

## Nuevas Aplicaciones de la L-Serina Hidroximetiltransferasa y la Benzaldehído Liasa en Síntesis Orgánica

Karel Hernández Sánchez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència <u>Reconeixement- CompartIgual 3.0. Espanya de Creative Commons</u>.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia <u>Reconocimiento - Compartirlgual 3.0. España de</u> <u>Creative Commons.</u>

This doctoral thesis is licensed under the <u>Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0. Spain License.</u>





# Nuevas Aplicaciones de la L-Serina Hidroximetiltransferasa y la Benzaldehído Liasa en Síntesis Orgánica.

Instituto de Química Avanzada de Cataluña (IQAC). Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Programa de Biotecnología.

Karel Hernández Sánchez 2014

# INSTITUTO DE QUÍMICA AVANZADA DE CATALUÑA-CSIC UNIVERSIDAD DE BARCELONA Facultad de Farmacia

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular Programa de Doctorado de Biotecnología

## Nuevas Aplicaciones de la L-Serina Hidroximetiltransferasa y la Benzaldehído Liasa en Síntesis Orgánica.

Memoria presentada por Karel Hernández Sánchez para optar al Título de Doctor por la Universidad de Barcelona

Dirigida por: Tutora:

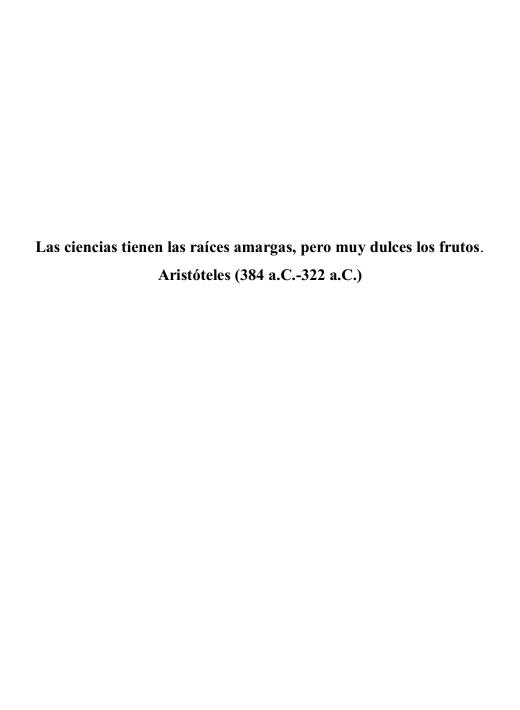
Dr. Pere Clapés Saborit Dra. Josefa Badía Palacín

Dr. Jordi Bujons Vilàs

Doctorando:

Karel Hernández Sánchez

Karel Hernández Sánchez 2014



#### Agradecimientos

Quisiera en esta sección agradecer a todas aquellas personas que a lo largo de estos años estuvieron presentes de muchas maneras durante el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Pere Clapés, por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación. A los Dres. Jordi Bujons y Jesús Joglar por toda la ayuda recibida durante estos años. A Pepita Badía, por todo el apoyo en el sin fin de trámites a realizar.

A todos mis compañeros del laboratorio.

Y finalmente y no por último menos importante, a mi madre, por cuidarme y darme amor y apoyo incondicional. También a mi tía Olga, porque fue el muro afectivo y económico donde apoyarnos en los momentos difíciles.

#### Sumario

Las enzimas son importantes aliados en la síntesis de complejas moléculas orgánicas. Estos biocatalizadores ofrecen una elevada quimio, regio y estereoselectividad. Esto hace que se minimize la formación de subproductos por reacciones competitivas no deseadas y se obtienen, por lo general, productos con una elevada pureza estereoquímica. Una especial atención, por sus aplicaciones en Química Orgánica, han recibido las enzimas que median la formación de enlaces C-C. Estas liasas catalizan la síntesis de moléculas complejas muchas de las cuales poseen variadas actividades biológicas. Debido al enorme potencial de este campo de investigación en esta tesis se desarrollan nuevas aplicaciones sintéticas de dos C-C liasas: la L-serina hidroximetiltransferasa de *Streptoccocus thermophilus* (SHMT<sub>Sth</sub>) y la benzaldehído liasa de *Pseudomonas fluorescens* biovar I (BAL). Para ello este estudio se ha dividido en 3 apartados:

**Apartado 3.1**. Se muestra el diseño de nuevas variantes de la SHMT<sub>Sth</sub> que catalizan la síntesis de β-hidroxi- $\alpha$ , $\alpha$ -dialquil- $\alpha$ -aminoácidos. Utilizando la ingeniería de proteínas y un diseño semirracional se incrementó la selectividad de la SHMT<sub>Sth</sub> nativa hacia otros sustratos diferentes de la Gly. Por medio de esta metodología se encontraron tres variantes de la enzima, Y55T, Y55C y Y55S que catalizaron la adición aldólica de D-Ala y D-Ser a diferentes aldehídos. La SHMT<sub>Sth</sub> Y55T resultó ser el biocatalizador más activo y permitió sintetizar β-hidroxi- $\alpha$ , $\alpha$ -dialquil- $\alpha$ -aminoácidos con una elevada estereoselectividad (> 95%).

**Apartado 3.2**. En este apartado se describe como se acoplan las potencialidades sintéticas de una enzima tiamin dependiente con dos aldolasas a través de dos etapas químicas sencillas en la síntesis de *C*-

arilmonosacáridos. La primera reacción enzimática consistió en la adición benzoínica cruzada entre varios aldehídos aromáticos y el dimetoxiacetaldehído catalizado por BAL. Esta reacción alcanzó conversiones superiores al 95 % y se realizó en un sistema tampón: MTBE (1:1 v/v) donde el producto se separó en la fase orgánica y se utilizó directamente en la siguiente etapa de síntesis. Posteriormente se redujeron las (R)-1-aril-2-hidroxi-3,3-dimetoxipropan-1-onas con una elevada diastereoselectividad utilizando NaBH<sub>4</sub> en MTBE (diol anti ≥ 90 %). A continuación se hidrolizó el grupo acetal en medio ácido (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M) y los (2S,3S)-3-aril-2,3-dihidroxipropanal obtenidos fueron utilizados en reacciones de adición aldólicas con diferentes sustratos dadores: dihidroxiacetona (DHA), hidroxiacetona (HA) y glicolaldehído (GO), catalizadas por D-fructosa-6-fosfato aldolasa (FSA) y sus variantes A129S y A129T respectivamente. Esto permitió sintetizar derivados de L-sorbosa (DHA), 1-desoxi-L-sorbosa (HA) y Lxilosa (GO). También se realizó la reacción de adición aldólica de DHA a los dihidroxialdehídos en tampón borato catalizado por Lramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA). Por medio de esta reacción se obtuvieron análogos de L-fructosa y L-tagatosa.

**Apartado 3.3** En esta sección se describe la adición benzoínica intramolecular catalizada por BAL, reacción no descrita hasta el momento. Con la síntesis de varios dialdehídos aromáticos se encontraron los requerimientos estructurales del sustrato que permitieron que la enzima catalizara la reacción de carboligación intramolecular. De los posibles sustratos ensayados el 2,2'-(propano-1,3-diilbis(oxi))dibenzaldehído permitió sintetizar el ciclo (*R*)-15-hidroxi-7,8-dihidro-6*H*-dibenzo[*f,j*][1,5]dioxacicloundecen-14(15*H*)-ona como único productos en la reacción enzimática con conversiones

superiores al 75 %. A partir de aquí se sintetizaron otros dialdehídos con los que se obtuvieron análogos de 7,8,14,15-tetrahidro-6*H*-dibenzo[*f,j*][1,5]dioxacicloundeceno. De este estudio se determinó que la BAL cataliza reacciones de adición benzoínica intramolecular de aldehídos aromáticos unidos por una cadena espaciadora, propano-1,3-oxi, en posición 2,2′. La enzima también toleró sustituciones en posición 3,3′y 5,5′ del anillo aromático así como dialdehídos derivados de la piridina.

Todos los productos descritos en esta tesis fueron purificados y caracterizados por técnicas de RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSQC, NOESY 1D selectivos, NOESY y HMBC). Cuando no fue posible determinar la estereoquímica utilizando las <sup>3</sup>J(<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H) o los efectos nOe se cristalizaron los compuestos y se analizó la configuración por difracción de rayos X. Todos los resultados aparecen en el material suplementario electrónico.

### Índice

Abreviaturas utilizadas con mayor frecuencia
INTRODUCCIÓN21
1.1 Enzimas
1.2 Enzimas en Síntesis Orgánica. Estrategias para la optimización de las
reacciones enzimáticas
1.2.1 Ingeniería del medio de reacción
1.2.2 Efectos de los solventes orgánicos
1.2.3 Efectos de la temperatura
1.2.4 Efectos del pH
1.2.5 Ingeniería de sustratos
1.2.6 Ingeniería de proteínas
1.2.6a Diseño racional
1.2.6b Evolución dirigida
1.2.6c Diseño semirracional
1.3 Liasas (EC 4.x.x.x)
1.3.1 L-Serina hidroximetiltransferasa
1.3.2 Benzaldehído liasa
1.3.3 D-Fructosa-6-fosfato aldolasa
1.3.4 L-Ramnulosa-1-fosfato aldolasa
1.4 Aplicaciones y síntesis de α,α -dialquil-α-aminoácidos73
1.5 Aplicaciones y síntesis de <i>C</i> -arilmonosacáridos
OBJETIVOS81
2.1 Objetivos generales
2.2 Objetivos particulares
2.2.1 Síntesis enzimática de $\alpha$ , $\alpha$ -dialquil- $\alpha$ -aminoácidos utilizando L-serina
hidroximetiltransferasa de Streptococcus thermophilus modificada por
ingeniería de proteínas

2.2.2 Desarrollo de una estrategia quimio-enzimática en la síntesis de C
arilmonosacáridos utilizando benzaldehído liasa de Pseudomona.
fluorescens biovar I, D-frutosa-6-fosfato aldolasa y L-ramnulosa-1-fosfato
aldolasa de <i>E. coli</i> 84
2.2.3 Adición benzoínica intramolecular catalizada por benzaldehído liasa
de Pseudomonas fluorescens biovar I. Nuevas aplicaciones de
biocatalizador en síntesis orgánica85
Resultados y Discusión87
3.1.1 Modificación por Ingeniería de Proteínas de la L-serina
hidroximetiltransferasa de Streptococcus thermophilus: Incremento de la
actividad hacia D-Ala y D-Ser como sustratos dadores
3.1.2 Caracterización de las variantes Y55T, Y55C y Y55S de SHMT <sub>Sth</sub> 98
3.1.3 Estudio de las condiciones del medio de reacción en la adición
aldólica catalizada por SHMT <sub>Sth</sub> Y55T107
3.1.3.1 Efecto de la naturaleza y concentración del solvente orgánico 108
3.1.3.2 Efecto de la relación molar entre los reaccionantes
3.1.3.3 Efecto de la concentración de cofactor añadido a la reacción 112
3.1.3.4 Efecto del pH
3.1.3.5 Efecto de la concentración de enzima
3.1.4 Síntesis de α,α-dialquil-α-aminoácido y su caracterización
estructural. 115
3.1.4.1 Determinación de la estereoquímica de los productos derivados de
Gly
3.1.4.2 Determinación de la estereoquímica de los productos derivados de
D-Ala
3.1.4.3 Determinación de la estereoquímica de los productos derivados de
D-Ser
3.1.5 Resumen. 132
3.2.1 Síntesis quimio-enzimática de C-arilmonosacáridos utilizando
benzaldehído liasa de Pseudomonas fluorescens biovar I, D-frutosa-6
fosfato aldolasa y L-ramnulosa-1-fosfato aldolasa de <i>E. coli</i>

3.2.2 Estudio de la adición benzoínica cruzada de aldehídos aromáticos al
dimetoxiacetaldehído catalizado por BAL
3.2.2.1 Efecto de la relación molar $6:5t$ en la formación de $(R)$ -2-hidroxi-1-
(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3,3-dimetoxipropan-1-ona (8t) catalizado por
BAL148
3.2.2.2 Efecto de la concentración de biocatalizador en la formación de $(R)$ -
$2\text{-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3,3-dimetoxipropan-1-ona} \ (\textbf{8t}) \dots 1500000000000000000000000000000000000$
3.2.2.3 Efecto de la concentración de dimetoxiacetaldehído en la formación
de (R)-2-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3,3-dimetoxipropan-1-ona
(8t) catalizado por BAL
3.2.3 Síntesis de (R)-1-aril-2-hidroxi-3,3-dimetoxipropan-1-ona catalizado
( <b>8</b> ) por BAL
3.2.4 Síntesis de (1 $S$ ,2 $S$ )-1-aril-3,3-dimetoxipropano-1,2-diol (10) 159
3.2.5 Síntesis de $(2S,3S)$ -3-aril-2,3-dihidroxipropanal $(11)$
3.2.6 Síntesis de C-arilmonosacáridos catalizado por D-frustosa-6-fosfato
aldolasa (FSA) y L-ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA) de $E.coli$ 167
3.2.6.1 Síntesis de $(6S)$ -6- $C$ -aril- $\alpha$ -L-sorbopiranosas $(12)$ catalizado por
FSA A129S
3.2.6.2 Síntesis de $(6S)$ -1-desoxi-6- $C$ -aril- $\alpha$ -L-sorbopiranosas (13)
catalizado por FSA nativa
3.2.6.3 Síntesis de $(5S)$ -5- $C$ -aril- $\alpha/\beta$ -L-xilopiranosas (14) catalizado por
FSA A129T
3.2.6.4 Síntesis de (6S)-6-C-aril-L-fructosa (15) y (6S)-6-C-aril-L-tagatosa
(16) catalizado por RhuA
3.2.7 Resumen
3.3.1 Reacciones intramoleculares catalizadas por benzaldehído liasa de
Pseudomonas fluorescens biovar I (BAL)
3.3.2 Síntesis de nuevos aldehídos bifuncionales y su estudio en la reacción
benzoínica intramolecular catalizada por BAL
3.3.3 Resumen. 207

Conclusiones
4.1 Síntesis enzimática de α,α-dialquil-α-aminoácidos utilizando L-serina
hidroximetiltransferasa de Streptococcus thermophilus modificada por
ingeniería de proteínas
4.2 Desarrollo de una estrategia quimio-enzimática en la síntesis de C
arilmonosacáridos utilizando benzaldehído liasa de Pseudomonas
fluorescens biovar I, D-frutosa-6-fosfato aldolasa y L-ramnulosa-1-fosfato
aldolasa de <i>E. coli.</i>
4.3 Adición benzoínica intramolecular catalizada por benzaldehído liasa de
Pseudomonas fluorescens biovar I. Nuevas aplicaciones del biocatalizador
en síntesis orgánica.
Sección experimental215
5.1 Reactivos
5.2 Material biológico
5.2.1 Microorganismos. 217
5.2.2 Plásmidos
5.2.3 Oligonucleótidos
5.2.4 Medios de cultivo
5.3 Análisis por HPLC. 219
5.4 Construcción de las diferentes variantes de la SHMT <sub>Sth</sub>
5.4.1 Construcción de la librería de variantes de SHMT <sub>Sth</sub> (Y55X) y su
evaluación en la reacción de adición aldólica de D-Ser a
(benciloxi)acetaldehído.
5.5 Clonación del gen <i>bal</i> en el plásmido pQE60223
5.5.1 Amplificación del gen bal a partir del plásmido pKK233-2/bal 223
5.5.2 Digestión del ADN con endonucleasas de restricción
5.5.3 Ligación del ADN (clonación del gen bal en pQE60)
5.6 Expresión y purificación de proteínas
5.6.1 Expresión y purificación de la SHMT <sub>sth</sub> y sus variantes
5.6.2 Expresión y purificación de la BAL
5 6 3 Expresión y purificación de la ESA y sus variantes

5.6.4 Expresión y purificación de RhuA
5.7 Determinación de la actividad enzimática de los diferentes
biocatalizadores
5.7.1 Determinación de la actividad treonina aldolasa de la SHMT $_{sth}$ 230
5.7.2 Determinación de la actividad ligasa de la BAL230
5.7.3 Determinación de la actividad de la FSA
5.7.4 Determinación de la actividad de la RhuA
5.8 Determinación de la masa molecular de las variantes de SHMT <sub>sth</sub> Y55T,
Y55C y Y55S
5.9 Métodos computacionales: Modelaje molecular
5.10 Adiciones aldólicas catalizadas por SHMT $_{\mathit{Sth}}$ y sus variantes234
5.10.1 Reacciones a escala analítica
5.10.2 Síntesis y purificación de los productos de adición aldólica
catalizado por SHMT <sub>Sth</sub> y sus variantes
5.10.3 Determinación de la estereoquímica de los productos obtenidos en la
adición aldólica de Gly, D-Ala y D-Ser a varios aldehídos catalizado por
SHMT <sub>Sth</sub> Y55T y la enzima nativa
5.11 Síntesis de $(R)$ -1-aril-2-hidroxi-3,3-dimetoxipropan-1-ona $(8)$
catalizado por BAL
5.12 Síntesis de (1S,2S)-1-aril-3,3-dimetoxipropan-1,2-diol ( <b>10</b> )
5.12.1 Síntesis y purificación del $(1S,2R)$ y $(1S,2S)$ -3,3-dimetoxi-1-
fenilpropan-1,2-diol (9 y 10)
$5.12.2$ Síntesis de $(4S,\!5R)$ y $(4S,\!5S)$ -4-(dimetoximetil)-5-fenil-1,3-dioxalan-
2-ona ( <b>S9a</b> y <b>S10a</b> )
5.12.3 Síntesis de (1S,2S)-1-aril-3,3-dimetoxipropan-1,2-diol (10) 264
5.13 Síntesis de (2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> )-3-aril-2,3-dihidroxipropanal ( <b>11</b> )
5.14 Síntesis de (6S)-6-C-aril-L-sorbosas (12). Procedimiento general 265
5.15 Síntesis de (6S)-1-desoxi-6-C-aryl-L-sorbosas (13). Procedimiento
general. 271
5.16 Síntesis de las (5S)-5-aril-L-xilosas (14). Procedimiento general 273

ona ( <b>22</b> )
5.19.4 Síntesis enzimática de (R)-2-hidroxi-1,2-bis(2-hidroxifenil) etan-1-
catalizado por BAL
5.19.3 Síntesis de benzoinas a partir de los dialdehídos 17bb y 17bc
5.19.2 Reacción de adición benzoínica intramolecular catalizada por BAL.
5.19.1 Reacciones a escala analítica
5.19 Reacciones de adición benzoínica catalizada por BAL
reacción de adición benzoínica intramolecular catalizada por BAL 285
5.18 Síntesis química de dialdehídos ensayados como sustratos en la
Procedimiento general. 282
5.17 Síntesis de (6S)-6-aril-L-fructosa (15) y (6S)-6-aril-L-tagatosa (16).

#### ABREVIATURAS UTILIZADAS CON MAYOR FRECUENCIA

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

BAL: Benzaldehído Liasa de Pseudomonas fluorescente biovar I.

Cbz: Benciloxicarbonil.

**DHA**: Dihidroxiacetona.

DHAP: Dihidroxiacetona fosfato.

**DMF**: Dimetilformamida

**DMSO**: Dimetilsulfóxido.

EC: Número de la Comisión de Enzimas (Enzyme Commission

Number).

ee: Exceso enantiomérico.

**FSA**: D-Fructosa 6-fosfato aldolasa de *Escherichia coli*.

**GO**:Glicolaldehído.

**HA**: Hidroxiacetona.

**HPLC**: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia.

IBX: Ácido 2-iodoxibenzoico

**IPTG**: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido.

**MSHMT**: α-Metilserina hidroximetiltransferasa

MTBE: tert-butilmetiléter.

nOe: Nuclear Overhauser effect.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

**PLP**: Fosfato de piridoxal.

RhuA: L-Ramnulosa-1-fosfato aldolasa de Escherichia coli.

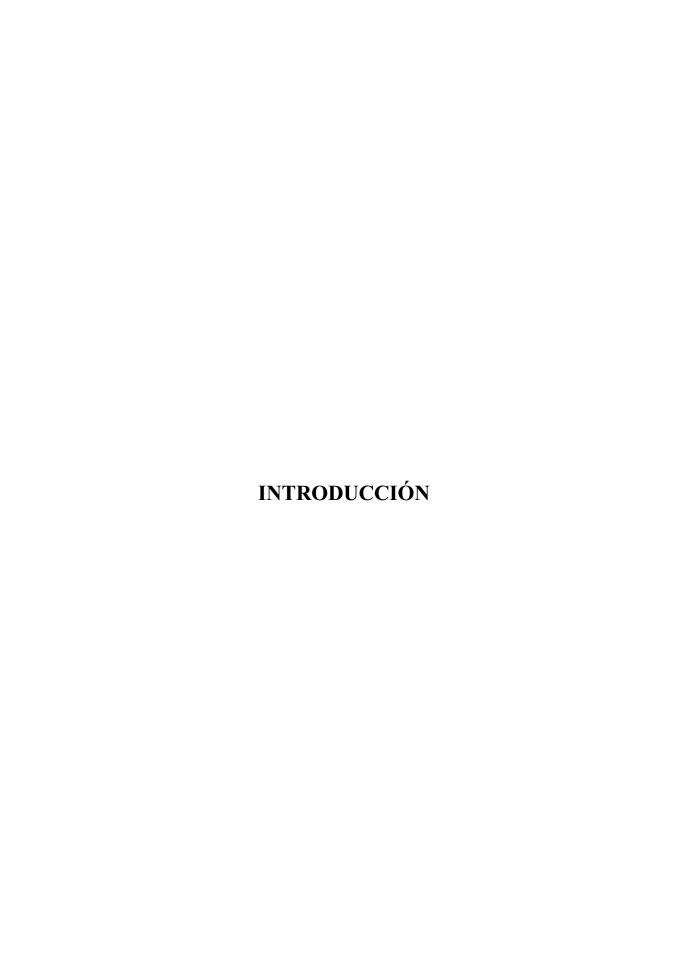
RMN: Resonancia Magnética Nuclear

SHMT<sub>Sth</sub>: L-Serina hidroximetiltransferasa de Streptococcus thermo-

philus.

TA: Treonina aldolasa.

**ThDP**: Pirofosfato de tiamina.



#### 1.1 Enzimas.

La vida se sustenta por un conjunto de reacciones químicas acopladas y reguladas (metabolismo). Estas reacciones requieren ser catalizadas para que ocurran a una velocidad que permita la dinámica celular de cualquier ser vivo.

