos para alcanzar buenas conversiones. Resulta evidente la necesidad de la disolución tampón para mantener una elevada actividad enzimática.

El efecto de la supresión del medio acuoso es especialmente notable para el hidroxialdehído **8**. A 15°C en *i*Pr₂O, es posible conseguir la hidroxicnhidrina (*R*)-**12** con un *ee*=62%, frente al 25% obtenido en la transcianación con una disolución tampón de citratos (entrada 5). Similares incrementos en la pureza óptica de la cianhidrina se observan en la reacción a 15°C con AcOEt (entrada 7) y en ambos disolventes a 30°C (entradas 6-8). Del mismo modo que para el sustrato **7**, son necesarios tiempos de reacción largos para obtener elevadas conversiones, puesto que las velocidades de reacción descienden de modo apreciable en estas circunstancias.



Esquema 4.20.

Tabla 4.3. Reacciones de transcianación catalizada por la (*R*)-oxinitrilasa de *P. amygdalus* sobre **7** y **8** en sistemas micro-acuosos a diferentes temperaturas.

Entrada	Sustrato	Disolvente	T (°C)	t (h)	<i>c</i> ^a (%)	<i>ee</i> ^b (%)	<i>c</i> ^c (%)
1	7	ⁱ Pr ₂ O	15	200	84	50	14
2	7	ⁱ Pr ₂ O	30	72	80	21	17
3	7	AcOEt	15	200	78	46	12
4	7	AcOEt	30	76	74	24	15
5	8	ⁱ Pr ₂ O	15	280	64	62	13
6	8	ⁱ Pr ₂ O	30	140	96	43	21
7	8	AcOEt	15	300	55	60	15
8	8	AcOEt	30	190	90	45	22

^a Conversión del proceso enzimático, calculada por ¹H-RMN. ^b Determinado por GC tras acetilación. ^c Conversión de la reacción en ausencia de enzima, calculada por ¹H-RMN.

4.2.2.4. Efecto de la conversión.

Con el objeto de intentar minimizar en mayor medida el proceso no enzimático, se realizó un estudio de la transcianación enzimática deteniendo la reacción en tiempos de reacción más cortos. La cinética de los procesos biocatalíticos presenta una mayor velocidad de reacción al inicio de la misma. Por ello, acortando el tiempo del proceso, el descenso en la conversión debido a la adición química no deseada sería mayor que el de la conversión de la reacción enzimática, con lo que aumentaría la pureza óptica del producto obtenido.

Para ello, se estudió la transcianación del aldehído **8** en un sistema micro-acuoso de ⁱPr₂O a 30°C. Como puede observarse en la tabla 4.4, hay un ligero aumento del exceso enantiomérico de la cianhidrina (*R*)-**12**, cuando las reacciones se detienen a menores tiempos. De todos modos, sólo es posible conseguir (*R*)-**12** con un *ee*=63% a una conversión del 15% en 15 horas (entrada 1), aunque la adición no enzimática en este tiempo es sólo del 4%.

Tabla 4.4. Efecto de la conversión en la pureza óptica de la cianhidrina (*R*)-**12**.^a

Entrada	t (h)	<i>c</i> ^b (%)	<i>ee</i> ^c (%)	<i>c</i> ^d (%)
1	15	15	63	4
2	30	34	56	9
3	70	63	49	16
4	140	96	43	21

^a Reacción a 30°C, en medio micro-acuoso con ⁱPr₂O como disolvente. ^b Conversión del proceso enzimático, calculada por ¹H-RMN. ^c Determinado por GC tras acetilación. ^d Conversión de la reacción en ausencia de enzima, calculada por ¹H-RMN.

4.2.2.5. Influencia de la concentración de la cianhidrina de la acetona.

La cantidad de cianhidrina de la acetona presente en el medio es un factor fundamental en el desarrollo de las reacciones de transcianación. Como ya ha sido comentado, la reacción de transcianación enzimática es un proceso reversible de dos pasos. En primer lugar, se produce la liberación del cianuro que se adicionará al compuesto carbonílico. La concentración de cianuro en el medio es crucial, ya que altas cantidades de cianuro provocan un aumento de la adición no enzimática e incluso la inhibición del enzima. Pero sí la concentración de la cianhidrina es muy baja, la reactividad también lo será. En los estudios realizados en nuestro grupo de

investigación, la cantidad óptima de cianhidrina de la acetona fue establecida en 1.5-2.0 equivalentes respecto al aldehído de partida.

En las pruebas realizadas sobre el aldehído **8** a 30°C en medio micro-acuoso, utilizando $^i\text{Pr}_2\text{O}$ como disolvente y deteniendo las reacciones a las 30 horas, se observa que con 2 equivalentes de cianhidrina de la acetona (tabla 4.5, entrada 3), se alcanzan conversiones y excesos enantioméricos similares a las obtenidas con 1.5 equivalentes. Posteriormente, se realizó el mismo proceso con 1 equivalente (entrada 1). En estas condiciones la reacción es muy lenta, con sólo un 15% de conversión a las 30 horas, pero se suprime prácticamente toda adición no enzimática y la cianhidrina (*R*)-**12** se obtiene con una pureza óptica ligeramente superior ($ee=61\%$). Cuando se incrementa la concentración de la cianhidrina de la acetona a 4 equivalentes (entrada 4), el producto de la transcianación se obtiene prácticamente racémico. La conversión de este proceso es muy similar a la obtenida con 2 equivalentes. Sin embargo, en estas condiciones, la mayor parte del producto obtenido se debe a la adición espontánea de cianuro. Según los resultados se deduce que concentraciones mayores a 2 equivalentes de agente de transcianación afectan negativamente a la actividad y selectividad de la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus*.

Tabla 4.5. Efecto del número de equivalentes de cianhidrina de la acetona en la pureza óptica de la cianhidrina (*R*)-**12**.^a

Entrada	n^b	c^c (%)	ee^d (%)	c^e (%)
1	1.0	10	61	3
2	1.5	34	56	9
3	2.0	38	53	12
4	4.0	43	5	35

^a Reacción a 30°C, en medio micro-acuoso, con $^i\text{Pr}_2\text{O}$ como disolvente y detenida a las 30 horas. ^b Número de equivalentes de cianhidrina. ^c Conversión del proceso enzimático, calculada por $^1\text{H-RMN}$. ^d Determinado por GC tras acetilación. ^e Conversión de la reacción en ausencia de enzima, calculada por $^1\text{H-RMN}$.

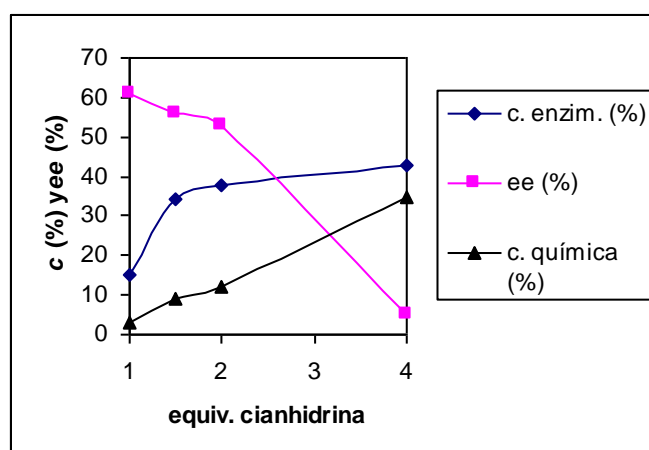


Gráfico 4.2. Efecto de la concentración de cianhidrina de la acetona en la conversión enzimática y exceso enantiomérico de (*R*)-**12**, así como en la conversión de la reacción no enzimática.

4.2.2.6. Reacciones de transcianación con otras (*R*)- y (*S*)-oxinitrilasas.

Finalmente, se emplearon otras oxinitrilasas en las reacciones de transcianación del hidroxialdehído **7**. Los procesos biocatalizados por la (*S*)-oxinitrilasa de *Manihot*

esculenta y las (*R*)-oxitrilasas de *Prunus amygdalus* y *Linux usitatissimum* comercializadas por Jülich en forma pura, generaron las correspondientes cianhidrinas racémicas cuando se emplean sistemas bifásicos con $^i\text{Pr}_2\text{O}$ a 30°C.

La (*R*)-oxinitrilasa de *P. Amygdalus* preparada en forma de crudo por Sigma genera la cianhidrina (*R*)-**11** con un exceso enantiomérico muy similar al obtenido con nuestro crudo ($ee=20\%$), pero con una menor velocidad de reacción ($c=92\%$ en 48 horas) en la transcianación realizada a 30°C con $^i\text{Pr}_2\text{O}$ en sistema bifásico. A 15°C en el mismo disolvente, se consiguen excesos enantioméricos más bajos ($ee=33\%$) y menores velocidades de reacción, ya que se necesitan 168 horas para alcanzar una conversión del 75%.

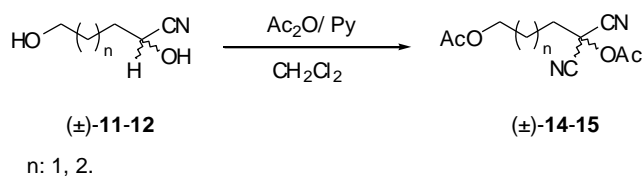
4.2.3. ASIGNACIÓN DE LAS CONFIGURACIONES ABSOLUTAS.

Las configuraciones absolutas de las hidroxicianhidrinas **11** y **12** se asignaron en función de la enantioselectividad mostrada por el enzima. Así, en los procesos catalizados por (*R*)-oxitrilasas, es aceptado que los productos obtenidos presentan configuración *R*,⁶⁶ por lo que las hidroxicianhidrinas sintetizadas en las reacciones de transcianación catalizadas por la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus* sobre los aldehídos **7** y **8** presentarán configuración *R*.

4.2.4. DETERMINACIÓN DE LOS EXCESOS ENANTIOMÉRICOS DE LAS CIANHIDRINAS (*R*)-**11** Y (*R*)-**12**.

Las hidroxicianhidrinas obtenidas son analizadas por cromatografía de gases (CG) utilizando una columna de relleno quiral RTβDEXse. En primer lugar, se intentó el análisis de las cianhidrinas racémicas (\pm)-**11** y (\pm)-**12**. Para su preparación se desarrollaron diversos métodos descritos en la literatura, como el tratamiento de **7** y **8** con cianuro de trimetilsilano (Me_3SiCN)²³⁶ catalizado por ZnI_2 , o la reacción con KCN en presencia de NaHSO_3 .²³⁷ Los mayores rendimientos se consiguieron, sin embargo, realizando la transcianación con la cianhidrina de la acetona de **7** y **8** en ausencia de enzima durante largos tiempos de reacción, obteniendo (\pm)-**11** y (\pm)-**12** con un 70 y un 62% de rendimiento, respectivamente.

Las hidroxicianhidrinas (\pm)-**11** y (\pm)-**12** no pudieron resolverse adecuadamente por ninguno de los métodos de análisis probados, por lo que hubieron de ser transformadas en los derivados diacetilados (\pm)-**14** y (\pm)-**15** por tratamiento con anhídrido acético y piridina en CH_2Cl_2 (esquema 4.21).



Esquema 4.21.

Los derivados diacetilados son resueltos satisfactoriamente por cromatografía de gases. En la tabla 4.6 se muestran las condiciones de análisis empleadas para la separación de los enantiómeros de las cianhidrinas (\pm)-**14** y (\pm)-**15**.

²³⁶ P. G. Gassman, J. J. Talley, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 40, 3773-3776.

²³⁷ J. March, "Advanced Organic Synthesis", John Wiley & Sons, Nueva York, **1985**, 854-855.

Tabla 4.6. Condiciones experimentales utilizadas para la determinación de los excesos enantioméricos de **14** y **15** mediante CG empleando una columna RT β DEXse.

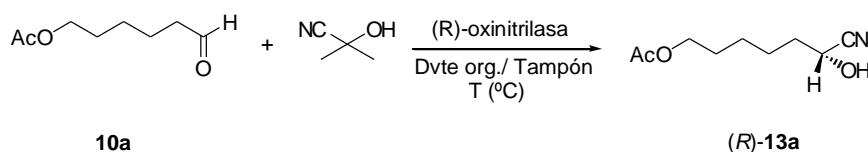
Compuesto	Condiciones ^a	t_{R1} (min)	t_{R2} (min)	$R_S^{b,c}$
14	100°C 5 min, 5°C/min	24.68	25.25	1.7
	200°C 20 min	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	
15	100°C 5 min, 5°C/min	22.17	22.83	1.9
	200°C 20 min	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	

^a Gas portador: N₂; $P_{G.P.}$: 110 kPa. ^b Concentración aproximada de muestra: 1.0 mg/mL. ^c Relación de split: (100:1)

4.2.5. REACCIONES DE TRANSCIANACIÓN ENZIMÁTICA SOBRE LOS HIDROXIALDEHÍDOS *O*-PROTEGIDOS **10a**, **10b** Y **10c**.

Posteriormente, se decidió analizar el comportamiento de los aldehídos **10a**, **10b** y **10c** en procesos catalizados por la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus*. Debido a la protección del grupo hidroxilo, estos sustratos no presentan carácter hidrofílico, por lo que en ninguna de las reacciones comentadas a continuación se produce la adición no enzimática. Las purzas ópticas obtenidas se deben únicamente a la selectividad del enzima.

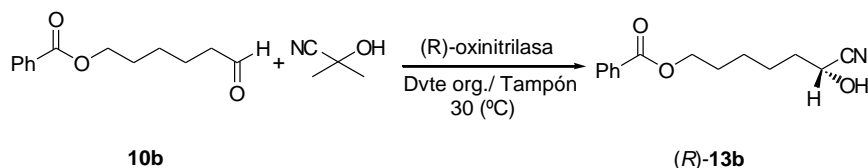
En primer lugar, se analizó el comportamiento del 6-acetoxihexanal **10a** (esquema 4.21, tabla 4.7). Cuando se realiza la transcianación en un sistema bifásico con ^{*i*}Pr₂O a 30°C (entrada 1), la cianhidrina obtenida (*R*)-**13a** presenta un exceso enantiomérico moderado, alcanzándose una conversión del 66% a las 96 horas de reacción. El empleo de AcOEt genera la cianhidrina con una pureza óptica ligeramente inferior (entrada 2), y como sucede con el resto de los hidroxialdehídos utilizados, la velocidad del proceso es mucho menor que en ^{*i*}Pr₂O, pues sólo se consigue una conversión del 31% a las 96 horas. Para intentar mejorar los resultados, se realizó una prueba en ^{*i*}Pr₂O a 30°C empleando doble cantidad de oxinitrilasa (entrada 3). Como es de esperar, aumenta de modo considerable la velocidad del proceso biocatalítico, aunque la pureza óptica de la cianhidrina (*R*)-**13a** prácticamente no se modifica. El descenso de la temperatura a 15°C en las mismas condiciones de reacción (entrada 4), nos permite obtener el producto de transcianación con un $ee=75\%$.

**Esquema 4.21.****Tabla 4.7.** Reacciones de transcianación catalizada por la (*R*)-oxinitrilasa de *P. amygdalus* sobre **10a**.

Entrada	Disolvente	Enzima ^a	T (°C)	t (h)	c^b (%)	ee^c (%)
1	^{<i>i</i>} Pr ₂ O	200	30	96	66	67
2	AcOEt	200	30	96	31	61
3	^{<i>i</i>} Pr ₂ O	400	30	48	63	68
4	^{<i>i</i>} Pr ₂ O	400	15	96	51	75

^a Cantidad expresada en mg mmol⁻¹. ^b Conversión del proceso enzimático, calculada por ¹H-RMN. ^c Determinado por GC tras acetilación.

La introducción en el 6-hidroxihexanal de un grupo protector más voluminoso, como el benzoílo, produce un descenso tanto en la pureza óptica de las cianhidrinas obtenidas como en la velocidad de la transcianación del hidroxialdehído **10b** (esquema 4.22), como puede observarse en la tabla 4.8. Realizando el proceso a 30°C en sistema bifásico con $i\text{Pr}_2\text{O}$, la hidroxicianhidrina (*R*)-**13b** se obtiene con baja pureza óptica ($ee=22\%$) y una conversión del 28% a las 168 horas. Cuadruplicando la cantidad de enzima empleada en las reacciones a 30°C en $i\text{Pr}_2\text{O}$ y AcOEt (entradas 2 y 3), se incrementa de manera notable la velocidad de reacción, sin embargo, no se consigue aumentar el exceso enantiomérico de (*R*)-**13b**. Como ocurre con el resto de las pruebas realizadas, la transcianación es considerablemente más rápida en $i\text{Pr}_2\text{O}$ que en AcOEt.



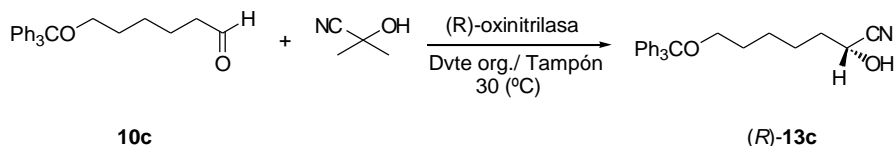
Esquema 4.21.

Tabla 4.8. Reacciones de transcianación catalizada por la (*R*)-oxinitrilasa de *P. amygdalus* sobre **10b** a 30°C.

Entrada	Disolvente	Enzima ^a	t (h)	c^b (%)	ee^c (%)
1	$i\text{Pr}_2\text{O}$	200	168	28	22
2	$i\text{Pr}_2\text{O}$	800	48	27	23
3	AcOEt	800	48	15	25

^a Cantidad expresada en mg mmol^{-1} . ^b Conversión del proceso enzimático, calculada por $^1\text{H-RMN}$. ^c Determinado por GC tras acetilación.

Finalmente, el 6-tritiloxihexanal **10c** fue utilizado como sustrato de la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus* (esquema 4.22). Como se puede observar en la tabla 4.9, este hidroxialdehído no es un buen sustrato para el enzima, debido a la presencia de un grupo muy voluminoso en su estructura. Así, en la reacción de transcianación a 30°C en sistema bifásico con $i\text{Pr}_2\text{O}$, no se observa reacción alguna a las 168 horas (entrada 1). Para intentar aumentar la velocidad del proceso se realizó una prueba a 40°C en el mismo medio de reacción incrementando 4 veces la cantidad de enzima habitual (entrada 2). En el mismo tiempo de reacción, se consigue una conversión del 18%, siendo el exceso enantiomérico de la cianhidrina (*R*)-**13c** sólo del 28%. Cuando la transcianación se lleva a cabo a 30°C es posible obtener (*R*)-**13c** con un mayor exceso enantiomérico (entrada 3), pero con menor conversión que en la reacción realizada a 40°C.



Esquema 4.22.

Tabla 4.9. Reacciones de transcianación catalizada por la (*R*)-oxinitrilasa de *P. amygdalus* sobre **10c** a 30°C en ¹Pr₂O.

Entrada	Enzima ^a	T(°C)	<i>c</i> ^b (%)	<i>ee</i> ^c (%)
1	200	30	≤3	--
2	800	40	18	28
3	800	30	10	41

^a Cantidad expresada en mg mmol⁻¹. ^b Conversión del proceso enzimático, calculada por ¹H-RMN. ^c Determinado por HPLC.

El grupo protector de los 6-hidroxialdehídos *O*-protegidos puede tener una influencia notable en el desarrollo de la reacción de transcianación enzimática. Según los experimentos realizados, los mejores resultados en cuanto a selectividad y actividad se consiguen con el sustrato menos voluminoso **10a**. El aumento en el tamaño del grupo protector provoca un descenso en la actividad del enzima, siendo el aldehído *O*-tritolado **10c** el menos reactivo. Con respecto a la selectividad, no existe una correlación tan clara, pues se consiguen mejores excesos enantioméricos en el caso de la cianhidrina tritolada (*R*)-**13c** que para su análoga benzoilada (*R*)-**13b**.

4.2.6. ASIGNACIÓN DE LAS CONFIGURACIONES ABSOLUTAS Y DETERMINACIÓN DE LOS EXCESOS ENANTIOMÉRICOS DE LAS CIANHIDRINAS (*R*)-**13a**, (*R*)-**13b** Y (*R*)-**13c**.

Para la asignación de la configuración absoluta de las hidroxicianhidrinas **13a**, **13b** y **13c** se estableció el mismo criterio que para los sustratos **11** y **12**, por lo que los productos obtenidos presentan configuración *R* tras el proceso de transcianación catalizado por la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus*.

Los excesos enantioméricos de las hidroxicianhidrinas (*R*)-**13a** y (*R*)-**13b** se determinaron mediante cromatografía de gases, empleando una columna de relleno quiral RTβDExse. La pureza óptica de la hidroxicianhidrina (*R*)-**13c** se analizó mediante HPLC, utilizando una columna de relleno quiral Chirobiotic T a una longitud de onda (λ) de 215 nm. La preparación de las hidroxicianhidrinas racémicas (\pm)-**13a**, (\pm)-**13b** se realizó por el tratamiento de los correspondientes hidroxialdehídos *O*-protegidos con CH₃SiCN en CH₂Cl₂, catalizado por ZnI₂. La hidroxicianhidrina (\pm)-**13c** se obtuvo por reacción del hidroxialdehído **10c** con KCN y una disolución acuosa de NaHSO₃.

El análisis directo de las tres hidroxicianhidrinas libres no pudo llevarse a cabo, siendo necesaria la derivatización de las mismas en las correspondientes cianhidrinas acetiladas (\pm)-**16a**, (\pm)-**16b** y (\pm)-**16c** por tratamiento con anhídrido acético y piridina en CH₂Cl₂. En la tabla 4.10 se muestran las condiciones empleadas para la separación de los enantiómeros de las cianhidrinas acetiladas (\pm)-**16a**, (\pm)-**16b**, empleando la cromatografía de gases.

Tabla 4.10. Condiciones experimentales utilizadas para la determinación de los excesos enantioméricos de **16a** y **16b** mediante CG empleando una columna RT β DEXse.

Compuesto	Condiciones ^a	t_{R1} (min)	t_{R2} (min)	$R_S^{b,c}$
16a	100°C 5 min, 5 °C/min	27.34	27.78	1.8
	200°C 20 min	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	
16b	180 °C	116.59	121.42	2.2
		(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	

^a Gas portador: N₂; $P_{G.P.}$: 110 kPa. ^b Concentración aproximada de muestra: 1.0 mg/mL. ^c Relación de split: (100:1).