Los catalizadores biológicos o biocatalizadores son conocidos como enzimas (del griego ενζυμον "en levadura"). Estas moléculas son proteínas con una compleja estructura terciaria y cuaternaria determinada por su secuencia primaria de aminoácidos, 1,2 aunque actualmente se conoce que algunos tipos de ARN también tienen actividad catalítica. 3,4,5 El plegamiento de la cadena polipeptídica estructura una región conocida como centro activo, en cuyo entorno tiene lugar la catálisis. 2

En el centro activo de las enzimas ocurre la estabilización preferencial del estado de transición. Esto explica los enormes incrementos de velocidad de reacción con respecto al proceso no catalizado, del orden de 10<sup>6</sup> a 10<sup>12</sup>, a temperaturas de alrededor de 37 °C, presión atmosférica y pH cercanos a la neutralidad. Como ejemplo significativo encontramos la orotidina-5`-monofosfato descarboxilasa (EC 4.1.1.23), enzima que incrementa la velocidad de la reacción en un orden de 10<sup>23</sup> siendo el biocatalizador más eficiente hasta el momento. <sup>2</sup>

En el centro activo las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos como: Asp, Glu, His, Cys, Ser, Tyr o Lys pueden actuar como catalizadores ácido-base generales o nucleófilos. <sup>7-9</sup> Es común encontrar también iones metálicos que facilitan la catálisis al apantallar cargas electrostáticas o comportarse como ácidos de Lewis. <sup>10-12</sup> Estos grupos ven afectada su reactividad debido al microentorno donde se localizan o a cambios de solvatación que aparecen al unirse el sustrato al centro

activo. Así se altera la constante dieléctrica del medio, lo que afecta el pKa de los grupos catalíticos, las interacciones electrostáticas, los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas. También durante la catálisis enzimática se controla la orientación espacial del sustrato a través de las interacciones con los residuos de aminoácidos en el centro activo, alcanzándose una elevada quimio, regio y estereoselectividad en la reacción. 17

Algunas enzimas requieren moléculas adicionales, de naturaleza no proteica, para poder actuar como catalizadores (cofactor). Los cofactores pueden ser iones metálicos, moléculas orgánicas con estructuras más o menos complejas o una combinación de ambos. La forma de la enzima, libre de cofactor, se conoce como apoenzima. La unión de la apoenzima con su cofactor origina la forma activa del biocatalizador denominada holoenzima.<sup>18</sup>

# 1.2 Enzimas en Síntesis Orgánica. Estrategias para la optimización de las reacciones enzimáticas.

Las enzimas pueden ser clasificadas, según el tipo de reacción que catalizan, en: oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. Varios miembros de estas familias de enzimas han sido utilizados en síntesis orgánica, como por ejemplo:

Introducción.

**Oxidorreductasas** (EC 1.x.x.x). Enzimas que catalizan transferencia de electrones en reacciones de oxidación–reducción. 18,19

Aprepitant (antiemético)

OxiRed, oxidorreductasa de Leifsonia xyli CCTCC M 2010241

**Transferasas** (EC 2.x.x.x). Enzimas que catalizan reacciones de transferencia de un grupo de una molécula a otra. 18,20

**Hidrolasas** (EC 3.x.x.x). Enzimas que catalizan la ruptura de enlaces C-O, C-S, C-N, C-P, C-C por medio de la adición de agua. 18,21

**Liasas** (EC 4.x.x.x) Enzimas que catalizan la ruptura de enlaces C-C, C-O, C-N mediante reacciones diferentes a la oxidación-reducción o hidrólisis. 18,22

Atorvastatina (Inhibidor de la HMGCoA reductasa (EC 1.1.1.34)

**Isomerasas** (EC 5.x.x.x) Enzimas que catalizan reordenamientos intramoleculares (racemasas, epimerasas, *cis-trans* isomerasas, etc.). <sup>18,23</sup>

Rac, racemasa AArac 12996 de Pseudomonas putida BRC12996

**Ligasas** (sintetasas) (EC 6.x.x.x) Enzimas que catalizan la formación de enlaces C-C, C-O, C-S, P-O y C-N acoplado a la hidrólisis de un enlace pirofosfato del ATP u otra molécula análoga. Presentan escasa aplicación en biocatálisis debido a que su actividad está asociada a la hidrólisis de ATP encareciendo su uso. Sin embargo es de destacar la T4 ligasa (EC 6.5.1.1) por sus aplicaciones en Biología Molecular. <sup>18,24</sup> La aplicación de las enzimas en síntesis orgánica está relacionada con su elevada quimio, regio y estereoselectividad que minimiza la

formación de subproductos y reacciones secundarias.<sup>25-27</sup> Además al ocurrir la catálisis en condiciones "suaves de reacción" se evitan también isomerizaciones, racemizaciones, epimerizaciones y reordenamientos, de moléculas lábiles, en comparación con los procesos químicos clásicos. La alta regioselectividad de los biocatalizadores evita pasos tediosos de protección y desprotección de grupos funcionales.<sup>28</sup> Además es posible acoplar varias reacciones enzimáticas sintetizándose productos muy complejos sin necesidad de aislar los intermediarios sintéticos.<sup>29-31</sup>

A pesar de esto las enzimas presentan algunas desventajas que limitan su aplicación extensiva en síntesis orgánica, como son:

- Muchos biocatalizadores se inactivan rápidamente al ser aislados del entorno celular o en el propio medio de reacción (presencia de solventes orgánicos, sales, temperatura, etc.).
- En muchos casos es necesario utilizar cofactores o sistemas para su regeneración. Este punto resulta particularmente problemático en el caso de las oxidorreductasas.
- Pueden aparecen dificultades al utilizar reaccionantes con estructura muy diferente a los sustratos naturales de las enzimas, pudiendo ocurrir una disminución de la actividad enzimática y la quimio, regio y estereoselectividad de la catálisis.<sup>17</sup>
- En ocasiones resulta muy elevado el coste de los procesos de sobreexpresión y purificación de las enzimas.

Actualmente se dispone de varias herramientas para solucionar los problemas relacionados con la implementación de la catálisis enzimática en síntesis orgánica. En modo general de pueden agrupar en tres estrategias: aquellas dirigidas a modificar el entorno que rodea a la enzima (medio de reacción), modificaciones sobre la estructura del

sustrato (ingeniería de sustratos) y las que alteran la propia naturaleza del biocatalizador a través de cambios en su secuencia primaria de aminoácidos (ingeniería de proteínas).

#### 1.2.1 Ingeniería del medio de reacción.

La modificación de los parámetros físico-químicos del medio de reacción permite alterar el curso de los procesos biocatalíticos. Las variables más importantes a modificar son la concentración y naturaleza de solventes orgánicos, la temperatura de la reacción y el pH del medio.

#### 1.2.2 Efectos de los solventes orgánicos.

La adición de solvente orgánico al medio de reacción es necesaria para solubilizar compuestos hidrofóbicos que presentan una baja solubilidad en medio acuoso. Además permite desplazar equilibrios de hidrólisis al disminuir la actividad del agua.

Los sistemas agua-solvente orgánico pueden clasificarse en 3 tipos, dependiendo de la miscibilidad de ambos y la composición del medio. 32,33

Sistema de cosolvente (agua-solvente orgánico miscible). En estos sistemas se aumenta la velocidad de la reacción al disminuir los procesos de transferencia de masa e incrementarse la concentración de sustrato disuelto (importante para enzimas con un elevado valor de  $K_m$ ). En este medio ocurre una rápida inactivación de la enzima al incrementarse la concentración de solvente orgánico. <sup>33</sup>

- Sistema bifásico (agua-solvente orgánico inmiscible). Estos sistemas se presenta en dos fases donde la enzima se encuentra en la fase acuosa y los sustratos y productos, mayoritariamente, en la fase orgánica Esto permite una fácil separación de los productos de la reacción y además disminuye la inhibición por producto de las enzimas, al existir una menor concentración de producto en la fase acuosa. A menudo la velocidad de la reacción enzimática es relativamente lenta por una baja velocidad de transferencia de masa a través de la interfase entre ambos solventes. También ocurre inactivación de la enzima en la interfase entre los solventes.<sup>33</sup>
- Sistema con bajo contenido en agua ( $a_{H2O} < 1$ ). En estos sistemas las enzimas muestra una mayor estabilidad y rigidez conformacional en comparación con los sistemas acuosos. Una mayor rigidez en la estructura de la enzima puede causar modificaciones en su quimio, regio y estereoselectividad.<sup>33</sup>

En la literatura aparecen un gran número de ejemplos donde se utilizan solventes orgánico en el medio de reacción. Así, se describe la glicosilación enzimática de la mangiferina. Esta molécula presenta propiedades antioxidantes, antitumorales y estimuladoras del sistema inmune, pero su aplicación se ve limitada por su baja solubilidad en agua. La glicosilación de la mangiferina se realizó utilizando la β-fructofuranosidasa (EC 3.2.1.26) de *Arthrobacter arilaitensis* NJEM0 con un 20 % (v/v) de DMSO en el medio de reacción. El solvente permitió solubilizar al sustrato y demás moduló el nivel de glicosilación del sustrato por parte de la enzima (**Figura 1.1**).<sup>34</sup>

Introducción.

**Figura 1.1** Glicosilación de la mangiferina catalizada por β-fructofuranosidasa de *Arthrobacter arilaitensis* NJEM0 (β-FFasa).<sup>34</sup>

Los solventes añadidos al medio de reacción pueden causar cambios en la estereoselectividad de las enzimas. La interacción con la capa de solvatación del biocatalizador, así como con los grupos polares y apolares de la cadena polipeptídica causan modificaciones en la estructura tridimensional de las enzimas. Estos efectos pueden ir dirigidos hacia una mejora de las propiedades del biocatalizador. Así, la esterasa de *Arthrobacter* sp. ZJB-09277 mostró un incremento de la estereoselectividad hacia el enantiómero *S* al adicionar DMSO (50 % v/v) en el medio de reacción en la hidrólisis del (*RS*)-3-ciano-5-metilhexanoato de etilo (**Figura 1.2**). 35

**Figura 1.2** Resolución cinética del (*RS*)-3-ciano-5-metilhexanoato de etilo catalizado por la esterasa de *Arthrobacter* sp. ZJB-09277. El ácido (*S*)-3-ciano-5-metilhexanoico es precursor del fármaco pregabalina.<sup>35</sup>

Como se mencionó anteriormente en los sistemas bifásicos la velocidad de la reacción suele estar influenciada por los procesos de transferencia de masa. Una alternativa para solucionar este problema es la formación de emulsiones donde se aumenta el área superficial entre las fases. En nuestro grupo de investigación se utilizó esta estrategia en la adición de dihidroxiacetona fosfato a varios *N*-Cbz-aminoaldehídos cataliza por fructosa-1,6-bifosfato aldolasa (EC 4.1.2.13) de *E. coli*. La enzima mostró un incremento en la conversión de la reacción de 10 veces en sistemas bifásicos emulsionados en comparación con mezclas DMF:agua (1:4 v/v). <sup>36</sup>

Los medios de reacción con bajo contenido en agua son muy utilizados en las reacciones catalizadas por lipasas. En condiciones fisiológicas estas enzimas catalizan reacciones de hidrólisis debido a la elevada actividad del agua en el medio, sin embargo, en sistemas con bajo contenido de agua se pueden dar procesos de síntesis. Como ejemplo tenemos la acilación de la cordicepina (3'-desoxiadenosina). Esta molécula estimula el sistema inmune, pero su aplicación se ve limitada por su rápida degradación en el organismo y su hidrofilicidad que le impide atravesar las membranas biológicas. Por esta razón se utilizó la lipasa B de *Candida antárctica* (CalB) en la acetilación de la cordicepina con acetato de vinilo en 2-metiltetrahidrofurano anhidro (**Figura 1.3**). Esto incrementó la hidrofobicidad de la molécula mejorando su biodisponibilidad.<sup>37</sup>

**Figura 1.3** Reacción de acetilación de la cordicepina catalizada por la lipasa CalB en solvente con bajo contenido en agua.<sup>37</sup> 2-MTHF, 2-metiltetrahidrofurano.

En la actualidad se estudia el desarrollo de nuevos sistema de reacción con solventes menos tóxicos y reutilizables. Es de señalar las reacciones enzimáticas realizadas en líquidos iónicos donde las enzimas muestran una elevada estabilidad y una excelente quimio, regio y estereoselectividad. Además, resultan adecuados para disolver una amplia variedad de sustratos.<sup>38,39</sup>

Otros medios de reacción no convencionales son los fluidos supercríticos. Estos poseen una baja viscosidad y una alta difusibilidad, típica de los gases, además del elevado poder de solubilización de los líquidos. Dentro de estos solventes se utiliza el CO<sub>2</sub> supercrítico por poseer una baja toxicidad, no es inflamable y tiene una baja temperatura crítica. Además se elimina del medio de reacción al despresurizar la muestra a presión atmosférica. 40

En este trabajo la mayoría de los sutratos utilizados son hidrofóbicos, por ello las reacciones enzimáticas se realizarán utilizando DMSO y *tert*-butilmetiléter (MTBE) como cosolventes para garantizar una adecuada solubilización en el medio de reacción.

#### 1.2.3 Efectos de la temperatura.

El perfil de velocidad de una reacción catalizada por enzimas frente a la temperatura indica la acción de fenómenos contrapuestos. Un aumento de la temperatura incrementa la velocidad de la reacción como predice la ecuación de Arrhenius. Después de un determinado valor comienza a predominar la desnaturalización e inactivación del biocatalizador. Consecuentemente, existe una temperatura óptima a la cual las enzimas muestran su máxima actividad catalítica sin que afecte significativamente su inactivación. <sup>1</sup>

La temperatura también modifica la estereoselectividad de una reacción enzimática. En condiciones cinéticas, la formación predominante de un estereoisómero estará determinada por su mayor velocidad dereacción, las cuales están relacionadas con la temperatura a través de la ecuación de Eyring-Polanyi. Existe una temperatura a la cual la enzima no discriminará entre ningún estereoisómero (E (razón enantiomérica) = 1) y por encima o por debajo de ella la reacción será estereoselectiva en mayor o menor grado ( $E \neq 1$ ) (**Figura 1.4**). En condiciones de equilibrio químico la proporción entre ambos estereoisómeros estará determinada por la constante de equilibrio de la reacción.

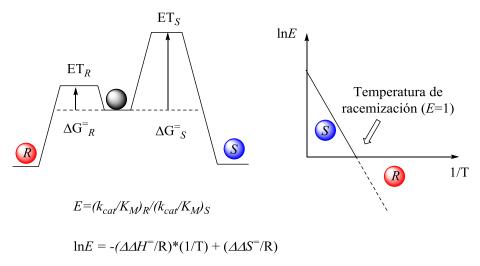
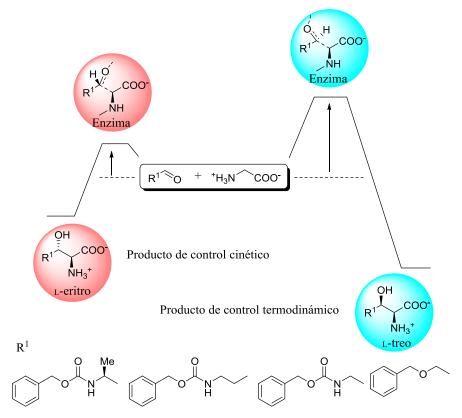


Figura 1.4 Efecto de la temperatura en la estereoselectividad de una reacción enzimática.<sup>41</sup>

Como ejemplo del efecto de la temperatura sobre la estereoselectividad de una enzima tenemos la reacción de oxidación de varios alcoholes catalizado alcohol (EC 1.1.1.1) por deshidrogenasa de Thermoanaerobacter ethanolicus. A temperaturas inferiores a 26 °C la enzima oxida preferentemente al (R)-2-butanol, mientras que a temperaturas superiores el enantiómero S es mejor sustrato. Por otro lado, con el 2-pentanol la temperatura de racemización fue de 60°C. En la oxidación del 2-hexanol la enzima muestra preferencia por el enantiómero S, dado que la temperatura de racemización calculada fue de 240 °C.42

En nuestro grupo de investigación se ha estudiado el efecto de la temperatura sobre la estereoselectividad de la catálisis enzimática. La L-serina hidroximetiltransferasa (EC 2.1.2.1) de *Streptococcus thermophilus* cataliza la formación preferente del estereoisómero L-eritro en la reacción de adición de Gly a diferentes aldehídos a 4 °C. A esta temperatura existe un desbalance entre las velocidades de la

reacción de síntesis y degradación del estereoisómero, favoreciendo su síntesis y acumulación. A 4 °C se forma el producto cinético, pero a medida que se incrementa la temperatura comienza a acumularse el estereoisómero L-treo (producto de control termodinámico). De manera semejante ocurrió con la L-treonina aldolasa (EC 4.1.2.5) de *E. coli* pero con una menor estereoselectividad (**Figura 1.5**).<sup>43</sup>



**Figura 1.5** Síntesis de varios  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -minoácidos catalizado por L-serina hidroximetiltransferasa de *Streptococcus thermophilus*. El diastereómero L-eritro se forma más rápido (producto de control cinético) mientras que en condiciones de equilibrio aparecen mezcla de ambos disterómeros.<sup>43</sup>

## 1.2.4 Efectos del pH.

La presencia de grupos ionizables en el centro activo de las enzimas provoca que sus propiedades catalíticas sean sensibles a las variaciones del pH del medio. Es común encontrar un pH óptimo o un rango de pH donde se alcanza la máxima actividad del biocatalizador. Por lo general a valores de pH extremos las enzimas muestran una rápida inactivación al modificarse la ionización de los grupos que mantienen la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas.<sup>1</sup>

Cambios en el pH no sólo afectan la actividad de una enzima, sino también la reacción a catalizar. Por ejemplo, la glicerol deshidrogenasa (EC 1.1.1.72) de *Gluconobacter oxydans* mostró un rango de pH óptimo de 5,5 a 7,0 para la reducción del gliceraldehído. Sin embargo la reacción de oxidación del glicerol se favorece a pH entre 9,2 y 10,0 (**Figura 1.6**). 44

**Figura 1.6** Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la glicerol deshidrogenasa de *Gluconobacter oxydans*.

La regioselectividad de las enzimas puede ser modificada por variaciones en el pH del medio. Así, la epóxido hidrolasa (EC 3.3.2.3) de *Solanum tuberosum* exhibe un perfil de regioselectividad distinto en la hidrólisis del (2R,3R)-3-fenil-2-metiloxirano, según el pH del medio sea menor o mayor que 8 (**Figura 1.7**).<sup>45</sup>

**Figura 1.7** Variación en el pH modifican la regioselectividad de la epóxido hidrolasa (EH) de *Solanum tuberosum* en la hidrólisis del (2*R*,3*R*)-3-fenil-2-metiloxirano.<sup>45</sup>

Las variaciones del pH también afectan la estereoselectividad de las enzimas. Su comprensión resulta más compleja que el efecto de la temperatura puesto que también influye los grupos ionizables del sustrato<sup>46</sup>. Por ejemplo, la alcohol deshidrogenasa equina no mostró variación en su enantioselectividad, al modificar el pH, en la oxidación del (RS)-2-butanol (E = R/S = 0.26). Sin embargo, la alcohol deshidrogenasa de *Thermoanerobacter ethanolicus*, con el mismo sustrato, duplica la velocidad de oxidación del enantiómero R al disminuir el pH de 9.0 a 5.5.

# 1.2.5 Ingeniería de sustratos.

Variaciones estructurales de grupos sintéticos equivalentes permiten alterar las conversiones o la estereoselectividad de un proceso biocatalítico. Por ejemplo, las reacciones de adición aldólicas de dihidroxiacetona fosfato a 3-aminopropanal *N*-protegidos catalizado

por varias aldolasas mostraron variaciones en los grados de conversión de la reacción según la naturaleza del grupo protector utilizado. Con fenilacetilo (PhAc) y *tert*-butiloxicarbonilo (<sup>t</sup>Boc) las conversiones fueron del 70 % mientras que para el fluoren-9-ilmetoxicarbonilo (Fmoc) la conversión de producto fue del 25 %. <sup>48</sup>

Muchas aldolasas catalizan reacciones donde participan sustratos fosforilados, como la dihidroxiacetona fosfato (DHAP). La síntesis de DHAP por medios enzimáticos requieren ATP como agente fosforilante (**Figura 1.8**)<sup>49</sup>, mientras que su síntesis química se da en varias etapas de reacción (**Figura 1.9**).<sup>50</sup>

HO OH 
$$O$$
 OHAK O OPO $_3$ H $_2$ 

ATP ADP

AK

OHAK

OPO $_3$ H $_2$ 

**Figura 1.8** Estrategia de síntesis enzimática de dihidroxiacetona fosfato a partir de dihidroxiacetona y ATP.<sup>49</sup> DHAK, dihidroxiacetona quinasa (EC 2.7.1.29) de *Citrobacter freundii* y AK, acetato quinasa (EC 2.7.2.1) de *Bacillus subtilis*.

HO OH i EtO O OEt ii, iii EtO O OEt iv 
$$H_2O_3PO$$
 OH

**Figura 1.9** Estrategias de síntesis química de dihidroxiacetona fosfato utilizada en nuestro grupo de investigación. **i**) HC(OEt)<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (cat.). **ii**) ClP(O)(OBn)<sub>2</sub>, piridina. **iii**) H<sub>2</sub>, 50 psi, Pd/C. **iv**) H<sub>2</sub>O/H<sup>+</sup> 65°C (5 h).<sup>50</sup>

La DHAP posee una baja estabilidad química a pH básicos y temperatura ambiente, sufriendo reacciones de eliminación<sup>51</sup>. Además

los productos fosforilados son difíciles de manipular necesitándose pasos adicionales de desfosforilación. Estos inconvenientes limitan el empleo de DHAP como sustrato, sin embargo, es posible evitar su uso al adicionar sales de arseniatos (AsO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) o boratos (B(OH)<sub>4</sub><sup>-</sup>) en el medio de reacción. Dichos aniones forman de manera reversible ésteres con la dihidroxiacetona mimetizando los efectos del grupo fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>). Así, varias aldolasas dependientes de DHAP catalizan la adición aldólica de dihidroxiacetona a diferentes aldehídos aceptores al adicionar arseniatos o boratos en el medio de reacción. <sup>52-54</sup>

Determinadas enzimas catalizan reacciones en las cuales el rendimiento del producto es escaso debido a limitaciones termodinámicas. Los efectos termodinámicos se pueden superar acoplando reacciones paralelas irreversibles que eliminen algún componente de la reacción. Por ejemplo las ω-transaminasas catalizan la transferencia de grupos aminos entre una amina y una cetona (**Figura 1.10**). Los grados de conversión de esta reacción son bajos debido al equilibrio entre reaccionantes y productos y a la inhibición por producto de la enzima. Al utilizar ácido 3-aminociclohexan-1,5-dieno como amina donadora se forma como producto una cetona que sufre una rápida isomerización irreversible a ácido 3-hidroxibenzoico. Por medio de esta estrategia se alcanzan conversiones > 97 % al desplazarse el equilibrio hacia la formación de productos. Además se minimiza la inhibición de la enzima porque no se acumula uno de los productos de la reacción (**Figura 1.10**).<sup>55</sup>

**Figura 1.10** Representación de reacciones de transferencia de grupos aminos catalizada por ω-transaminasa (TAS). Las limitaciones termodinámicas se pueden superar al eliminar una de los productos de la reacción. <sup>55</sup>

Otro ejemplo lo tenemos con la alcohol deshidrogenasa equina. Esta enzima cataliza la reducción de 2-fenil-1-propanal unido a la oxidación del 2-propanol (14 % de conversión). Al utilizar 1,4-butanodiol la conversión es del 99 % debido a la formación de γ-butirolactona. Este producto no sufre reacciones de oxidación-reducción haciendo que la reacción sea irreversible. (**Figura 1.11**).<sup>56</sup>

**Figura 1.11** Reducción de 2-fenil-1-propanal catalizado por alcohol deshidrogenasa equina (ADH). Al utilizando 1,4-butanodiol como cosustrato se obtiene  $\gamma$ -butirolactona desplazándose el equilibrio de la reacción hacia la formación de 2-fenil-1-propanol.