En el caso del 7-tritiloxi-2-acetoxiheptanonitilo **16c**, las mejores condiciones para su separación mediante HPLC se obtienen con una mezcla de hexano: isopropanol (97:3) a un flujo de 0.3 mL/min y una temperatura de 20°C. La inyección se realiza con un 20 μ L de una disolución de muestra en el mismo eluyente a una concentración de 1.0 mg/mL. El cromatograma correspondiente a la hidroxicianhidrina acetilada **16c** presenta dos picos bien resueltos ($R_S=2.8$) a 24.68 (enantiómero *R*) y 28.40 (enantiómero *S*) minutos.

4.3. CONCLUSIONES

Los aldehídos 4-hidroxibutanal y 5-hidroxipentalanal se aíslan mayoritariamente en su forma hemiacetálica, por lo que en principio, son sustratos menos adecuados que los aldehídos libres en reacciones de transcianación catalizadas por la (R)-oxinitrilasa de Prunus amygdalus. Los bajos excesos enantioméricos obtenidos para las dos (R)-hidroxicianhidrinas son debidos principalmente a la adición química no enzimática, que se produce en competencia con la cianación enzimática.

Mediante la modificación de diversos parámetros de reacción, es posible reducir en parte la reacción química y optimizar la pureza óptica de las cianhidrinas obtenidas. Así, los mayores excesos enantioméricos para ambos productos se obtienen realizando las reacciones a 15°C. También es fundamental la concentración de agua en el medio. A pesar de la disminución de la velocidad del proceso, es posible conseguir el (R)-2,5-dihidroxipentanonitrilo y el (R)-2,6-dihidroxihexanonitrilo con las mayores purezas ópticas (ee=62-50%, respectivamente).

También se ha optimizado la concentración de la cianhidrina de la acetona en el medio, siendo la cantidad óptima de 1.5-2.0 equivalentes con respecto al aldehído de partida.

Finalmente, se estudiaron una serie de 6-hidroxihexanales O-protegidos como sustratos de la (R)-oxinitrilasa de Prunus amygdalus. Con estos sustratos, no se produce la adición química de cianuro. Los mejores resultados se obtienen con el 6-acetoxihexanal, con el que es posible conseguir el 7-acetoxi-2-hidroxiheptanonitrilo con ee=75%, aunque son necesarias grandes cantidades de enzima para conseguir una conversión aceptable. Los aldehídos O-benzoilados y O-tritilados no son buenos sustratos para este enzima, siendo las conversiones y las purezas ópticas de las correspondientes hidroxicianhidrinas bajas en todas las condiciones ensayadas.

4.4. PARTE EXPERIMENTAL

4.4.1. TÉCNICAS INSTRUMENTALES Y REACTIVOS DE USO GENERAL

El enzima utilizado principalmente es la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus*. Este enzima fue preparada en nuestro laboratorio de investigación. Para ello, se hierve en agua destilada una cantidad determinada de almendras durante 1 hora, se pelan, se secan al aire y se machacan mecánicamente. El crudo de harina de almendras así obtenido se desengrasa mediante sucesivos lavados con dietil éter, se filtra y se guarda a 4°C para su posterior utilización.

También se empleó (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus* comercial, proporcionada en forma de harina de almendras por la casa Sigma. La (*S*)-oxinitrilasa de *Manihot esculenta*, así como las (*R*)-oxinitrilasas de *Prunus amygdalus* y de *Linum usitatissimum*, utilizadas en forma purificada son comercializadas por Jülich Fine Chemicals.²³⁸

Cromatografía de gases (GC)

Para la determinación de los excesos enantioméricos de las cianhidrinas **11**, **12**, **13a** y **13b** se emplea un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 con una columna de relleno quiral RtβDexse (30 m x 0.25 mm; Restek). La temperatura del inyector es de 250 °C y la del detector de ionización de llama (FID) es de 270°C. Como gas portador se empleó nitrógeno. La presión en cabeza de columna es de 110 Kpa. La inyección se llevó a cabo con 2 µL de una disolución en CH₂Cl₂ de concentración 0.5 mg/mL.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para la determinación del exceso enantiomérico de la cianhidrina tritilada **13c** se emplea una columna de relleno quiral Chirobiotic T (250 x 0.46 mm, Astec), con un detector de fotodiodos SP-M10A en el canal de 215 nm.

El resto de técnicas experimentales empleadas se encuentran descritas en el capítulo 1.

4.4.2. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS Y DATOS EXPERIMENTALES.

4.4.2.1. Síntesis de 2-hidroxitetrahidropirano, **7**.

Una disolución de DIBAL-H 1.0 M en tolueno (55 mmoles, 1.1 equiv.) se adiciona sobre una disolución de δ-valerolactona (50 mmoles, 1 equiv.) en THF (40 mL). La mezcla se agita a -70 °C durante 5 horas. A continuación se para la reacción por lenta adición de agua (20 mL) y se lleva hasta temperatura ambiente. Posteriormente, se añaden 175 mL de HCl 0.5 M y la mezcla de reacción se extrae con CH₂Cl₂ (5 x 200 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ y se evaporan los disolventes a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por destilación (62 °C, 4 mm Hg) para obtener el hemiacetal **7** como un aceite amarillento.

4.4.2.2. Síntesis de 2-hidroxitetrahidrofurano, **8**.

Una disolución de 2-etoxitetrahidrofurano (21.5 mmoles, 1 equiv.) en 40 mL de una disolución de H₂SO₄ 0.05 M, se agita a temperatura ambiente durante 1 semana.

²³⁸ Actividad de las oxinitrilasas purificadas: MeHNL (A= 4333 U/mL; 42.4 mg/mL), LuHNL (A= 60.9 U/mL; 3.1 mg/mL), PaHNL (A= 70.4 U/mL; 7.6 mg/mL).

Transcurrido este tiempo, se adiciona ácido acético (2.5 mL) y la reacción se neutraliza con una disolución de NaOH 1.0 M. El producto se extrae en continuo durante 12 horas con CH₂Cl₂ (100 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ y se evaporan disolventes a presión reducida para obtener el hemiacetal **8** como un aceite incoloro que no necesita posterior purificación.

4.4.2.3. Síntesis de 6-hidroxihexanal, **9**.

El procedimiento empleado es el mismo que el descrito para la preparación del 2-hidroxitetrahidropirano **7**. El aceite incoloro que se obtiene como producto se emplea como tal en las posteriores reacciones de síntesis.

4.4.2.4. Síntesis de 6-acetoxihexanal, **10a**

El 6-hidroxihexanal **9** (8.6 mmol, 1 equiv.) se hace reaccionar bajo atmósfera inerte, disuelto en 20 mL de CH₂Cl₂ y a temperatura ambiente, con piridina (10.3 mmol, 1.2 equiv.) y anhídrido acético (10.3 mmol, 1.2 equiv.), durante 6 horas. Una vez concluida la reacción, ésta se filtra sobre gel de sílice, lavando con CH₂Cl₂. A continuación, el disolvente se evapora a presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla hexano/acetato de etilo 7:3.

4.4.2.5. Síntesis de 6-benzoiloxihexanal, **10b**.

En un bulbo bajo atmósfera inerte se disuelve el 6-hidroxihexanal **9** (8.6 mmol, 1 equiv.) en 20 mL de CH₂Cl₂ y a continuación se adicionan a temperatura ambiente la piridina (10.3 mmol, 1.2 equiv.) y el cloruro de benzoílo (10.3 mmol, 1.2 equiv.). El sistema se deja reaccionar durante 8 horas y a continuación se filtra la reacción sobre gel de sílice, lavando varias veces con CH₂Cl₂. A continuación se evapora el disolvente a presión reducida y se purifica el crudo de reacción por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente una mezcla hexano/acetato de etilo 9:1.

4.4.2.6. Síntesis de 6-tritiloxihexanal, **10c**.

Sobre una disolución de 6-hidroxihexanal **9** (8.6 mmol, 1 equiv.) en piridina seca (20 mL), se adiciona el cloruro de tritilo (10.3 mmol, 1.2 equiv.). El sistema se calienta a 75 °C y se deja reaccionar durante 12 horas. A continuación, se evapora la piridina a presión reducida y se purifica el crudo resultante por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla hexano/acetato de etilo 8:2.

4.4.2.7. Procedimiento general para la síntesis enzimática de (*R*)-hidroxicianhidrinias alifáticas empleando enzima crudo.

El crudo de almendra desengrasado (200 mg) se incuba durante 15 minutos con agitación en 250 µL de una disolución tampón citrato 0.1 M (pH 5.4). A continuación se adicionan el hidroxialdehído correspondiente **7**, **8**, **10a**, **10b** ó **10c** (1.0 mmol, 1 equiv.) y la cianhidrina de la acetona (1.5 mmol, 1.5 equiv) disueltos en 5 mL de éter diisopropílico o acetato de etilo. La mezcla de reacción se agita a la temperatura correspondiente a 250 r.p.m., siguiendo el transcurso de la misma por TLC. Una vez finalizada la reacción, se filtra el enzima lavando con acetato de etilo (20 mL). El disolvente se evapora a presión reducida y las correspondientes hidroxicianhidrinias se purifican mediante cromatografía en columna, usando como eluyentes CHCl₃/metanol 8:1 para los productos **11** y **12**; CH₂Cl₂/éter dietílico 95:5 para **13a**; hexano/acetato de etilo 7:3 para **13b** y hexano/acetato de etilo 8:2 para la cianhidrina **13c**.

Las condiciones aquí descritas son las generales para la trascianación entre cianhidrinias y ω-hidroxialdehídos. Se realizaron otras reacciones variando la cantidad

de enzima o de cianhidrina de la acetona, así como pruebas en ausencia de la disolución tampón en el medio de reacción. Estas reacciones se han comentado en detalle en la discusión de resultados.

4.4.2.8. Procedimiento general para la síntesis enzimática de (*R*)-2,6-dihidroxihexanonitrilo, (*R*)-11 utilizando enzimas purificados.

Sobre una disolución de 2-hidroxitetrahidropirano **7** (1.0 mmol, 1 equiv.) en 8 mL de éter diisopropílico, se añaden 1.5 equiv. de la cianhidrina de la acetona y a continuación se adiciona la correspondiente oxinitrilasa (\cong 250 unidades) disuelta en 500 μ L de disolución tampón citrato 0.1 M (pH 5.4). El sistema se incuba a 30°C bajo agitación orbital de 250 r.p.m.. Una vez concluida la reacción, se lava con una disolución de NaHSO₃ al 10% (2 x 15 mL) y se extrae con éter dietílico (3 x 15 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ y se evapora el disolvente a presión reducida.

4.4.2.9. Procedimiento general para la síntesis química de (\pm)-2,6-dihidroxihexanonitrilo, (\pm)-11 y (\pm)-2,5-dihidroxipentanitrilo, (\pm)-12.

Sobre una disolución de hidroxialdehído **7** u **8** (1.0 mmol, 1 equiv.) en una mezcla de 15 mL de éter diisopropílico y 1.4 mL de disolución tampón citrato 0.1 M (pH 5.4), se adicionan 1.5 mmoles de la cianhidrina de la acetona. La reacción se agita a 40°C durante 6 días. Una vez concluida se evapora el disolvente a sequedad y las correspondientes hidroxicianhidrinas (\pm)-**11** y (\pm)-**12** se purifican mediante cromatografía en columna de gel de sílice utilizando como eluyente una mezcla CHCl₃/metanol 8:1.

4.4.2.10. Síntesis de 2-acetoxi-7-hidroxiheptanonitrilo racémico, (\pm)-13a.

Se hace reaccionar bajo atmósfera inerte, el 6-acetoxihexanal, (\pm)-**10a** (3.2 mmol, 1 equiv.) con el cianuro de trimetilsilano (3.8 mmol, 1.2 equiv.) y una cantidad catalítica de yoduro de zinc (5.0 mg), en 12 mL de CH₂Cl₂ seco durante 12 horas. Terminada la reacción, se evapora el disolvente a presión reducida y se añaden 5.0 mL de HCl 3.0 N. La mezcla resultante se agita durante 4 horas. A continuación se extrae varias veces con acetato de etilo (3 x 15 mL), se seca la fase orgánica sobre Na₂SO₄ y se evaporan disolventes a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, empleando como eluyente hexano/acetato de etilo 7:3.

4.4.2.11. Síntesis de 7-benzoiloxi-2-hidroxiheptanonitrilo racémico, (\pm)-13b.

El procedimiento empleado es análogo al descrito anteriormente. En este caso se purifica el crudo de reacción por cromatografía en columna de gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla hexano/acetato de etilo 8:2.

4.4.2.12. Síntesis de 7-tritiloxi-2-hidroxiheptanonitrilo racémico, (\pm)-13c.

Sobre una disolución de 7-tritiloxihexanal, (\pm)-**10c** (4,9 mmol, 1 equiv.) en 2 mL de agua, se añade cianuro potásico (5.4 mmol, 1.4 equiv.). A continuación, el sistema se lleva a 0°C y se adicionan 2 mL de una disolución acuosa de NaHSO₃ al 40 %. La reacción se agita durante 20 horas y se extrae con acetato de etilo (3 x 20 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ y el disolvente se evapora bajo presión reducida. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía en columna, usando como eluyente una mezcla hexano/acetato de etilo 8:2.

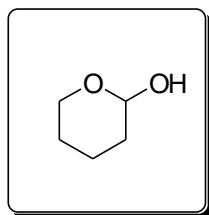
4.4.2.13. Preparación de 2,5-diacetoxipentanonitrilo, 14 y 2,6-diacetoxipentanonitrilo, 15, utilizados para la determinación de los excesos enantioméricos de las hidroxicianhidrinas.

Sobre una disolución bajo atmósfera inerte de hidroxicianhidrina **11** ó **12** (1.0 mmol, 1 equiv.) en 3 mL de CH₂Cl₂, se adiciona piridina (2.4 mmol, 2.4 equiv.) y anhídrido acético (2.4 mmol, 2.4 equiv.). La reacción se agita a temperatura ambiente durante 6 horas y a continuación la mezcla se lava con una disolución de HCl 1.0 N (4 x 10 mL). La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ y el disolvente se evapora a presión reducida para obtener las hidroxicianhidrinas acetiladas **14** y **15**, que se analizan por cromatografía de gases sin necesidad de purificación.

4.4.2.14. Preparación de los derivados acetilados de las cianhidrinas 13a, 13b y 13c para la determinación de sus excesos enantioméricos.

El procedimiento es análogo al descrito en el apartado anterior, empleando 1.2 equiv. de piridina y de anhídrido acético. La purificación de los productos obtenidos **16a**, **16b** y **16c** no es necesaria.

2-Hidroxitetrahidropirano, 7



Aceite incoloro

Rendimiento: 70 %.

Fórmula molecular: C₅H₁₀O₂

Peso molecular (g/mol): 102.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3380, 2948, 1443, 1208.

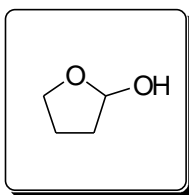
E.M. (IE) m/z (%): 101 (M-H, 9%), 85 (100), 67 (14), 56 (33).

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm): 1.48-1.65 (m, 4H, 2CH₂), 1.86-2.09 (m, 2H, CH₂), 3.48-3.59 (m, 1H, CHHO), 3.99-4.10 (m, 1H, CHHO), 4.21 (sa, 1H, OH), 4.85-4.95 (m, 1H, CHOH).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm): 19.8 (CH₂), 24.7 (CH₂), 31.4 (CH₂), 63.4 (CH₂), 94.0 (CH).

Anal. Elemental (%). Calculado para C₅H₁₀O₂: C, 58.80; H, 9.87. Encontrado: C, 58.6; H, 10.1.

2-Hidroxitetrahidrofurano, 8



Aceite incoloro

Rendimiento: 60 %.

Fórmula molecular: C₄H₈O₂

Peso molecular (g/mol): 88.

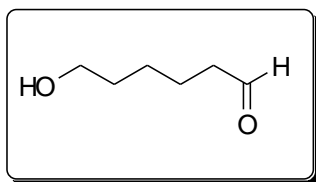
I.R. (KBr, cm⁻¹): 3400, 2960, 1441 y 1223.

E.M. (IE) m/z (%): 87 (M-H, 11), 71 (100), 53 (32).

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.84-1.99 (m, 2H, CH₂), 2.01-2.07 (m, 2H, CH₂), 3.80 (m, 1H, CHHO), 4.01 (m, 1H, CHHO), 5.27 (t, 1H, CHOH, ³*J*_{HH} 6.3), 5.51 (s, 1H, OH).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm): 23.2 (CH₂), 32.8 (CH₂), 67.1 (CH₂), 98.1 (CH).

Anal. Elemental (%). Calculado para C₄H₈O₂: C, 54.53; H, 9.15. Encontrado: C, 54.8; H, 9.3.

6-Hidroxihexanal, **9**

Aceite incoloro

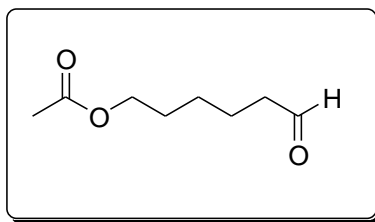
Rendimiento: 76 %.

Fórmula molecular: C₆H₁₂O₂

Peso molecular (g/mol): 116.

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.32-1.37 (m, 2H, CH₂), 1.49-1.63 (m, 4H, 2CH₂), 2.33 (t, 2H, CH₂, ³*J*_{HH} 7.1), 3.67 (t, 2H, CH₂OH, ³*J*_{HH} 6.7), 9.78 (s, 1H, CH=O)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm): 21.5 (CH₂), 25.1 (CH₂), 28.3 (CH₂), 43.5 (CH₂), 61.9 (CH₂), 202.8 (HC=O).

6-Acetoxihexanal, **10a**

Aceite incoloro

Rendimiento: 50 %.

Fórmula molecular: C₈H₁₄O₃

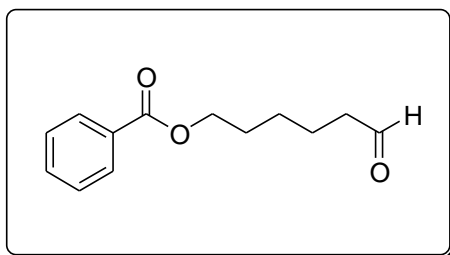
Peso molecular (g/mol): 158.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 2943, 2866, 1730, 1418, 1215.

E.M. (ESI⁺) m/z (%): 197 [(M+K)⁺, 100], 181 [(M+Na)⁺, 56]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.26-1.33 (m, 2H, CH₂), 1.48-1.57 (m, 4H, 2CH₂), 1.90 (s, 3H, CH₃), 2.33 (t, 2H, CH₂, ³*J*_{HH} 7.0), 3.92 (t, 2H, CH₂O, ³*J*_{HH} 6.8), 9.68 (s, 1H, CH=O)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm): 20.6 (CH₃), 21.3 (CH₂), 25.2 (CH₂), 28.1 (CH₂), 43.4 (CH₂), 63.8 (CH₂), 170.8 (C=O), 202.1 (HC=O).

6-Benzoiloxihexanal, **10b**

Aceite incoloro

Rendimiento: 48%

Fórmula molecular: C₁₃H₁₆O₃

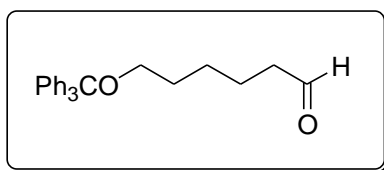
Peso molecular (g/mol): 220.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3022, 2942, 2864, 1716, 1602, 1421, 1221.

E.M. (ESI⁺) m/z (%): 259 [(M+K)⁺, 100], 243 [(M+Na)⁺, 15], 221 [(M+H)⁺, 2]

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.40-1.50 (m, 2H, CH₂), 1.60-1.78 (m, 4H, 2CH₂), 2.43 (t, 2H, CH₂, ³*J*_{HH} 6.2), 4.28 (t, 2H, CH₂O, ³*J*_{HH} 6.5), 7.28-7.49 (m, 3H, 3CH_{arom}), (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.1, ⁴*J*_{HH} 1.2), 9.71 (s, 1H, CH=O)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm): 21.4 (CH₂), 25.3 (CH₂), 28.2 (CH₂), 43.4 (CH₂), 64.4 (CH₂), 128.3 (CH_{arom}), 129.2 (CH_{arom}), 130.0 (C_{arom}), 132.6 (CH_{arom}), 166.3 (C=O), 202.3 (HC=O).

6-Tritiloxihexanal, **10c**

Sólido blanco

Rendimiento: 40%.

Fórmula molecular: C₂₅H₂₆O₂

Peso molecular (g/mol): 358

Punto de fusión (°C): 75.5-76.9.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3019, 2936, 2871, 1724, 1596, 1490, 1454, 1215.

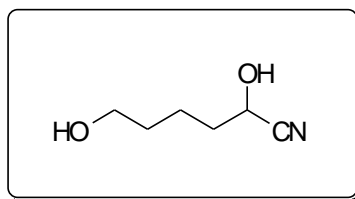
E.M. (ESI⁺) m/z (%): 381 [(M+Na)⁺, 100], 359 [(M+H)⁺, 23]

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.42-1.55 (m, 2H, CH₂), 1.61-1.74 (m, 4H, 2CH₂), 2.42 (t, 2H, CH₂, ³*J*_{HH} 6.2), 3.08 (t, 2H, CH₂O, ³*J*_{HH} 6.3), 7.24-7.33 (m, 9H, 9CH_{arom}), 7.44-7.51 (m, 6H, 6CH_{arom}), 9.74 (s, 1H, CH=O)

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm): 22.1 (CH₂), 26.1 (CH₂), 29.9 (CH₂), 44.0 (CH₂), 63.4 (CH₂), 86.5 (C), 127.1 (CH_{arom}), 127.9 (CH_{arom}), 128.9 (CH_{arom}), 144.6 (C_{arom}), 203.0 (HC=O).

Anal. Elemental (%): Calculado para C₂₅H₂₆O₂: C, 83.76; H, 7.31. Encontrado: C, 83.9; H, 7.2.

(±)-2,6-Dihidroxihexanonitrilo, (±)-11



Aceite incoloro

Rendimiento: 70%.

Fórmula molecular: C₆H₁₁NO₂

Peso molecular (g/mol): 129.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3345, 2928, 2251, 1456, 1215.

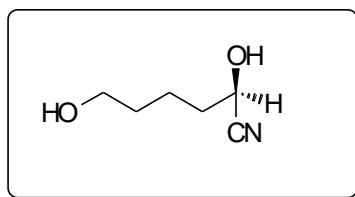
E.M. (IE) m/z (%): 129 (M⁺, 40), 111 (30), 85 (100), 71 (22).

¹H-RMN (MeOD, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.68-1.95 (m, 4H, 2CH₂), 2.01-2.08 (m, 2H, CH₂), 3.79 (t, 2H, CH₂OH, ³*J*_{HH} 5.6), 4.70 (t, 1H, CHOH, ³*J*_{HH} 6.6).