Por último mencionar que la inmovilización de proteínas es otra alternativa para modificar las propiedades de un biocatalizador. En este trabajo no se utiliza esta técnica para alterar las propiedades de las enzimas en síntesis orgánica; sin embargo es destacable mencionar por su importancia y aplicación en biocatálisis. <sup>57,58</sup>

## 1.2.6 Ingeniería de proteínas.

En los inicios de la Biocatálisis sólo era posible utilizar las enzimas existentes en la naturaleza. Los procesos biocatalíticos se adaptaban a las propiedades de los biocatalizadores. Con el advenimiento de la tecnología del ADN recombinante fue posible cambiar la secuencia primaria de las proteínas obteniendo nuevas variantes. En la actualidad las enzimas se modifican en función de los requerimientos particulares de un determinado proceso biocatalítico.

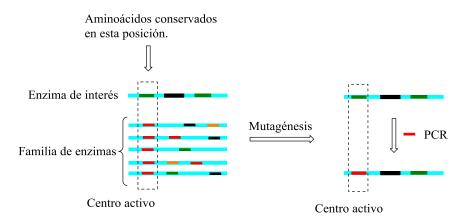
La ingeniería de proteínas puede ser abordada desde tres estrategias diferentes: El diseño racional, la evolución dirigida y el diseño semirracional.

### 1.2.6a Diseño racional.

Para aplicar un diseño racional se requiere tener información estructural de la enzima cuyas propiedades se quiere modificar. A partir de aquí se puede predecir el aminoácido o los aminoácidos que deben ser variados para lograr alterar las propiedades del biocatalizador en la dirección buscada. Como resultado de su aplicación se generan pocas variantes de la enzima que pueden ser fácilmente analizadas y seleccionadas en función de las propiedades catalíticas buscadas. <sup>58,59</sup>

Al diseñar una variante de un biocatalizador hay que tener en cuenta dos aspectos: la posición dentro de la secuencia que se debe modificar y el tipo de modificación a realizar en dicha posición. La comparación de estructuras tridimensionales de enzimas relacionadas permite identificar los aminoácidos responsables de una propiedad (sitio de modificación) y de acuerdo al objetivo final se puede racionalizar el

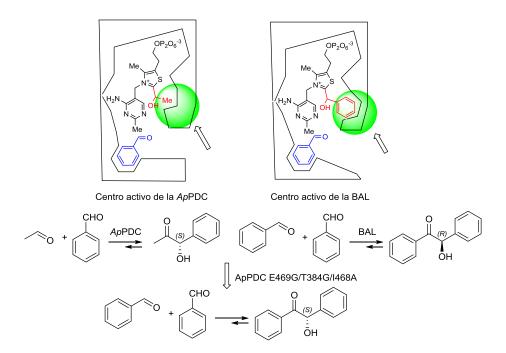
tipo de sustitución adecuada. También, a través del alineamiento de secuencias entre proteínas homólogas se pueden identificar los sitios que deben ser modificados (posiciones conservadas) y el tipo de sustitución (aminoácidos más conservados). (**Figura 1.12**).<sup>59</sup>



**Figura 1.12** Representación de la aproximación guiada por secuencia y estructura. Un aminoácido conservado en una familia de proteínas debe contribuir a las propiedades características para ese grupo de moléculas. Su inserción en otra proteína similar debe imitar estas propiedades en un menor o mayor grado.

Como ejemplo de esta estrategia tenemos la modificación de la selectividad de sustratos de la piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1) de *Acetobacter pasteurianus* (*Ap*PDC). Esta enzima cataliza la adición benzoínica de acetaldehído a benzaldehído formando (*S*)-1-fenil-1-hidroxipropan-2-ona, pudiendo utilizar sólo acetaldehído como sustrato dador (**Figura 1.13**). Por otro lado una enzima con una estructura similar, la benzaldehído liasa (EC 4.1.2.38) de *Pseudomonas fluorescens* biovar I (BAL), cataliza la adición benzoínica entre dos moléculas de benzaldehído formando (*R*)-benzoina (**Figura 1.13**). Al comparar la estructura tridimensional de ambas enzimas se identificaron lo residuos de aminoácidos responsable de conferir

selectividad por el sustrato aceptor. Los aminoácidos en esta región de la estructura de la *Ap*PDC fueron sustituidos por aminoácidos con cadenas laterales menos voluminosas para originar una cavidad que permitiera acomodar a una molécula de mayor tamaño que el acetaldehído. De esta manera se obtuvo la variante *Ap*PDC E469G/T384G/I468A que catalizó la síntesis de (*S*)-benzoina con un 95 % de conversión y un 87 % de *ee* (**Figura 1.13**). 60



**Figura 1.13** Representación del centro activo de la ApPDC y la BAL. Aparece señalado la región que confiere especificidad por el sustrato aceptor. En la variante *Ap*PDC E469G/T384G/I468A se creó una cavidad que permite acomodar la molécula de benzaldehído. Aparece representado el cofactor, pirofosfato de tiamina. En rojo el sustrato dador y en azul los sustratos aceptores. <sup>60</sup>

Con el diseño racional no sólo es posible modificar enzimas ya existentes, sino también crear otras nuevas (diseño *de novo*). Como

ejemplo de esta metodología tenemos el diseño *de novo* de enzimas con actividad retroaldólica. Para ello se construyeron por ordenador uno o más posible estados de transición (ET) de la reacción estabilizados por los grupos presentes en las cadenas laterales de los aminoácidos, definiéndose una "arquitectura" para el ET. En una segunda etapa se identifican los motivos estructurales en proteínas que puedan acomodar dichos ET. De esta manera se diseñó una proteína con actividad retroaldólica que incrementa la velocidad de la reacción en cuatro órdenes de magnitud respecto a la reacción no catalizada. Sin embargo, las enzimas *de novo* presentan una baja eficiencia catalítica (1-100 M<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>), en comparación con las enzimas naturales (10<sup>5</sup>-10<sup>9</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>), necesitándose algoritmos de cálculo más complejos y ordenadores más potentes para el diseño de biocatalizadores que compitan con los creados en la naturaleza.<sup>61</sup>

# 1.2.6b Evolución dirigida.

La evolución dirigida trata de mimetizar en el laboratorio el proceso evolutivo que ocurre en la naturaleza. Presenta como ventaja que no requiere datos estructurales para su realización. Además las sustituciones de aminoácidos quedan distribuidas por toda la secuencia de la proteína pudiendo identificarse residuos distantes del centro activo que pueden influyen en la actividad catalítica, como en el caso de las enzimas alostéricas. <sup>58,59</sup>

Su principal desventaja está relacionada con el tamaño de la librería de clones generada, lo que limita la exploración de toda la diversidad de la secuencia.<sup>59</sup> En el análisis de las librería se utilizan ensayos espectrofotométricos, fluorimétricos o de supervivencia celular para

poder procesar gran cantidad de clones.<sup>62</sup> Esta tarea resulta compleja cuando no se dispone del equipamiento necesario o de un método de selección adecuado.<sup>63</sup>

Entre los procedimientos utilizados para la introducción masiva de mutaciones tenemos: el PCR mutagénico, la combinación de ADN entre genes homólogos (DNA shuffling), la mutagénesis química y el uso de cepas bacterianas deficientes en enzimas que participan en la reparación del ADN (cepas mutagénicas).<sup>59</sup>

Un ejemplo de aplicación de la evolución dirigida en la modificación de un biocatalizador es la mejora de la estereoselectividad de la *N*-acetilneuraminidato liasa (EC 4.1.3.3). Esta enzima es utilizada en la síntesis de análogos del ácido siálico, precursores de fármacos como el Oseltamivir o el Zanamivir. Sin embargo, la enzima muestra una baja estereoselectividad obteniéndose mezclas de diastereómeros que deben ser separados (**Figura 1.14**). Con el objetivo de mejorar la estereoselectividad del biocatalizador se realizaron PCR mutagénicos para identificar los residuos del centro activo que influían en la configuración de los productos. Sobre estos sitio se realizó mutación por saturación de sitio y se encontraron dos variantes de la enzima con estereoselectividades complementarias (**Figura 1.14**).<sup>64</sup>

**Figura 1.14** Reacción de adición aldólica de piruvato a (2S,3S)-2,3-dihidroxi-4-oxo-N,N-dipropilbutiramida catalizado por dos variantes estereocomplementarias de N-acetilneuraminidato liasa (NAL).

### 1.2.6c Diseño semirracional.

El diseño semirracional ocupa una posición intermedia entre el diseño racional y la evolución dirigida. Utiliza evidencias estructurales para identificar los sitios, en la secuencia de aminoácidos, que pueden influir sobre una propiedad determinada. Esto facilita el trabajo con las librerías de clones al ser más pequeñas que en el caso de la evolución dirigida. <sup>58,59</sup>

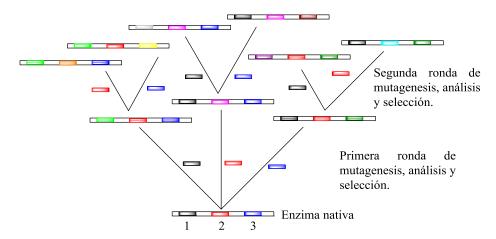
La sustitución de aminoácidos se consigue utilizando oligonucleótidos con cambios en su secuencia de bases en relación con la secuencia diana. Al hibridar en posiciones concretas del ADN queda fijada la variación en el sitio de interés. Dicha técnica permite realizar la mutación por saturación de sitio al utilizar secuencias degeneradas en los oligonucleótidos (**NNN**, donde **N** es cualquier nucleótido: A, G, T, C). 65

En la mutación por saturación de sitio, cuando se introduce una sola variante con un cebador totalmente degenerado (**NNN** donde **N**: A, G, T, C); resulta una colección de variantes con 64 secuencias diferentes (20 aminoácidos y 3 codones de parada). En este caso la librería debe estar constituida por 190 clones para tener representado con una probabilidad del 95 % las 64 secuencias ( $N=\ln(1-p)/\ln(1-1/n)$ , donde N, tamaño de la librería, p la probabilidad de encontrar todas las secuencias en la librería y n, el total de clones).  $^{66,67}$ 

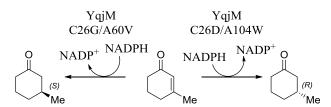
Es posible disminuir el tamaño de la librería minimizando la degeneración de la tercera base del codón. Una construcción del tipo **NNK** (**N**: A, G, T, C y **K**: T o G) reduce el tamaño de la librería a la mitad (N = 94, para p = 0.95 y n = 32) donde están todos los aminoácidos representados y sólo un codón de parada. <sup>66,67</sup>

Una aproximación novedosa para reducir los esfuerzos en el análisis de las librerías de clones es la mutación por saturación iterativa (*ISM*, del inglés *I*terative *S*aturation *M*utagenesis). Para su aplicación es necesario conocer la estructura de la enzima y los posibles sitios del centro activo que puedan influir en una propiedad a modificar. Con esta información se realizan mutaciones por saturación de sitio en una posición dada y sobre la variante seleccionada se realizan nuevos ciclos de mutaciones de manera iterativa. Así se genera un "árbol evolutivo" de la enzima hasta llegar a un variante con las cualidades buscadas (**Figura 1.15**). <sup>68</sup> Con esta metodología se incrementó la enantioselectividad de la enoato reductasa (EC 1.3.1.) YqjM de *Bacillus bubtilis* en la reducción de 3-

metilciclohexan-2-en-1-ona obteniéndose variantes de la enzima estereocomplementarias (> 95 % ee) (**Figura 1.16**). <sup>69</sup>



**Figura 1.15** Representación esquemática de una estrategia de mutación por saturación iterativa (*ISM*, del inglés *I*terative *S*aturation *M*utagenesis) en una enzima con tres residuos que influyen un una propiedad a modificar<sup>68</sup>. Utilizando este método se necesitan analizar <u>846 colonias</u>. Al variar las tres posiciones a la vez habría que analizar <u>98 163 colonias</u> para tener con un 95 % de probabilidades a todas las posibles secuencias representadas.



**Figura 1.16** Reducción de 3-metilciclohexan-2-en-1-ona catalizado por variantes estereocomplementarias de la enolato reductasa YqjM de *Bacillus bubtilis*. <sup>69</sup>

El diseño semirracional se ha utilizado en la modificación de enzimas con importantes aplicaciones prácticas. Así, se mejoró la especificidad de sustrato de la amilosucrasa (EC 2.4.1.4) de *Neisseria polysaccharea*. Esta enzima cataliza la síntesis de oligosacáridos que pueden ser

utilizados en el desarrollo de vacunas al ser análogos de antígenos de superficie encontrados en bacterias patógenas. Después de analizar 20 000 clones se encontró una variante de la enzima con un incremento de 400 veces en la eficiencia catalítica respecto a la sucrosa y el sustrato no natural alil 2-acetamido-2-desoxi-α-D-glucopiranósido (**Figura 1.17**). Los autores introdujeron variaciones aleatorias en dos residuos de aminoácido próximos en el centro activo (*CAST*, del inglés *Combinatorial Active-Site Saturation Test*).<sup>70,71</sup>

**Figura 1.17** Reacción catalizada por amilosucrasa de *Neisseria polysaccharea* modificada por ingeniería de porteínas.<sup>70</sup>

Otro ejemplo es la modificación de la especificidad de la glucosiltransferasa ElmGT (EC 2.4. .) de *Streptomyces olivaceus* hacia diferentes desoxiazúcares. Esta enzima encuentra aplicación en la síntesis de la droga antitumoral elloramicina. Utilizando información estructural se identificó los residuos L309 y N312 como responsables de la especificidad de sustrato de la enzima. Mediante mutación sitio específica se obtuvieron variantes que catalizaron la transferencia de diferentes L- y D-desoxiazúcares a 8-demetil-tetracenomicina, aglicona de la elloramicina (**Figura 1.18**).<sup>72</sup>

**Figura 1.18** Reacción catalizada por glucosiltransferasa ElmGT de *Streptomyces olivaceus*, modificada por ingeniería de proteínas, en la síntesis de análogos de la elloramicina. dNDP, desoxinucleótidodifosfato.<sup>72</sup>

A manera de resumen podemos decir que el diseño racional se apoya en datos estructurales para predecir los sitios en la secuencia de aminoácidos que deben ser modificados. También trata de racionalizar el tipo de sustitución que debe realizarse de acuerdo a las propiedades físico-químicas de los aminoácidos. De esta manera se generan pocas variantes de la enzima nativa que son fácilmente evaluadas para la propiedad buscada (**Figura 1.19**).

No siempre es posible disponer de información estructural, por lo cual se aplica la evolución dirigida. En esta metodología se utilizan métodos de introducción masiva de mutaciones que generan una gran diversidad de secuencia. La caracterización de todas las variantes puede resultar una tarea muy compleja y esto constituye su principal desventaja (**Figura 1.19**).

Entre ambas estrategias está el diseño semirracional que trata de disminuir el tamaño de las librería a analizar apoyándose en información estructural (Figura 1.19).

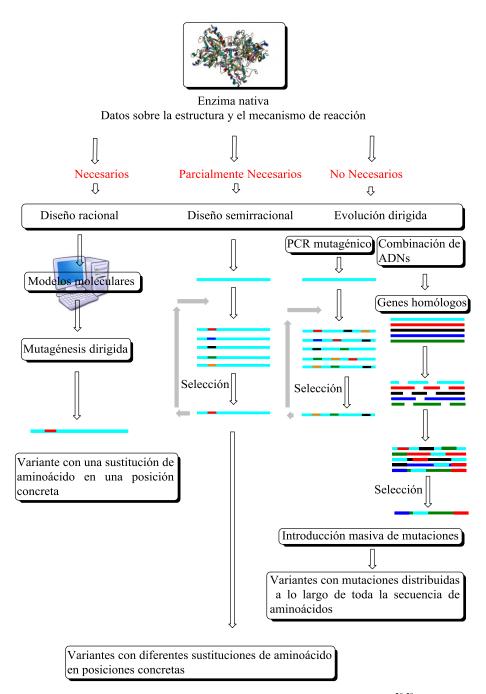


Figura 1.19 Diferentes estrategias utilizadas en ingeniería de proteínas. 58,59

En este trabajo utilizaremos el diseño racional en la construcción de mutantes de la L-serina hidroximetiltransferasa de *Streptococcus* 

thermophilus. También se realizará un diseño semirracional para estudiar el efecto de diferentes aminoácidos en una posición concreta del centro activo de la enzima (librería con 94 clones). Aplicar una evolución dirigida sobre esta enzima resulta complejo porque no se dispone de una metodología que permita analizar de manera práctica un gran número de clones.

## 1.3 Liasas (EC 4.x.x.x)

Las Liasas son enzima que catalizan la ruptura, reversible o no, de un enlace covalente (C-C, C-N, C-O, C-S, C-P, C-Cl) por mecanismos diferentes a la oxidación-reducción o la hidrólisis.<sup>2</sup> Esta familia de enzimas ha encontrado importantes aplicaciones en biocatálisis. Como ejemplo tenemos las aminoácido amonio liasas (EC 4.3.1.x) enzima que catalizan la desaminación reversibles de aminoácidos o la halohidrina deshalogenasa (EC 4.5.1.x) que cataliza la adición estereoselectiva de diferentes nucleófilos a epóxidos.<sup>73</sup>

Dentro de las liasas, las enzimas que catalizan la formación de enlace C-C (EC 4.1.x.x) pueden agruparse desde un punto de vista Bioquímico en las siguientes subfamilias:

Carboxi-liasas (EC 4.1.1.x), ejemplo piruvato descarboxilasa (EC 4.1.1.1).

$$\bigcup_{CO_2^-}^{O} \longrightarrow \bigcirc_{O} + CO_2$$

**Aldehído-liasas (EC 4.1.2.x)**, ejemplo L-fuculosa-1-fosfato aldolasa (EC 4.1.2.17)

Oxoácido-liasas (EC 4.1.3.x), ejemplo N-acetilneuraminidato liasa

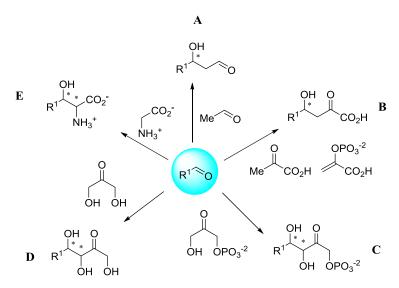
Otras C-C liasas (EC 4.1.99.x), ejemplo Triptofanasa (4.1.99.1).

Estas subfamilias de enzimas han recibido mucha atención por la importancia de la reacción de formación de enlaces C-C en química orgánica; siendo utilizadas con éxito en la síntesis de complejas moléculas polifuncionales.<sup>74,75</sup>

En nuestro grupo de investigación se tiene una amplia experiencia en el trabajo con enzimas que participan en la formación de enlaces C-C, en particular las aldolasa (término muy común en Biocatálisis para referirse a un grupo de C-C liasas, generalmente aldehído liasas y oxoácido liasas). Estas enzimas catalizan reacciones de adición aldólica entre diferentes sustratos dadores y aldehídos como sustratos aceptores. De acuerdo a la naturaleza del sustrato dador las aldolasas pueden clasificarse en 5 grandes grupos: las dependientes de acetaldehído, las dependientes de piruvato, fosfoenolpiruvato, oxalacetato y 2-oxobutirato, las dependientes de dihidroxiacetona fosfato, las

dependientes de dihidroxiacetona y sus análogos y las dependientes de Gly o Ala (**Figura 1.20**).<sup>76</sup>

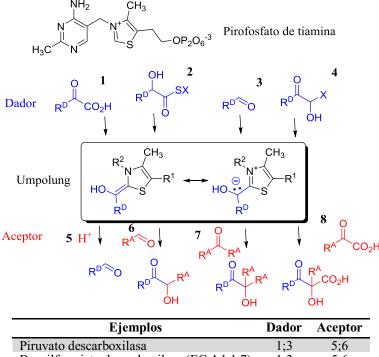
Las aldolasas promueven la abstracción del protón en el  $C\alpha$  respecto a un grupo carbonilo. El carbanión puede ser estabilizado por la formación de una base de Schiff (aldolasas clase I) o a través de complejos con iones metálicos (aldolasas clase II) (**Figura 1.21**).<sup>77</sup>



**Figura 1.20** Clasificación de las aldolasas de acuerdo a la naturaleza del sustrato dador. **A** dependientes de acetaldehído, **B** dependientes de piruvato, fosfoenolpiruvato, oxalacetato y 2-oxobutirato, **C** dependientes de dihidroxiacetona fosfato, **D** dependientes de dihidroxiacetona y sus análogos y **E** dependientes de Gly o Ala. <sup>76</sup>

**Figura 1.21** Representación del mecanismo de estabilización del ión enolato en una aldolasa clase I y clase  ${\rm II.}^{76}$ 

Otros biocatalizadores que participan en la formación de enlaces C-C, son las enzimas dependientes de tiamina. Todas tienen en común que utilizan como cofactor pirofosfato de tiamina y Mg<sup>2+</sup>. La reacción transcurre con inversión de la polaridad del grupo carbonilo del sustrato dador (umpolung, del alemán) (**Figura 1.22**).<sup>78</sup> Al igual que las aldolasas este grupo de enzimas ha encontrado importantes aplicaciones en síntesis orgánica.<sup>79-81</sup>



Ejemplos	Dador	Aceptor
Piruvato descarboxilasa	1;3	5;6
Bencilformiato descarboxilasa (EC 4.1.1.7)	1;3	5;6
Acetohidroxiácido sintasa (EC 4.1.3.18)	1	6;8
Transketolasa (EC 2.2.11)	1;3;4	6
2-HidroxifitilCoA liasa (EC 4.1)	2	5
Glioxalato carboxiligasa (EC 4.1.1.47)	1	8

**Figura 1.22** Representación general de las reacciones catalizadas por enzimas dependientes de pirofosfato de tiamina.  $^{82}$ 

En este trabajo se estudió nuevas aplicaciones en química orgánica de la L-serina hidroximetiltransferasa de *Streptococcus thermophilus* y la benzaldehído liasa de *Pseudomonas fluorescens* biovar I. Además se aprovecharon las potencialidades sintéticas de la D-fructosa-6-fosfato aldolasa (EC 4.1.2.-) y la L-ramnulosa-1-fosfato aldolasa (EC 4.1.2.19), enzimas muy estudiadas en nuestro grupo de investigación.