¹³C-RMN (MeOD, 75.4 MHz), δ (ppm): 22.8 (CH₂), 33.5 (CH₂), 36.8 (CH₂), 62.1 (CH), 63.0 (CH₂), 122.3 (C≡N).

Anal. Elemental (%): Calculado para C₆H₁₁NO₂: C, 55.80; H, 8.58; N, 10.84.
Encontrado: C, 56.0; H, 8.4; N, 10.6.

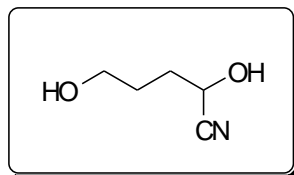
(R)-2,6-Dihidroxihexanonitrilo, (R)-11



Exceso enantiomérico= 50%.

[α]_D¹⁸= +5.1 (c=0.95, EtOH).

(±)-2,5-Dihidroxipentanonitrilo, (±)-12



Aceite incoloro

Rendimiento: 62%.

Fórmula molecular: C₅H₉NO₂

Peso molecular (g/mol): 115.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3320, 2930, 2245, 1450, 1222.

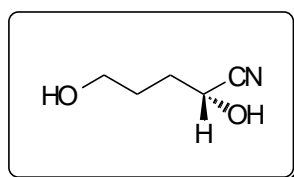
E.M. (IE) m/z (%): 115 (M⁺, 56), 97 (50), 71 (70), 57 (100).

¹H-RMN (MeOD, 300 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.91-1.98 (m, 2H, CH₂), 2.06-2.13 (m, 2H, CH₂), 3.84 (t, 2H, CH₂OH, ³*J*_{HH} 5.0), 4.76 (t, 1H, CHOH, ³*J*_{HH} 6.2).

¹³C-RMN (MeOD, 75.4 MHz), δ (ppm): 29.3 (CH₂), 33.7 (CH₂), 62.1 (CH), 62.6 (CH₂), 122.2 (C≡N).

Anal. Elemental (%): Calculado para C₅H₉NO₂: C, 52.16; H, 7.88; N, 12.17.
Encontrado: C, 52.0; H, 8.1; N, 12.4.

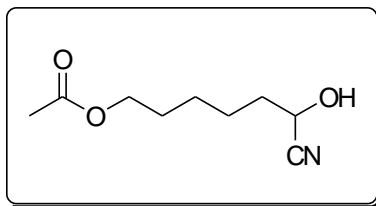
(R)-2,5-dihidroxipentanonitrilo, (R)-12



Exceso enantiomérico= 62%.

[α]_D¹⁸ = +5.8 (c=1.14, EtOH).

(±)-7-Acetoxy-2-hidroxiheptanonitrilo, (±)-13a



Aceite incoloro

Rendimiento: 84%

Fórmula molecular: C₉H₁₅NO₃

Peso molecular (g/mol): 185.

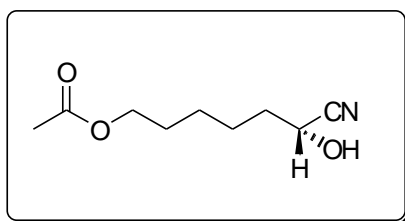
I.R. (KBr, cm⁻¹): 3451, 2952, 2246, 1730, 1452, 1220.

E.M. (ESI⁺) m/z (%): 208 [(M+Na)⁺, 100], 186 [(M+H)⁺, 7]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.35-1.54 (m, 4H, 2CH₂), 1.57-1.68 (m, 2H, CH₂), 1.82-1.93 (m, 2H, CH₂), 2.07 (s, 3H, CH₃), 2.60 (sa, 1H, OH), 4.08 (t, 2H, CH₂O, ³*J*_{HH} 6.4), 4.49 (t, 1H, CHOH, ³*J*_{HH} 6.7).

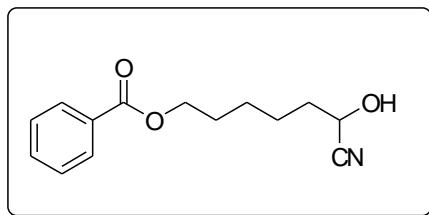
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm): 20.9 (CH₃), 24.1 (CH₂), 25.2 (CH₂), 28.2 (CH₂), 34.1 (CH₂), 61.0 (CH), 64.2 (CH₂), 119.8 (C≡N), 171.4 (C=O).

(R)-2-Acetoxy-7-hidroxiheptanonitrilo, (R)-13a



Exceso enantiomérico= 67%.

[α]_D¹⁸= +9.5 (c=1.25, EtOH).

(±)-7-Benzoiloxi-2-hidroxiheptanonitrilo, (±)-13b

Aceite incoloro

Rendimiento: 53%.

Fórmula molecular: C₁₄H₁₇NO₃

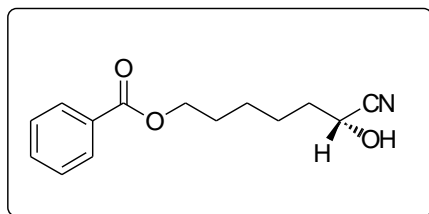
Peso molecular (g/mol): 247.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3334, 3019, 2943, 2238, 1716, 1601, 1451.

E.M. (ESI⁺) m/z (%): 286 [(M+K)⁺, 100], 270 [(M+Na)⁺, 48], 248 [(M+H)⁺, 10]

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.48-1.64 (m, 4H, 2CH₂), 1.78-1.94 (m, 4H, 2CH₂), 3.31 (sa, 1H, OH), 4.33 (t, 2H, CH₂O, ³*J*_{HH} 6.5), 4.49 (t, 1H, CHOH, ³*J*_{HH} 6.5), 7.44 (t, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.7), 7.56 (t, 1H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.1), 8.03 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.1, ⁴*J*_{HH} 1.4).

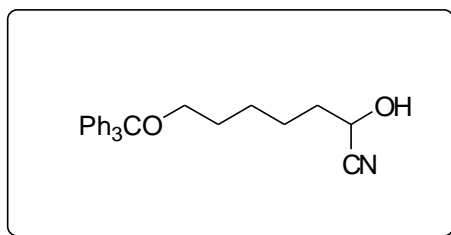
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm): 24.1 (CH₂), 25.3 (CH₂), 28.4 (CH₂), 34.9 (CH₂), 61.0 (CH), 64.7 (CH₂), 119.9 (C≡N), 128.3 (CH_{arom}), 129.4 (CH_{arom}), 130.1 (C_{arom}), 132.9 (CH_{arom}), 166.9 (C=O).

(R)-2-Benzoiloxi-7-hidroxiheptanonitrilo, (R)-13b

Exceso enantiomérico= 25%.

[α]_D¹⁸= +0.8 (c=0.78, EtOH).

(±)-2-Hidroxi-7-tritiloxiheptanonitrilo, (±)-13c



Sólido blanco.

Rendimiento: 57%

Fórmula molecular: C₂₆H₂₇NO₂

Peso molecular (g/mol): 385

Punto de fusión (°C): 90.4-91.7.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3434, 3021, 2936, 2250, 1596, 1490, 1448, 1218.

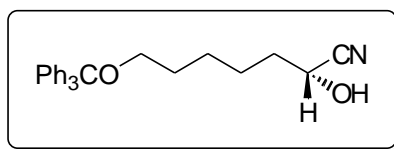
E.M. (ESI⁺) m/z (%): 408 [(M+Na)⁺, 100], 386 [(M+H)⁺, 3]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.45-1.56 (m, 4H, 2CH₂), 1.64-1.72 (m, 2H, CH₂), 1.79-1.90 (m, 2H, CH₂), 2.70 (d, 1H, OH, ³J_{HH} 5.8), 3.10 (t, 2H, CH₂O, ³J_{HH} 6.3), 4.43 (t, 1H, CHOH, ³J_{HH} 6.6), 7.22-7.37 (m, 9H, 9CH_{arom}), 7.45-7.53 (m, 6H, 6CH_{arom}).

¹³C-RMN (CDCl₃, 50.3 MHz), δ (ppm): 24.4 (CH₂), 25.7 (CH₂), 29.8 (CH₂), 35.2 (CH₂), 61.3 (CH), 63.2 (CH₂), 86.4 (C), 119.9 (C≡N), 126.9 (CH_{arom}), 127.8 (CH_{arom}), 128.7 (CH_{arom}), 144.4 (C_{arom}).

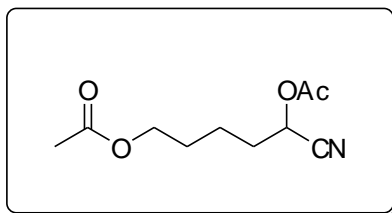
Anal. Elemental (%): Calculado para C₂₆H₂₇NO₂: C, 81.01; H, 7.06; N, 3.63. Encontrado: C, 81.2; H, 7.0; N, 3.5.

(R)-2-Tritiloxi-7-hidroxiheptanonitrilo, (R)-13c



Exceso enantiomérico= 41%.

[α]_D¹⁸= +4.6 (c=0.75, EtOH).

(±)-2,6-Diacetoxihexanonitrilo, (±)-14

Aceite incoloro

Rendimiento: 84%.

Fórmula molecular: C₁₀H₁₅NO₄

Peso molecular (g/mol): 213

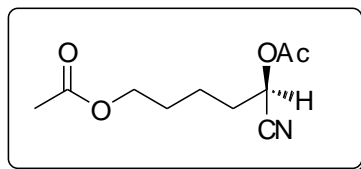
I.R. (KBr, cm⁻¹): 2948, 2246, 1750, 1722, 1446, 1220.

E.M. (ESI⁺) m/z (%): 252 [(M+K)⁺, 22], 236 [(M+Na)⁺, 100], 214 [(M+H)⁺, 6]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.55-1.76 (m, 4H, 2CH₂), 1.90-2.01 (m, 2H, CH₂), 2.07 (s, 3H, CH₃), 2.11 (s, 3H, CH₃), 4.10 (t, 2H, CH₂O, ³*J*_{HH} 5.9), 5.34 (t, 1H, CHO, ³*J*_{HH} 6.7).

¹³C-RMN (MeOD, 75.4 MHz), δ (ppm): 20.7 (CH₃), 21.3 (CH₃), 21.6 (CH₂), 28.2 (CH₂), 32.2 (CH₂), 61.2 (CH), 64.0 (CH₂), 117.0 (C≡N), 169.5 (C=O), 171.4 (C=O).

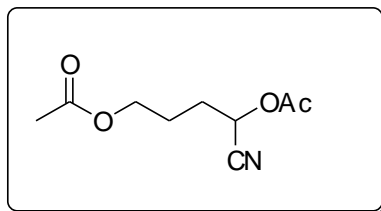
Anal. Elemental (%): Calculado para C₁₀H₁₅NO₄: C, 56.33; H, 7.09; N, 6.57. Encontrado: C, 56.5; H, 7.0; N, 6.7.

(R)-2,6-Diacetoxihexanonitrilo, (R)-14

Exceso enantiomérico= 50%.

[α]_D¹⁸ = +23.2 (c=1.25, MeOH).

(±)-2,5-Diacetoxipentanonitrilo, (±)-15



Aceite incoloro

Rendimiento: 82%

Fórmula molecular: C₉H₁₃NO₄

Peso molecular (g/mol): 199.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 2961, 2250, 1746, 1720, 1450, 1230.

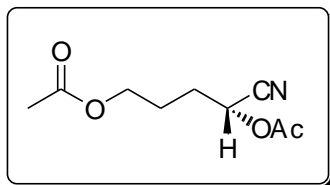
E.M. (ESI⁺) m/z (%): 238 [(M+K)⁺, 49], 222 [(M+Na)⁺, 100], 200 [(M+H)⁺, 4]

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.76-1.90 (m, 2H, CH₂), 1.92-1.97 (m, 2H, CH₂), 2.00 (s, 3H, CH₃), 2.10 (s, 3H, CH₃), 4.06 (t, 2H, CH₂O, ³*J*_{HH} 6.3), 5.31 (t, 1H, CH-O, ³*J*_{HH} 6.6).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm): 20.2 (CH₃), 20.7 (CH₃), 23.7 (CH₂), 29.0 (CH₂), 60.4 (CH), 62.8 (CH₂), 116.4 (C≡N), 168.4 (C=O), 170.7 (C=O).

Anal. Elemental (%): Calculado para C₉H₁₃NO₄: C, 54.26; H, 6.58; N, 7.03. Encontrado: C, 54.5; H, 6.4; N, 6.8.

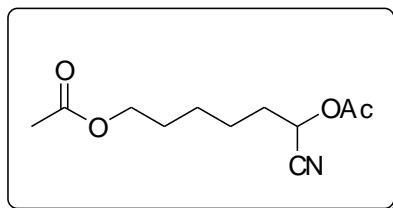
(R)-2,5-Diacetoxipentanonitrilo, (R)-15



Exceso enantiomérico= 62%.

[α]_D¹⁸= +31.4 (c=0.71, MeOH).

(±)-2,7-Diacetoxiheptanonitrilo, (±)-16a



Aceite incoloro

Rendimiento: 92%

Fórmula molecular: C₁₁H₁₇NO₄

Peso molecular (g/mol): 227.

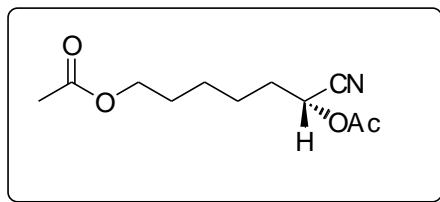
I.R. (KBr, cm⁻¹): 2942, 2248, 1760, 1724, 1448, 1232.

E.M. (ESI⁺) m/z (%): 250 [(M+Na)⁺, 100], 228 [(M+H)⁺, 12]

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.42-1.48 (m, 2H, CH₂), 1.51-1.59 (m, 2H, CH₂), 1.61-1.70 (m, 2H, CH₂), 1.87-1.92 (m, 2H, CH₂), 2.04 (s, 3H, CH₃), 2.14 (s, 3H, CH₃), 4.06 (t, 2H, CH₂O, ³*J*_{HH} 6.5), 5.31 (t, 1H, CHOH, ³*J*_{HH} 6.6).

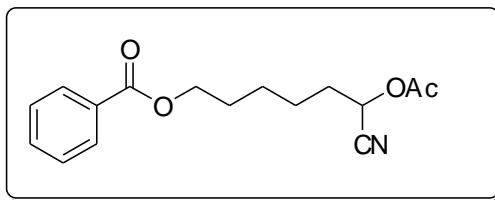
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm): 20.8 (CH₃), 21.3 (CH₃), 24.6 (CH₂), 25.6 (CH₂), 28.6 (CH₂), 32.5 (CH₂), 61.2 (CH), 64.4 (CH₂), 117.1 (C≡N), 169.5 (C=O), 171.5 (C=O).

(R)-2,7-Diacetoxiheptanonitrilo, (R)-16a



Exceso enantiomérico= 67%.

[α]_D¹⁸ = +31.4 (c=1.12, MeOH).

(±)-2-Acetoxi-7-benzoiloxiheptanonitrilo, (±)-16b

Aceite incoloro

Rendimiento: 89%.

Fórmula molecular: C₁₆H₁₉NO₄

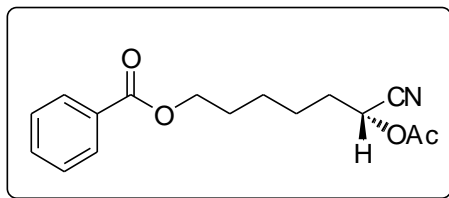
Peso molecular (g/mol): 289.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3062, 2929, 2239, 1755, 1716, 1601, 1455, 1215.

E.M. (ESI⁺) m/z (%): 328 [(M+K)⁺, 44], 312 [(M+Na)⁺, 90], 290 [(M+H)⁺, 5]

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.53-1.60 (m, 4H, 2CH₂), 1.77-1.82 (m, 2H, CH₂), 1.88-1.97 (m, 2H, CH₂), 2.11 (s, 3H, CH₃), 4.32 (t, 2H, CH₂O, ³*J*_{HH} 6.3), 5.31 (t, 1H, CHO, ³*J*_{HH} 6.8 Hz), 7.43 (t, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.2), 7.53 (t, 1H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 6.9), 8.04 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 6.9 Hz, ⁴*J*_{HH} 1.4).

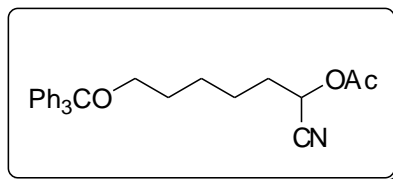
¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm): 20.2 (CH₃), 24.1 (CH₂), 25.3 (CH₂) 28.3 (CH₂), 32.0 (CH₂), 60.7 (CH), 64.4 (CH₂), 116.6 (C≡N), 128.2 (CH_{arom}), 129.3 (CH_{arom}), 130.1 (C_{arom}), 132.7 (CH_{arom}), 166.4 (C=O), 168.9 (C=O).

(R)-2-Acetoxi-7-benzoiloxiheptanonitrilo, (R)-16b

Exceso enantiomérico= 25%.

[α]_D¹⁸ = +2.0 (c=0.85, MeOH).

(±)-2-Acetoxy-7-tritiloheptanonitrilo, (±)-16c



Sólido higroscópico.

Rendimiento: 93%

Fórmula molecular: C₂₈H₂₉NO₃

Peso molecular (g/mol): 427.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3022, 2938, 2240, 1752, 1597, 1489, 1448, 1217.

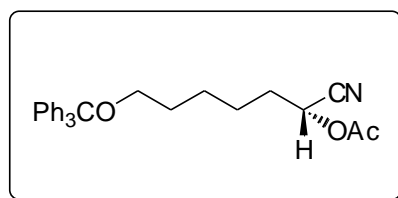
E.M. (ESI⁺) m/z (%): 450 [(M+Na)⁺, 100], 438 [(M+H)⁺, 2]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.46-1.52 (m, 4H, 2CH₂), 1.62-1.70 (m, 2H, CH₂), 1.85-1.92 (m, 2H, CH₂), 2.14 (s, 3H, CH₃), 3.09 (t, 2H, CH₂O, ³*J*_{HH} 6.2), 5.30 (t, 1H, CHO, ³*J*_{HH} 6.7), 7.21-7.36 (m, 9H, 9CH_{arom}), 7.43-7.50 (m, 6H, 6CH_{arom}).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm): 20.3 (CH₃), 24.3 (CH₂), 25.5 (CH₂), 29.6 (CH₂), 32.1 (CH₂), 60.9 (CH), 63.0 (CH₂), 86.3 (C), 116.8 (C≡N), 126.8 (CH_{arom}), 127.6 (CH_{arom}), 128.6 (CH_{arom}), 144.3 (C_{arom}), 169.1 (C=O).

Anal. Elemental (%): Calculado para C₂₈H₂₉NO₃: C, 81.72; H, 7.10; N, 3.40. Encontrado: C, 81.5; H, 7.2; N, 3.6.

(R)-2-Acetoxy-7-tritiloheptanonitrilo, (R)-16c



Exceso enantiomérico= 41%.

[α]_D¹⁸ = +10.1 (c=1.15, MeOH).

Capítulo 5

Reacciones de acetilación enzimática sobre ω -hidroxicianhidrinás

5.1. ANTECEDENTES

Una alternativa a la síntesis asimétrica de cianhidrinas ópticamente activas mediante oxinitrilasas son las reacciones de resolución enzimática sobre el grupo hidroxilo secundario presente en estas moléculas. Así, es posible realizar acilaciones selectivas sobre cianhidrinas racémicas libres y transesterificaciones o hidrólisis sobre los correspondientes ésteres de cianhidrinas.

5.1.1. SÍNTESIS DE CIANHIDRINAS RACÉMICAS.

La adición de cianuro de hidrógeno sobre aldehídos y cetonas es el método más empleado en la síntesis industrial de cianhidrinas (esquema 5.1, reacción 1).²³⁹ Este proceso es catalizado por bases, pero debido a la toxicidad del cianuro de hidrógeno, a escala de laboratorio es preferible la adición de una disolución acuosa de una sal de cianuro al sustrato en presencia de medio ácido (esquema 5.1, reacción 2).²⁴⁰

Otro método muy común de síntesis de cianhidrinas racémicas consiste en la reacción con cianuros de trialkilsilanos.²⁴¹ En este caso, se requiere la posterior desprotección de la cianhidrina *O*-silylada (esquema 5.1, reacción 3). Como catalizadores en este proceso se han utilizado reactivos como ioduro de zinc, éteres corona con cianuro potásico, triciano de iterbio y bases de Lewis. De esta manera se han conseguido preparar una gran variedad de cianhidrinas a partir de compuestos carbonílicos muy impedidos estéricamente, α,β -insaturados y sensibles a la acción de ácidos.

La transcianación entre la cianhidrina de la acetona y aldehídos o cetonas (esquema 5.1, reacción 4) también permite la obtención de cianhidrinas racémicas.²⁴² La reacción se cataliza en medio básico, que facilita la descomposición de la cianhidrina de la acetona y la posterior adición del cianuro de hidrógeno generado. Recientemente se ha descubierto que ciertos alcóxidos de lantánidos son catalizadores efectivos en este proceso.

Existen otros métodos menos comunes de formación de cianhidrinas, como la adición de cianuro de dietilaluminio a cetonas y aldehídos relativamente poco reactivos.²⁴³ Con cianuros de acilo y mezclas heterogéneas de carbonato potásico y acetonitrilo, es posible preparar ésteres de cianhidrinas a partir de los correspondientes compuestos carbonílicos.²⁴⁴

²³⁹ F. L. Winckler, *Liebigs Ann. Chem.* **1832**, 4, 242-247.

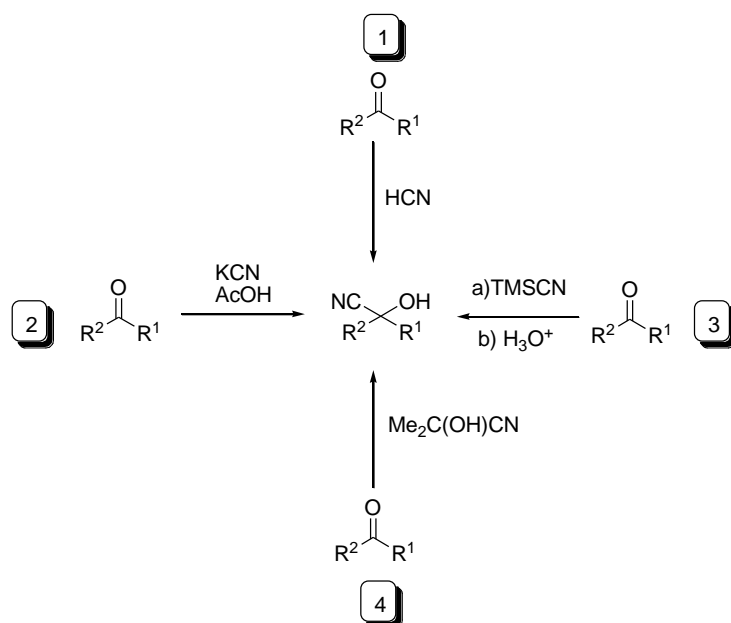
²⁴⁰ E. Smitskamp-Wilms, J. Brussee, A. van der Gen, G. J. M. van Scharenburg, J. B. Sloothaak, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **1991**, 110, 209-215.

²⁴¹ M. Golinski, C. P. Brock, D. S. Watt, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 159-164.

²⁴² B. E. Betts, W. Davey, *J. Chem. Soc.* **1958**, 4193-4197.

²⁴³ W. Nagata, M. Yoshioka, M. Nurakami, "Organic Syntheses", John Wiley & Sons, Nueva York, **1988**, 307-310.

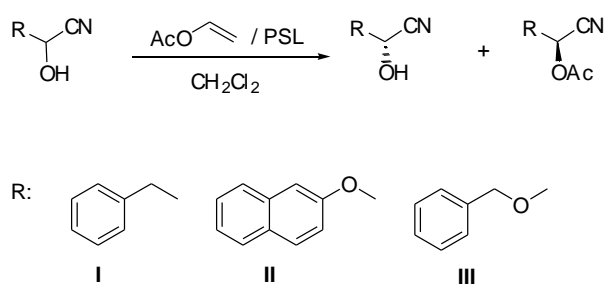
²⁴⁴ R. Yoneda, S. Harusawa, T. Kurihara, *J. Org. Chem.* **1991**, 56, 1827-1832.



Esquema 5.1.

5.1.2. ACILACIÓN ENZIMÁTICA DE CIANHIDRINAS RACÉMICAS.

Wong y col.²⁴⁵ realizaron la acilación selectiva de cianhidrina empleando la lipasa de *Pseudomonas cepacea* (lipasa PS de Amano) en CH_2Cl_2 (esquema 5.2). Las enantioselectividades conseguidas fueron moderadas, con lo que se pudieron obtener las cianhidrina libres con excesos enantioméricos superiores al 95 % a conversiones mayores del 55 %. Como agente acilante se emplea acetato de vinilo para que el proceso sea irreversible. En el caso de la cianhidrina **I** se acetila el enantiómero de configuración *S*, mientras que para las cianhidrina β -oxigenadas **II** y **III**, los productos de reacción presentaban configuración *R*.²⁴⁶



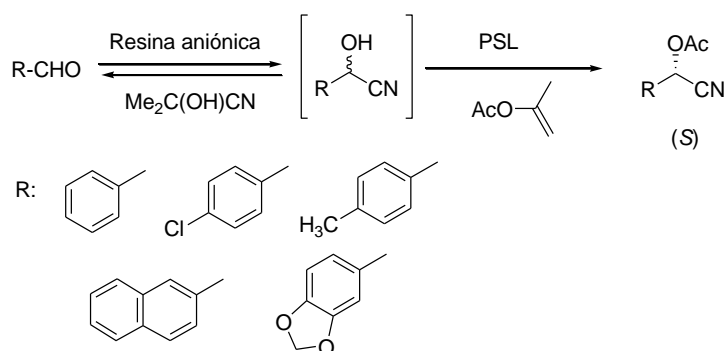
Esquema 5.2.

La acilación enzimática sobre cianhidrina aromáticas también ha sido estudiada empleando la lipasa PS inmovilizada sobre el soporte XAD-8. En estas condiciones se consiguen velocidades de reacción 200 veces mayores que utilizando el enzima no inmovilizado. Se cree que en este soporte se produce la adsorción del sustrato, con lo que aumenta su contacto con el biocatalizador y por tanto la velocidad de reacción.

²⁴⁵ Y.-F. Wang, S.-T. Chen, K. K.-C. Liu, C.-H. Wong, *Tetrahedron Lett.* **1989**, 30, 1917-1920.

²⁴⁶ Esta configuración es debida a la aplicación de las reglas de preferencia por el cambio de prioridad de los sustituyentes.

Diversas técnicas de resolución dinámica se han aplicado para la síntesis de cianhidrinas quirales con lipasas. Inagaki y col.²⁵⁰ desarrollaron la preparación de una serie de ésteres de cianhidrinas aromáticos mediante la combinación de la formación de las cianhidrinas *in-situ* con su resolución cinética catalizada por la lipasa PS en disolvente orgánico (esquema 5.4). Los aldehídos aromáticos de partida son convertidos reversiblemente en las correspondientes cianhidrinas mediante la transcianación con la cianhidrina de la acetona, catalizada por una resina intercambiadora aniónica. Las cianhidrinas resultantes se acetilan enantioselectivamente por la acción de la lipasa, empleando acetato de isopropenilo como agente acilante para obtener los ésteres de cianhidrina con elevados rendimientos y excesos enantioméricos. Debido a la reversibilidad de la transcianación catalizada por base, el enantiómero remanente se racemiza fácilmente.



Esquema 5.4.

Esta reacción fue estudiada en profundidad, analizando todos los factores que influyen en la misma.²⁵¹ Los mejores resultados tras probar una serie de enzimas se obtienen con la lipasa de *Pseudomonas cepacia* inmovilizada sobre Hyflo Super-Cel. El disolvente más adecuado para la resolución es el dietil éter. Se ha comprobado que cuando se utilizan cianhidrinas derivadas de aldehídos alifáticos, el enzima no discrimina entre los dos enantiómeros y se consiguen bajos excesos enantioméricos. También se emplearon diferentes resinas aniónicas, como la Amberlite IRA-904, Amberlyst A-27 y Duolite A-162, siendo todas igualmente efectivas.

Recientemente ha sido analizada la resolución cinética dinámica del benzaldehído con la lipasa CAL-B en su forma L-2.²⁵² La reacción se lleva a cabo en tolueno con acetato de isopropenilo como agente acilante y en presencia de la resina Amberlite IRA-904. El procedimiento permite la obtención de (*S*)-acetato de mandelonitrilo con elevada pureza óptica, a pesar de que la presencia de pequeñas cantidades de agua en el medio pueden provocar la hidrólisis del acetato de isopropenilo y del producto final, y la inactivación de la resina.

Otra metodología empleada para obtener el enantiómero más reactivo con un 100 % de rendimiento teórico en la acilación enzimática de cianhidrinas consiste en realizar dicha resolución acoplada con la esterificación de Mitsunobu del enantiómero que reacciona más lentamente (esquema 5.5).²⁵³ Por tratamiento con DEAD, trifenilfosfina y un ácido carboxílico, se consigue la inversión de la configuración de este enantiómero por un proceso S_N2 . Este método ha sido aplicado a una amplia variedad de cianhidrinas alifáticas y aromáticas, empleando las lipasas de *Candida*

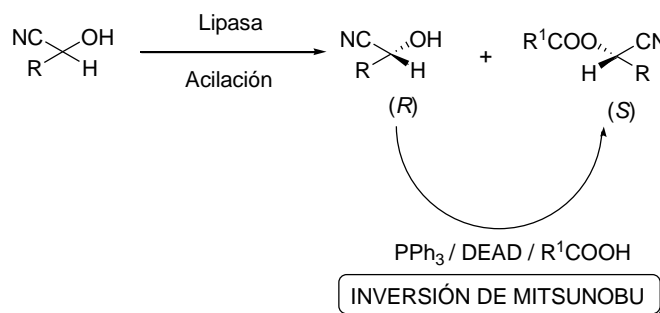
²⁵⁰ M. Inagaki, J. Hiratake, T. Nishioka, J. Oda, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9360-9361.

²⁵¹ M. Inagaki, J. Hiratake, T. Nishioka, J. Oda, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5643-5649.

²⁵² Y. X. Li, A. J. J. Straathof, U. Hanefeld, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2002**, *13*, 739-743.

²⁵³ E. Vääntinen, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, *6*, 1779-1786.

rugosa, *Pseudomonas cepacea* y de páncreas de cerdo, con acetato y butirato de vinilo como agentes acilantes. Los resultados son excelentes para aquellas cianhidrinas cuya acilación presente una razón enantiomérica mayor de 100. El inconveniente estriba en que la reacción S_N2 no está favorecida en todas las cianhidrinas estudiadas, por lo que las purezas ópticas obtenidas son menores de lo esperado en estos casos.



Esquema 5.5.

5.1.3. MODELADO MOLECULAR

Debido a que la selectividad es una de las propiedades más importantes de un biocatalizador, un gran número de investigadores han desarrollado a lo largo de los últimos 20 años una serie de metodologías que permitan racionalizar los resultados obtenidos en las reacciones enzimáticas.

El modelado molecular es una disciplina que hace referencia a una serie de modelos químico-físicos que tratan de representar, analizar y simular el comportamiento de los sistemas moleculares.²⁵⁴

Aunque en la actualidad se suele identificar el término modelado molecular con la utilización de sistemas teóricos computacionales, existen otras metodologías que recogen el uso de técnicas experimentales.

Como ya ha sido comentado, en base a los resultados experimentales obtenidos con un gran número de sustratos, es posible predecir el comportamiento de un determinado enzima para un sustrato en base a sus propiedades estéricas y/o electrónicas. Tras un cuidadoso análisis de los resultados experimentales obtenidos, se pueden establecer también modelos acerca de la estructura del centro activo de los enzimas estudiados, con lo que es posible explicar de antemano la selectividad del biocatalizador frente a un nuevo sustrato. Como es natural, la capacidad de predicción de estos métodos experimentales depende en gran medida del número de sustratos analizados, por lo que la obtención de buenos resultados requiere de un elevado esfuerzo experimental.

5.1.3.1. Métodos teóricos.

Los métodos teóricos permiten calcular la energía y otras propiedades de un sistema molecular (distancias y ángulos de enlace, distribución de cargas y potenciales, etc.), por lo que son de gran utilidad para explicar tanto la selectividad enzimática como las interacciones moleculares que la provocan.

Mediante los métodos teóricos es posible obtener las energías de los dos estados de transición diastereoméricos que un enzima forma con los dos enantiómeros de una mezcla racémica en una resolución cinética ($\Delta\Delta G_{\text{teor}}^\ddagger$). Sin embargo, la correlación de este valor con el obtenido experimentalmente a través de los cálculos de la razón

²⁵⁴ (a) R. J. Kazlauskas, *Biocat. Biotrans.* **2000**, *4*, 81-88. (b) R. J. Kazlauskas, *Science*, **2001**, *293*, 2277-2278.

enantiomérica ($\Delta\Delta G_{\text{exp}}^{\ddagger}$, ecuación 5.1) presenta normalmente diferencias, por lo que la estimación de la E mediante métodos teóricos no es una metodología fiable.

$$\text{Ecuación 5.1} \quad \Delta\Delta G_{\text{exp}}^{\ddagger} = -RT \ln E = \Delta\Delta H_{\text{exp}}^{\ddagger} - T\Delta\Delta S_{\text{exp}}^{\ddagger}$$

La aplicación de los métodos teóricos sí que permite una estimación cualitativa acerca del enantiómero que va a reaccionar más rápido en una mezcla racémica. Además, va a ser posible la obtención de importante información estructural acerca de los estados de transición correspondientes al paso determinante de la enantiodiscriminación, de tal manera que una vez determinado el modo de unión de cada sustrato al enzima se puedan establecer relaciones entre la E con diversos factores estructurales como distancias de enlaces por puente de hidrógeno, conformación de los sustratos, interacciones sustrato-centro activo, etc.

La cristalografía de rayos X ha jugado un papel fundamental en el desarrollo de los métodos teóricos, ya que es necesario un conocimiento claro de la estructura tridimensional del biocatalizador para poder analizar de forma clara el desarrollo de la reacción enzimática. También es fundamental para estudiar la selectividad de un proceso biocatalítico establecer como va a producirse la interacción entre el sustrato y el centro activo del enzima. La resolución por cristalografía de rayos X de complejos enzimáticos con diferentes inhibidores permite conocer de manera más o menos exacta cómo se produce la unión del sustrato al enzima y las interacciones que se generan.²⁵⁵

Los métodos teóricos se clasifican según el fundamento físico empleado para su desarrollo en:

5.1.3.1.1. Mecánica molecular

Los métodos de mecánica molecular o métodos clásicos utilizan la mecánica clásica o newtoniana para el análisis de los sistemas moleculares. En este caso los átomos son representados como esferas en los que las cargas parciales se encuentran localizadas en el centro de los mismos, mientras que los enlaces son representados como muelles. Como no se incluyen las interacciones electrónicas, se parte de un modelo aproximado para explicar los datos experimentales. El estado del sistema viene determinado por una función de energía potencial, denominada *campo de fuerza*, que define la energía que el sistema posee en un determinado momento en función de las coordenadas de sus átomos. La mecánica molecular representa un sistema rápido y seguro, especialmente para moléculas orgánicas simples en las que existen un amplio rango de datos experimentales. Es un sistema adecuado para estudios de sistemas moleculares “grandes” (cientos de átomos) como proteínas dependiendo del campo de fuerzas empleado. Sin embargo, la mecánica molecular no se puede aplicar a sistemas donde se produce la formación y ruptura de enlaces químicos, ya que estos métodos no son capaces de calcular propiedades electrónicas.

5.1.3.1.2. Métodos cuánticos.

En este caso, se utilizan una serie de aproximaciones para resolver la ecuación de Schrödinger del sistema a estudiar. Con estos métodos es posible obtener información de las energías potenciales así como de las distribuciones electrónicas de todos los estados implicados en una reacción, incluyendo los estados de transición. La información sobre la diferente energía de los estados de transición nos permitiría conocer la causa de la discriminación enzimática, por lo que en principio estos métodos

²⁵⁵ J. B. Jones, G. Desantis, *Acc. Chem. Res.* **1999**, 32, 99-107.

representan el mejor modo de abordar el estudio acerca de la selectividad de los biocatalizadores. Existen dos tipos de métodos basados en la mecánica cuántica:

- Métodos semiempíricos, que utilizan la mecánica cuántica en conjunción con ciertos parámetros empíricos. Sin embargo, recientes estudios entre métodos semiempíricos y clásicos han demostrado que estos últimos reproducen mejor los resultados experimentales.
- Métodos *ab-initio*: Calculan las conformaciones sin la ayuda de ningún tipo de parámetro experimental. Pueden establecer la razón de que el sistema molecular favorezca una determinada conformación. Sin embargo, requieren grandes cantidades de cálculo computacional y su estudio está limitado a sistemas “pequeños” (menos de diez átomos). Son excelentes para nuevos estudios en los que no existen datos experimentales.

5.1.4. MECÁNICA MOLECULAR.

La base fundamental de los distintos métodos clásicos que permiten el estudio de la enantioselectividad enzimática consiste en la utilización de una función semiempírica conocida como campo de fuerza.²⁵⁶ Ésta proporciona el valor de la energía potencial de un sistema molecular en función de las posiciones que ocupen los átomos en un instante dado de tiempo.

El campo de fuerza muestra para un sistema molecular de N átomos la energía del mismo a través de una serie de parámetros que contribuyen a la misma: Interacciones covalentes entre dos átomos, las energías asociadas con los ángulos formados por tres átomos unidos de forma covalente, las energías de los ángulos diedros generados por cuatro ángulos enlazados de forma covalente, las interacciones no enlazantes, como las uniones de Van der Waals o coulombianas, etc. Dependiendo de cada campo de fuerzas utilizado, existen variaciones sobre los parámetros empleados para calcular la energía potencial del sistema.

La determinación de los valores de los diferentes parámetros que componen el campo de fuerzas se puede realizar:

- Mediante cálculos *ab initio* sobre moléculas pequeñas y su posterior ajuste en la ecuación del campo de fuerzas.
- Mediante la determinación experimental.

Los campos de fuerza de primera generación nos permiten predecir la estructura del sistema molecular. Con los campos de fuerza de segunda generación (por ejemplo, MM2 o AMBER), es posible la predicción de parámetros termodinámicos, como las energías de las diferentes estructuras.

En función del sistema que se vaya a someter a estudio, es posible aplicar diferentes campos de fuerza. Por ejemplo, la utilización del campo de fuerzas AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement) es de gran interés en el campo de la biocatálisis, ya que ha sido parametrizado para proteínas y ácidos nucleicos.²⁵⁷ Presenta importantes ventajas en el tratamiento de las interacciones electroestáticas del sistema, siendo su tratamiento simplificado de enlaces y ángulos de enlace su mayor inconveniente.

²⁵⁶ W. F. van Gunsteren, H. J. C. Berendsen, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, 29, 992-1023.

²⁵⁷(a) S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. A. Case, U. C. Singh, C. Ghio, G. Alagona, S. Profeta, P. Weiner, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 765-784. (b) W.D Cornell, P. Cieplak, C. I. Bayly, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9620-9631.

5.1.4.1. Estudio de la enantioselectividad enzimática mediante mecánica molecular.

La mecánica molecular no puede modelar directamente un estado de transición debido a que los campos de fuerzas son únicamente aplicables a moléculas estables. Para solucionar este inconveniente, se han desarrollado estados de transición estables análogos o bien se ha realizado una aproximación mixta entre la mecánica molecular y la mecánica cuántica. Un ejemplo de estado de transición análogo los constituye el uso de fosfonatos, que pueden ser modelados por la mecánica molecular, para simular estados de transición en la hidrólisis de ésteres.²⁵⁸ La desventaja de este nuevo estado de transición es que sólo es una aproximación al verdadero. La aplicación de sistemas mixtos entre mecánica molecular/cuántica emplea la mecánica cuántica para modelar el estado de transición en fase gas. Este modelo se transfiere al enzima y el cálculo se continua con la mecánica molecular.²⁵⁹

Para estudiar la enantioselectividad enzimática, es necesario conocer las conformaciones de mínima energía de los estados de transición intermedios de ambos enantiómeros, analizando después las diferencias estructurales y energéticas que presenten.

Una de las grandes dificultades de esta metodología estriba en encontrar el mínimo de energía global para los estados de transición enzimática. El modelado molecular conduce al mínimo de energía potencial más próximo a la configuración de partida, que no coincide generalmente con el mínimo absoluto. Por lo tanto, es necesario buscar medios adicionales para encontrar este mínimo global. Los métodos más habituales para determinar la conformación de más baja energía son:

- La búsqueda sistemática (generalmente aplicada a sustratos con tres o menos enlaces rotables), modificando los ángulos diédros, mientras que se mantienen constantes los ángulos y las distancias de enlace, para obtener el mayor número posible de conformaciones.
- Los métodos de Monte Carlo (MC),²⁶⁰ basados en la generación de conformaciones aleatorias del sistema a partir de una conformación inicial. Si la energía de la conformación es menor que la anterior, es aceptada y se prosigue con el proceso. Si es mayor, debe variarse entonces la evolución del sistema. No es muy adecuado porque genera inconvenientes cuando el movimiento de la molécula se ve afectado por fenómenos de cooperatividad.
- Métodos de dinámica molecular (MD), que permiten reproducir de manera más o menos fiel el movimiento real del sistema. Las simulaciones cubren espacios de tiempo del orden de picosegundos, porque el intervalo de tiempo a analizar debe ser menor que el tiempo necesario para una vibración de enlace. De otro modo, los cálculos serían incorrectos. Es el mejor método para las biomoléculas.²⁶¹

La enantioselectividad de un proceso enzimático se origina en la diferencia de energía libre en los estados de transición diastereoméricos para la reacción de cada enantiómero con el biocatalizador (ecuación 5.1, página 186). Esta energía libre consta de una parte entálpica ($\Delta\Delta H^\ddagger$) y otra parte entrópica dependiente de la temperatura ($T\Delta\Delta S^\ddagger$). Los campos de fuerza sólo proporcionan datos de la contribución entálpica debido a la dificultad de cálculo de las entropías. En muchos casos, estos datos se

²⁵⁸ D. J. Tantillo, K. N. Houk, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3066-3076.

²⁵⁹ G. Colombo, S. Toba, K. M. Merz Jr, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 3486-3493.

²⁶⁰ D. W. Heerman, "Computer simulation methods", Ed. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, **1990**.

²⁶¹ A. E. Howard, P. A. Kollman, *J. Med. Chem.* **1998**, *31*, 1669-1675.

ignoran, asumiendo que son despreciables. Sin embargo, experimentos recientes han confirmado que la contribución entrópica es del orden de la entálpica,²⁶² con lo cual se comete un error considerable en la determinación de la energía libre del sistema que permite explicar las diferencias obtenidas entre los valores de $\Delta\Delta G^\ddagger$ teóricos a los obtenidos experimentalmente.

Un factor fundamental en las modelizaciones es la solvatación. La mayoría de los modelos computerizados incluyen agua en la estructura cristalina, pero no se incluyen las moléculas de agua de solvatación. El efecto de este agua se trata generalmente mediante la aproximación de considerarla como un dieléctrico dependiente de la distancia.²⁶³ Otro parámetro a tener en cuenta cuando se desarrollan modelizaciones es el efecto de los aminácidos que no están en contacto con el sustrato, pero que pueden influir en determinados casos en la enantioselectividad del enzima.²⁶⁴

5.1.4.2. Aplicación del modelado molecular a la resolución de alcoholes secundarios.

Como ya ha sido comentado en los antecedentes del capítulo 1, los alcoholes secundarios reaccionan con lipasas en procedimientos de acilación enzimática siguiendo la regla de Kazlauskas. Esta regla empírica, basada en estudios sistemáticos sobre una amplia variedad de sustratos, establece la preferencia de las lipasas en la resolución de alcoholes secundarios en función de la diferencia de tamaños entre los sustituyentes del estereocentro (figura 5.1). A mayor diferencia entre ambos sustituyentes, mayor será en principio la enantioselectividad del proceso puesto que más inestable será el estado de transición del enantiómero menos reactivo.

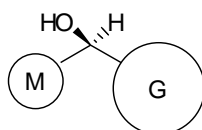


Figura 5.1. Representación del enantiómero reactivo según la regla de Kazlauskas, siendo G el sustituyente grande y M el sustituyente mediano.

La regla de Kazlauskas fue inicialmente enunciada para las lipasas de *Candida rugosa* y *Pseudomonas cepacea* y la esterasa de colesterol, aunque se cumple con particularidades para un amplio rango de biocatalizadores. Este modelo de predicción es limitado y en ciertos casos no se ajusta a la realidad debido a que la interacción enzima-sustrato es tratada únicamente en términos de repulsiones estéricas, ignorando otros componentes de la misma. Por otro lado, el modelo no tiene en cuenta las diferencias entre los centros activos de las diferentes lipasas y en algunos casos la predicción de la enantioselectividad depende del criterio empleado para la estimación del tamaño de cada sustituyente.