### 1.3.1 L-Serina hidroximetiltransferasa.

La L-serina hidroximetiltransferasa o glicina hidroximetiltransferasa (SHMT) es una enzima que cataliza *in vivo* la síntesis de  $N^5$ , $N^{10}$ -metilentetrahidrofolato a partir de L-Ser y tetrahidrofolato (**Figura 1.23 A**). *In vitro* la enzima también puede catalizar la adición reversible de Gly a diferentes aldehídos comportándose como una aldehído-liasa. Debido a esto inicialmente se pensó que la SHMT (EC 2.1.2.1) y la treonina aldolasa (EC 4.1.2.5) eran la misma enzima (**Figura 1.23 B**).  $^{83,84}$ 

La SHMT presenta una distribución ubicua en la naturaleza. Utiliza como cofactor fosfato de piridoxal (PLP) unido a un residuo de Lys, formando un enlace aldimina. El centro activo está localizado en la interface entre dos monómeros por lo que la enzima precisa estar en forma dimérica para ser activa (en eucariontes aparece como un dímero de dímeros). 85

**Figura 1.23** Reacciones catalizadas por SHMT. **A** *in vivo* cataliza la transferencia de un grupo hidroximetilo de la L-Ser al tetrahidrofolato formando Gly y  $N^5$ ,  $N^{10}$ -metilentetrahidrofolato. **B** *in vitro* cataliza la adición aldólica reversible de Gly a diferentes aldehídos obteniéndose β-hidroxi-L-α-aminoácidos.

La catálisis transcurre por medio de un intermediario quinoideo entre la Gly y el PLP (**Figura 1.24**). La función del cofactor es incrementar la acidez de los protones en  $\alpha$  de la Gly al deslocalizar la carga negativa del C $\alpha$  anión por el sistema  $\pi$  del anillo de piridina. Un grupo básico en el centro activo abstrae estereoselectivamente el protón pro-S de la aldimina externa formando el intermediario quinoideo (**Figura 1.24**). El mecanismo catalítico continúa cuando dicho intermediario realiza un ataque nucleo fílico sobre el grupo carbonilo de un aldehído. La enzima bloquea la cara re del intermediario quinoideo, adicionando el aldehído sólo por la cara si. Esta es la razón del control absoluto de la estereo química sobre el C $\alpha$  en el producto de la reacción. Sin embargo, el modo de unión del aldehído puede ser promiscuo, con lo que el grupo carbonilo puede recibir el ataque nucleo fílico tanto por su cara re o si. Por esta razón la enzima no muestra un control absoluto de la

estereoquímica del carbono  $\beta$  en el producto de reacción (**Figura 1.24**). 85

**Figura 1.24** Representación esquemática del mecanismo catalítico de la SHMT en la adición aldólica de Gly a un aldehído.

Existe un consenso sobre el mecanismo de la reacción pero no está clara la función de los diferentes grupos en la catálisis. Se ha especulado sobre el papel de un residuo de Glu y una Try en el mecanismo de reacción pero a ciencia cierta no se conoce el rol que juegan los diferentes grupos del centro activo en la catálisis. 87,88

La SHMT ha sido poco utilizada con fines biocatalíticos y la mayoría de la literatura existente se centra en estudios estructurales y mecanísticos. El biocatalizador se ha utilizado en la síntesis de ácido L-eritro-2-amino-3-hidroxipentanodioico y ácido L-eritro-2-amino-3-hidroxi-6-henenoico, ambos precursores en la síntesis de antibióticos de la familia de las cefalosporinas.<sup>89,90</sup> La enzima también ha sido utilizada en la resolución de mezclas racémicas de DL-β-hidroxi-α-aminoácidos.<sup>91</sup>

En nuestro grupo de investigación se ha estudiado este biocatalizador en la síntesis de diferentes  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ , $\omega$ -diamoniácidos a través de la adición aldólica de Gly a varios N-Cbz-aminoaldehídos. Para ello se ha clonado y expresado la SHMT de *Streptococcus thermophilus*. La enzima alcanza elevados niveles de expresión en *E.coli*, llegando a representar el 50 % de la proteína soluble de la célula. Esto la convierte en un biocatalizador prometedor y objeto de estudio para ampliar sus aplicaciones en síntesis orgánica en la presente tesis.

### 1.3.2 Benzaldehído liasa.

La benzaldehído liasa (BAL) de *Pseudomonas fluorescens* biovar I es una aldehído-liasa que cataliza reversiblemente la síntesis de (*R*)-benzoina a partir de benzaldehído (**Figura 1.25 A**). La enzima es un homotetrámero (4 x 59 kDa) y requiere como cofactores pirofosfato de tiamina (ThDP) e iones divalentes (Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> o Ca<sup>2+</sup>). De forma general la enzima media la adición benzoínica entre un aldehído aromático (dador) y otro aldehído aromático o alifático que actúa como aceptor. (**Figura 1.25 B**). P4-97

**Figura 1.25** Reacciones catalizadas por BAL. **A**, síntesis de (*R*)-benzoina a partir de benzaldehído (*in vivo*). **B**, la enzima cataliza la adición benzoínica de un aldehído aromático (dador) y otro aldehído aromático o alifático que actúa como aceptor.

La catálisis se inicia cuando el ion dipolar (iluro) del cofactor realiza un ataque nucleofílico al grupo carbonilo del aldehído dador. Se genera una enamina-carbanión con inversión de la polaridad del carbono del grupo carbonilo (umpolung, del alemán). Este intermediario realiza un ataque nucleofílico sobre el grupo carbonilo del aldehído aceptor, con configuración R en el centro estereogénico creado. Finalmente es liberado el producto de la reacción y regenerado el cofactor para iniciar otro ciclo catalítico (**Figura 1.26**). La enzima muestra diferentes valores de  $K_m$  para el aldehído dador y el aceptor, incluso cuando se trata de la misma molécula. 98

**Figura 1.26** Representación esquemática del mecanismo catalítico de la BAL en la homo-adición benzoínica de benzaldehído.

El biocatalizador es estable a 37 °C y pH entre 6,0 y 8,0 mostrando máxima actividad a pH 8,0 tanto para la síntesis como degradación de benzoina. La BAL se estabiliza en presencia de DMSO (20-30 % v/v)<sup>99</sup> y es particularmente estable en solvente no miscible en agua (dietiléter, *ter*-butilmetiléter, diisopropiléter).<sup>100</sup>

La enzima ha sido ampliamente estudiada y aplicada en biocatálisis. Así por medio de la condensación benzoínica catalizada por BAL se han sintetizado diferentes  $\alpha$ -(R)-hidroxidihidrochalconas, moléculas intermediarias en la ruta de síntesis de flavonoides y otros compuestos con propiedades antioxidantes (**Figura 1.27**). <sup>101</sup>

**Figura 1.27**. Reacción de adición benzoínica entre metoxibenzaldehídos y el fenilacetaldehído catalizado por BAL.

Otro ejemplo lo tenemos en la síntesis de 2-hidroxicetonas enantioméricamente puras, que son importantes precursores en la síntesis de compuestos con actividad biológica. La adición benzoínica entre aldehídos aromáticos y acetaldehído, catalizado por BAL, permite sintetizar (*R*)-2-hidroxi-1-arilpropanonas con elevada enantioselectividad (**Figura 1.28**). 103,104

**Figura 1.28** Reacción de adición benzoínica de aldehídos aromáticos al acetaldehído. Las (R)-2-hidroxi-1-arilpropanonas son precursores de moléculas con actividad biológica.  $^{103-105}$ 

Utilizando cascadas multienzimáticas entre la BAL y varias deshidrogenasas se han sintetizado 1-aril-1,2-dioles. La condensación

benzoínica entre benzaldehído y formaldehído requiere utilizar un exceso de aldehído alifático para compensar el elevado valor de  $K_m$  que muestra la enzima por este sustrato. Añadiendo en el sistema glicerol deshidrogenasa de *Cellulomonas* sp se reduce el 2-aril-2-oxo-1-etanol (producto benzoínico) y el NADH es regenerado a partir del exceso de formaldehído en la reacción utilizando formaldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.1) de *Pseudomonas putida* (**Figura 1.29**).  $^{106}$ 

**Figura 1.29** Ejemplo de reacción acoplada entre la BAL y varias oxidorreductasas. GDH, glicerol deshidrogenasa de *Cellulomonas* sp, FDH, formaldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas putida*. 106

La enzima también se ha utilizado en la síntesis de análogos de la eritrulosa, precursores quirales en la síntesis de moléculas más complejas. 107,108 Así, se describe la auto-adición benzoínica del (benciloxi)acetaldehído y la adición cruzada entre (benciloxi)acetaldehído, dimetoxiacetaldehído o furfuraldehído. La reacción se realiza en un sistema bifásico agua-diisopropiléter alcanzándose un 90 % de conversión y un 95 % de *ee* para la auto-adición de (benciloxi) acetaldehído (**Figura 1.30**). 96

Introducción.

**Figura 1.30** Reacción de adición benzoínica del (benciloxi)acetaldehído a varios aldehídos catalizada por BAL.<sup>96</sup>

## 1.3.3 D-Fructosa-6-fosfato aldolasa.

La D-fructosa-6-fosfato aldolasa (FSA) es una enzima aislada del genoma de  $E.\ coli$  en el año 2000, siendo la primera aldolasa descubierta que cataliza la adición aldólica reversible de D-fructosa-6-fosfato a dihidroxiacetona y D-gliceraldehído-3-fosfato. La enzima no se inhibe por EDTA y presenta un residuo de Lys esencial para la catálisis (aldolasa clase I) (**Figura 1.31**). La FSA pertenece a la subfamilia de las transaldolasas (MipB/TalC) con plegamiento barril  $\alpha/\beta$  y una estructura decamérica muy compacta.

**Figura 1.31** Reacción de retro-aldólisis de D-fructosa-6-fosfato catalizada por FSA. El mecanismo transcurre con formación de una imina entre el grupo carbonilo del sustrato y el residuo de Lys del centro activo. Una base en el centro activo abstrae un protón y se libera el D-gliceraldehído-3-fosfato. Posteriormente se hidroliza la imina de la dihidroxiacetona y se libera la enzima.

Una de las características más significativas de la FSA, y que la distingue de otras aldolasas, es su selectividad por sustratos dadores no fosforilados. La enzima nativa puede utilizar diferentes dadores con mayor o menor eficiencia, mostrando una mayor especificidad de sustrato para la hidroxiacetona (**Tabla 1.1**). El diseño racional ha ampliado las posibilidades sintéticas de la enzima al modificar la especificidad por los diferentes dadores. La variante A129S muestra una especificidad de sustrato incrementada 17 veces para la dihidroxiacetona (DHA) en comparación con la enzima nativa y una disminución de la especificidad por la HA. Utilizando FSA A129S se sintetizaron varios nitrociclitoles con rendimientos superiores al 50 %. 111

Introducción.

Tabla 1.1 Parámetros cinéticos para diferentes sustratos dadores de la FSA nativa. 111

Dadores	$K_M$ [mM]	$k_{cat}$ [s <sup>-1</sup> ]	$k_{cat}/K_M$ [s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ]
Dihidroxiacetona (DHA)	32,0	116	4
Hidroxiacetona (HA)	17,4	2527	145
Glicolaldehído (GO)	0,2	16,5	83

Por otro lado, el glicolaldehído (GO) posee un especial interés, puesto que permite acceder a derivados de aldosas. La FSA nativa cataliza la adición homoaldólica de GO obteniéndose D-treosa, así como la adición cruzada de este sustrato con diferentes aldehídos actuando el GO como nucleófilo (**Figura 1.32**).<sup>112</sup>

**Figura 1.32** La FSA nativa cataliza la adición aldólica de GO a diferentes sustratos. <sup>112</sup>

Recientemente en nuestro grupo de investigación se han desarrollado varias variantes de la FSA muy eficientes en la adición aldólica cruzada de GO a diferentes aldehídos. La FSA A129G, A129T o A129V poseen una mayor actividad enzimática en la homoadición aldólica del GO en comparación con la enzima nativa. Además en la adición aldólica cruzada de GO a *N*-Cbz-aminoaldehídos la formación de producto se incrementa para las variantes A129G, A129T y A129V en comparación con la FSA A129S y la enzima nativa. (**Tabla 1.2**).<sup>113</sup>

**Tabla 1.2** Adición de GO a varios *N*-Cbz-aminoaldehídos catalizado por diferentes variantes de FSA. La formación de producto se determinó por HPLC después de 6 h de reacción. <sup>112</sup>

Variante FSA	Producto/%		Variante FSA	Producto/%	
	n = 1	n=2		n = 1	n=2
Nativa	3	38	A129T	44	79
A129S	12	41	A129V	46	88
A129G	67	82			

De acuerdo con lo anterior disponemos en nuestro grupo de investigación de las variantes más eficientes de la enzima para cada tipo de sustrato dador. La FSA nativa es el biocatalizador utilizado en la adición aldólica de HA a aldehídos. En el caso de la DHA el biocatalizador de elección sería la FSA A129S y con el GO sería la FSA A129G(T,V).

La capacidad de la enzima de utilizar varios dadores no fosforilados (DHA, HA y GO) y diferentes aldehídos aceptores ha extendido el uso del biocatalizador en la síntesis de carbohidratos y moléculas análogas polihidroxiladas. 114-119 Como uno de los ejemplo más importantes

tenemos la adición aldólica, catalizada por FSA nativa, de DHA a *N*-Cbz-3-aminopropionaldehído, seguido de una etapa de hidrogenación catalítica para obtener D-fagomina con un 51 % rendimiento (**Figura 1.33**). Esta síntesis quimio-enzimática presenta importantes aplicaciones prácticas porque en estudios *in vivo* la D-fagomina ha resultado ser eficaz en la disminución de los niveles de glucosa en sangre después de una ingesta de carbohidratos. <sup>121</sup>

**Figura 1.33** Síntesis de D-fagomina por medio de un proceso quimio-enzimático de dos etapas.

### 1.3.4 L-Ramnulosa-1-fosfato aldolasa.

La L-ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA) cataliza la retro-aldólisis de L-ramnulosa-1-fosfato a dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y L-lactaldehído. La enzima es inhibida competitivamente por 1,10-fenantrolina y no posee residuo de Lys esencial para la catálisis (aldolasa clase II) (**Figura 1.34**). 122

**Figura 1.34** Reacción de retro-aldólisis de la L-ramnulosa-1-fosfato catalizada por RhuA y representación esquemática del mecanismo de reacción. El metal unido en el centro activo actúa como un ácido de Lewis aumentando la polaridad del grupo carbonilo y estabiliza el ion enolato, intermediario de la reacción. <sup>122</sup>

El biocatalizador coordina en su centro activo un ion Zn<sup>2+</sup>, pudiendo también utilizar Co<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup> en la catálisis<sup>123</sup>. En su forma activa la enzima es un homotetrámero que utiliza una gran variedad de aldehídos aceptores, pero es muy específica para DHAP (**Tabla 1.3**).<sup>54</sup>

Tabla 1.3 Parámetros cinéticos para los diferentes dadores de la RhuA nativa de E. coli. 54

Dadores	$K_M$ [mM]	$V_{max}/\mathrm{U^{[a]}}~\mathrm{mg^{-1}}$	$V_{max}/K_M/\mathrm{U~mg^{-1}mM^{-1}}$
DHAP	0,6	606	1
DHA	1125	108	0,00003

<sup>[</sup>a] Una unidad es definida como los umol de producto formado por hora.

La RhuA de  $E.\ coli$  muestra un valor de  $K_m$  para DHA más de 1000 veces superior al de la DHAP. Sin embargo, en nuestro grupo investigación se demostró que la adición de boratos al medio de reacción mejora las propiedades de la DHA como sustrato dador de la enzima (**Tabla 1.4**). El ion borato puede formar, reversiblemente, esteres tanto con la DHA como con los productos de la reacción (**Figura 1.35**). Como se explicó anteriormente los esteres de borato mimetizan al grupo fosfato aumentando la actividad de la enzima hacia el sustrato dador e incrementan las conversiones de la reacción (**Tabla 1.4**); probablemente debido a que el ion borato "secuestra" el producto aldólico en forma de hemiaminal (derivados N-Cbz protegidos) desplazando el equilibrio hacia la formación del producto (**Figura 1.35**).  $^{54,124}$ 

**Tabla 1.4** Conversión de la reacción (%) y velocidades iniciales ( $V_{\theta}$ ) en la adición aldólica de DHA y DHA/borato a diferentes aldehídos catalizada por RhuA de  $E.\ coli.^{54}$ 

R	DHA		DHA+Borato	
	Producto /% V <sub>0</sub> /U <sup>[a]</sup> mg <sup>-1</sup>		Producto /%	V <sub>0</sub> /Umg <sup>-1</sup>
HO-	63	2,4	100	240
CbzNH-	40	2,4	100	84

<sup>[</sup>a]Una unidad es definida como los µmol de producto formado por hora.

**Figura 1.35** Representación de la estructura de los posibles complejos de borato con DHA y el producto de adición aldólica de DHA a (S)-Cbz-alaninal. 124

En nuestro grupo de investigación la RhuA se ha utilizado en la síntesis de diferentes moléculas con actividad biológica. Utilizando una estrategia quimio-enzimática se sintetizaron estereoisómeros de la hiacintacina A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> (derivados de pirrolizidina, **Figura 1.36**), basándose en la adición aldólica de DHAP a *N*-Cbz-prolinal catalizado por la aldolasa.<sup>125</sup>

También se han sintetizado diversas indolicidinas y quinolicidinas (**Figura 1.36**) a través de la adición aldólica de DHAP a derivados de *N*-Cbz-piperidinacarbaldehído, seguido de hidrogenación catalítica. <sup>126</sup> El 1,4-didesoxi-1,4-imino-L-arabibitol (LAB) es otro iminociclitol con actividad biológica obtenido por medio de una estrategia quimienzimática (**Figura 1.36**). La síntesis comienza con la adición aldólica, mediada por RhuA, de DHA a *N*-Cbz-glicinal en tampón borato. Posteriormente el producto es reducido, H<sub>2</sub> (50 psi) Pd/C, obteniéndose el iminociclitol. <sup>127</sup>

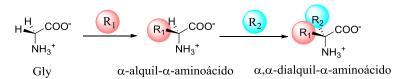
**Figura 1.36** Productos polihidroxilados obtenidos a través de la adición aldólica de DHAP y DHA a diferentes *N*-Cbz-aminoaldehídos catalizado por RhuA.

La RhuA y la FSA catalizan reacciones de adición aldólicas de DHA a diferentes aldehídos. Sin embargo, los biocatalizadores poseen diferentes preferencias estereoquímicas (enzimas estéreocomplementarias) permitiendo realizar síntesis estereodivergente a partir de los mismos precursores sintéticos (**Figura 1.37**).

**Figura 1.37** La RhuA y la FSA pueden utilizar los mismos sustratos en una reacción de adición aldólica pero muestran diferentes estereoselectividades.

### 1.4 Aplicaciones y síntesis de α,α -dialquil-α-aminoácidos.

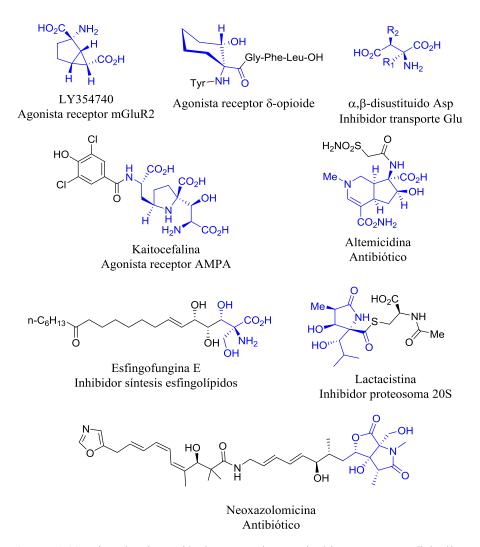
Los  $\alpha$ , $\alpha$ -dialquil- $\alpha$ -aminoácido (DAAC) son derivados de la Gly obtenidos por sustitución de los protones del C $\alpha$  por grupos alquilo o arilos (**Figura 1.38**).



**Figura 1.38** Representación de la estructura de un  $\alpha$ , $\alpha$ -dialquil- $\alpha$ -aminoácido.

Compuestos de origen natural y sintético poseen DAAC en su estructura (**Figura 1.39**). Estas moléculas muestran actividad biológica como inhibidores enzimáticos, bloqueadores de canales iónicos, agonistas/antagonistas de receptores neuronales y antibióticos.  $^{128}$  Además los DAAC son inductores de estructura helicoidal ( $\alpha$  y  $3_{10}$ ), cuando son incorporados en la secuencia de péptidos.  $^{129}$ 

Introducción.



**Figura 1.39** Ejemplo de moléculas naturales y sintéticas con  $\alpha$ , $\alpha$ -dialquil- $\alpha$ -aminoácidos en su estructura. 128

La síntesis química de DAAC es compleja y precisa de pasos de protección y desprotección de grupos funcionales, bases fuertes y catalizadores quirales para controlar la estereoquímica de los centros estereogénicos (**Figura 1.40**). 130-132

**Figura 1.40** Ejemplo de estrategia de síntesis química de  $\alpha$ ,α-dialquil-α-aminoácidos. **ia** benzaldehído, LDA, SnCl<sub>2</sub>, THF, -78 °C. **ib** PhCH<sub>2</sub>Br, catalizador (0,05 mol %), CsOH\*H<sub>2</sub>O, tolueno, -20 °C. **iib** ácido cítrico (0,5 M), THF. <sup>131,132</sup>

Las estrategias de síntesis biocatalítica de DAAC son escasas, presumiblemente porque la mayoría de las enzimas utilizan como sustrato dador Gly. Se han descrito treoninas aldolasas (TA) capaces de catalizar la retro-aldólisis de α-metriltreonina a acetaldehído y D-Ala. Utilizando L-TA de *Aeromonas jandaei* y D-TA de *Pseudomonas* sp se han sintetizado β-hidroxi-α,α-dialquil-α-aminoácidos (**Figura 1.41**). 133

**Figura 1.41.** Síntesis de β-hidroxi- $\alpha$ , $\alpha$ -dialquil- $\alpha$ -aminoácidos utilizando L y D-treoninas aldolasas. <sup>133</sup>

Ambas TA utilizan como sustratos dadores D-Ala, D-Ser y D-Cys y como aceptores aldehídos alifáticos y aromáticos con conversiones de reacción que oscilaron alrededor del 30 %. En todos los casos se obtuvieron mezclas de diastereómeros debido a la baja estereoselectividad en la formación del segundo centro estereogénico durante la catálisis (**Tabla 1.5**). 133

**Tabla 1.5** Síntesis de β-hidroxi-α,α-dialquil-α-aminoácidos a través de la adición aldólica de D-Ala, D-Ser y D-Cys a diferentes aldehídos catalizado por L-TA de *Aeromonas jandaei*. <sup>133</sup> **Conv**, conversión de la reacción.

$$R_1$$
  $COO^ R_2$   $COO^ R_2$   $R_3$   $R_1$   $R_3$   $R_4$   $R_1$   $R_2$   $R_3$   $R_4$   $R_5$   $R_6$ 

$R_1$	CI	<b>I</b> <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub>	ОН	CH <sub>2</sub>	SH
$\mathbf{R}_2$	Conv/ %	anti:syn	Conv/ %	anti:syn	Conv/ %	anti:syn
CH <sub>3</sub>	20	73:27	6	82:18	30	72:28
$C_6H_5$	35	50:50	10	70:30	27	59:41
$3-O_2NC_6H_5$	60	53:47	15	82:18	30	56:44

En el año 2008 se aisló y caracterizó, una nueva enzima de *Ralstonia* sp. y *Variovorax paradoxus*. Dicha enzima, denominada  $\alpha$ -metilserina aldolasa (EC 4.1.2.-), cataliza la síntesis de  $\alpha$ -metil-L-serina a partir de formaldehído y D-Ala. <sup>134,135</sup> En ese mismo año se describió la clonación y caracterizaron de la  $\alpha$ -metilserina hidroximetiltransferasa (EC 2.1.2.7) de *Aminobacter* sp. AJ 110403, *Ensifer* sp. AJ 110404 y *Paracoccus* sp. AJ 110402. Esta enzima cataliza la transferencia de formaldehído de la  $\alpha$ -metil-L-serina al tetrahidrofolato formando D-Ala y  $N^5$ ,  $N^{10}$ -metilentetrahidrofolato. Además mostraba actividad racemasa al isomerizar reversiblemente D-Ala y L-Ala. Sin embargo no muestra actividad liasa resultando inactiva en la adición aldólica de aminoácidos a aldehídos. <sup>136,137</sup>

### 1.5 Aplicaciones y síntesis de C-arilmonosacáridos.

Los carbohidratos o sacáridos (del griego *sakcharon*, azúcar) son moléculas esenciales en todos los organismos vivos. Pueden aparecer como monosacáridos, oligosacáridos, polisacáridos o asociados a proteínas (glucoproteínas) y lípidos (glucolípidos). Son muy abundantes en la matriz extracelular y en la membrana biológica de las células.<sup>2</sup> Median procesos de señalización y reconocimiento celular, como la infección por bacterias y virus, <sup>138,139</sup> los procesos de metástasis cancerosa<sup>140,141</sup> y la respuesta inflamatoria. <sup>142,143</sup>

Algunos carbohidratos naturales presentan residuos aromáticos en su estructura unidos a través de un enlace C-C. Por ejemplo, la goniofufurone, con actividad citotóxica contra algunas líneas de células tumorales (**Figura 1.42**). Otros derivados sintéticos son inhibidores selectivos del cotransportador Na<sup>+</sup>/glucosa 2 (SGTL 2) en el intestino, siendo fármacos potenciales para el tratamiento de la diabetes. Tal es el caso de la dapagliflozina (aprobado por la FDA el 8 de enero del 2014, con el nombre de Farxiga) 145-147 o la canagliflozina (ensayos clínicos fase III, nombre comercial Invokana, Janssen Pharmaceuticals). 148,149 También se han descritos metil 5-*C*-aril-L-xilopiranósidos con actividad inhibitoria sobre el SGTL2 con IC<sub>50</sub> en el rango nM (**Figura 1.42**). 150

Introducción.