La aplicación de los métodos teóricos (Monte Carlo o dinámica molecular) junto con los estudios mediante cristalografía de rayos X, han permitido la racionalización de la estereopreferencia de ciertas lipasas en las reacciones de acilación enzimática sobre alcoholes secundarios. Esta preferencia es una consecuencia de la estructura tridimensional de la zona del centro activo que aloja al sustrato. Así, hay casos en los que la enantioselección se debe a la diferente acomodación de ambos enantiómeros en el centro activo, mientras que en otros casos se debe a la pérdida de alguno de los

²⁶² P. L. A. Overbeeke, S. C. Orrenius, J. A. Jongejan, J. A. Duine, *Chem. Phys. Lipids*, **1998**, *93*, 81-93.

²⁶³ T. Ke, B. Tidor, A. M. Klibanov, *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *57*, 741-745.

²⁶⁴ E. R. Guito, S. Caccia, T. Rose, K. Fütterer, G. Waksman, E. di Cera, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, *96*, 1852-1858.

enlaces de hidrógeno esenciales para que la catálisis pueda llevarse a cabo, como por ejemplo el existente entre el aminoácido histidina de la tríada catalítica y el oxígeno del nucleófilo en el intermedio tetraédrico 2 formado en las reacciones de acilación enzimática (figura 5.2).²⁶⁵

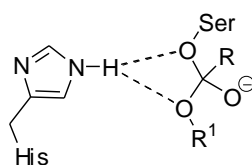


Figura 5.2.

²⁶⁵ (a) M. Cygler, P. Grochulski, R. J. Kazlauskas, J. D. Schrag, F. Bouthillier, B. Rubin, A. N. Serrequei, A. K. Gupta, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3180-3186. (b) F. Haeffner, T. Norin, K. Hult, *Biophys. J.* **1998**, *74*, 1251-1262. (c) D. Rottici, F. Haeffner, C. Orrenius, T. Norin, K. Hult, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **1998**, *5*, 267-272. (d) T. Schulz, J. Pleiss, R. D. Schmid, *Protein. Sci.* **2000**, *9*, 1053-1062.

5.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el capítulo anterior de la presente Memoria, se ha desarrollado la preparación de diferentes hidroxicianhidrinias ópticamente activas mediante la reacción enzimática de transcianación empleando (*R*)-oxinitrilasas. Sin embargo, en todos los casos, los excesos enantioméricos obtenidos son bajos o moderados. Para los hidroxialdehídos **7** y **8**, las bajas purezas ópticas se deben principalmente a la adición no enzimática de cianuro de hidrógeno, mientras que para los sustratos **10a**, **10b** y **10c**, la (*R*)-oxinitrilasa de *Prunus amygdalus* no parece ser un catalizador muy selectivo.

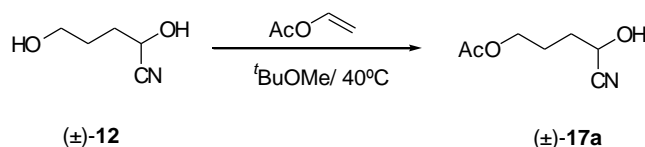
Una alternativa a la síntesis asimétrica de cianhidrinias quirales consiste en la reacción de acilación enzimática sobre cianhidrinias racémicas empleando lipasas. Esta metodología va a ser la utilizada en el presente capítulo para intentar conseguir una serie de hidroxicianhidrinias *O*-protegidas en el grupo hidroxilo primario con elevados excesos enantioméricos.

5.2.1. PREPARACIÓN DE LAS HIDROXICIANHIDRINAS 5-*O*-PROTEGIDAS.

En primer lugar, se estudió el comportamiento frente a la reacción de acilación enzimática de una serie de cianhidrinias racémicas derivadas del (\pm)-2,5-dihidroxinitrilo (\pm)-**12**. En experimentos de acetilación con diferentes cantidades de acetato de vinilo (2, 5 y 10 equivalentes) sobre este sustrato a 30°C en diferentes disolventes, se produce la acetilación química no deseada del grupo hidroxilo primario, por lo que debe ser protegido para realizar la reacción de resolución únicamente sobre el alcohol secundario de la hidroxicianhidrina.

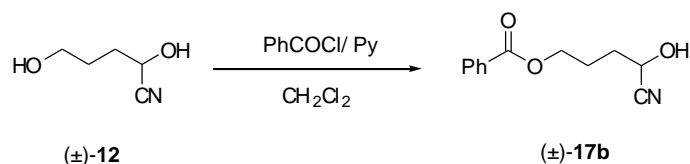
A partir de la hidroxicianhidrina libre (\pm)-**12** se sintetizaron cuatro derivados 5-*O*-sustituídos. Para ello, se utilizaron dos grupos protectores de tipo éster (acetilo y benzoílo) y otros dos de tipo éter (metoximetilo y tritilo), presentando cada grupo diferentes tamaños. Con la preparación de estos derivados, va a ser posible estudiar el efecto tanto de las propiedades electrónicas como del volumen de los grupos protectores en la selectividad de las reacciones de acilación enzimática.

La síntesis del (\pm)-5-acetoxi-2-hidroxipentanitrilo (\pm)-**17a** se realiza por tratamiento de (\pm)-**12** con 5 equivalentes de acetato de vinilo a 40°C en *t*BuOMe (esquema 5.6). Debido a la mayor reactividad del grupo hidroxilo primario únicamente se acetila esta función. La cianhidrina (\pm)-**17a** se obtiene con un 73% de rendimiento.



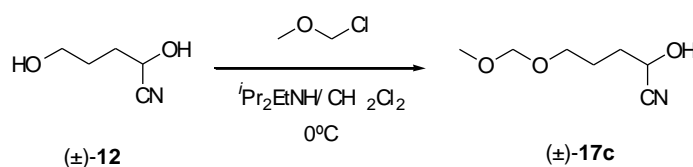
Esquema 5.6.

La síntesis de la hidroxicianhidrina *O*-benzoílada (\pm)-**17b** se lleva a cabo mediante la reacción de (\pm)-**12** con 1 equivalente de cloruro de benzoílo y piridina en CH_2Cl_2 a temperatura ambiente (esquema 5.7). En estas condiciones, dada la menor reactividad del agente acilante empleado y la utilización de un único equivalente, sólo se observa la formación del (\pm)-5-benzoiloxi-2-hidroxipentanitrilo con un rendimiento del 64%.



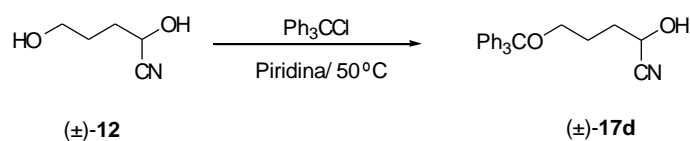
Esquema 5.7.

Dentro de los grupos protectores de tipo éter, fue preparado el derivado metoximetilo de la cianhidrina (±)-12. El grupo MOM es de pequeño tamaño y sus reacciones de protección y desprotección son sencillas. El (±)-2-hidroxi-5-(metoxi)metoxipentanonitrilo (±)-17c se sintetiza por tratamiento de la hidroxicianhidrina libre con cloruro de metoximetilo y diisopropiletilamina (esquema 5.8), con un rendimiento del 59%.



Esquema 5.8.

Finalmente, se sintetiza el derivado tritilado (±)-2-hidroxi-5-tritiloxipentanonitrilo (±)-17d por reacción de la cianhidrina libre (±)-12 con cloruro de tritilo en piridina a 50°C, con un rendimiento del 67% (esquema 5.9).



Esquema 5.9.

5.2.2. REACCIONES DE ACETILACIÓN ENZIMÁTICA SOBRE LAS CIANHIDRINAS 5-O-PROTEGIDAS.

Una vez sintetizadas todas las cianhidrinas protegidas, se realiza el estudio de la reacción de acetilación enzimática sobre las mismas. En todos los casos, el agente acilante empleado es acetato de vinilo, con lo cual se consigue que el proceso sea irreversible. Sobre la base de los resultados obtenidos, podremos comparar la influencia del grupo protector en la selectividad de las resoluciones que se han estudiado.

En todos los sustratos analizados en este capítulo se acetila preferentemente el enantiómero de configuración *S*, siendo el alcohol remanente de configuración *R*, por lo que estas reacciones enzimáticas cumplen con lo predicho por la regla de Kazlauskas para la acilación de alcoholes secundarios.

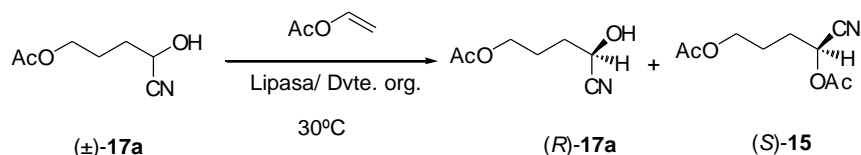
5.2.2.1. Reacciones de acetilación enzimática sobre (±)-5-acetoxi-2-hidroxipentanonitrilo, (±)-17a.

El (±)-5-acetoxi-2-hidroxipentanonitrilo (±)-17a fue el primer sustrato empleado en la acetilación enzimática, con 5 equivalentes de acetato de vinilo a 30°C (esquema 5.10). Inicialmente, se realizó un *screening* de la reacción biocatalizada en tolueno empleando una serie de lipasas comerciales: las dos variedades de la *Candida antarctica*, con las que se obtienen muy buenos resultados en las acilaciones descritas

en los capítulos 1, 2 y 3; la lipasa de *Pseudomonas cepacea* en sus preparados PSL y PS-C y la lipasa de páncreas de cerdo, que ha sido empleada con altas selectividades en la resolución de otras cianhidrinas alifáticas.²⁴⁷ Como se puede observar en la tabla 5.1, en todos los casos los procesos son muy poco selectivos, pues las enantioselectividades que se obtienen son menores de 10 con todas las lipasas estudiadas.

En cuanto a la actividad enzimática, se puede observar que los procesos más rápidos se consiguen empleando la lipasa de *Pseudomonas cepacea* inmovilizada (PS-C), alcanzándose una conversión del 38% a las 2 horas de reacción (entrada 4), y la CAL-A, con la que es posible obtener una conversión del 26% en 1 hora (entrada 1). Con el resto de biocatalizadores empleados las acetilaciones son mucho más lentas, siendo especialmente baja la actividad de la PPL, pues a las 72 horas de reacción, sólo se observa una conversión del 11%.

Posteriormente, se analizó la influencia del disolvente orgánico en la reacción. Para ello, se realizaron una serie de resoluciones catalizadas por la lipasa PS-C a 30°C en diferentes disolventes. Como puede observarse en las entradas 6 a 9, la variación del disolvente de reacción tampoco mejora de manera sustancial los resultados obtenidos en cuanto a la enantioselectividad de los procesos. Empleando ^tBuOMe o ⁱPr₂O las reacciones son más rápidas que en tolueno, mientras que en 1,4-dioxano y tetrahidrofurano, son necesarios largos tiempos de reacción para alcanzar conversiones cercanas a 15%.



Esquema 5.10.

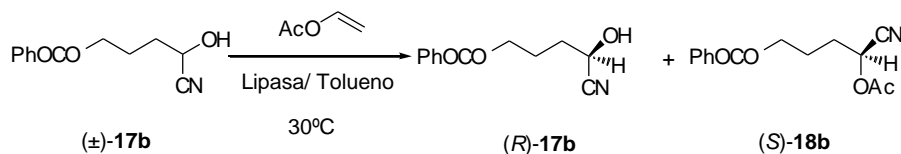
Tabla 5.1. Reacciones de acetilación enzimática sobre (±)-17a con 5 equivalentes de acetato de vinilo a 30°C.

Entrada	Enzima	Dvte.	t (h)	c (%)	<u>(R)-17a</u> <u>(S)-15</u>		E
					<i>ee</i> ^a (%)	<i>ee</i> ^a (%)	
1	CAL-A	Tolueno	1	26	31	63	5.9
2	CAL-B	Tolueno	20	29	30	75	9.4
3	PSL	Tolueno	24	21	15	61	4.8
4	PS-C	Tolueno	2	38	38	62	6.1
5	PPL	Tolueno	72	10	6	53	3.5
6	PS-C	^t BuOMe	2	52	57	53	5.6
7	PS-C	ⁱ Pr ₂ O	1	46	39	46	3.9
8	PS-C	1,4-dioxano	72	12	10	71	6.5
9	PS-C	THF	72	15	11	63	4.9

^a Determinados por CG.

5.2.2.2. Acetilación enzimática sobre (±)-5-benzoiloxi-2-hidroxipentanitrilo, (±)-17b.

La presencia en la molécula de cianhidrina de un grupo protector más voluminoso y de carácter aromático, puede modificar los valores de enantioselectividad conseguidos para (±)-17a. Por ello, se realizaron reacciones de acetilación enzimática sobre el (±)-5-benzoiloxi-2-hidroxipentanitrilo (±)-17b en tolueno con 5 equivalentes de acetato de vinilo a 30°C, como se muestra en el esquema 5.11.



Esquema 5.11.

En las reacciones realizadas con los biocatalizadores CAL-A, CAL-B y PS-C (tabla 5.2), las enantioselectividades conseguidas son muy bajas, del orden de las obtenidas para el sustrato (±)-17a. Hay que destacar que con las tres lipasas las reacciones son más rápidas que con las cianhidrinas acetiladas. Al igual que en la acetilación de (±)-17a, las reacciones catalizadas por las lipasas de CAL-A y PS-C muestran una elevada velocidad, con conversiones cercanas al 50% en 1 y 2 horas de reacción, respectivamente. En el proceso realizado con la CAL-B la resolución es más lenta, pues sólo se alcanza una conversión del 15% a las 6 horas.

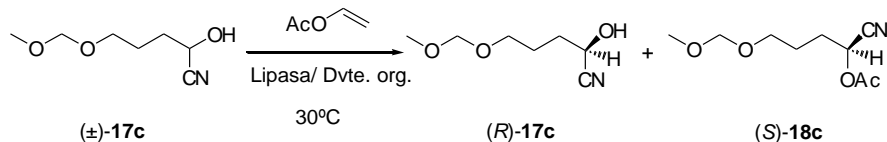
Tabla 5.2. Reacciones de acilación enzimática sobre (±)-17b en tolueno a 30°C con 5.0 equivalentes de acetato de vinilo.

Entrada	Enzima	t (h)	c (%)	(R)-17b	(S)-18b	E
				ee ^a (%)	ee ^a (%)	
1	CAL-A	1	52	66	59	7.5
2	PS-C	2	49	42	44	3.8
3	CAL-B	6	15	11	65	5.3

^a Determinados por HPLC.

5.2.2.3. Reacciones de acetilación enzimática sobre (±)-2-hidroxi-5-(metoxi)metoxipentanitrilo, (±)-17c.

A la vista de los resultados conseguidos con las cianhidrinas racémicas (±)-17a y (±)-17b, se decidió estudiar la reacción de acetilación enzimática sobre la hidroxicianhidrina protegida con el grupo metoximetilo (±)-17c (esquema 5.12).



Esquema 5.12.

Según se muestra en la tabla 5.3, se produce un incremento en las selectividades de los procesos catalizados por la CAL-A y la PS-C en tolueno a 30°C con 5 equivalentes de acetato de vinilo con respecto a las resoluciones de (±)-17a y (±)-17b. También se observa que con este grupo protector, las velocidades de reacción son menores a las conseguidas con los grupos acetilo y benzoílo. Así, con la lipasa de *Pseudomonas cepacea* inmovilizada es posible alcanzar una conversión del 42% a las 2 horas de reacción (entrada 1), con una moderada enantioselectividad ($E=19$). Cuando se emplea la lipasa A de *Candida antarctica*, la velocidad del proceso es ligeramente inferior ($c=45\%$ a las 4 horas) siendo la enantioselectividad conseguida muy similar (entrada 2). Sin embargo, la utilización de la CAL-B para la resolución de (±)-17c sigue resultando en bajas velocidades y enantioselectividades (entrada 3).

Debido a la mejora de la enantioselectividad obtenida con el grupo metoximetilo, especialmente en los procesos catalizados por la PS-C y la CAL-A, se decidió ampliar el análisis de las condiciones de reacción estudiando el efecto del disolvente. Como puede observarse en las entradas 4 y 5, las enantioselectividades conseguidas en las resoluciones catalizadas por la PS-C a 30°C en ^tBuOMe y 1,4-

dioxano son menores que en tolueno. Mientras que con el primero la acetilación es más rápida que en tolueno, en 1,4-dioxano son necesarias 48 horas para conseguir (*S*)-**18c** con una conversión del 27%.

Tabla 5.3. Reacciones de acilación enzimática sobre (\pm)-**17c** con 5 equivalentes de acetato de vinilo a 30°C.

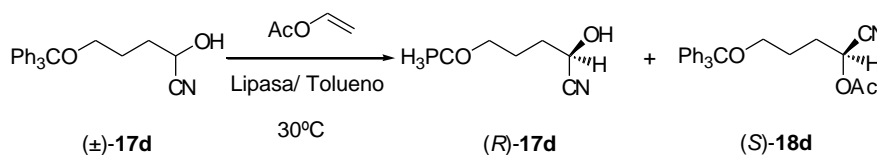
Entrada	Enzima	Dvte.	t (h)	c (%)	<i>(R)</i> - 17c (<i>S</i>)- 18c		<i>E</i>
					<i>ee</i> ^a (%)	<i>ee</i> ^a (%)	
1	PS-C	Tolueno	2	42	60	82	19
2	CAL-A	Tolueno	4	45	63	78	16
3	CAL-B	Tolueno	24	43	50	65	7.7
4	PS-C	<i>t</i> BuOMe	1	35	29	53	4.3
5	PS-C	1,4-dioxano	48	27	27	73	8.5

^a Determinados por CG.

5.2.2.4. Reacciones de acetilación enzimática sobre (\pm)-2-hidroxi-5-tritiloxipentanitrilo (\pm)-**17d**.

Por último, se estudiaron las reacciones de acetilación sobre la hidroxicianhidrina 5-*O*-tritilada (esquema 5.13). Como se puede observar en la entrada 1 de la tabla 5.4, la resolución del sustrato (\pm)-**17d** catalizada por la PS-C en tolueno a 30°C con 5 equivalentes de agente acilante muestra una excelente selectividad (*E*=125), alcanzándose una conversión cercana al 50% a las 4 horas de reacción. Con la enantioselectividad de este proceso, es posible conseguir tanto el sustrato (*R*)-**17d** como el producto (*S*)-**18d** enantioméricamente puros en función de la conversión a la que sea detenida la reacción. Así, la cianhidrina *O*-tritilada libre puede obtenerse con excesos enantioméricos mayores del 97% para conversiones superiores al 51%, con lo que se ha conseguido un excelente método para la obtención de hidroxicianhidrinas ópticamente puras.

Cuando se utiliza como biocatalizador la CAL-A (entrada 2) en las mismas condiciones de reacción, el proceso es más lento que con la PS-C (*c*=25% a las 6 horas). La resolución en este caso transcurre también con alta enantioselectividad (*E*=72), de manera que va a ser posible obtener el sustrato (*R*)-**17d** con elevadas purzas ópticas a conversiones aceptables. Sin embargo, con la CAL-B (entrada 3), la velocidad de reacción es muy baja en comparación con las otras dos lipasas (como sucede en todos los sustratos probados) y la resolución con acetato de vinilo presenta una muy baja selectividad (*E*=8.6).



Esquema 5.13.

Tabla 5.4. Reacciones de acilación enzimática sobre (\pm)-**17d** en tolueno a 30°C con 5.0 equivalentes de acetato de vinilo.

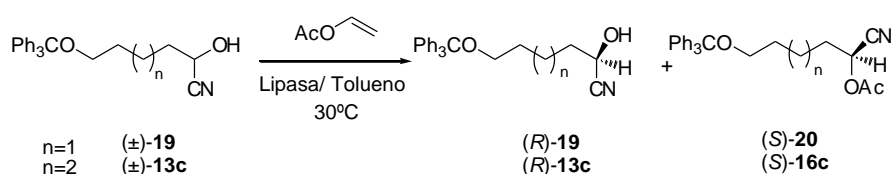
Entrada	Enzima	t (h)	c (%)	<i>(R)</i> - 17d (<i>S</i>)- 18d		<i>E</i>
				<i>ee</i> ^a (%)	<i>ee</i> ^a (%)	
1	PS-C	4	46	82	96	125
2	CAL-A	6	25	32	96	72
3	CAL-B	22	22	21	75	8.6

^a Determinados por HPLC.

5.2.3. REACCIONES DE ACETILACIÓN ENZIMÁTICA SOBRE (±)-2-HIDROXI-6-HEXANONITRILO, (±)-**19** Y 2-HIDROXI-7-HEPTANONITRILO, (±)-**13c**.

Conseguido el mejor grupo protector para el hidroxilo primario en el (±)-2,5-dihidroxipentanonitrilo, se decidió utilizar la protección con el grupo tritilo para la resolución de las cianhidras racémicas de 6 y 7 miembros.

Para sintetizar el (±)-2-hidroxi-6-tritilohexanonitrilo (±)-**19** se sigue la misma metodología que para la preparación de (±)-**17d**, es decir, tratamiento del (±)-2,6-dihidroxihexanonitrilo con cloruro de tritilo en piridina a 50°C. La preparación del 2-hidroxi-7-tritiloheptanonitrilo (±)-**13c** ya ha sido descrita en la discusión del capítulo 4. Una vez preparadas las hidroxicianhidras racémicas tritiladas se desarrollaron las resoluciones por acetilación enzimática empleando 5 equivalentes de acetato de vinilo (esquema 5.14). Las reacciones se realizaron en tolueno a 30°C, empleando como biocatalizadores las lipasas PS-C y CAL-A, con las que se habían obtenido las mejores enantioselectividades en la resolución de (±)-**17a**.



Esquema 5.14.

Como puede observarse en las entradas 1 y 3 de la tabla 5.5, las reacciones catalizadas por la PS-C sobre los sustratos (±)-**19** y (±)-**13c** son mucho más lentas y menos selectivas que para el sustrato (±)-**17d**. Así, para la hidroxicianhidrina (±)-**19** se alcanza una conversión del 27% a las 4 horas de reacción, mientras que para (±)-**13c** la conversión es ligeramente superior en el mismo tiempo. Las enantioselectividades conseguidas presentan valores de 51 y 62, respectivamente. A pesar de ser significativamente inferiores al valor de *E* logrado para (±)-**17d**, es posible obtener los sustratos de la resolución (*R*)-**19** y (*R*)-**13c** prácticamente enantiopuros a conversiones superiores al 53%.