**Figura 1.42** Ejemplos de *C*-arilmonosacáridos con actividad biológica<sup>144, 145,148,150</sup>.

La síntesis química de C-arilmonosacáridos requiere numerosos pasos de reacción con protección y desprotección de grupos funcionales. Por ejemplo, la síntesis del inhibidor metil (5S)-5-C-[4-cloro-3-(4-etoxibencil)fenil]- $\beta$ -L-xilopiranósido se realizó partiendo de L-xilosa en 11 pasos de reacción y con un rendimiento global del 29 % (**Figura 1.43**). 145

**Figura 1.43** Síntesis de (5*S*)-5-*C*-[4-cloro-3-(4-etoxibencil)fenil]-β-L-xilopiranósido. **i**) CuSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, acetona, HCl/H<sub>2</sub>O. **ii**) BzCl, piridina, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. **iii**) TBSCl, imidazol, DMF. **iv**) NaOMe, MeOH. **v**) (COCl)<sub>2</sub>, DMSO, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. **vi**) (4-cloro-3-(4-etoxibencil)fenil)litio, THF, -78 °C. **vii**) AcOH/H<sub>2</sub>O, 100 °C. **viii**) Ac<sub>2</sub>O, piridina. **ix**) HBr, AcOH. **x**) ZnO, MeOH, 60 °C. **xi**) K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, MeOH (29 % rendimiento global). 150

La síntesis de moléculas similares se ha abordado con estrategias quimi-enzimáticas utilizando α,β-dihidroxialdehídos como sustratos de DHAP dependientes. aldolasas Los α,β-dihidroxialdehídos se obtuvieron mediante dihidroxilación de Sharpless de los correspondientes acetales α,β-insaturados, seguido de hidrólisis del acetal dihidroxilado. De esta manera se sintetizó (6R)-6-C-fenil-Lfructosa y (6S)-6-C-fenil-D-fructosa, ambos con un 18 % de rendimiento global (Figura 1.44). 151

**Figura 1.44** Estrategia quimio-enzimática de síntesis de 6-*C*-fenilhexosas. **i** 3-metoxi-1,5-dihidro-3*H*-2,4-benzodioxepina, TsOH, DME, 2 h. **iia** AD-mix-β, *t*BuOH:H<sub>2</sub>O (1:1 v/v), 25°C, 48 h. **iib** AD-mix-α, *t*BuOH:H<sub>2</sub>O (1:1 v/v), 25°C, 48 h. **iii** Pd(OH)<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> (50 psi), MeOH, 25 °C, 48 h ó HCl pH 1,0, 65 °C, 12 h. **iv** DHAP, RhuA, pH 7,5, 25 °C, 48 h, después fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2) pH 4,4, 37 °C, 48 h. **v** DHAP, fructosa-1,6-bifosfato aldolasa, pH 7,5, 25 °C, 48 h después fosfatasa ácida (EC 3.1.3.2) pH 4,4, 37 °C, 48 h.



#### 2.1 Objetivos generales.

El presente trabajo tiene como objetivo general estudiar nuevas aplicaciones biocatalíticas de la L-serina hidroximetiltransferasa de *Streptococcus thermophilus* (SHMT<sub>Sth</sub>) y la benzaldehído liasa de *Pseudomonas fluorescens* biovar I (BAL) en síntesis orgánica.

Con este fin la SHMT<sub>Sth</sub> modificada por ingeniería de proteínas se aplicó en la síntesis de nuevos  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ , $\alpha$ -dialquil- $\alpha$ -aminoácidos (**Figura 2.1 I**). Mientras que la BAL se estudió en dos aplicaciones: En la síntesis de *C*-arilmonosacáridos (**Figura 2.1 II**) mediante una estrategia quimio-enzimática combinando reacciones biocatalíticas de formación de enlaces C-C y como catalizador en reacciones de adición benzoínicas intramoleculares con formación de derivados del 7,8,14,15-tetrahidro-6*H*-dibenzo[*f*,*j*] [1,5]dioxacicloundeceno (**Figura 2.1 III**).

**Figura 2.1** Representación de las moléculas sintetizadas en este trabajo utilizando catálisis enzimática. **I**, β-hidroxi- $\alpha$ , α-dialquil- $\alpha$ -aminoácidos. **II**, *C*-arilmonosacáridos. **III**, Derivados del 7,8,14,15-tetrahidro-6*H*-dibenzo[f,j][1,5]dioxa cicloundeceno.

### 2.2 Objetivos particulares

# 2.2.1 Síntesis enzimática de $\alpha,\alpha$ -dialquil- $\alpha$ -aminoácidos utilizando L-serina hidroximetiltransferasa de *Streptococcus thermophilus* modificada por ingeniería de proteínas.

- ➤ Modificación de la SHMT<sub>Sth</sub> por medio de ingeniería de proteínas y evaluación de su tolerancia hacia diferentes aminoácidos dadores diferentes de la Gly.
- Estudio del efecto de la concentración y naturaleza del solvente orgánico, relación molar entre los sustratos, concentración de cofactor, pH del medio y concentración de enzima en la síntesis de ácido (2*S*,3*R*)-2-amino-4-(benciloxi)-3-hidroxi-2-(hidroxi metil)butanoico catalizado por SHMT<sub>Sth</sub> Y55T.
- Síntesis de β-hidroxi-α,α-dialquil-α-aminoácidos, utilizando las mejores condiciones de reacción, y su caracterización estructural por técnicas de RMN y difracción de rayos X.

# 2.2.2 Desarrollo de una estrategia quimio-enzimática en la síntesis de *C*-arilmonosacáridos utilizando benzaldehído liasa de *Pseudomonas fluorescens* biovar I, D-frutosa-6-fosfato aldolasa y L-ramnulosa-1-fosfato aldolasa de *E. coli*.

➤ Estudio del efecto de la relación molar entre los sustratos, la concentración de enzima y la concentración de aldehído alifático en la adición benzoínica cruzada entre aldehídos aromáticos y el dimetoxiacetaldehído, catalizado por BAL, en un sistema bifásico tampón:MTBE.

- Estudio de las estrategias químicas para la modificación de los productos de la reacción con BAL para su posterior adición aldólica mediada por D-frustosa-6-fosfato aldolasa (FSA) y L-ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA).
- ➤ Síntesis de diferentes *C*-arilmonosacáridos y su caracterización estructural por técnicas de RMN.

# 2.2.3 Adición benzoínica intramolecular catalizada por benzaldehído liasa de *Pseudomonas fluorescens* biovar I. Nuevas aplicaciones del biocatalizador en síntesis orgánica.

- Evaluación de los requerimientos estructurales del sustrato necesaria para la reacción benzoínica intramolecular catalizada por BAL.
- ➤ Síntesis de nuevos dialdehídos derivados del 2,2'-(propano-1,3-diilbis(oxi))dibenzaldehído y su evaluación como sustratos en la reacción enzimática intramolecular catalizada por BAL.
- ➤ Síntesis enzimática y purificación de ciclos derivados del 7,8,14,15-tetrahidro-6*H*-dibenzo[*f,j*][1,5]dioxacicloundeceno. Caracterización por técnicas de RMN y difracción de rayos X.



Síntesis enzimática de  $\alpha,\alpha$ -dialquil- $\alpha$ -aminoácidos utilizando L-serina hidroximetiltransferasa de Streptococcus thermophilus modificada por ingeniería de proteínas.

# 3.1.1 Modificación por Ingeniería de Proteínas de la L-serina hidroximetiltransferasa de *Streptococcus thermophilus*: Incremento de la actividad hacia D-Ala y D-Ser como sustratos dadores.

Como se mencionó en el Capítulo 1 los  $\alpha$ , $\alpha$ -dialquil- $\alpha$ -aminoácidos poseen variadas actividades biológicas tanto individualmente como formando parte de estructuras más complejas. Su síntesis, por métodos enzimáticos, ha sido poco explorada ya que la mayoría las treonina aldolasas (TA) o las L-serina hidroximetiltransferasas (SHMT) con actividad TA poseen una selectividad elevada hacia Gly (**Figura 3.1**).

En nuestro grupo de investigación nos planteamos desarrollar una estrategia para la síntesis de  $\alpha$ , $\alpha$ -dialquil- $\alpha$ -aminoácidos por medios enzimáticos. Para ello se modificaron las propiedades catalíticas de una enzima con actividad TA utilizando ingeniería de proteínas (**Figura 3.1**)

$$R_{1} \stackrel{COO^{-}}{\longrightarrow} R_{1} \stackrel{COO^{-}}{\longrightarrow} R_{1} \stackrel{R_{2}}{\longrightarrow} COO^{-}$$

$$R_{1} \stackrel{R_{3}^{+}}{\longrightarrow} R_{1} \stackrel{R_{2}^{+}}{\longrightarrow} COO^{-}$$

$$R_{1} \stackrel{R_{2}^{+}}{\longrightarrow} COO^{-}$$

**Figura 3.1** Síntesis de  $\alpha$ , $\alpha$ -dialquil- $\alpha$ -aminoácidos por vía enzimática.

La SHMT de *Streptococcus thermophilus* (SHMT<sub>Sth</sub>) es un biocatalizador estudiado anteriormente en nuestro grupo de

investigación. Se conoce el espectro de sustratos que acepta la enzima y la estereoselectividad en la reacción de adición aldólica. Además se alcanzan altos niveles de expresión con rendimientos de 400 mg de enzima  $L^{-1}$  de cultivo de  $E.\ coli.^{92}$  También se dispone de la estructura tridimensional de la proteína obtenida por difracción de rayos X en colaboración con el grupo de la profesora Isabel Usón (Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC). Por ello, decidimos utilizar la SHMT $_{Sth}$  como enzima modelo para diseñar un biocatalizador activo hacia la síntesis de  $\alpha, \alpha$ -dialquil- $\alpha$ -aminoácidos.

Con el objetivo de modificar la selectividad de la SHMT<sub>Sth</sub> por el aminoácido dador se utilizó un diseño guiado por estructura. Para ello nos apoyamos en la  $\alpha$ -metilserina hidroximetiltransferasa (MSHMT), enzima que cataliza la retroaldólisis de  $\alpha$ -metilserina a de D-Ala y formaldehído/tetrahidrofolato (**Figura 3.2**)<sup>134,135</sup>.

**Figura 3.2** Estrategia general para el diseño de variantes de SHMT que catalicen la síntesis de  $\alpha$ , $\alpha$ -dialquil- $\alpha$ -aminoácidos.

Utilizando la secuencia de aminoácidos de 11 SHMT y 3 MSHMT descritas se realizó un alineamiento múltiple de secuencias (**Figura 3.3**, alineamiento completo en el material suplementario) y se encontró que

\*\*\*

la SHMT<sub>Sth</sub> posee alrededor de un 50 % de identidad de estructura primaria con las MSHMT. Además la SHMT<sub>Sth</sub> presenta en el centro activo tres aminoácidos conservados en la familia de las SHMT (Y55, Y65, H229), los cuales aparecen modificados en las MSHMT (T60, H70, T236) (**Figura 3.3**).

	<u> Y55</u>	<u>Y65</u>	<u>H229</u>	
$\mathtt{SHMT}_{\mathtt{Bst}}$	GSVLTNKYAEGY	PGRRYYGGCE-	VTTTT <b>h</b> KTLRGPRGGM	236
$SHMT_{Bsb}$	GSVLTNK <b>Y</b> AEGY	PGKRY <b>Y</b> GGCE-	VTTTT <b>h</b> KTLRGPRGGM	236
SHMT <sub>Sth</sub>	<b>GTLLTNKYAEGY</b>	PGKRYYGGTA-	<mark>TTTTTHKTLRGPRGGL</mark>	240
SHMT <sub>Eco</sub>	GSQLTNK <b>Y</b> AEGY	PGKRY <b>Y</b> GGCE	VTTTT <mark>H</mark> KTLAGPRGGL	241
MSHMT <sub>Ab</sub>	GHEMTNKTLEGY	PGNRFHGGGQ-	VTCTT <mark>T</mark> KTLRGPRGGL	245
MSHMT <sub>PC</sub>	GHEMTNKTLEGY	PGNRFHGGGQ-	VTCTT <b>T</b> KTLRGPRGGL	245
$\mathtt{MSHMT}_{Ef}$	GHEITNKTLEGY	PGNRFHGGGQ-	VTCTT <b>T</b> KTLRGPRGGL	245
SHMT <sub>Oac</sub>	GSCLNNK <b>Y</b> SEGY	PGQRY <b>Y</b> GGTE	VSTTT <b>h</b> KTLRGCRAGM	266
SHMT <sub>Occ</sub>	GSCLNNK <b>Y</b> SEGY	PGQRY <b>Y</b> GGTE	VTTTT <b>H</b> KTLRGCRAGM	266
$\mathtt{SHMT}_{\mathit{Oc}\mathtt{m}}$	GSCLNNK <b>Y</b> SEGY	PGKRY <b>Y</b> GGAE	VTTTT <b>H</b> KTLRGARSGL	260
$\mathtt{SHMT}_{\mathit{Hs}\mathtt{m}}$	GSCLNNK <b>Y</b> SEGY	PGKRY <b>Y</b> GGAE	VTTTT <b>H</b> KTLRGARSGL	275
$SHMT_{Pf}$	GDRISNK <b>Y</b> SEGY	PHKRY <b>Y</b> GGND-	VTTTT <b>H</b> KILRGPRSAL	247
$SHMT_{Mj}$	ATDFMHR <b>Y</b> AEGL	PGKRL <b>Y</b> QGCK	LMGST <b>H</b> KTFFGPQGGV	236
SHMT <sub>St</sub>	MSDFMSR <b>Y</b> AEGK	PYKRY <b>Y</b> QGTK	MTSST <b>H</b> KTFPGPQGGA	238

Figura 3.3 Fragmento del alineamiento múltiple de secuencia (ClustalW) de SHMT y MSHMT de diferentes organismos. SHMT de *B. stearothermophilus* (SHMT<sub>Bst</sub>, código (NCIB): S30382), SHMT de *B. subtilis* (SHMT<sub>Bst</sub>, WP\_014115504), SHMT de *S. thermophilus* (SHMT<sub>Sth</sub>, EHE87326), SHMT de *E. coli* (SHMT<sub>Eco</sub>, ACA76793), MSHMT de *Aminobacter sp.* AJ110403 (MSHMT<sub>Ab</sub>, BAG31001), MSHMT de *Paracoccus sp.* AJ110402 (MSHMT<sub>Pc</sub>, BAG 31000), MSHMT de *Ensifer sp.* AJ110404 (MSHMT<sub>Ef</sub>, BAG 31004), SHMT de *O. aries*, citosólica (SHMT<sub>Occ</sub>, NP\_001009469). SHMT de *O. cuniculus*, citosólica (SHMT<sub>Occ</sub>, NP\_001095187), SHMT de *O. cuniculus*, mitocondrial (SHMT<sub>Ocm</sub>, A33696), SHMT de *H. sapiens*, mitocondrial (SHMT<sub>Hsm</sub>, NP\_001159829), SHMT de *P. falciparum*, (SHMT<sub>Pf</sub>, AAF07198.1), SHMT de *M. jannaschii* (SHMT<sub>Mj</sub>, Q58992), SHMT de *S. tokodaii* (SHMT<sub>Si</sub>; Q971K4.1).

Con estas evidencias, nuestra hipótesis fue que las sustituciones: Y55T, Y65H y H229T podrían conferir a la SHMT<sub>Sth</sub>, actividad catalítica hacia otros aminoácidos dadores diferentes a la Gly. Presumiblemente al generar espacio suficiente para acomodar las cadenas laterales de aminoácidos más complejos originando un intermediario aminoácido-PLP con la disposición espacial óptima para la catálisis.

Para estudiar las propiedades catalítica de las variantes propuestas se utilizó como aldehído aceptor el (benciloxi)acetaldehído. Este compuesto ya había sido estudiado en nuestro grupo de investigación como sustrato de la SHMT<sub>Sth</sub>. Además puede ser monitorizado fácilmente por HPLC debido a la absorbancia del grupo fenilo en el UV a 215 ó 250 nm.<sup>43</sup>

En la selección del sustrato dador se utilizaron aminoácidos de la serie D. Esto se debe a que la enzima abstrae selectivamente el protón *pro-S* en el complejo aminoácido-PLP debido a que el enlace N-Cα no tiene libertad de giro en el centro activo de la enzima y ambos protones no son equivalentes (**Figura 3.4**). <sup>86</sup> De acuerdo con esto se seleccionaron los siguientes aminoácidos: D-Ala, D-Ser y D-Thr, en los que hay un aumento del volumen de la cadena en el Cα: Me < -CH<sub>2</sub>OH < -CH(OH)CH<sub>3</sub> (**Figura 3.4**). Para un estudio inicial de las variantes de SHMT<sub>Sth</sub> se utilizó D-Ser y D-Thr bajo la hipótesis que si una variante de la enzima catalizara la adición aldólica con estos aminoácidos muy probablemente también lo haría con D-Ala al tener como sustituyente, en el Cα, un grupo metilo menos voluminoso.

Hay que señalar que no puede utilizarse D-Cys como sustrato a pesar de ser estructuralmente semejante a la D-Ser. En presencia de la enzima la D-Cys reacciona con el PLP formando muy probablemente un derivado de tiazolidina que se libera del centro activo y la enzima queda libre de cofactor (apoenzima) (material suplementario electrónico). 152,153

**Figura 3.4** Representación de la aldimina externa aminoácido-PLP. La conformación queda fijada en el centro activo de la SHMT $_{Sth}$  y el enlace N-C $\alpha$  no tiene libertad de giro. La enzima abstrae el protón pro-S de Gly (protón de un aminoácido serie D). <sup>86</sup> Posibles sustratos utilizados en la adición aldólica catalizada por las variantes de SHMT $_{Sth}$ .

Utilizando la técnica de QuickChange<sup>TM</sup> <sup>154</sup> se construyeron todas las combinaciones posibles de variantes de la SHMT<sub>Sth</sub>: Y55T, Y65H, H229T, Y55T/Y65H, Y55T/H229T, Y65H/H229T y Y55T/Y65H/H229T, siendo estudiadas en la adición aldólica de D-Ser (1a) a (benciloxi)acetaldehído (2a). La enzima nativa no catalizó la reacción, mientras que la sustitución de la Tyr, en la posición 55, por Thr permitió alcanzar un 50 % de conversión en condiciones óptimas (Tabla 3.1). El resto de variantes de la enzima no catalizó esta reacción

probablemente debido a alteraciones en la estructura del centro activo que afectan negativamente la catálisis. Sin embargo la variante que posee las tres sustituciones de aminoácido alcanzó valores de conversión del 21 % en 24 h (**Tabla 3.1**).

**Tabla 3.1** Evaluación de la SHMT<sub>Sth</sub> nativa y las diferentes variantes propuestas en la adición aldólica de D-Ser (**1a**) a **2a**.

HO 
$$\frac{\text{COO}^{-}}{\text{NH}_{3}^{+}}$$
 +  $\frac{\text{SHMT}_{Sth}}{\text{O}}$   $\frac{\text{SHMT}_{Sth}}{\text{HO}}$   $\frac{\text{H}_{3}\text{N}}{\text{HO}}$   $\frac{\text{H}_{3}\text{N}}{\text{H}_{3}}$   $\frac{\text{H}_{3}\text{N}}{\text{HO}}$   $\frac{\text{$ 

Variante SHMT <sub>Sth</sub>	Producto 3aa % [a]
Nativa	0
Y55T	37 (50 <sup>[b]</sup> )
Y65H	1
H229T	0
Y55T/Y65H	10
Y55T/H229T	8
Y65H/H229T	2
Y55T/Y65H/H229T	21

<sup>[a]</sup>D-Ser (0,1 mmol), **2a** (0,025 mmol), PLP (0,3 μmol), pH 6,5, DMF o DMSO (20 % v/v), 2 mg de proteína, volumen total de la reacción 1 mL. El porcentaje de producto aldólico formado después de 24 h se determinó por HPLC, a partir del área de los picos en el cromatograma, utilizando un estándar externo para la cuantificación. Los valores son la media de tres medicines. <sup>[b]</sup>Reacción en 50 % DMF o DMSO (v/v).

De acuerdo con los resultados anteriores la naturaleza del aminoácido en la posición 55 modula la selectividad de la enzima por el aminoácido dador. A partir de aquí se pasó a estudiar el efecto de diferentes aminoácidos, en esta posición, sobre la formación del producto **3aa**. Se diseñaron oligonucleótidos degenerados del tipo **NNK** (**N**=A/G/C/T, **K**=T/G) para realizar mutación por saturación de

sitio. 154-157 En el diseño de los oligonucleótidos se mantuvo los codones que codifican para Thr porque sirvieron como control positivo dentro de la librería de clones.

En correspondencia con la degeneración de condones utilizada se construyó una librería con 94 colonias y se cribaron con la reacción aldólica descrita anteriormente, detectándose el producto **3aa** por HPLC (material suplementario electrónico). Los resultados mostraron una baja conversión en la reacción debido a una menor expresión de la SHMT<sub>Sth</sub> en placas de 96 pocillos (volumen cultivo 1 mL). En un primer análisis resultaron 7 clones positivos que se volvieron a ensayar a una escala mayor para incrementar la expresión de la enzima y verificar que eran realmente positivos. Dentro de los 7 clones se encontraron 2 nuevas variantes de la enzima que catalizaban la formación de **3aa** (Y55C y Y55S) y un falso positivo (Y55G) (**Tabla 3.2**).

Después de analizar la librería de variantes Y55X con D-Ser se utilizó D-Thr manteniendo **2a** como aldehído aceptor. Con este aminoácido no se encontró ningún biocatalizador capaz de catalizar la reacción de adición aldólica.

**Tabla 3.2** Adición aldólica de D-Ser a **2a** catalizada por los clones seleccionados. Enzima expresada a una escala de 10 mL.

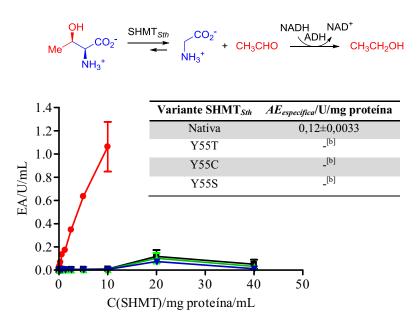
HO 
$$\frac{\text{COO}^-}{\text{NH}_3^+}$$
 +  $\frac{\text{SHMT}_{Sth}}{\text{O}}$   $\frac{\text{SHMT}_{Sth}}{\text{HO}}$   $\frac{\text{H}_{3}\text{N}}{\text{HO}}$   $\frac{\text{H}_{3}\text{N$ 

Variante SHMT <sub>Sth</sub>	Secuencia <sup>[a]</sup>	Producto 3aa % <sup>[b]</sup>
Y55T	ACT	55
Y55T	ACT	50
Y55T	ACG	54
Y55T	ACG	55
Y55C	TGT	39
Y55S	TCG	15
Y55G	GGT	0

<sup>[a]</sup>Secuencia de nucleótidos en el codón 55 (clones seleccionados). <sup>[b]</sup>D-Ser (0,1 mmol), **2a** (0,025 mmol), PLP (0,3 μmol), pH 6,5, DMF o DMSO (50 % v/v), volumen total de la reacción 1 mL. El porcentaje de producto aldólico formado después de 24 h se determinó por HPLC, a partir del área de los picos en el cromatograma, utilizando un estándar externo para la cuantificación.

## 3.1.2 Caracterización de las variantes Y55T, Y55C y Y55S de SHMT $_{Sth}$ .

Para cada una de las variantes de la enzima, Y55T, Y55C y Y55S se evaluó la actividad retro-aldólica utilizando L-Thr como sustrato. Ninguna de las variantes de la SHMT<sub>Sth</sub> fue activa para esta reacción, incluso a altas concentraciones de enzima (**Figura 3.5**). Esto se corresponde con los resultados reportados con SHMT Y51F de *Bacillus stearothermophilus* (Y51 corresponde al residuo Y55 en la SHMT<sub>Sth</sub>).<sup>158</sup>



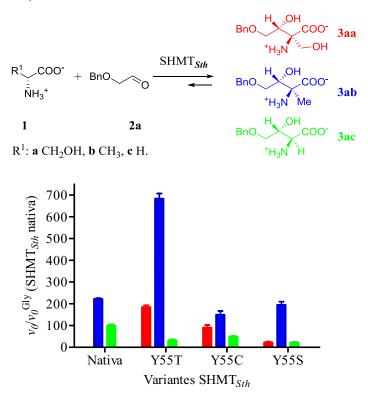
**Figura 3.5** Relación de la actividad enzimática (AE) con la concentración de biocatalizador. SHMT<sub>Sth</sub> nativa (•), Y55T (▼), Y55C (▲) y Y55S (■). Una unidad de actividad enzimática (U) es definida como los μmol de L-Thr consumidos por minuto en 0,1 M de tampón fosfato de potasio pH 6,5 a 37 °C. <sup>[b]</sup>Actividad no detectable.

Además de analizar la actividad retro-aldólica de los diferentes biocatalizadores se estudiaron las actividades catalíticas en reacciones de adición aldólica de Gly, D-Ala y D-Ser a **2a**. Así, en el caso de la Gly todas las formas de la SHMT<sub>Sth</sub> fueron menos activas que la enzima nativa, como lo demuestran las velocidades iniciales de formación de **3ac** (**Figura 3.6**).

Frente a la adición de D-Ser a 2a el orden de actividad fue: Y55T > Y55C > Y55S, mientras que la SHMT<sub>Sth</sub> nativa no catalizó la reacción. La variante Y55T media la formación de 3aa a una velocidad 185 veces superior a que la SHMT<sub>Sth</sub> nativa adiciona Gly a 2a (Figura 3.6).

En el caso de D-Ala, Y55T mostró una velocidad inicial 684 veces superior a la que la SHMT<sub>Sth</sub> nativa forma **3ac** (**Figura 3.6**).

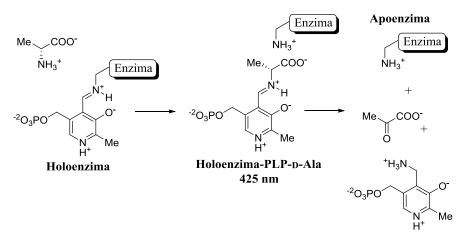
Un resultado sorprendente fue que la enzima nativa catalizara la adición aldólica de D-Ala a **2a** con una actividad 220 veces superior respecto a la mostrada con Gly. Hasta el momento no existe referencia de adiciones aldólicas de D-Ala a aldehídos catalizadas por SHMT nativas (**Figura 3.6**).



**Figura 3.6** Velocidad inicial relativa ( $v_0/v_0^{\text{Gly}}$  SHMT<sub>Sth</sub> nativa.) en la adición aldólica de D-Ser (rojo), D-Ala (azul) y Gly (verde) a **2a**.  $v_0$ , velocidad inicial de la reacción.  $v_0^{\text{Gly}}$  SHMT<sub>Sth</sub> nativa, velocidad inicial de la reacción entre **1c** y **2a** catalizado por SHMT<sub>Sth</sub> nativa.

De acuerdo con los resultados reportados en la literatura la D-Ala puede unirse al PLP en el centro activo de la enzima y formar el intermedio D-

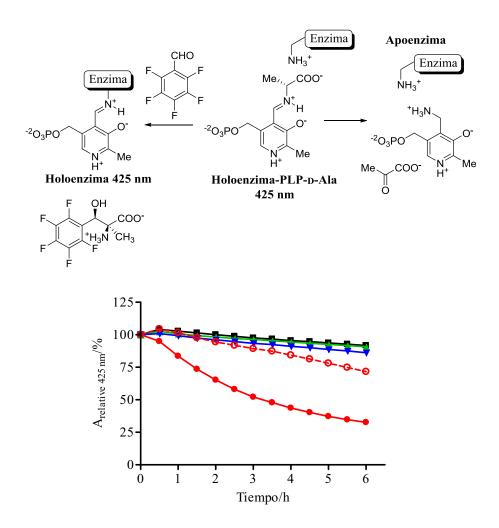
Ala-PLP, primera etapa en el mecanismo catalítico (**Figura 3.7**). Seguidamente a través de una "actividad suicida" la SHMT cataliza la transaminación entre el aminoácido y el PLP formando piruvato y fosfato de piridoxamina (actividad transaminasa). De esta manera se consume todo el cofactor y la enzima pierde su actividad catalítica (**Figura 3.7**). 159



**Figura 3.7** Mecanismo porpuesto para la "desactivación" de la SHMT<sub>Sth</sub> por transaminación entre D-Ala y PLP. El fosfato de piridoxamina no es cofactor de la enzima y se disocia del centro activo formando la apoenzima del biocatalizador. <sup>158</sup>

Al aparecer una contradicción entre los resultados experimentales de este trabajo y los datos reportados en la literatura se realizó un estudio del efecto de la D-Ala sobre la "desactivación" de la SHMT<sub>Sth</sub> nativa y las variantes Y55T, Y55C y Y55S. Para el caso de la enzima nativa a pH 6,0 la formación de la apoenzima sigue una cinética de primer orden con un  $t_{1/2}$  de la holoenzima de 3,3 h como lo demuestra la disminución de la absorbancia a 425 nm típica del complejo D-Ala-PLP (**Figura 3.8 y Tabla 3.3**). Sin embargo, al adicionar un aldehído aceptor como el 2,3,4,5,6-pentafluor benzadehído (**2m**) la velocidad de la reacción de transaminación fue 3,3 veces menor ( $t_{1/2}$  de la

holoenzima 11,3 h) (**Figura 3.8** y **Tabla 3.3**). Según estos resultados en presencia de un sustrato aceptor ocurrió un rescate químico del complejo D-Ala-PLP permitiendo la catálisis sobre la reacción de transaminación.



**Figura 3.8** Cinética de transaminación de D-Ala (0,1 M) con el complejo PLPapoSHMT<sub>Sth</sub>. Enzima nativa sin aldehído aceptor (•) y en presencia de **2m** (0,025 M) (•), SHMT<sub>Sth</sub> Y55T (▼), Y55C (▲) y Y55S (■) (5 mg mL<sup>-1</sup>). La reacción se realizó en placas de 96 pocillos (300  $\mu$ L) a pH 6,0 y 25 °C sin la adición de PLP.

Otro factor que influyó en la velocidad de la reacción de transaminación fue el pH. A valores de pH básicos, pH 8,0, la reacción de transaminación fue 2,5 veces más rápida en comparación con pH 6,0 ( $t_{1/2}$  de la holoenzima 1,4 h) (**Tabla 3.3**). Como las reacciones de adición aldólicas de D-Ala a diferentes aldehídos se realizaron a pH 6,0 es de esperar que se favorezca esta reacción sobre la transaminación entre el aminoácido y el cofactor.

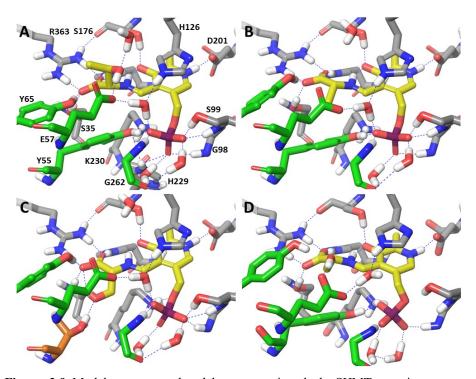
**Tabla 3.3** Constantes cinéticas aparentes de primer orden de la reacción de transaminación entre D-Ala y PLP y tiempo de vida media de la holoenzima de las variantes de SHMT $_{Sth}$ . Los parámetros cinéticos se obtuvieron al realizar un ajuste de los datos a un modelo mono-exponencial ( $y=Ae^{-kx}$ ), utilizando el software GraphPad (www.graphpad.com).

Variantes SHMT <sub>Sth</sub>	$k \ 10^{-2}/h^{-1}$	<i>t</i> <sub>1/2</sub> /h
Nativa	20±0,3 (pH 6,0)	3,3±0,05
	$6\pm0.2 \text{ (pH } 6.0 + 2\text{m)}$	11,3±0,3
	50±2 (pH 8,0)	$1,4\pm0,05$
Y55T	3±0,07 (pH 6,0)	$25,8\pm0,6$
Y55C	2±0,08 (pH 6,0)	33,8±1,3
Y55T	2±0,08 (pH 6,0)	$33,8\pm1,2$

En general la presencia de un sustrato aceptor y pH < 8 disminuyen la velocidad de formación de la apoenzima de la SHMT $_{Sth}$  cuando se utiliza D-Ala como aminoácido dador.

Es significativo destacar que para las holoenzimas de las variantes Y55T, Y55C y Y55S la velocidad de la reacción de transaminación con D-Ala fue 10 veces menor en comparación con la enzima nativa (**Tabla 3.3**). Este hecho demostró que el residuo Y55 influye en esta "actividad suicida" del biocatalizador.

Una vez realizado un estudio funcional de las variantes de la SHMT<sub>Sth</sub>, se realizó una interpretación estructural del comportamiento de los diferentes sistemas catalíticos estudiados en este capítulo. Para esto nos apoyamos en la estructura obtenida por difracción de rayos X del complejo L-Thr-PLP-SHMT<sub>Sth</sub> (material suplementario) y varios modelos (**Figura 3.9**).



**Figura 3.9** Modelos estructurales del centro activo de la SHMT<sub>Sth</sub> nativa con L-Thr(**A**) (comparada con la estructura obtenida por difracción de rayos X, este modelo incluye los átomos de hidrógeno y sólo una de las conformaciones alternativas para el residuo K230), D-Ala (**B**) y D-Ser (**D**) unidas formando la aldimina externa. También aparece representado la aldimina externa con D-Ser (**C**) para la variante SHMT<sub>Sth</sub> Y55T. Las aldiminas se muestran en amarillo, los residuos de la proteína en gris o verde, significando que pertenecen a diferentes monómeros y el residuo T55 (**C**) en anaranjado. Los modelos fueron construidos a partir de la estructura de rayos X del complejo L-Thr-SHMT<sub>Sth</sub>.

Los modelos construidos con D-Ala (**Figura 3.9 B**) sugirieron que el aminoácido podría formar la aldimina externa con la enzima nativa adoptando una conformación similar al complejo L-Thr-PLP. De esta manera el grupo metilo del aminoácido estaría orientado hacia el interior de la cavidad del centro activo y el átomo de hidrógeno en el Cα (H-Cα) podría abstraerse para formar el intermediario quinoideo. El H-Cα se encuentra próximo al grupo carboxilo del residuo E57 (4,4 Å) y de una molécula de agua (3,9 Å) que está activada por una red de puentes de hidrógeno entre el grupo fosfato del PLP, el residuo E57 y H126. Para los modelos con D-Ser y la variante Y55T (**Figura 3.9 C**) se muestra que el espacio generado al eliminar el anillo fenólico de la Y55 es ocupado por el grupo hidroximetilo de la D-Ser. En esta conformación también el H-Cα aparece próximo al residuo E57 (3,0 Å) y la molécula de agua (3,3 Å).

De acuerdo con lo anterior durante la catálisis es necesario una disposición espacial del complejo aminoácido-PLP con el H-Cα próximo a un residuo ácido-base (residuo E57 o molécula de agua). Con el objetivo de esclarecer el papel del residuo E57 se diseñaron variantes del biocatalizador en esta posición y se evaluaron en la adición aldólica de Gly al dimetoxiacetaldehído. Las variantes de la SHMT<sub>Sth</sub> E57Q, E57L, E57V y E57K fueron activas para esta reacción (**Tabla 3.4**) incluso cuando se sustituyó el Glu por aminoácidos cuyas cadenas laterales no pueden actuar como grupos ácido-bases (Gln, Leu y Val). Esto demostró que el Glu, en la posición 57, no es esencial para la catálisis quedando la molécula de agua como mejor candidato en la abstracción del H-Cα, de manera similar a como se describe en la L-treonina aldolasa de *Aeromonas jandaei*. 133

**Tabla 3.4** Reacción de adición aldólica de Gly al dimetoxiacetaldehído catalizado por varias variantes de la SHMT $_{Sth}$  obtenidas por modificación de los aminoácidos en la posición E57.

$$\begin{array}{c} \text{Variantes SHMT}_{Sth} \\ \text{O} \\ \text{NH}_3^+ \end{array} \begin{array}{c} \text{OH} \\ \text{O} \\ \text{NH}_3^+ \end{array} \begin{array}{c} \text{OH} \\ \text{O} \\ \text{NH}_3^+ \end{array}$$

Variantes SHMT <sub>Sth</sub>	Conversión <sup>[a]</sup> / % 24 h
Nativa	61
E57Q	95
E57L	58
E57V	91
E57K	10

[a]La reacción (1 mL) se realizó con Gly (0,1 mmol), dimetoxiacetaldehído (0,1 mmol, 17 μL de una solución acuosa 5,8 M), PLP (0.3 μmol), enzima (2mg mL<sup>-1</sup>) a pH 6,5 y 25 °C. La cantidad de producto aldólico formado después de 24 h se determinó por HPLC detectando los *N*-Cbz-aminoácidos previo tratamiento de las muestras de reacción (10 μL) con CbzOSu (50 μL, 0,5 M en acetonitrilo) a 60 °C durante 1 h. La cuantificación se realizó a partir del área de los picos en el cromatograma utilizando un estándar externo.

El resultado anterior es importante para explicar la ausencia de actividad enzimática de la SHMT<sub>Sth</sub> nativa en reacciones de adición aldólica con D-Ser como sustrato dador. El modelo con este aminoácido mostró que la SHMT<sub>Sth</sub> nativa podría formar la aldimina externa pero el grupo hidroximetilo de la D-Ser adoptaría una orientación opuesta a la que se describió con SHMT<sub>Sth</sub> Y55T (**Figura 3.9 D**). La cadena lateral del aminoácido formaría puentes de hidrógeno con los residuos E57 y Y65 bloqueando el acceso del H-Cα a la molécula de agua (> 5 Å) postulada por nosotros como posibles residuo ácido-base.

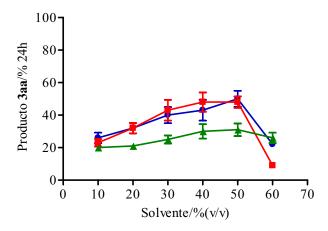
### 3.1.3 Estudio de las condiciones del medio de reacción en la adición aldólica catalizada por SHMT<sub>Sth</sub> Y55T.

Dado los escasos ejemplos en la literatura sobre la aplicación de las SHMT en biocatálisis, inicialmente se utilizaron condiciones de reacción para este biocatalizador que fueron válidas para otras enzimas estudiadas en nuestro grupo de investigación. Por ejemplo, empleando como catalizador SHMT<sub>Sth</sub> nativa se sintetizaron varios β-hidroxi-α,ω-diamoniácidos a través de adición aldólica de Gly a diferentes Cbz-aminoaldehídos con DMF (20 % v/v) de en el medio de reacción. Por otro lado en un estudio preliminar de la adición aldólica de D-Ser al (benciloxi)acetaldehído, catalizado por SHMT<sub>Sth</sub> Y55T, se mejoró la formación de producto cuando se aumentó la concentración de cosolvente de un 10 % a un 50 % (v/v) en el medio de reacción.

En este punto y a la vista de los resultados anteriores se realizó un estudio más detallado sobre el efecto de las condiciones del medio de reacción en la formación de los productos de adición aldólica. Como variables se seleccionaron la concentración y naturaleza del solvente orgánico, la relación molar entre los sustratos, la concentración de cofactor, el pH del medio y la concentración de biocatalizador. No se estudió el efecto de la temperatura porque a medida que se disminuye comienza a precipitar el aminoácido debido a la alta concentración de cosolvente en el medio de reacción.

## 3.1.3.1 Efecto de la naturaleza y concentración del solvente orgánico.

Como reacción modelo para realizar los estudios de las diferentes variables del medio de reacción, se escogió la adición aldólica de D-Ser a 2a. Se realizó la reacción en un sistema de cosolventes, por la experiencia que se tenía previamente en el trabajo con la SHMT<sub>Sth</sub>. <sup>43</sup> Como cosolvente orgánicos se utilizó DMF, DMSO y polietilenglicol 400 (PEG-400). También se ensayaron otros solventes como el acetonitrilo, dioxano, tetrahidrofurano y acetona pero en estos casos 2a no se mantuvo en solución mostrando coalescencia con formación de dos fases. Con DMF y DMSO la formación de 3aa siguió un comportamiento similar mientras que con el PEG-400 los rendimientos de producto fueron menores (Figura 3.10).

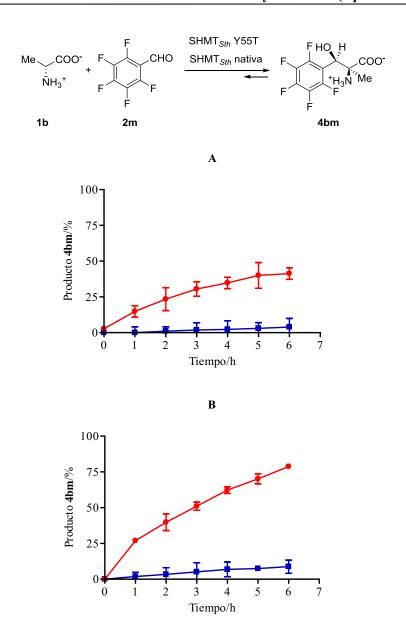


**Figura 3.10** Efecto del tipo de solvente orgánico y su concentración (% v/v) en la formación de **3aa** catalizado por SHMT<sub>Sth</sub> Y55T (2 mg mL<sup>-1</sup>). DMSO (■), DMF (●) y PEG-400 (▲). La reacción (1 mL), D-Ser (0,1 M), se realizó a 25 °C, pH 6,0 y añadiendo cofactor (PLP 0,3 µmol mL<sup>-1</sup>).

Con un 50 % (v/v) de DMF o DMSO se incrementó la formación de **3aa** hasta un 50 % en 24 h (**Figura 3.10**). Cuando se utilizó mayores concentraciones de cosolvente disminuyó la cantidad de producto formado probablemente por inactivación de la enzima. Debido a que no hubo diferencias en la formación de producto con DMF o DMSO se escogió realizar las reacciones de adición aldólica con el segundo solvente por su menor toxicidad en comparación con la DMF. 161,162

El incremento de la concentración de solvente orgánico aumenta la solubilidad del aldehído aceptor (2a), lo que posiblemente explica los incrementos en la conversión de la reacción. Con otro sustrato aceptor como 2m (aldehído soluble en agua a concentración 25 mM) y D-Ala (no se utilizó D-Ser como aminoácido dador porque no es sustrato en esta reacción) se alcanzaron conversiones de reacción menores del 10 % (6 h) en ausencia de DMSO tanto para la variante Y55T como para la enzima nativa (Figura 3.11). Cuando se añadió un 50 % de DMSO (v/v) se alcanzó un 40 % y un 80 % de formación de 4bm con Y55T y la enzima nativa respectivamente (Figura 3.11).