Por el contrario, el empleo de la CAL-A (entradas 2 y 4) provoca un aumento en la velocidad de la acetilación de los sustratos (±)-**19** y (±)-**13c** con respecto a la cianhidrina (±)-**17d**. Para estas dos hidroxicianhidras, también se produce una disminución en la enantioselectividad, pero en este caso los valores obtenidos (*E*=28-16), corresponden a procesos moderadamente selectivos.

Tabla 5.5. Reacciones de acilación enzimática sobre (±)-**19** y (±)-**13c** en tolueno con 5 equivalentes de acetato de vinilo a 30°C y detenidas a las 4 horas.

Entrada	Enzima	Alcohol	<i>c</i> (%)	(<i>R</i>)-alcohol	(<i>S</i>)-éster	<i>E</i>
				<i>ee</i> ^a (%)	<i>ee</i> ^a (%)	
1	PS-C	19	27	35	94	51
2	CAL-A	19	53	91	80	28
3	PS-C	13c	32	44	95	62
4	CAL-A	13c	55	87	71	16

^a Determinados mediante HPLC.

5.2.4. DETERMINACIÓN DE LAS CONFIGURACIONES ABSOLUTAS.

La configuración absoluta de la cianhidrina **17a** fue establecida por comparación del signo de rotación específica de su derivado acetilado **15** obtenido por tratamiento con anhídrido acético y piridina en CH₂Cl₂ ($[\alpha]_{\text{D}}^{18} = +28.2$, *c* 0.55, MeOH, 57% *ee*, *R*) con el obtenido en el capítulo 4 para el producto (*R*)-**15** ($[\alpha]_{\text{D}}^{18} = +31.4$, *c* 0.71, MeOH, 62% *ee*, *R*). De esta forma queda también asignada la configuración absoluta del éster (*S*)-**15**.

En el caso de las cianhidrinas **17b**, **17c** y **17d**, la metodología desarrollada para asignar las configuraciones absolutas consiste en la desprotección del grupo protector para generar la hidroxicianhidrina libre **12**, cuyo signo de rotación específica para el enantiómero (*R*)-**12** está descrito en el capítulo anterior ($[\alpha]_{\text{D}}^{18} = +5.81$ *c* 1.14, EtOH, 62% *ee*, *R*). Una vez asignada la configuración de los alcoholes, es posible establecer la configuración absoluta de los ésteres **18b**, **18c** y **18d**.

La desprotección de la cianhidrina **17b** (tabla 5.2, entrada 1) se realiza por tratamiento con una disolución de NaOH al 1% en metanol a 20°C.²⁶⁶ En estas condiciones se produce una parcial descomposición y racemización de la cianhidrina, por lo que el rendimiento obtenido es bajo (16%). La rotación específica de la hidroxicianhidrina libre generada **12** es $[\alpha]_{\text{D}}^{18} = +1.9$, *c* 0.50, EtOH, 28% *ee*, por lo que presenta configuración *R*.

La cianhidrina **17c** obtenida en la tabla 5.3, entrada 2, es desprotegida por tratamiento con HCl 6.0 N en isopropanol,²⁶⁷ obteniendo **12** con un rendimiento del 41%. La rotación específica de la hidroxicianhidrina libre obtenida es $[\alpha]_{\text{D}}^{18} = +6.0$, *c* 1.25, EtOH, 63% *ee*, con lo que el sustrato **17c** presenta configuración *R*.

Para la desprotección de la cianhidrina **17d** (tabla 5.4, entrada 1), se emplea un tratamiento con una mezcla bifásica HCl 3.0 N: CH₂Cl₂ a temperatura ambiente, consiguiendo así la cianhidrina libre **12** con un rendimiento del 66%. La rotación específica medida para este producto es $[\alpha]_{\text{D}}^{18} = +7.9$, *c* 0.90, EtOH, 82% *ee*, con lo que su configuración es *R*.

La hidroxicianhidrina **19** (obtenida en tabla 5.5, entrada 2), se desprotege de la misma manera que su análoga **17d**, con un rendimiento del 54%. El valor de la rotación específica de la hidroxicianhidrina **11** generada tras la desprotección ($[\alpha]_{\text{D}}^{18} = +9.9$ *c* 0.60, EtOH, 91% *ee*) se compara con el descrito en el capítulo 4 para (*R*)-**11** ($[\alpha]_{\text{D}}^{18} = +5.12$, *c* 0.95, EtOH, 50% *ee*, *R*), por lo que en las acetilaciones realizadas para este sustrato, el alcohol presenta configuración *R* y el éster obtenido *S*.

La comparación del signo de la rotación específica de **13c** obtenida en las condiciones de la tabla 5.5, entrada 4, ($[\alpha]_{\text{D}}^{18} = +10.2$, *c* 0.80, EtOH, 87% *ee*), con el descrito en el capítulo anterior para (*R*)-**13c** ($[\alpha]_{\text{D}}^{18} = +4.6$, *c* 0.75, EtOH, 41% *ee*, *R*) nos permite asignar la configuración de esta hidroxicianhidrina, así como la del compuesto **16c**.

5.2.5. DETERMINACIÓN DE LOS EXCESOS ENANTIOMÉRICOS.

Los excesos enantioméricos de **17a** y **15** se determinaron mediante cromatografía de gases (CG) empleando una columna de relleno quiral RTβDEXse. Para analizar la pureza óptica del compuesto **17a** es necesaria su acetilación para generar **15**, mientras que el compuesto **15** no necesita derivatización alguna. Las

²⁶⁶ K. Mashimo, Y. Sato, *Tetrahedron*, **1970**, 26, 803-812.

²⁶⁷ D. G. Hall, P. Deslongchamps, *J. Org. Chem.* **1995**, 60, 7796-7814.

condiciones de análisis, así como los tiempos de retención de cada enantiómero están descritos en la tabla 4.6 del capítulo anterior.

Las medidas de los excesos enantioméricos de las cianhidrinas **17b** y **18b** se realizaron mediante HPLC empleando una columna de relleno quiral Chiralcel OD a una longitud de onda (λ) de 215 nm. El análisis directo de **17b** no fue posible, por lo que se transformó, por reacción con anhídrido acético y piridina en CH_2Cl_2 , en el compuesto **18b**. Las mejores condiciones para la separación se consiguen empleando una mezcla hexano: isopropanol (90:10) a un flujo de 0.8 mL/min y una temperatura de 35°C. La inyección se realiza con un 20 μL de una disolución de muestra en el mismo eluyente a una concentración de 1.0 mg/mL. El cromatograma de (\pm)-**18b** presenta dos picos bien resueltos ($R_S=10.1$) a 16.98 (*S*) y 28.78 (*R*) minutos.

Los *ees* de los compuestos **17c** y **18c** fueron determinados por cromatografía de gases utilizando una columna de relleno quiral RT β DEXse. El sustrato **17c** no pudo ser analizado directamente, por lo que es necesaria su transformación en el compuesto **18c** mediante tratamiento con anhídrido acético y piridina en CH_2Cl_2 . En la tabla 5.6 se muestran las condiciones experimentales del análisis.

Tabla 5.6. Condiciones experimentales utilizadas para la determinación de los excesos enantioméricos de **18c** mediante CG empleando una columna RT β DEXse.

Condiciones ^a	t_{R1} (min)	t_{R2} (min)	R_S ^{b, c}
100°C 5 min, 5 °C/min	20.82	21.52	3.8
200°C 20 min	(<i>R</i>)	(<i>S</i>)	

^a Gas portador: N_2 ; $P_{G.P.}$: 110 kPa. ^b Concentración aproximada de muestra: 1.0 mg/mL. ^c Relación de split: (100:1).

La determinación de la pureza óptica de las hidroxicianhidrinas *O*-tritoladas **17d** y **18d** se realiza mediante HPLC utilizando la columna de relleno quiral Chirobiotic T a una longitud de onda (λ) de 215 nm. El compuesto **17d** se derivatizó por tratamiento con anhídrido acético y piridina en CH_2Cl_2 en el éster **18d**. Para la determinación se emplea una mezcla hexano: isopropanol (95:5) a un flujo de 0.3 mL/min y una temperatura de 20°C. La inyección se realiza con 20 μL de una disolución de muestra en el mismo eluyente a una concentración de 0.25 mg/mL. En la figura 5.3 se observa el cromatograma de (\pm)-**18d**. Éste presenta dos picos (t_R 26.51 y 29.40 minutos) bien resueltos ($R_S=2.4$).

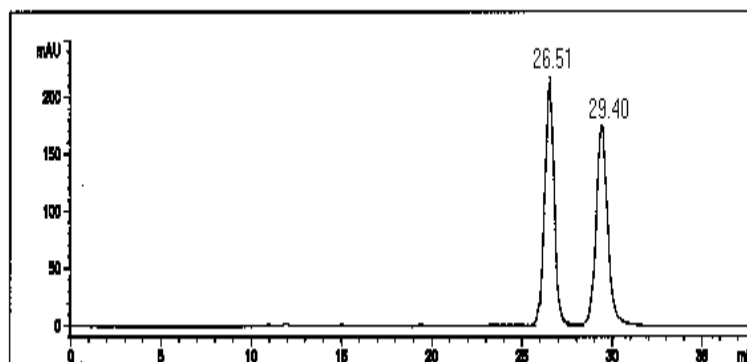


Figura 5.3.

Los *ees* de los compuestos **19** y **20** son analizados por HPLC con una columna de relleno quiral Chiralcel OD a una longitud de onda (λ) de 215 nm. El análisis directo de **19** no fue posible, por lo que hubo de convertirse en **20** por tratamiento con anhídrido acético y piridina en CH_2Cl_2 . Para la determinación se emplea una mezcla hexano:

isopropanol (98:2) a un flujo de 0.3 mL/min y una temperatura de 20°C. La inyección se realiza con un 20µL de una disolución de muestra en el mismo eluyente a una concentración de 1.5 mg/mL. En la figura 5.4 se observa el cromatograma de (±)-**20**. Éste presenta dos picos (t_R 50.63 y 57.75 minutos) bien resueltos ($R_S=2.0$).

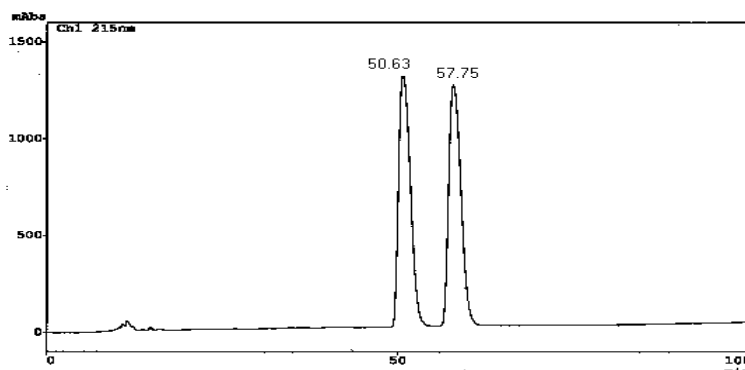


Figura 5.4.

El análisis de los compuestos **13c** y **16c** mediante HPLC empleando la columna de relleno quiral Chirobiotic T ya ha sido descrito en el apartado 4.3.5 del capítulo anterior.

5.2.6. ESTUDIOS DE MODELADO MOLECULAR.

Según los resultados experimentales obtenidos en la resolución enzimática con lipasas de las hidroxicianhidrinas *O*-protegidas, se aprecia una gran diferencia en las enantioselectividades en función del grupo protector utilizado. Así, mientras en la cianhidrinas *O*-acetilada **17a** y *O*-benzoliada **17b**, los enzimas probados no discriminan ambos enantiómeros, la introducción de grupos protectores de tipo metoximetilo **17c** y tritilo **17d** provoca un aumento en la selectividad de la resolución catalizada por las lipasas PS-C y CAL-A. Este aumento es especialmente significativo en el caso de las cianhidrinas *O*-tritiladas, puesto que en las resoluciones sobre el sustrato (±)-**17d** catalizadas por la PS-C y la CAL-A en tolueno, a 30°C se logran excelentes valores de enantioselectividad ($E=72-125$).

Para explicar estas diferencias en la enantiodiscriminación enzimática, decidimos realizar diversos estudios de modelado molecular que nos permitan razonar de un modo cualitativo las enantioselectividades conseguidas en las reacciones de acilación de los sustratos **17a** y **17d** catalizadas por la PS-C. Estos análisis no se pudieron aplicar sobre la lipasa A de *Candida antarctica*, debido a que su estructura tridimensional no se encuentra elucidada en la actualidad.

En la investigación de modelado molecular tenemos que analizar uno de los estados de transición existentes en el ciclo biocatalítico. Para ello, haremos uso de la Mecánica Molecular. Los átomos son tratados como esferas y los enlaces como muelles, estableciéndose una serie de parámetros que se engloban en el llamado campo de fuerzas. En nuestro estudio, el utilizado es el AMBER, especialmente adecuado para proteínas y ácidos nucleicos, como ya se ha comentado en los antecedentes del presente capítulo. La Mecánica Molecular no es capaz de modelizar directamente un estado de transición, ya que los campos de fuerzas sólo se aplican a moléculas estables. Por ello, es necesario recurrir a la modelización de análogos del mismo utilizando, por ejemplo, grupos fosfonatos.

5.2.6.1. Modelización molecular para la PSL.

En primer lugar, se debe aclarar que aunque las reacciones de acilación han sido catalizadas por la lipasa PS-C, el estudio de modelado molecular se ha realizado sobre la lipasa PSL, cuya estructura tridimensional está elucidada. Hasta el momento, no se conocen las posibles diferencias estructurales que existen entre ambas lipasas.

A pesar de los intentos para minimizar las cianhidrinas **17a** y **17c**, este proceso no se pudo realizar debido a la presencia del grupo nitrilo en la molécula, cuyo potencial no es asignado por el campo de fuerzas. Por ello, este grupo fue sustituido por un átomo de cloro, con lo cual el modelado molecular se realizó sobre las correspondientes clorhidrinas.

El centro activo de la PSL contiene un hueco hidrofóbico grande o *del acilo*, donde se unen las largas cadenas aciladas de lípidos. Además, contiene un hueco hidrofóbico pequeño, conocido como *hueco del nucleófilo* o *hueco intermedio*, donde se aloja el nucleófilo que va a reaccionar con el sustrato. Según ciertos autores,¹¹⁹ esta lipasa presenta, a diferencia de otras, un *hueco hidrofóbico alternativo*, situado en una posición muy cercana al hueco del nucleófilo. Este hueco alternativo es largo y estrecho. Como ya se ha comentado, el hueco grande constituye el lugar de unión del grupo acilo para el enzima; no obstante, se ha demostrado que también puede contener sustituyentes grandes del nucleófilo. De igual manera, se ha observado que dentro del hueco alternativo se colocan grupos de gran tamaño del alcohol. En la figuras 5.5 se muestran los tres huecos del centro activo de la PSL: el hueco grande (figura 5.5, a), el hueco intermedio (figura 5.5, b) y el hueco alternativo (figura 5.5, c)

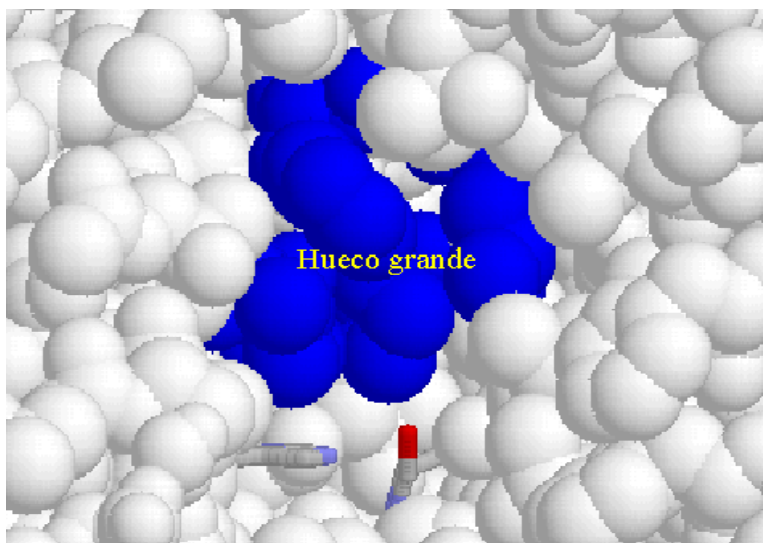


Figura 5.5, a.

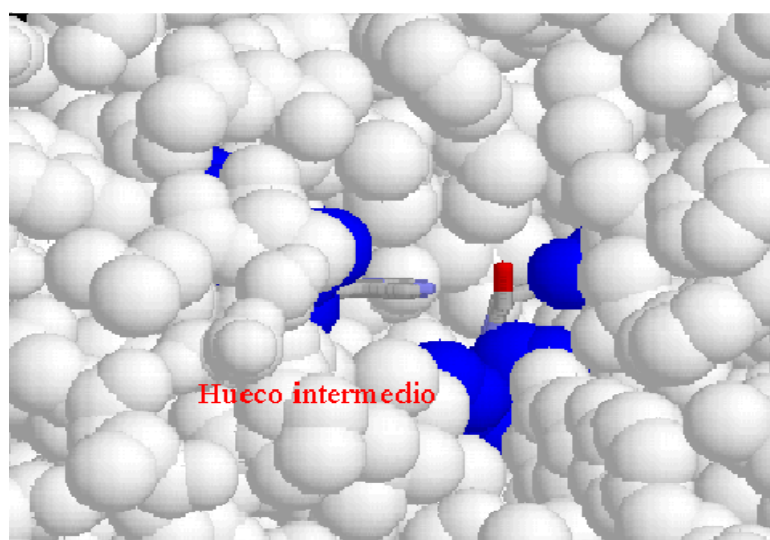


Figura 5.5, b.

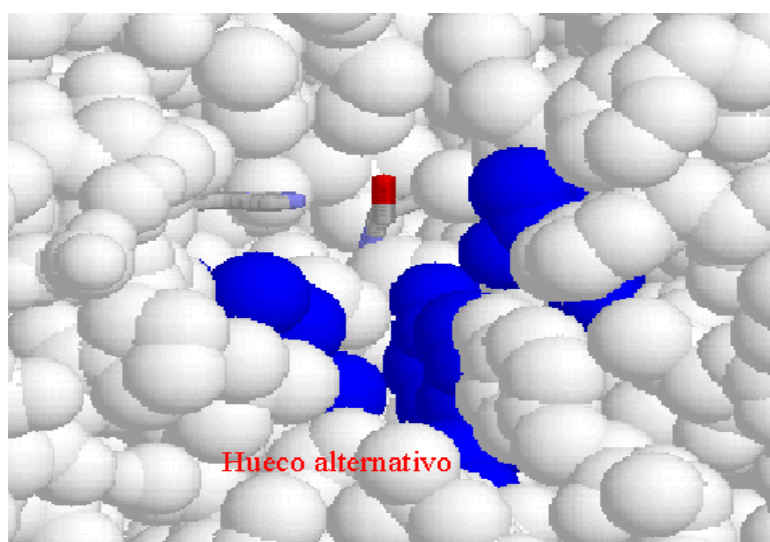


Figura 5.5, c.

Como ya se ha comentado en la introducción de la presente Memoria, la actividad catalítica de la mayoría de las lipasas transcurre a través del mecanismo de las proteasas serínicas (esquema I.4, página 11). En este ciclo catalítico, el ataque del nucleófilo sobre el intermedio acil-enzima genera el *intermedio tetraédrico 2 (IT2)*, sobre el que se van a realizar los estudios de modelización molecular. En la figura 5.6 se muestra dicho intermedio, generado en la reacción de acetilación enzimática de las hidroxicianhidrinas (\pm)-**17a** y (\pm)-**17d** con la PS-C, empleando acetato de vinilo como agente acilante.

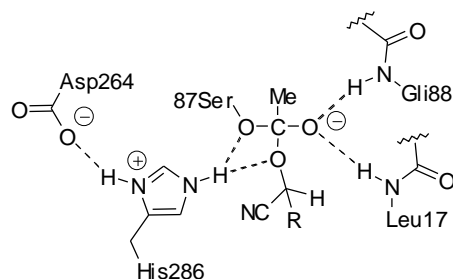


Figura 5.6. El fragmento R corresponde a la cadena alifática de la cianhidrina, bien *O*-acetilada u *O*-tritolada. La numeración de los aminoácidos corresponde a la PSL.

Para realizar el estudio de modelización molecular, el intermedio a minimizar contiene un grupo inhibidor fosfonato en su centro activo (figura 5.7), en lugar del oxianión. Dicho grupo posee un grupo metilo, que se conserva durante los estudios realizados. Además, el grupo cianuro ha sido sustituido por un átomo de cloro.

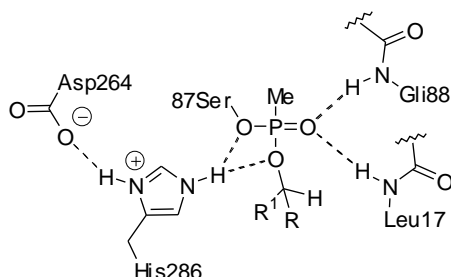


Figura 5.7. Intermedio tetraédrico con el grupo fosfonato utilizado en la modelización molecular.

El grupo fosfonato se encuentra estabilizado por dos puentes de hidrógeno con dos grupos amidas, correspondientes a los aminoácidos leucina y glicina. La histidina presenta dos enlaces de hidrógeno con los oxígenos de la serina y de la clorhidrina unida al grupo fosfonato. La tríada catalítica se completa con el puente de hidrógeno existente entre el resto aspartato y la histidina. El mantenimiento de estos puentes de hidrógeno es fundamental para la actividad del biocatalizador. Las diferencias de enantioselectividad observadas en la resolución de las cianhidras (\pm)-**17a** y (\pm)-**17d** dependen en gran medida de la formación de estos enlaces por puente de hidrógeno en el *IT2*.

Para realizar el estudio sobre el intermedio tetraédrico generado en la reacción de acetilación enzimática sobre la cianhidrina (\pm)-**17d**, en primer lugar se efectuaron las minimizaciones sobre el fragmento P-O-CHRR¹, siendo R¹= H y el fragmento R= Et. Una vez minimizado este fragmento, se realizan sobre aquel que posee R¹= H, mientras que R= (CH₂)₄OCH₃. Posteriormente, se introducen los tres grupos fenilo en la cianhidrina, por lo que R= (CH₂)₄OCPH₃, permaneciendo R¹= H. Incluida la cadena principal de la cianhidrina, se realizan las minimizaciones sobre **17d** sustituyendo en el carbono quiral el átomo de hidrógeno R¹ por un átomo de cloro, para generar los dos enantiómeros posibles, *R* o *S*.

En el caso de la cianhidrina *O*-acetilada (\pm)-**17a**, inicialmente se analiza el fragmento con R= Et y R¹= H. Posteriormente, se incluye toda la cadena de la cianhidrina y se realizan las minimizaciones (R= (CH₂)₄OCOCH₃; R¹= H). Finalmente, se introduce en el carbono quiral del átomo de cloro, permitiéndonos realizar las últimas minimizaciones sobre cada uno de los enantiómeros generados.

5.2.6.2. Estado de transición para el (*S*)-2-hidroxi-5-tritiloxipentanonitrilo, (*S*)-**17d**.

En la figura 5.8 se muestra la mejor de las estructuras encontradas para el intermedio formado en la acetilación de (*S*)-**17d**. En ella se observa como se sitúa la molécula de cianhidrina en el centro activo de la lipasa. La cadena alifática está colocada en el hueco del nucleófilo apuntando hacia el hueco alternativo. Parte del grupo tritilo se encuentra alojado en este hueco, mientras que el resto se expone hacia el disolvente. El metilo se aloja en el hueco del acilo, mientras que el oxianión realiza los enlaces por puentes de hidrógeno necesarios para la catálisis.

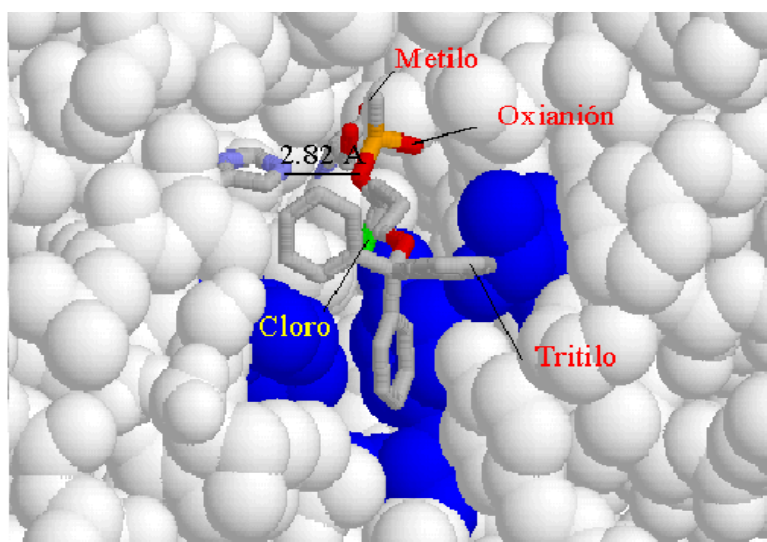


Figura 5.8.

En la figura 5.9 se observan las distancias obtenidas entre los heteroátomos entre los que se forman los enlaces por puente de hidrógeno necesarios para la catálisis. Para estos casos, normalmente se considera una buena distancia aquella que es menor de 3.3 Å. Como se puede observar, para el enantiómero (*S*)-**17d** todas ellas se encuentran dentro del rango óptimo, por lo que se puede considerar que esta es estructura apropiada para la catálisis.

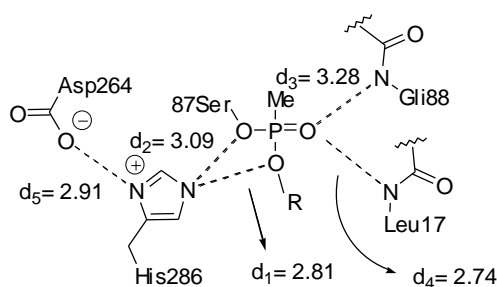


Figura 5.9.

5.2.6.3. Estado de transición para el (*R*)-2-hidroxi-5-tritiloxipentanonitrilo, (*R*)-**17d**.

En el caso del enantiómero *R*, la mejor estructura presenta una conformación muy similar a la encontrada para el enantiómero *S*. Sin embargo, en este caso el átomo de cloro se coloca muy próximo al aminoácido de leucina que realiza el puente de hidrógeno con el oxianión, obligando al hidrógeno unido al carbono quiral a situarse muy cerca de la histidina de la tríada catalítica. Por ello, este aminoácido se distancia del oxígeno del nucleófilo, como se observa en la figura 5.10.

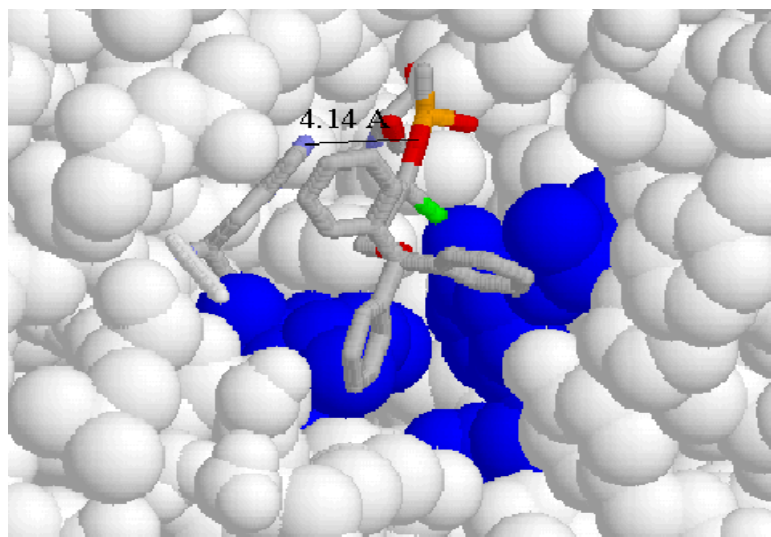


Figura 5.10.

La distancia de enlace entre el átomo de nitrógeno de la histidina y el oxígeno de la cianhidrina que está unido al fosfonato presenta un valor excesivo (4.14 Å), como se muestra en la figura 5.11, por lo que la transferencia del protón entre dichos átomos, necesaria para la catálisis, se encuentra impedida. Esta estructura es, por lo tanto, mucho peor que la mostrada para el enantiómero *S*.

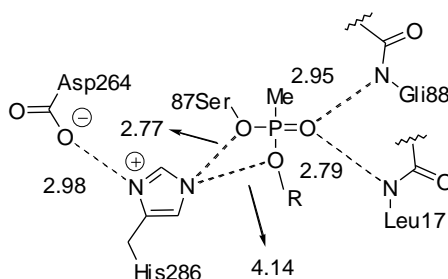


Figura 5.11.

Así, en el caso del análogo al sustrato (\pm)-**17d**, los estudios de modelado molecular establecen que el proceso de acetilación enzimático está mucho más favorecido para el enantiómero *S* que para el *R*, debido a que en este último no se forma un enlace por puente de hidrógeno fundamental en el ciclo catalítico. La diferente reactividad que presentan los dos enantiómeros explica el porqué de la alta enantioselectividad obtenida en esta resolución.

5.2.6.4. Estado de transición para el (*S*)-5-acetoxi-2-hidroxipentanitrilo, (*S*)-**17a**.

La mejor estructura minimizada para el enantiómero *S* de la cianhidrina *O*-acetilada se observa en la figura 5.12. En ella, la cadena alifática se reparte entre los huecos intermedio y del acilo. El menor tamaño de la cianhidrina *O*-acetilada con respecto a la *O*-tritolada provoca que adopte esta conformación en el centro activo de la PSL.

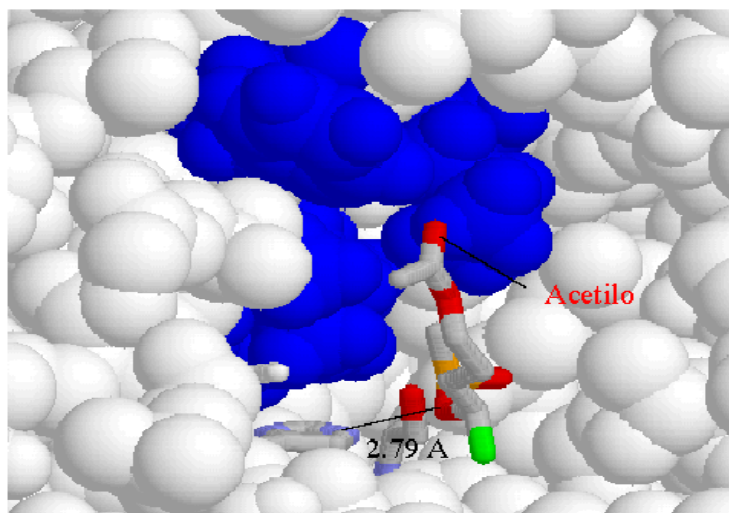


Figura 5.12.

Como se puede observar en la figura 5.13, todas las distancias de enlace obtenidas para la conformación minimizada presentan los valores adecuados para que se establezcan los puentes de hidrógeno esenciales en la catálisis, por lo que se ha conseguido una estructura correcta.

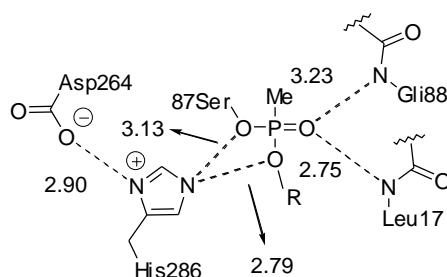


Figura 5.13.

5.2.6.5. Estado de transición para el (*R*)-5-acetoxi-2-hidroxipentanitrilo, (*R*)-17a.

La estructura minimizada obtenida para este enantiómero se presenta en la figura 5.14. La cadena alifática adopta una disposición distinta a la del enantiómero *S*. En este caso, se dispone dentro del hueco alternativo de la lipasa, permitiendo de esta manera que los sustituyentes del carbono quiral no causen impedimentos estéricos con el aminoácido de histidina, por lo que así se conservan todos los puentes de hidrógeno.

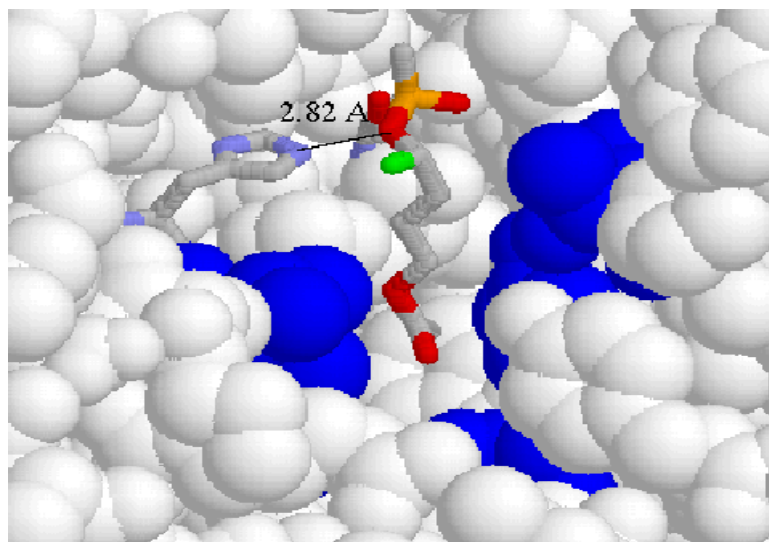


Figura 5.14.

Como se puede apreciar en la figura 5.15, todas las distancias de enlaces obtenidas para esta conformación muestran la existencia de todos los enlaces por puentes de hidrógeno, lo que explica la buena reactividad de este enantiómero.

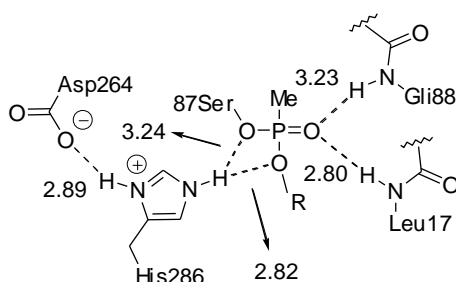


Figura 5.15.

En el caso del compuesto (\pm)-**17a**, las estructuras minimizadas para cada uno de los enantiómeros indican la existencia de todos los enlaces por puente de hidrógeno. Por tanto, ambos enantiómeros van a ser capaces de reaccionar en el proceso de acetilación enzimática, con lo que la enantiodiscriminación del enzima es mucho menor que en el caso de la cianhidrina *O*-tritolada, donde la acetilación del enantiómero *R* está desfavorecida.

5.3. CONCLUSIONES

En el presente capítulo se ha analizado la reacción de acetilación enzimática sobre diversas hidroxicianhidrinas ω -O-protegidas, empleando lipasas como biocatalizadores.

En todos los casos estudiados, se acetila preferentemente el enantiómero S, considerando el grupo nitrilo como grupo pequeño, pero de mayor prioridad que el alquilo. Estos resultados están en consonancia con lo predicho por la regla de Kazlauskas.

El grupo protector tiene una influencia notable tanto en la actividad como en la selectividad de las acetilaciones realizadas. Así, las resoluciones con acetato de vinilo a 30°C sobre las hidroxicianhidrinas O-acetiladas y O-benzoliladas presentan en todas las condiciones probadas muy bajas enantioselectividades. En el caso del sustrato O-protegido con el grupo metoximetilo, es posible conseguir selectividades con valores cercanos a 20, realizando las reacciones en tolueno con los biocatalizadores PS-C y CAL-A. Finalmente, en la reacción de acetilación con acetato de vinilo en tolueno a 30°C sobre el 2-hidroxi-5-tritiloxipentanonitrilo, se obtienen excelentes selectividades con la CAL-A ($E=72$) y con la PS-C ($E=125$), mientras que con la CAL-B, el proceso es muy poco selectivo. Las resoluciones sobre este sustrato son ligeramente más lentas que con el resto de cianhidrinas utilizadas, posiblemente debido a factores estéricos.

Cuando se realizan las reacciones de acetilación enzimática sobre las cianhidrinas de 6 y 7 miembros O-tritiladas, los valores de enantioselectividad obtenidas son menores que en el caso del 2-hidroxi-5-tritiloxipentanonitrilo. Esta disminución es especialmente importante con la CAL-A, mientras que con la PS-C se logran valores de E superiores a 50.

Finalmente, se han llevado a cabo estudios de modelado molecular para explicar la distinta enantiodiscriminación observada en la acetilación catalizada por la PS-C sobre el 5-acetoxi-2-hidroxipentanonitrilo y el 2-hidroxi-5-tritiloxipentanonitrilo. En el caso de esta última, las minimizaciones llevadas a cabo sobre análogos de intermedios del proceso biocatalítico, muestran que el enantiómero R no forma un puente de hidrógeno necesario para la catálisis. Por ello, su reacción está desfavorecida frente al enantiómero S, siendo ésta la causa de la elevada discriminación observada. En el caso de la cianhidrina O-acetilada, las minimizaciones para ambos enantiómeros muestran estructuras que presentan todos los enlaces por puentes de hidrógeno. La reacción de acetilación está favorecida para los dos intermedios estudiados, por lo que el enzima no es capaz de discriminar entre los dos enantiómeros, obteniéndose por tanto bajas enantioselectividades.

5.4. PARTE EXPERIMENTAL

5.4.1. TÉCNICAS INSTRUMENTALES Y REACTIVOS DE USO GENERAL

Cromatografía de gases (GC)

Los análisis mediante cromatografía de gases se realizaron con un aparato Hewlett packard 6890 Series con una columna de relleno quiral RtβDexse (30 m x 0.25 mm; Restek). La temperatura del inyector es de 250 °C y la del detector de llama es de 270°C.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para la determinación del exceso enantiomérico mediante HPLC se emplearon las columnas de relleno quiral Chirobiotic T (250 x 0.46 mm, Astec) y Chiralcel OD (25 x 0.46 cm, Daicel). En todos los casos, la detección se llevó a cabo con un detector de fotodiodos SP-M10A a 215 nm. El resto de técnicas experimentales de análisis y determinación estructural empleadas, así como los reactivos utilizados en este capítulo, se encuentran descritos en la parte experimental del capítulo 1.

5.4.2. MODELIZACIÓN MOLECULAR.

La modelización de los análogos de los estados de transición se realizó empleando la versión 2.9.7 del Discover (Biosym/ MSI, San Diego, CA). Para las minimizaciones de Mecánica Molecular se utilizó un campo de fuerzas AMBER. Los resultados de modelización, construcción y minimización se procesaron con una plataforma *Insight II*, versión 2000.1 (Biosym/ MSI, San Diego, CA)

Los estudios se realizaron considerando un entorno con ausencia total de disolvente, para ello se fijó como 4.0 el valor de la constante dieléctrica dependiente de la distancia. La estructura cristalina de rayos X 3LIP para la lipasa PS-C, se obtuvo del Brookhaven Protein Data Bank (PDB). Esta estructura presenta un inhibidor en el centro activo del enzima, el cual debe ser eliminado manualmente para relajar el enzima libre, asegurándonos que presenta todos los enlaces de hidrógeno esenciales para la catálisis. Las moléculas de agua, junto con todos los iones relevantes presentes en la estructura cristalina, fueron utilizados para crear el mejor entorno de disolventes durante los cálculos. Se ajustó el pH de manera que el residuo de His286 estuviese protonado.

Sobre cada uno de los fragmentos analizados, las minimizaciones se llevaron a cabo en varias etapas. En primer lugar, se fija la conformación del enzima y se permite al sustrato acomodarse en el interior del centro activo. Dicha minimización se realiza sistemáticamente utilizando gradientes paso a paso (*steepest*) y conjugados (*conjugate*). A continuación se permite el movimiento libre del sustrato y de las cadenas laterales del enzima, permaneciendo la cadena principal de éste fija. De nuevo, las minimizaciones se realizan paso a paso y conjugadas. Finalmente, se permite la libertad completa de movimientos de todo el enzima, repitiéndose los dos gradientes para su minimización. Con este procedimiento, se evita cualquier cambio drástico en la estructura del enzima, debido a la incorporación del sustrato y de cada componente adicional. En todos los casos, la estructura completa se minimiza hasta que la desviación RMS es menor de 0.005 Å mol⁻¹.

5.4.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS Y DATOS EXPERIMENTALES.

5.4.3.1. Síntesis de (±)-5-acetoxi-2-hidroxi-pentanonitrilo, (±)-17a.

Se disuelve el (±)-2,5-dihidroxi-pentanonitrilo, (±)-12 (4.3 mmol, 1 equiv) en 40 mL de *tert*-butilmetiléter, en presencia de tamiz molecular de 4 Å (800 mg). A continuación se adiciona acetato de vinilo (21.2 mmol, 5 equiv.) y se deja reaccionar el sistema mediante agitación orbital a 40 °C durante 5 días. Posteriormente, se filtra la reacción sobre celita, lavando con *tert*-butilmetiléter. El disolvente se evapora a sequedad y el crudo obtenido se purifica por cromatografía en columna sobre gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla hexano/acetato de etilo 1:1.

5.4.3.2. Síntesis de (±)-5-benzoiloxi-2-hidroxi-pentanonitrilo, (±)-17b.

En un bulbo bajo atmósfera inerte se disuelve el (±)-2,5-dihidroxicianhidrina, (±)-12 (4.3 mmol, 1 equiv.) en 20 mL de CH₂Cl₂ y a continuación se adicionan a temperatura ambiente piridina (5.2 mmol, 1.2 equiv.) y cloruro de benzoilo (5.2 mmol, 1.2 equiv.). El sistema se deja reaccionar durante 12 horas. Una vez concluida la reacción, se lava varias veces con HCl 2.0 N. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando como eluyente una mezcla Et₂O/CH₂Cl₂ 8:2.

5.4.3.3. Síntesis de (±)-2-hidroxi-5-(metoxi)metoxipentanonitrilo, (±)-17c.

Se añade en un bulbo bajo atmósfera de nitrógeno la hidroxicianhidrina (±)-12 (4.8 mmol, 1 equiv.), 12 mL de CH₂Cl₂ y diisopropiltilamina (11.9 mmol, 2.5 equiv.). El sistema se enfría a 0°C y se adiciona gota a gota el cloruro de metoximetilo (5.7 mmol, 1.2 equiv.). Transcurridos 15 minutos, la reacción se calienta a reflujo durante 8 horas. Una vez terminada, se añade HCl 3.0 N hasta alcanzar pH 1-2 (seguimiento con papel indicador de pH) y se extrae con CH₂Cl₂ (4 x 25 mL). La fase orgánica se lava con agua (3 x 50 mL) para reducir su acidez, se seca sobre Na₂SO₄ y se evapora el disolvente a presión reducida. El crudo de reacción se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente una mezcla CH₂Cl₂/diel éter 95:5.

5.4.3.4. Síntesis de (±)-5-tritiloxi-2-hidroxi-pentanonitrilo, (±)-17d.

Sobre una disolución bajo atmósfera inerte de hidroxicianhidrina (±)-12 (6.5 mmol, 1 equiv.) en piridina (30 mL), se añade cloruro de tritilo (7.8 mmol, 1.2 equiv.). El sistema se deja reaccionar durante 14 horas a 75°C. Una vez concluida la reacción, se lleva a temperatura ambiente y se evapora el disolvente bajo presión reducida. El crudo de reacción se purifica mediante cromatografía en columna de gel de sílice, usando como fase móvil una mezcla hexano/acetato de etilo 8:2.

5.4.3.5. Síntesis de (±)-6-tritiloxi-2-hidroxi-hexanonitrilo, (±)-19.

El procedimiento sintético es el mismo al descrito en el apartado anterior. La reacción concluye a las 14 horas y el crudo se purifica por cromatografía en columna, empleando como eluyente una mezcla hexano/acetato de etilo 8:2.

5.4.3.6. Procedimiento general para la resolución enzimática de hidroxicianhidrinas *O*-protegidas con lipasas.

En un erlenmeyer bajo atmósfera inerte se mezcla la correspondiente hidroxicianhidrina (0.3 mmol, 1 equiv.) con acetato de vinilo (1.5 mmol, 5 equiv.) en una suspensión de las lipasas CAL-A (60 mg), CAL-B (60 mg), PS-C (60 mg), PSL (90

mg) o PPL (150 mg) en el disolvente correspondiente (12 mL). La mezcla de reacción se mantiene a 30°C y a una velocidad de agitación orbital de 250 r.p.m., siguiendo su transcurso por cromatografía en capa fina. Una vez concluido el proceso, se separa el enzima por filtración, lavando varias veces con CH₂Cl₂. El disolvente se evapora a vacío y los componentes del crudo de reacción se separan por cromatografía en columna de gel de sílice empleando como eluyente una mezcla CH₂Cl₂/éter dietílico 95:5 para la resolución de las hidroxicianhidrinas **17a** y **17c**, hexano/acetato de etilo 7:3 para la cianhidrina **17b** y una mezcla hexano/acetato de etilo 8:2 para los compuestos **13c**, **17d** y **19**.