El aumento de la solubilidad del sustrato aceptor no es la única causa responsable del incremento en la formación de producto. El cosolvente puede modificar localmente la estructura de la enzima en el centro activo, favoreciendo la catálisis. También se ha descrito que la presencia de solvente orgánico en el centro activo de las enzimas puede afectar la solvatación de los diferentes grupos catalíticos y la constante dieléctrica del medio influyendo significativamente en la catálisis. 163

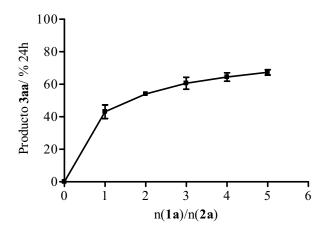


**Figura 3.11** Cinética de formación de **4bm** en la reacción de adición aldólica de D-Ala (100 mM) a **2m** (25 mM) catalizado por SHMT<sub>Sth</sub> Y55T (2 mg mL<sup>-1</sup>) (**A**) y la enzima nativa (2 mg mL<sup>-1</sup>) (**B**) en ausencia de DMSO (**1**) y adición de DMSO (50 % v/v) (•). La reacción (1 mL) se realizó a 25 °C, pH 6,0 y añadiendo cofactor (PLP 0,3 μmol mL<sup>-1</sup>).

#### 3.1.3.2 Efecto de la relación molar entre los reaccionantes.

El exceso de uno de los sustratos de partida permite desplazar equilibrios de reacción hacia la formación de productos. En reacciones biocatalíticas también se puede compensar un valor elevado de  $K_m$  utilizando un exceso de sustrato. Si bien, se debe tener en cuenta que cantidades adicionales de un reaccionante no se transforman pudiendo dificultar las etapas de purificación posteriores o incluso inhibir la enzima.

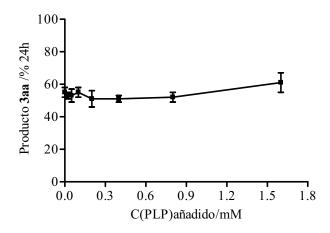
Los máximos rendimientos en la formación de **3aa** se alcanzaron adicionando un exceso de 4 equivalentes del aminoácido respecto al aldehído (**Figura 3.12**). Estas relaciones molares se corresponden con las utilizadas en la síntesis de α,α-dialquil-α-aminoácidos con TA como biocatalizador. Un efecto similar se observó para la adición de Gly al (*S*)-*N*-Cbz-alaninal catalizado por SHMT<sub>sth</sub> nativa. Igualmente se describió el uso de 3 a 4 equivalentes de Gly en la adición aldólica al 1-penten-4-al catalizado por SHMT de *E. coli*. <sup>89,90</sup> Manteniendo esta relación molar entre los reaccionantes se trabajo con una concentración de aminoácido de 0,1 M. A concentraciones mayores aparecen problemas de solubilidad en la mezcla de reacción por la concentración de solvente orgánico utilizada.



**Figura 3.12** Efecto de los equivalentes de D-Ser (**1a**) en la formación de **3aa**. La reacción (1 mL) se realizó con D-Ser (cantidad variable), **2a** (0,025 M), SHMT<sub>Sth</sub> Y55T (2 mg mL<sup>-1</sup>), DMSO (50 % v/v), PLP (0,3  $\mu$ mol mL<sup>-1</sup>) a 25 °C y pH 6,0.

#### 3.1.3.3 Efecto de la concentración de cofactor añadido a la reacción.

En la adición aldólica de D-Ser a **2a**, catalizada por SHMT<sub>Sth</sub> Y55T, no se observó variaciones en la formación de **3aa** con el incremento de la concentración de PLP añadido a la reacción (**Figura 3.13**). Esto puede deberse a que en la última etapa del proceso de purificación la enzima fue sometida a diálisis con tampón fosfato de potasio (10 mM pH 7,0) y PLP (0,01 μmol/mL) para saturar al biocatalizador de cofactor. Las cantidades de PLP apartadas a la reacción junto con la enzima son suficientes para garantizar la catálisis y esto presupone una ventaja desde un punto de vista económico.

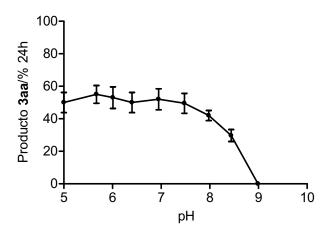


**Figura 3.13** Efecto de la concentración de PLP añadido a la reacción en la formación de **3aa**. La reacción (1 mL) se realizó con D-Ser (0,1 M, 4eq), **2a** (0,025 M, 1eq), SHMT<sub>Sth</sub> Y55T (2 mg mL<sup>-1</sup>), DMSO (50 % v/v) a 25 °C y pH 6,0.

Los resultados obtenidos contrastan con los descritos en la literatura. Por ejemplo, la adición de Gly a 4-penten-1-al, catalizada por SHMT de *E. coli*, requiere una concentración final de cofactor en la reacción entre 40 µM<sup>89</sup> y 1,16 mM.<sup>90</sup> Otras enzimas PLP dependientes también muestran una dependencia de su actividad enzimática con la concentración de cofactor incorporado en la reacción.<sup>164,165</sup>

#### 3.1.3.4 Efecto del pH.

La SHMT<sub>Sth</sub> nativa muestra un pH óptimo entre 6,0 y 7,0 en la retroaldólisis de L-Thr.  $^{92}$  En la adición aldólica de D-Ser a **2a**, catalizada por SHMT<sub>Sth</sub> Y55T, se observó un comportamiento similar con una máxima formación de producto a pH ácidos y neutros (5,0 - 7,5). A pH básicos disminuye la formación de **3aa** debido a la inactivación de la enzima (**Figura 3.14**).  $^{92}$ 

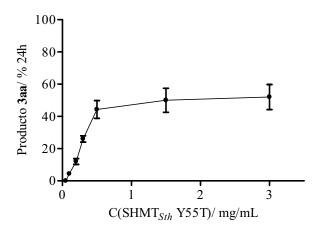


**Figura 3.14** Efecto de la variación del pH en la formación de **3aa**. La reacción (1 mL) se realizó con D-Ser (0,1 M, 4eq), **2a** (0,025 M, 1eq), SHMT<sub>Sth</sub> Y55T (2 mg mL<sup>-1</sup>), DMSO (50 % v/v) a 25 °C.

#### 3.1.3.5 Efecto de la concentración de enzima.

Durante cualquier proceso biocatalítico ocurre la "desactivación" de la enzima debido a las condiciones del medio de reacción o la formación de producto (inhibición por producto). La cantidad de biocatalizador necesario para alcanzar la máxima transformación de sustrato en producto está determinado por su actividad y la velocidad con que ocurre su "desactivación". También es frecuente observar que cantidades adicionales de enzima no conducen a incrementos en las conversiones de reacción debido a que se alcanza el equilibrio químico entre reaccionantes y productos.

En la adición aldólica de D-Ser a 2a, catalizada por la SHMT<sub>Sth</sub> Y55T, se alcanzó una máxima formación de 3aa a concentraciones de enzima mayores de 0.5 mg mL<sup>-1</sup> (**Figura 3.15**).



**Figura 3.15** Efecto de la variación de la concentración de SHMT<sub>Sth</sub> Y55T en la formación de **3aa**. La reacción (1mL) se realizó con D-Ser (0.1 M, 4eq), **2a** (0.025 M, 1eq), DMSO (50 % v/v) a 25 °C y pH 6,0.

En resumen, las mejores condiciones de reacción encontradas para la síntesis del ácido (2*S*,3*R*)-2-amino-4-(benciloxi)-3-hidroxi-2-(hidroximetil)butírico (**3aa**) catalizado por SHMT<sub>Sth</sub> Y55T fueron: cosolvente DMSO (50 % v/v) y n(**1a**)/n(**2a**) = 4 con C(**1a**) = 100 mM y C(**2a**) = 25 mM. No fue necesario adicionar cofactor y la reacción se realizó a pH 6,0 con una C(SHMT<sub>Sth</sub>) = 2 mg mL<sup>-1</sup> y temperatura de 25 °C. Estas condiciones se extrapolaron a la síntesis del otros α,α-dialquil-α-aminoácidos.

## 3.1.4 Síntesis de $\alpha,\alpha$ -dialquil- $\alpha$ -aminoácido y su caracterización estructural.

En trabajos anteriores se observó que aldehídos con anillos aromáticos en su estructura como el (benciloxi)acetaldehído (**2a**) y aminoaldehídos *N*-Cbz protegidos eran sustratos de la SHMT<sub>Sth</sub>. <sup>43,92</sup> En base a esto se

seleccionaron aldehídos estructuralmente variados y se ensayaron como sustratos aceptores en adiciones aldólicas catalizadas por SHMT $_{Sth}$  nativa junto con las variantes Y55T, Y55C y Y55S a D-Ser (1a), D-Ala (1b) y Gly (1c) (Figura 3.16).

Variantes SHMT 
$$Sth$$
  $R^2$   $CO_2H$   $R^2$   $CO_2H$   $R^2$   $R^3$   $R^4$   $R^2$   $R^4$   $R^4$   $R^2$   $R^4$   $R^4$ 

**Figura 3.16** Adición aldólica de D-Ser (**1a**), D-Ala (**1b**) y Gly (**1c**) a diferentes aldehídos catalizado por SHMT<sub>Sth</sub> nativa y las variantes de la enzima Y55T, Y55C y Y55S. Los aldehídos **2b-f** fueron obtenidos a partir de los alcoholes *O* y *N* protegidos por oxidación con ácido 2-iodoxibenzoico (IBX). 114,117,120

La D-Ser (1a) no fue sustrato de la SHMT<sub>Sth</sub> nativa con ninguno de los aldehídos estudiados mientras que la variante Y55T fue el mejor biocatalizador para esta reacción, seguido de Y55C y el Y55S (**Figura 3.17**, resultados cuantitativos en material suplementario). Con D-Ala (2a) SHMT<sub>Sth</sub> Y55T también fue el mejor biocatalizador, exceptuando los aldehídos aromáticos 2l-n. La enzima nativa catalizó las reacciones de adición aldólica con D-Ala llegando a conversiones superiores al 80 % con los aldehídos 2l-n. Por último, frente a la Gly el mejor biocatalizador fue la SHMT<sub>Sth</sub> nativa.

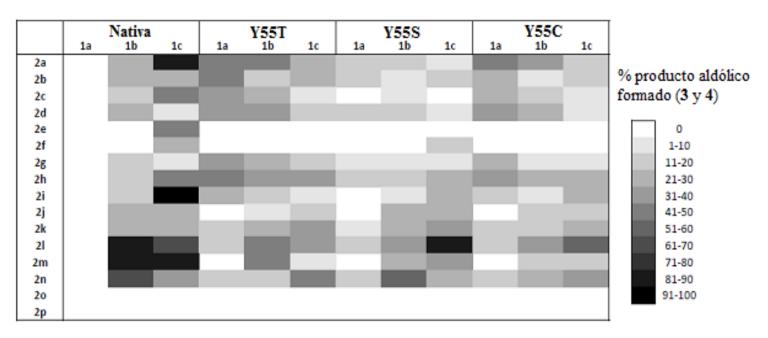


Figura 3.17 Representación cualitativa de los por ciento de formación de producto aldólico (3 y 4) en la adición de D-Ser (1a), D-Ala (1b) y Gly (1c) a diferentes aldehídos (2a-p) catalizado por SHMT<sub>Sth</sub> nativa y las variantes Y55T, Y55C y Y55S.

En este estudio se incluyeron aldehídos derivados del benzaldehído, nunca ensayados como sustratos de la SHMT<sub>Sth</sub>. De acuerdo con los resultados obtenidos aldehídos aromáticos con grupos electro-aceptores fueron buenos sustratos en la adición aldólica catalizada por SHMT<sub>Sth</sub> y sus variantes. Por ejemplo, en la adición de Gly a 2j, 2l y 2m, catalizado por enzima nativa, la formación de producto a las 24 h siguió el orden: 2m (81 %) > 2l (63 %) > 2j (25 %). Un comportamiento similar se observó con D-Ala y la variante Y55T 2m (43 %)  $\approx$  2l (41 %) > 2j (9 %) o la enzima nativa 2m (85 %)  $\approx$  2l (90 %) > 2j (21 %). Por otro lado los aldehídos con grupos electro-donadores (2o y 2p) no son sustratos de la enzima. La diferencia de reactividad puede ser explicada por el incremento de la electrofilicidad del carbono del grupo carbonilo por grupos electro-aceptores en posiciones o- y p- del anillo aromático. Un comportamiento similar fue descrito para diferentes TA.  $^{166,167}$ 

De acuerdo con los resultados anteriores se escalaron las reacciones de 1mL, a nivel analítico, a 250 mL y se aislaron y caracterizaron los productos de reacción. (**Tabla 3.5**) (Espectros de RMN en el material suplementario).

**Tabla 3.5** Conversión (**Conv**.) y rendimiento de producto aislado (**Rend**) en la reacción de adición aldólica de D-Ser (**1a**), D-Ala (**1b**) y Gly (**1c**) a varios aldehídos (**2**) catalizado por SHMT<sub>Sth</sub> nativa y la variante Y55T. (Los procesos de purificación no fueron optimizados).

$\mathbb{R}^1$	CH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	Н
$SHMT_{Sth}$	Y55T	Nativa	Y55T	Nativa
$\mathbb{R}^2$	Conv(3+4) <sup>[a]</sup> /% (Rend)/%	Conv(3+4) <sup>[a]</sup> /% (Rend)/%	Conv(3+4) <sup>[a]</sup> /% (Rend)/%	Conv(3+4) <sup>[a]</sup> / %(Rend)/%
BnOCH <sub>2</sub> ( <b>2a</b> )	47 (28)	24 (21)	61 (36)	_[d]
BnO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> ( <b>2b</b> )	32 (20)	27 (11)	45 (22)	15 (5)
CbzNHCH <sub>2</sub> (2c)	44 (21)	44 (18)	39 (23)	_[d]
CbzNH(CH2)2 (2d)	31 (16)	25 (9)	38 (6)	_[d]
$C_6H_5CH_2$ (2g)	22 (14)	_[b]	34 (22)	_[b]
$C_6H_5(CH_2)_2$ (2h)	31 (23)	44 (31)	52 (35)	18 (10)
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OCH <sub>2</sub> ( <b>2i</b> )	40 (22)	40 (21)	71 (20)	33 (13)
$C_6H_5$ (2j)	_[b]	25 (16)	_[b]	29 (10)
4-C1C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ( <b>2k</b> )	12 (5)	35 (20)	24 (12)	29 (15)
2-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (2 <b>1</b> )	14 (9)	55 (29)	48 (26)	59 (48)
$C_6F_5$ (2m)	_[b]	94 (31)	_[c]	86 (65)
4-O <sub>2</sub> NC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ( <b>2n</b> )	21 (15)	83 (51)	61 (43)	60 (56)

<sup>[a]</sup>El porcentaje de producto aldólico formado después de 24 h se determinó por HPLC a partir del área de los picos en el cromatograma utilizando un estándar externo para la cuantificación. <sup>[b]</sup>No hay reacción. <sup>[c]</sup>Reacción no escalada. <sup>[d]</sup>Reacciones estudiadas en un trabajo anterior en nuestro grupo de investigación. <sup>43</sup>

## 3.1.4.1 Determinación de la estereoquímica de los productos derivados de Gly.

Una de las ventajas del uso de biocatalizadores es su elevada estereoselectividad.<sup>25-27</sup> Por razones mecanísticas la SHMT<sub>Sth</sub> muestra un control absoluto de la estereoquímica del Cα en el producto de reacción cualquiera que sea la estructura del sustrato aceptor. Sin embargo la estereoquímica en el Cβ puede verse comprometida debido a una orientación menos restrictiva del aceptor en el centro activo de la enzima. Es decir, el ataque del nucleófilo puede producirse por ambas caras estereotópicas del grupo carbonilo del aldehído.<sup>85</sup> Por tanto, la enzima tiende a producir mezclas de diastereómeros en dependencia de las condiciones de reacción y los sustratos utilizados.<sup>43</sup>

Para determinar la configuración de los productos de las reacciones se utilizó técnicas de RMN y difracción de rayos X.

Con los productos derivados de la reacción con Gly se sintetizaron las oxazolidin-2-onas, con el objetivo de obtener una estructura cíclica donde se restringiera la libertad de giro en el enlace  $C\alpha$ - $C\beta$ . De acuerdo a la regla de Karplus ( $J_{\text{H-H}} = f(\cos\phi)$ ,  $\phi$  águlo diedro), <sup>168,169</sup> es de esperar que en los productos cíclicos  ${}^3J(\text{H}_a,\text{H}_b)$  (**3c**) >  ${}^3J(\text{H}_a,\text{H}_b)$  (**4c**) (**Figura 3.18**).

**Figura 3.18** Formación de las oxazolidin-2-onas de los productos **3c** y **4c** derivados de Gly. **i** CO(OCCl<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, 12 h, 25 °C.

Las constantes de acoplamiento  ${}^3J(H_a,H_b)$  para la oxazolidin-2-ona derivada del producto  ${\bf 3c}$  fueron mayores que las del producto  ${\bf 4c}$ , como debía esperarse según la estereoquímica planteada ( ${\bf Tabla}$  3.6). También se aprecia que  $\delta(H_a)({\bf 3c}) > \delta(H_a)({\bf 4c})$  y  $\delta(H_b)({\bf 3c}) > \delta(H_b)({\bf 4c})$  (material suplementario), resultados que se corresponden con los obtenidos con anterioridad en  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -aminoácidos con la misma estereoquímica ( ${\bf Tabla}$  3.6). De acuerdo con esto se pudo asignar inequívocamente la configuración absoluta de ambos diastereómeros.

**Tabla 3.6** Constantes de acoplamiento  ${}^3J({}^1H, {}^1H)$  (Hz) en las oxazolidin-2-onas sintetizadas a partir de los productos de adición aldólica de la Gly a diferentes aldehídos catalizado por SHMT<sub>Sth</sub> nativa.

$$H_{a}$$
  $H_{a}$   $H_{a}$   $H_{a}$   $H_{a}$   $H_{a}$   $H_{a}$   $H_{a}$   $H_{b}$   $H_{b}$   $H_{b}$   $H_{a}$   $H_{b}$   $H_{b$ 

oxazolidin-2-ona derivada de **3c** oxazolidin-2-ona derivada de **4c** 

		3c	4c
$\mathbb{R}^2$	Producto	$^{3}J(H_{a},H_{b})$	$^3J(H_a,H_b)$
$BnOCH_2$	<b>3cb,4cb</b>	8,5	4,8
$C_6H_5(CH_2)_2$	3ch,4ch	8,8	5,4
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OCH <sub>2</sub>	3ci,4ci	9,8	5,0
$C_6H_5$	3cj,4cj	8,9	4,9
4-C1C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3ck,4ck	8,9	4,9
$2-FC_6H_4$	3cl,4cl	9,0	5,0
$C_6F_5$	3cm,4cm	10,0	5,9
$4-O_2NC_6H_4$	3cn,4cn	9,0	5,0

La razón diastereomérica para cada producto se determinó por <sup>1</sup>H RMN (material suplementario electrónico). No fue posible distinguir los diastereómeros de los diferentes productos por HPLC con fase reversa (C18) porque tuvieron tiempos de retención muy similares. De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que la SHMT<sub>Sth</sub> nativa tuvo una baja diastereoselectividad en las condiciones de reacción utilizadas (**Tabla 3.7**). Estos resultados están en correspondencia con los obtenidos en nuestro grupo de investigación con otros aldehídos a 25 °C. <sup>43</sup>

50:50

**Tabla 3.7** Razón diastereomérica (rd) de los productos de adición aldólica de Gly a diferentes aldehídos catalizado por SHMT<sub>Sth</sub> nativa.

#### 3.1.4.2 Determinación de la estereoquímica de los productos derivados de D-Ala.

3cn,4cn

 $4-O_2NC_6H_4$ 

Para la elucidación de la estereoquímica de los productos derivados de D-Ala también se recurrió a la formación de oxazolidin-2-onas (**Figura 3.19**).

**Figura 3.19** Formación de las oxazolidin-2-onas de los productos **3b** y **4b** derivados de D-Ala. **i** CO(OCCl<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, 12 h, 25 °C.

Estos aminoácidos carecen de protón en el  $C\alpha$  por lo que no fue posible utilizar las  ${}^3J(H_a,H_b)$  para determinar la estereoquímica. La proximidad espacial entre los H del grupo metilo en el  $C\alpha$  y el H en el  $C\beta$ , en la estructura cíclica de **3b**, originó una señal nOe (de las siglas en ingles **n**uclear **O**verhauser **e**ffect) entre ambos. En el caso de la oxazolidin-2-onas derivadas de **4b** por la separación entre ambos grupo de protones la señal nOe entre ellos fue menos intensa en comparación con **3b** (**Tabla 3.8** y **3.9**, espectros RMN en material suplementario).

De esta manera se pudo determinar inequívocamente la señal de cada estereoisómero en los espectros de RMN y se calculó la razón diastereomérica para cada producto. Estos resultados se comprobaron con los obtenidos por HPLC, porque a diferencia de los productos de Gly los diastereómeros **3b** y **4b** pudieron ser separados en fase reversa (C18).

**Tabla 3.8** Desplazamientos químicos ( $\delta$  ppm) de  $^{1}$ H y  $^{13}$ C en oxazolidin-2-onas sintetizadas a partir de los productos de adición aldólica de D-Ala a diferentes aldehídos catalizado por SHMT<sub>Sth</sub> Y55T.



oxazolidin-2-ona derivada de 3b

oxazolidin-2-ona derivada de 4b

$\mathbb{R}^2$	Productos	$\delta H_{\text{Me}}$	$\delta C_{Me}$	$\delta H_b$	$\delta C_b$	NOE 3b:4b <sup>[a]</sup>
BnOCH <sub>2</sub>	3ba	1,56	20,52	4,03	72,03	_[b]
	4ba					_
BnO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	3bb	1,56	21,11	3,71	74,25	_[b]
\ <u>-</u> /	4bb					_
CbzNHCH <sub>2</sub>	3bc	1,54	19,46	4,74	76,22	_[b]
-	4bc					-
CbzNH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	3bd	1,60	21,67	3,72	70,73	_[b]
(= 2)2	4bd					-
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub>	3bg	1,65	21,16	3,95	75,12	84:16
-0 3- 2	4bg	1,57	19,32	4,01	74,47	04.10
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	3bh	1,52	20,30	3,70	74,23	75:25
-0 3(- 2)2	4bh	1,41	19,05	3,79	73,38	13.23
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OCH <sub>2</sub>	3bi	1,65	20,95	4,24	72,18	_[b]
-0 3 2	4bi					-
4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3bk	1,70	20,95	4,93	75,83	80:20
. 0100114	4bk	1,36	20,40	4,96	75,11	00.20
2-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3bl	1,64	20,14	5,28	70,24	72.29
	4bl	1,41	19,75	5,42	69,05	72:28
4-O <sub>2</sub> NC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3bn	1,74	21,11	5,07	75,48	_[b]
1 021(00114	4bn					<u> -</u> . ,

 $<sup>^{[</sup>a]}$ Relación de las intensidades de los nOe entre  $H_{Me}$ - $H_{C\beta}$  en los productos **3b** y **4b**. Los valores se han ponderado teniendo en cuenta la abundancia de cada diastereómero.  $^{[b]}$ Se detecta sólo una señal de nOe intenso entre  $H_{Me}$ - $H_{C\beta}$ .