5.4.3.7. Procedimiento general de acetilación química de las hidroxicianhidrinas *O*-protegidas para la determinación de sus excesos enantioméricos.

En un bulbo bajo atmósfera de nitrógeno se disuelve la correspondiente hidroxicianhidrina (0.20 mmol, 1 equiv.) en CH₂Cl₂ (2 mL). A continuación se adiciona piridina (0.24 mmol, 1.2 equiv.) y anhídrido acético (0.24 mmol, 1.2 equiv.). El sistema se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. Una vez finalizada la reacción, se lava varias veces con HCl 2.0. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ y se evapora el disolvente a presión reducida. Las hidroxicianhidrinas acetiladas así obtenidas pueden analizarse sin necesidad de etapa de purificación.

5.4.3.8. Desprotección del 5-benzoiloxi-2-hidroxi-5-pentanonitrilo, **13b.**

Sobre una disolución del compuesto **17b** (0.91 mmoles, 1 equiv.) en metanol (6 mL), se adicionan 2 mL de una disolución de NaOH al 1.0%. El sistema se agita a temperatura ambiente, siguiendo el transcurso de la reacción por TLC. Una vez que se observa una apreciable formación de la cianhidrina **12**, se adiciona HCl 2.0 N hasta pH ligeramente ácido. El producto se extrae en continuo durante 12 horas con CH₂Cl₂, se seca la fase orgánica sobre Na₂SO₄ y se evapora el disolvente a presión reducida. Finalmente, la purificación se lleva a cabo mediante cromatografía en columna, utilizando como eluyente una mezcla dietil éter/CH₂Cl₂ 8:2.

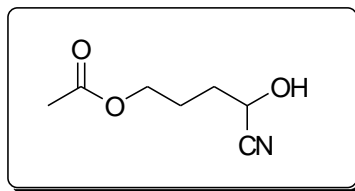
5.4.3.9. Desprotección de 2-hidroxi-5-(metoxi)metoxipentanonitrilo, **17c.**

Sobre una disolución de la cianhidrina **17c** (0.62 mmol, 1 equiv.) en 5 mL de isopropanol, se adicionan aproximadamente 0.25 mL de una disolución de HCl 6.0 N. El sistema se agita a 50°C durante 10 horas. Una vez concluida la reacción, el sistema se lava varias veces con una disolución acuosa de NaCl al 10% (3 x 10 mL). La fase acuosa se extrae en continuo con CH₂Cl₂ durante 12 horas, se seca la fase orgánica sobre Na₂SO₄ y se evapora el disolvente bajo presión reducida. La hidroxicianhidrina **12** se purifica mediante cromatografía en columna, utilizando como eluyente una mezcla CH₂Cl₂/dietil éter 95:5.

5.4.3.10. Desprotección de las hidroxicianhidrinas *O*-tritoladas **17d y **19**.**

Se disuelve la correspondiente hidroxicianhidrina *O*-tritolada (0.1 mmol, 1 equiv.) en una mezcla de CH₂Cl₂ (1.0 mL) y HCl 2.0 N (1.5 mL). El sistema se agita a temperatura ambiente durante 20 horas. Una vez concluida la reacción, se extrae en continuo con CH₂Cl₂ durante 12 horas, se seca la fase orgánica sobre Na₂SO₄ y se evapora el disolvente bajo presión reducida. Las correspondientes hidroxicianhidrina **12** se obtiene tras cromatografía en columna de gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla CHCl₃/metanol 8:1

(±)-5-Acetoxy-2-hidroxipentanonitrilo, (±)-17a



Aceite incoloro

Rendimiento: 73%

Fórmula molecular: C₇H₁₁NO₃

Peso molecular (g/mol): 157.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3417, 2963, 2244, 1730, 1442, 1254.

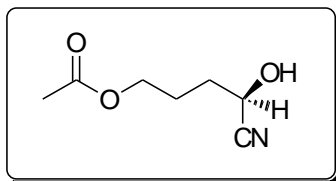
E.M. (ESI⁺) m/z (%): 180 [(M+Na)⁺, 100], 158 [(M+H)⁺, 2]

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.99-2.07 (m, 4H, 2CH₂), 2.26 (s, 3H, CH₃), 2.81 (sa, 1H, OH), 4.33 (t, 2H, CH₂O, ³*J*_{HH} 6.1), 5.31 (t, 1H, CHOH, ³*J*_{HH} 6.2).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm): 21.3 (CH₃), 25.7 (CH₂), 33.6 (CH₂), 61.7 (CH), 65.3 (CH₂), 122.1 (C≡N), 173.3 (C=O).

Anal. Elemental (%): Calculado para C₇H₁₁NO₃: C, 57.49; H, 7.05; N, 8.91. Encontrado: C, 57.3; H, 7.2; N, 9.1.

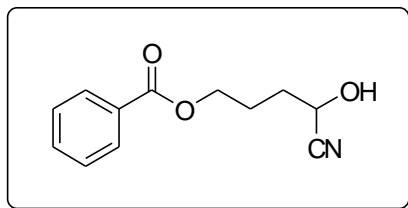
(R)-5-Acetoxy-2-hidroxipentanonitrilo, (R)-17a



Exceso enantiomérico= 57%.

[α]_D¹⁸= +7.5 (c=1.36, EtOH).

(±)-2-Benzoiloxi-5-hidroxipentanonitrilo, (±)-17b



Aceite incoloro

Rendimiento: 64%.

Fórmula molecular: C₁₂H₁₃NO₃

Peso molecular (g/mol): 219.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3421, 3073, 2942, 2246, 1717, 1601, 1434, 1268.

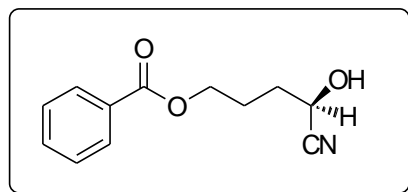
E.M. (ESI⁺) m/z (%): 258 [(M+K)⁺, 53], 242 [(M+Na)⁺, 100], 220 [(M+H)⁺, 20]

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 2.03-2.12 (m, 4H, 2CH₂), 3.41 (sa, 1H, OH), 4.41 (t, 2H, CH₂O, ³*J*_{HH} 5.8), 4.60 (t, CHOH, ³*J*_{HH} 6.1), 7.46 (t, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.6), 7.57 (t, 1H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.6), 8.04 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.6, ⁴*J*_{HH} 1.4).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm): 23.9 (CH₂), 31.7 (CH₂), 60.6 (CH), 63.8 (CH₂), 119.5 (C≡N), 128.3 (CH_{arom}), 129.4 (CH_{arom}), 129.6 (C_{arom}), 133.1 (CH_{arom}), 166.7 (C=O).

Anal. Elemental (%): Calculado para C₁₂H₁₃NO₃: C, 65.74; H, 5.98; N, 6.39. Encontrado: C, 65.9; H, 5.8; N, 6.6.

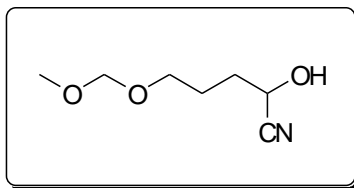
(R)-5-Benzoiloxi-2-hidroxipentanonitrilo, (R)-17b



Exceso enantiomérico= 66%.

[α]_D¹⁸= +3.8 (c=1.44, EtOH).

 (±)-2-Hidroxi-5-(metoxi)metoxipentanonitrilo, (±)-**17c**



Aceite incoloro

Rendimiento: 59%

Fórmula molecular: C₇H₁₃NO₃

Peso molecular (g/mol): 159.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3390, 2951, 2247, 1445, 1215.

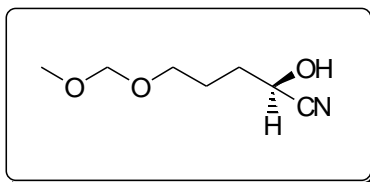
E.M. (ESI⁺) m/z (%): 198 [(M+K)⁺, 12], 182 [(M+Na)⁺, 100], 160 [(M+H)⁺, 2]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm): 1.86-2.09 (m, 4H, 2CH₂), 3.39 (s, 3H, CH₃), 3.58-3.69 (m, 2H, CH₂O), 4.18 (s, 1H, OH), 4.54-4.60 (m, 1H, CHOH) 4.67 (s, 2H, OCH₂O).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm): 24.9 (CH₂), 32.7 (CH₂), 55.3 (CH₃), 60.8 (CH), 66.7 (CH₂), 96.2 (CH₂), 119.7 (C≡N).

Anal. Elemental (%): Calculado para C₇H₁₃NO₃: C, 52.82; H, 8.23; N, 8.80. Encontrado: C, 53.0; H, 8.1; N, 8.7.

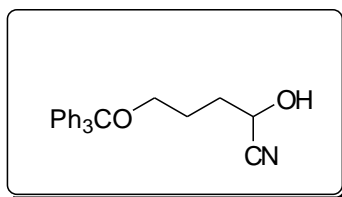
 (R)-2-Hidroxi-5-(metoxi)metoxipentanonitrilo, (R)-**17c**



Exceso enantiomérico= 63%.

[α]_D¹⁸= +9.2 (c=1.02, EtOH).

(±)-2-Hidroxi-5-tritiloxipentanonitrilo, (±)-17d



Sólido blanco.

Rendimiento: 67%

Fórmula molecular: C₂₄H₂₃NO₂

Peso molecular (g/mol): 357.

Punto de fusión (°C): 84.2-86.0 °C.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3430, 3019, 2928, 2239, 1596, 1489, 1448, 1217.

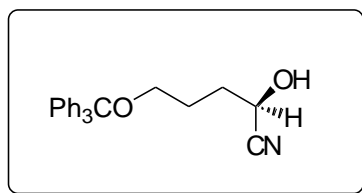
E.M. (ESI⁺) m/z (%): 396 [(M+K)⁺, 19], 380 [(M+Na)⁺, 100], 358 [(M+H)⁺, 2]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.80-2.04 (m, 4H, 2CH₂), 3.03-3.14 (m, 1H, CHH-O), 3.28-3.35 (m, 1H, CHH-O), 3.92 (d, 1H, OH, ³*J*_{HH} 10.2), 4.47-4.57 (t, 1H, CHOH), 7.26-7.38 (m, 9H, 9CH_{arom}), 7.42-7.50 (m, 6H, 6CH_{arom}).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm): 25.2 (CH₂), 33.2 (CH₂), 61.1 (CH), 63.2 (CH₂), 87.6 (C), 119.7 (C≡N), 127.1 (CH_{arom}), 127.9 (CH_{arom}), 128.4 (CH_{arom}), 143.4 (C_{arom}).

Anal. Elemental (%): Calculado para C₂₄H₂₃NO₂: C, 80.64; H, 6.49; N, 3.92. Encontrado: C, 80.5; H, 6.6; N, 4.0.

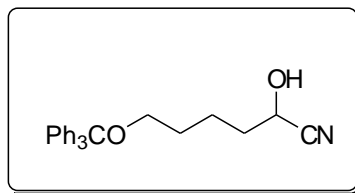
(R)-2-Hidroxi-5-tritiloxipentanonitrilo, (R)-17d



Exceso enantiomérico= 91%.

[α]_D¹⁸= +7.0 (c=0.98, EtOH).

(±)-2-Hidroxi-6-tritiloxihexanonitrilo, (±)-19



Sólido blanco.

Rendimiento: 62%

Fórmula molecular: C₂₅H₂₅NO₂

Peso molecular (g/mol): 371

Punto de fusión (°C): 87.4-88.8 °C

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3437, 3058, 2979, 2248, 1596, 1490, 1448, 1218.

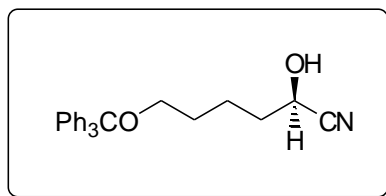
E.M. (ESI⁺) m/z (%): 394 [(M+Na)⁺, 100], 372 [(M+H)⁺, 5]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.60-1.72 (m, 4H, 2CH₂), 1.77-1.87 (m, 2H, CH₂), 2.42 (d, 1H, OH, ³*J*_{HH} 11.8), 3.11 (t, 2H, CH₂O, ³*J*_{HH} 5.9), 4.44 (dd, 1H, CHOH, ³*J*_{HH} 6.6, ³*J*_{HH} 11.8), 7.24-7.39 (m, 9H, 9CH_{arom}), 7.43-7.51 (m, 6H, 6CH_{arom}).

¹³C-RMN (CDCl₃, 50.3 MHz), δ (ppm): 21.3 (CH₂), 29.1 (CH₂), 34.8 (CH₂), 61.2 (CH), 62.8 (CH₂), 86.4 (C), 119.7 (C≡N), 126.9 (CH_{arom}), 127.7 (CH_{arom}), 128.5 (CH_{arom}), 144.1 (C_{arom}).

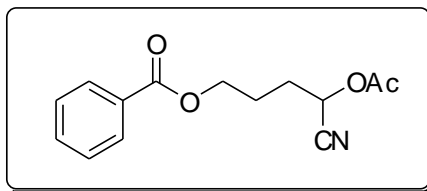
Anal. Elemental (%): Calculado para C₂₅H₂₅NO₂: C, 80.83; H, 6.78; N, 3.77. Encontrado: C, 81.0; H, 7.0; N, 3.7.

(R)-2-Hidroxi-6-tritiloxihexanonitrilo, (R)-19



Exceso enantiomérico= 82%.

[α]_D¹⁸ = +5.0 (c=1.15, EtOH).

(±)-2-Acetoxi-5-benzoiloxipentanonitrilo, (±)-18b

Aceite incoloro

Rendimiento: 90%.

Fórmula molecular: C₁₄H₁₅NO₄

Peso molecular (g/mol): 261.

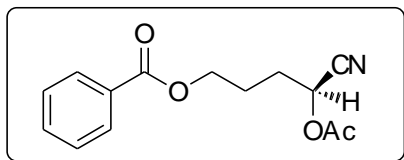
I.R. (KBr, cm⁻¹): 3020, 2942, 2246, 1753, 1714, 1622, 1454, 1215.

E.M. (ESI⁺) m/z (%): 300 [(M+K)⁺, 21], 284 [(M+Na)⁺, 100], 262 [(M+H)⁺, 5]

¹H-RMN (CDCl₃, 300 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.93-2.05 (m, 2H, CH₂), 2.07-2.16 (m, 2H, CH₂), 2.19 (s, 3H, CH₃), 4.41 (t, 2H, CH₂O, ³*J*_{HH} 6.0), 5.43 (t, 1H, CHO, ³*J*_{HH} 6.2), 7.48 (t, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.4), 7.60 (t, 1H, CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.4), 8.06 (dd, 2H, 2CH_{arom}, ³*J*_{HH} 7.4, ⁴*J*_{HH} 1.4).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm): 20.2 (CH₃), 24.0 (CH₂), 29.2 (CH₂), 60.6 (CH), 63.4 (CH₂), 116.4 (C≡N), 128.3 (CH_{arom}), 129.7 (CH_{arom}), 129.7 (C_{arom}), 130.1 (CH_{arom}), 166.3 (C=O), 169.0 (C=O).

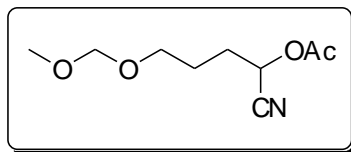
Anal. Elemental (%): Calculado para C₁₄H₁₅NO₄: C, 64.36; H, 5.79; N, 5.36. Encontrado: C, 64.5; H, 5.6; N, 5.4.

(S)-2-Acetoxi-5-benzoiloxipentanonitrilo, (S)-18b

Exceso enantiomérico= 65%.

[α]_D¹⁸= -9.0 (c=0.83, MeOH).

(±)-2-Acetoxi-5-(metoxi)metoxipentanonitrilo, (±)-18c



Aceite incoloro

Rendimiento: 87%

Fórmula molecular: C₉H₁₅NO₃

Peso molecular (g/mol): 201.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 2947, 2251, 1752, 1436, 1215.

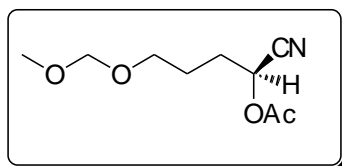
E.M. (ESI⁺) m/z (%): 224 [(M+Na)⁺, 100], 202 [(M+H)⁺, 15]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.75-1.88 (m, 2H, CH₂), 2.00-2.11 (m, 2H, CH₂), 2.16 (s, 3H, CH₃), 3.37 (s, 3H, CH₃), 3.59 (t, 2H, CH₂O, ³*J*_{HH} 5.9), 4.62 (s, 2H, CH₂), 5.41 (t, 1H, CHO, ³*J*_{HH} 6.7).

¹³C-RMN (CDCl₃, 75.4 MHz), δ (ppm): 19.9 (CH₃), 24.3 (CH₂), 29.1 (CH₂), 54.8 (CH₃), 60.4 (CH), 65.8 (CH₂), 95.9 (CH₂), 116.3 (C≡N), 168.7 (C=O).

Anal. Elemental (%): Calculado para C₉H₁₅NO₃: C, 53.72; H, 7.51; N, 6.96.
Encontrado: C, 53.7; H, 7.4; N, 7.0.

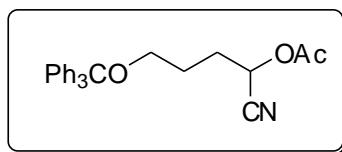
(S)-2-Acetoxi-5-(metoxi)metoxipentanonitrilo, (S)-18c



Exceso enantiomérico= 78%.

[α]_D¹⁸ = -29.0 (c=0.94, MeOH).

(±)-2-Acetoxy-5-tritiloxipentanonitrilo, (±)-18d



Sólido higroscópico.

Rendimiento: 91%

Fórmula molecular: C₂₆H₂₅NO₃

Peso molecular (g/mol): 399.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3022, 2934, 2240, 1756, 1596, 1490, 1448, 1220.

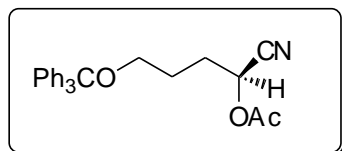
E.M. (ESI⁺) m/z (%): 438 [(M+K)⁺, 60], 422 [(M+Na)⁺, 100], 400 [(M+H)⁺, 2]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.78-1.84 (m, 2H, CH₂), 1.97-2.07 (m, 2H, CH₂), 2.14 (t, 3H, CH₃), 3.17 (m, 2H, CH₂O, ³*J*_{HH} 6.0), 5.33 (t, 1H, CHO, ³*J*_{HH} 6.4), 7.26-7.37 (m, 9H, 9CH_{arom}), 7.42-7.47 (m, 6H, 6CH_{arom}).

¹³C-RMN (CDCl₃, 50.3 MHz), δ (ppm): 20.8 (CH₃), 25.1 (CH₂), 29.5 (CH₂), 60.9 (CH), 62.1 (CH₂), 86.6 (C), 116.7 (C≡N), 127.1 (CH_{arom}), 127.8 (CH_{arom}), 128.5 (CH_{arom}), 143.9 (C_{arom}), 169.0 (C=O).

Anal. Elemental (%): Calculado para C₂₆H₂₅NO₂: C, 78.17; H, 6.31; N, 3.51. Encontrado: C, 78.0; H, 6.6; N, 3.4.

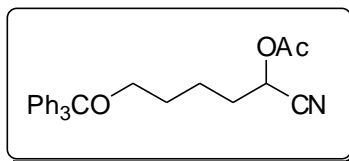
(S)-2-Acetoxy-5-tritiloxipentanonitrilo, (S)-18d



Exceso enantiomérico= 96%.

[α]_D¹⁸ = -22.4 (c=1.28, MeOH).

(±)-2-Acetoxi-6-tritiloxihexanonitrilo, (±)-20



Sólido higroscópico.

Rendimiento: 85%

Fórmula molecular: C₂₇H₂₇NO₂

Peso molecular (g/mol): 413.

I.R. (KBr, cm⁻¹): 3058, 2933, 2241, 1753, 1596, 1490, 1448, 1219.

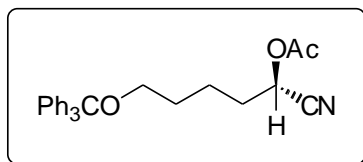
E.M. (ESI⁺) m/z (%): 452 [(M+K)⁺, 12], 436 [(M+Na)⁺, 100]

¹H-RMN (CDCl₃, 200 MHz), δ (ppm), *J* (Hz): 1.58-1.72 (m, 4H, 2CH₂), 1.83-1.90 (m, 2H, CH₂), 2.14 (s, 3H, CH₃), 3.11 (t, 2H, CH₂O, ³*J*_{HH} 5.9), 5.31 (t, 1H, CHO, ³*J*_{HH} 6.7), 7.24-7.37 (m, 9H, 9CH_{arom}), 7.41-7.52 (m, 6H, 6CH_{arom}).

¹³C-RMN (CDCl₃, 50.3 MHz), δ (ppm): 20.5 (CH₃), 21.5 (CH₂), 29.1 (CH₂), 32.1 (CH₂), 61.0 (CH), 62.7 (CH₂), 85.5 (C), 116.9 (C≡N), 127.0 (CH_{arom}), 127.8 (CH_{arom}), 128.7 (CH_{arom}), 144.2 (C_{arom}), 169.2 (C=O).

Anal. Elemental (%): Calculado para C₂₇H₂₇NO₂: C, 78.42; H, 6.58; N, 3.39.
Encontrado: C, 78.2; H, 6.7; N, 3.3.

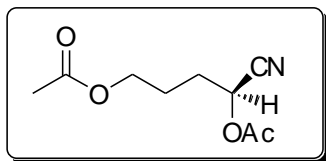
(S)-2-Acetoxi-6-tritiloxihexanonitrilo, (S)-20



Exceso enantiomérico= 93%.

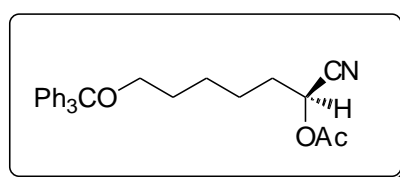
[α]_D¹⁸= -20.8 (c=0.95, MeOH).

(*S*)-2,5-Diacetoxipentanonitrilo, (*S*)-**15**



Exceso enantiomérico= 63%.
 $[\alpha]_D^{18}$ = -33.9 (c=0.90, MeOH).

(*S*)-2-Acetoxi-7-tritiloheptanonitrilo, (*S*)-**16c**



Exceso enantiomérico= 95%.
 $[\alpha]_D^{18}$ = -26.6 (c=1.17, MeOH).