**Tabla 3.9** Desplazamientos químicos (δ ppm) de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C en oxazolidin-2-onas sintetizadas a partir de los productos de adición aldólica de D-Ala a diferentes aldehídos catalizado por SHMT<sub>Sth</sub> nativa.



oxazolidin-2-ona derivada de 3b

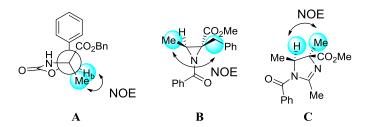
oxazolidin-2-ona derivada de 4b

$\mathbb{R}^2$	Productos	$\delta H_{\text{Me}}$	$\delta C_{Me}$	$\delta H_b$	$\delta C_b$	NOE 3b:4b <sup>[a]</sup>
$BnOCH_2$	3ba	1,55	20,52	4,02	72,13	_[b]
	4ba					
BnO(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	3bb	1,55	21,04	3,70	74,27	74:26
	4bb	1,40	18,91	3,77	73,74	,20
CbzNHCH <sub>2</sub>	3bc	1,55	19,49	4,74	76,40	_[b]
	4bc					
CbzNH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	3bd	1,58	25,32	3,72	70,92	_[b]
/-	4bd					_
$C_6H_5(CH_2)_2$	3bh	1,52	20,55	3,72	74,02	86:14
0 5( 2)2	4bh	1,41	18,92	3,80	73,25	00.14
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OCH <sub>2</sub>	3bi	1,65	20,84	4,24	72,23	[b]
0 5 2	4bi					-
$C_6H_5$	3bj	1,66	24,41	5,45	87,56	92:8
-0 5	4bj	0,99	20,48	5,83	84,79	92.8
4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3bk	1,64	24,21	5,43	86,57	95:5
	4bk	0,96	20,59	5,80	84,03	93.3
2-FC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3bl	1,68	24,35	5,76	81,70	89:11
04	4bl	1,06	19,68	6,07	80,57	89.11
$C_6F_5$	3bm	1,32	21,64	5,22	72,09	90:10
C01 3	4bm	1,24	19,94	6,29	77,22	90:10
	3bn	1,69	24,29	5,60	85,82	
$4-O_2NC_6H_4$	4bn	0,98	20,56	5,95	83,41	92:8

 ${}^{[a]}$ Relación de las intensidades de los nOe entre  $H_{Me}$ - $H_{C\beta}$  en los productos **3b** y **4b**. Los valores se han ponderado teniendo en cuenta la abundancia de cada diastereómero.  ${}^{[b]}$ Se detecta sólo una señal de nOe intenso entre  $H_{Me}$ - $H_{C\beta}$ .

En la literatura se reportan ejemplos de esta estrategia en la elucidación de estereoquímica para compuestos similares. Por ejemplo, esta metodología ha sido utilizada anteriormente para asignar la estereoquímica relativa de  $\alpha$ -metilserinas- $\beta$ -sustituidas describiéndose un nOe entre los protones del grupo metilo en el C $\alpha$  y el protón en el

Cβ en (4R,5R)-4-metil-2-oxo-5-feniloxazolidina-4-carboxilato de bencilo (**Figura 3.20 A**). También se ha descrito nOe entre grupos en *cis* en otros tipos de moléculas con estructuras rígidas como aziridinas sustituidas y 4,5-dihidro-1*H*-imidazoles (**Figura 3.20 B y C**).



**Figura 3.20** Determinación de la estereoquímica de diferentes heterociclos utilizando el efecto nOe. **A**, (4R,5R)-4-metil-2-oxo-5-feniloxazolidina-4-carboxilato de bencilo<sup>131</sup>, **B**, (2R,3S)-1-benzoil-2-bencil-3-metilaziridina-2-carboxilato de metilo y **C**, (4S,5S)-1-benzoil-2,4,5-trimetil-4,5-dihidro-1*H*-imidazol-4-carboxilato de metilo.<sup>170</sup>

Es de destacar que a pesar que la SHMT<sub>Sth</sub> nativa y la variante Y55T pueden utilizar D-Ala como sustrato, la diastereoselectividad del segundo biocatalizador es superior, detectándose en varios casos sólo un diastereómero (**Tabla 3.10**). Esto constituye una novedad porque una de las limitaciones que han encontrado las enzimas con actividad treonina aldolasa para su aplicación en biocatálisis es su promiscuidad estereoquímica en la formación del segundo centro quiral durante la adición aldólica. En este trabajo no sólo se incrementó la selectividad de SHMT<sub>Sth</sub> hacia sustratos dadores diferentes de Gly, sino también se ha creado un biocatalizador estereoselectivamente superior.

**Tabla 3.10** Razón diastereomérica (*rd*) de los productos de adición aldólica de D-Ala a diferentes aldehídos catalizado por SHMT<sub>Sth</sub> nativa y la variante Y55T.

		Variante SHMT <sub>Sth</sub>		
		Y55T	Nativa	
$\mathbb{R}^2$	<b>Productos</b>	rd (3b:4b)	rd(3b:4b)	
$BnOCH_2$	3ba,4ba	≥ 95:≤ 5	95:5	
$BnO(CH_2)_3$	3bb,4bb	95:5	72:28	
CbzNHCH <sub>2</sub>	3bc,4bc	$\geq$ 95: $\leq$ 5	93:7	
CbzNH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	3bd,4bd	$\geq$ 95: $\leq$ 5	91:9	
$C_6H_5CH_2$	3bg,4bg	86:14	_[a]	
$C_6H_5(CH_2)_2$	3bh,4bh	85:15	65:35	
$C_6H_5OCH_2$	3bi,4bi	95:5	86:14	
$C_6H_5$	3bj,4bj	_[a]	42:58	
$4-C1C_6H_4$	3bk,4bk	71:29	40:60	
$2-FC_6H_4$	3bl,4bl	76:24	29:71	
$C_6F_5$	3bm,4bm	_[a]	8:92	
$4-O_2NC_6H_4$	3bn,4bn	92:8	44:56	

<sup>[</sup>a]Reacciones no escaladas.

#### 3.1.4.3 Determinación de la estereoquímica de los productos derivados de D-Ser.

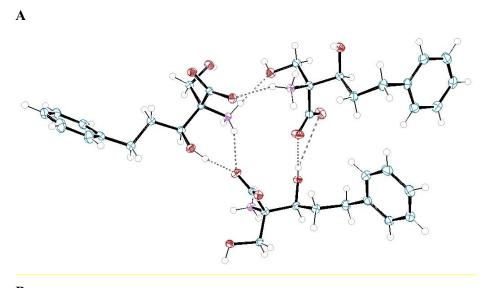
La introducción de un grupo hidroximetilo en  $C\alpha$  hizo muy difícil la modificación de los productos derivados de D-Ser. Ningunas de las reacciones ensayadas permitió modificar el grupo amino, carboxilo o hidroxilos de la molécula (material suplementario).

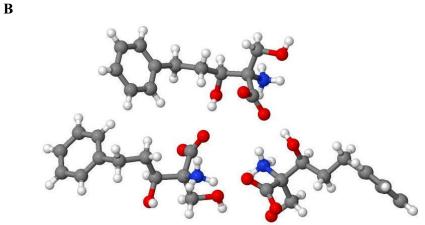
A pesar de esto, por técnicas de RMN sólo se observó un diastereómero, salvó en el caso de los productos derivados del fenilacetaldehído (2g) donde aparecieron las señales de ambos estereoisómeros (3ag y 4ag). Utilizando experimentos NOESY 1D

selectivos (material suplementario) combinados con los datos de desplazamiento químico ( $\delta$ ) de  $^{1}$ H y  $^{13}$ C de los productos sintetizados con Gly, D-Ala y D-Ser se pudo inferir los  $\delta(^{1}$ H) y  $\delta(^{13}$ C) relativos para cada diastereómero (**Tabla 3.11**). A partir de estos resultados se determinó que los productos derivados de D-Ser presentan estereoquímica *anti* (**3a**). Para confirmar inequívocamente lo antes expuesto se cristalizó el producto **3ah** analizándose la configuración por técnicas de difracción de rayos X (**Figura 3.21**).

**Tabla 3.11** Desplazamiento químico relativo de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C en los productos de adición aldólica **3** y **4**.

Producto	δ (¹H) relativo	δ ( <sup>13</sup> C) relativo
H b OH HO b H	H(3) <sub>a</sub> >H(4) <sub>a</sub>	$C(4)_a > C(3)_a$
R <sup>2</sup> <sup>+</sup> H <sub>3</sub> N H + H <sub>3</sub> N H  3cb,h-n 4cb,h-n	$H(3)_b > H(4)_b$	$C(3)_b > C(4)_b$
H OH HO H	$H(4)_b > H(3)_b$	$C(4)_a > C(3)_a$
$R^2$ b $r$ $c$ $R^2$ b $r$ $c$ $r$	$H(3)_c > H(4)_c$	$C(3)_b > C(4)_b$
3ba-d,g-i,k,l,n 4ba-d,g-i,k,l,n		$C(3)_c > C(4)_c$
H_OH HO_H a_COO-	$H(4)_b > H(3)_b$	$C(4)_a > C(3)_a$
$R^2$ b OH $R^2$ b OH $H_3$ N C OH	$H(3)_c > H(4)_c$	$C(3)_b > C(4)_b$
3aa-d,g-i,k,l,n 4ag,h,k,l,n	$H(3)_{c}$ ,> $H(4)_{c}$ ,	$C(3)_c > C(4)_c$





**Figura 3.21** Disposición espacial de los grupos en el zwitterion **3ah** obtenida por difracción de rayos X. **A**, Representación de los elipsoides térmicos (50 % de probabilidades) utilizando el programa ORTEP (Oak Ridge Thermal Ellipsoid Plot). **B**, Representación en modelos de bolas y varillas. Longitud de la celda unitaria (Å): 5.878 9.088 33.054. Ángulos de la celda unitaria (grados): 90.000 93.118 90.000. Cristal monoclínico. Aparecen representadas tres moléculas en la unidad asimétrica.

Al igual que con los productos derivados de D-Ala la variante de la SHMT $_{Sth}$  Y55T mostró una elevada estereoselectividad en la síntesis de  $\beta$ -hidroxi- $\alpha$ -hidroximetil- $\alpha$ -aminoácidos derivados de D-Ser,

detectándose por RMN sólo un diastereómero (exceptuando **3ag** y **4ag**, **Tabla 3.12**).

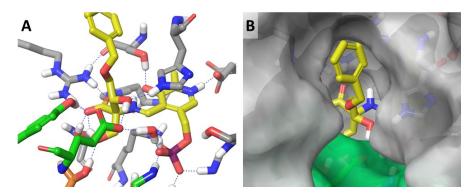
**Tabla 3.12** Razón diastereomérica (*rd*) de los productos de adición aldólica de D-Ser a diferentes aldehídos catalizado por SHMT<sub>Sth</sub> Y55T.

$$R^{2} \stackrel{\text{H}}{=} CO_{2}^{-}$$
 $R^{2} \stackrel{\text{OH}}{=} CO_{2}^{-}$ 
 $R^{2} \stackrel{\text{OH}}{=} CO_{2}^{-}$ 

$\mathbb{R}^2$	Productos	rd (3a:4a)
BnOCH <sub>2</sub>	<b>3aa,4aa</b>	≥95: ≤ 5
$BnO(CH_2)_3$	<b>3ab,4ab</b>	≥95: ≤ 5
CbzNHCH <sub>2</sub>	3ac,4ac	≥95: ≤ 5
$CbzNH(CH_2)_2$	3ad,4ad	≥95: ≤ 5
$C_6H_5CH_2$	3ag,4ag	87:13
$C_6H_5(CH_2)_2$	3ah,4ah	≥95: ≤ 5
$C_6H_5OCH_2$	3ai,4ai	≥95: ≤ 5
4-ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	3ak,4ak	≥95: ≤ 5
$2-FC_6H_4$	3al,4al	≥95: ≤ 5
$4-O_2NC_6H_4$	3an,4an	≥95: ≤ 5

De acuerdo a los resultados obtenidos la variante Y55T muestra una elevada estereoselectividad en la adición aldólica de D-Ala o D-Ser a diferentes aldehídos. Un modelo de la aldimina externa de **3aa** unida al centro activo de la SHMT<sub>Sth</sub> Y55T (**Figura 3.22**) mostró que el grupo benciloxi se extiende a través del canal del centro activo formado por las dos subunidades de la enzima. El grupo 3-OH establece puentes de hidrógeno con los residuos E57 y H126, de manera similar a como lo hace el grupo hidroxilo de la L-Thr. Tal interacción probablemente también estabilice el acercamiento del aldehído por su cara *re* al complejo quinoideo favoreciendo la formación del producto de adición *anti* (**3aa**). Este análisis puede extenderse al resto de los aldehídos con

los que el biocatalizador muestra una elevada estereoselectividad hacia la formación del producto *anti*.



**Figura 3.22 A**: Modelo de la aldimina externa para el compuesto **3aa** (amarillo) unido en el centro activo de la SHMT<sub>Sth</sub> Y55T. **B**: Modelo donde se muestra la superficie de cada monómero formando el centro activo.

#### 3.1.5 Resumen.

En la SHMT<sub>Sth</sub> la sustitución de la Tyr, en la posición 55, por Thr fue suficiente para ampliar la selectividad de la enzima hacia aminoácidos α-sustituidos. El nuevo biocatalizador, SHMT<sub>Sth</sub> Y55T, catalizó la adición aldólica de D-Ala y D-Ser a varios aldehídos alifáticos y aromáticos sintetizándose nuevos α,α-dialquil-α-aminoácidos. Desde un punto de vista estructural la mayor selectividad de la SHMT<sub>Sth</sub> Y55T se puede explicar porque la sustitución del grupo fenólico de Y55 por el grupo hidroxietilo de Thr genera una cavidad en el centro activo de la enzima. Muy probablemente en este espacio se acomode el grupo hidroximetilo de la D-Ser permitiendo que el complejo D-Ser-PLP adopte una conformación semejante al complejo L-Thr-PLP en la enzima nativa.

Un hecho no reportado hasta el momento fue la adición aldólica de D-Ala diferentes aldehídos catalizado por  $SHMT_{Sth}$ nativa. Contrariamente a lo esperado, según la literatura, la SHMT<sub>Sth</sub> no fue "desactivada" por este aminoácido. Un estudio más detallado mostró que la presencia de sustrato aceptor y el pH influyen en la velocidad de formación de la apoenzima. En el caso de las variantes de la enzima estudiadas en este trabajo Y55T, Y55C y Y55S la velocidad del proceso de desactivación con D-Ala fue un orden de magnitud más lento en comparación con la enzima nativa lo que demuestra que el residuo Y55 influye en la actividad de transaminación entre la D-Ala y el cofactor.

Un estudio de las condiciones de reacción mostró que la enzima tolera altas concentraciones de solvente orgánico, hasta un 50 % (v/v) de DMSO. El cosolvente contribuyó a solubilizar los sustratos hidrofóbicos pero muy probablemente influye en la estructura del biocatalizador favoreciendo la catálisis. Esto no se había descrito hasta el momento debido a que la SHMT han sido poco estudiada con fines biocatalíticos.

Otro aspecto novedoso en este trabajo fue que la sustitución Y55T también aumentó la estereoselectividad de la enzima. En las reacciones de adición aldólica de D-Ala o D-Ser a diferentes aldehídos la SHMT<sub>Sth</sub> Y55T catalizó la formación del diastereómero *anti* (3) ( $\geq$  95 % en la mayoría de los casos).

Desarrollo de una estrategia quimio-enzimática en la síntesis de *C*-arilmonosacáridos utilizando benzaldehído liasa de *Pseudomonas fluorescens* biovar I, D-frutosa-6-fosfato aldolasa y L-ramnulosa-1-fosfato aldolasa de *E. coli*.

# 3.2.1 Síntesis quimio-enzimática de *C*-arilmonosacáridos utilizando benzaldehído liasa de *Pseudomonas fluorescens* biovar I, D-frutosa-6-fosfato aldolasa y L-ramnulosa-1-fosfato aldolasa de *E. coli*.

Los carbohidratos son moléculas que juegan importantes roles en eventos fisiológicos y patológicos, como por ejemplo: la adhesión celular, la fertilización, la metástasis cancerosa, etc. 138-143 Su síntesis es tediosa y requiere, por lo general, numerosos pasos de reacción y protección-desprotección de grupos funcionales, 145,148,150 siendo necesarias etapas de purificación difíciles por la similitud en la polaridad y solubilidad entre productos y subproductos. 171

Las aldolasas son biocatalizadores útiles en la síntesis de carbohidratos por su elevada estereoselectividad y eficiencia catalítica. Generalmente no se utilizan grupos protectores debido a la alta quimio y regioselectividad durante la reacción de adición aldólica. Además permiten generar diversidad estructural variando los diferentes sustratos de la reacción. 114,117

En este capítulo se describe la utilización de carboligasas en la preparación de C-arilmonosacáridos. Una vía elegante de síntesis biocatalítica sería la adición secuencial de glicolaldehído a diferentes aldehídos mediada por D-frutosa-6-fosfato aldolasa (FSA) (Figura 3.23), de manera similar a la ruta de síntesis de derivados de D-idosa desarrollada en nuestro grupo de investigación (Tesis: Chemoenzymatic Synthesis of Carbohydrates and Derivatives with Engineered D-Fructose-6-Phosphate Aldolase, Anna Szekrényi, Universidad de Barcelona, 2014). Sin embargo, la estrategia no es adecuada porque aldehídos aromáticos no son sustratos de la FSA.

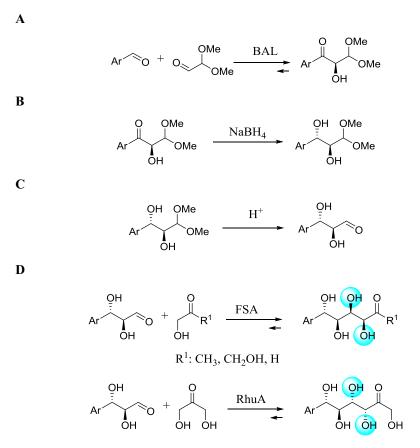
**Figura 3.23** Esquema de retro-síntesis de *C*-arilmonosacáridos mediante la adición aldólica secuencial de glicolaldehído a aldehídos aromáticos catalizado por D-frutosa-6-fosfato aldolasa (FSA). La reacción falla porque los aldehídos aromáticos no son sustratos de la enzima.

Una ruta alternativa de síntesis de C-arilmonosacáridos se desarrolló a través de la reacción benzoínica cruzada de aldehídos aromáticos a dimetoxiacetaldehído catalizada por benzaldehído liasa de Pseudomonas fluorescens biovar I (BAL). A continuación se redujo el grupo carbonilo e hidrolizó el acetal para dar derivados de 3-aril-2,3dihidroxipropanal (Figura 3.24). Estos aldehído fueron utilizado en reacciones de adición aldólica a hidroxiacetona (HA, R<sup>2</sup>: CH<sub>3</sub>), dihidroxiacetona (DHA, R<sup>2</sup>: CH<sub>2</sub>OH) o glicolaldehído (GO R<sup>2</sup>: H) catalizado por FSA nativa y las variantes A129S y A129T respectivamente. También se utilizó L-ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA) como biocatalizador en la adición aldólica de DHA a derivados de 3-aril-2,3-dihidroxipropanal (**Figura 3.24**).

**Figura 3.24** Esquema de retro-síntesis de *C*-arilmonosacáridos utilizando una estrategia quimio-enzimática.

En la estrategia planteada se unen las potencialidades sintéticas de la BAL en la reacción benzoínica (Figura 3.25 A) y aldolasas en las

adiciones aldólicas (**Figura 3.25 D**). Estas reacciones biocatalíticas se combinan con dos etapas químicas sencillas para la adecuación de las funcionalidades de las moléculas (**Figura 3.25 B y C**).



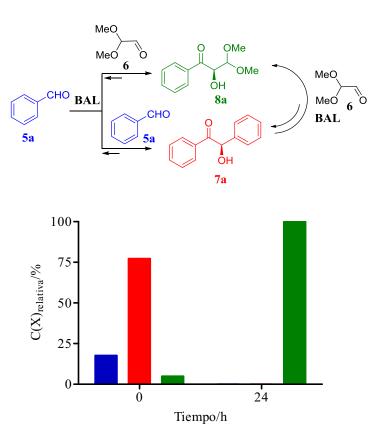
**Figura 3.25** Esquema de síntesis de *C*-arilmonosacáridos utilizando una estrategia quimio-enzimática. **A**, Adición benzoínica cruzada de aldehídos aromáticos al dimetoxiacetaldehído catalizado por BAL. **B**, Reducción. **C**, Desprotección. **D**, Reacciones de adición aldólica catalizada por FSA o RhuA.

## 3.2.2 Estudio de la adición benzoínica cruzada de aldehídos aromáticos al dimetoxiacetaldehído catalizado por BAL.

En la literatura se reportan pocos ejemplos de la adición benzoínica cruzada entre aldehídos aromáticos y dimetoxiacetaldehído catalizada por BAL. 95,100,172 Por ello se decidió realizar un estudio más detallado de esta reacción empleando dos sustratos modelos: benzaldehído y vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) como ejemplo de aldehído aromático sustituído. 173

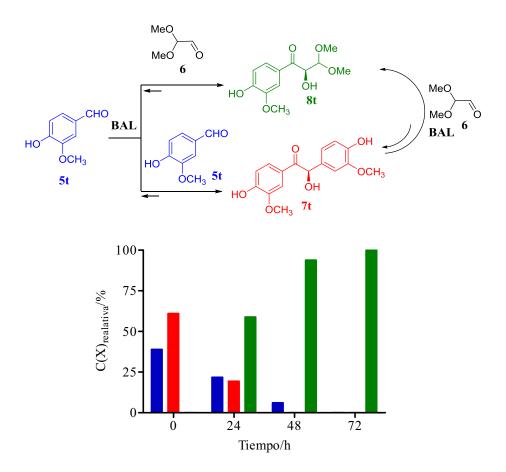
La reacción benzoínica cruzada de ambos aldehído aromáticos y el dimetoxiacetaldehído se estudió en un sistema homogéneo utilizando como cosolvente DMSO y en un sistema bifásico tampón:*tert*-butilmetiléter (MTBE). La elección de estos solventes se debió a que la BAL ha sido utilizada en síntesis orgánica en medios con cosolvente, DMSO (20-30 % v/v)<sup>95,99</sup> y en sistemas bifásicos tampón:dietiléter, tampón:diisopropiléter o tampón:MTBE.<sup>100</sup> Es de señalar que no se trabajó con el dietiléter por su elevada volatilidad y el diisopropiléter resultó ser un mal solvente para solubilizar la vainillina a las concentraciones que se realizaron las reacciones de adición benzoínica cruzada.

El estudio se comenzó con un sistema homogéneo, utilizando DMSO (20 % v/v) para solubilizar al benzaldehído (5a). En estas condiciones ocurrió una rápida reacción de autoadición benzoínica del aldehído aromático obteniéndose (*R*)-benzoina, mientas que la formación del producto de adición cruzada (8a) con el dimetoxiacetaldehído (6) ocurrió con una menor velocidad de reacción. Después de 24 h no se detectó benzaldehído y (*R*)-benzoina, apareciendo sólo el producto de adición cruzada (Figura 3.26).



**Figura 3.26** Reacción de adición benzoínica cruzada de benzaldehído (**5a** en azul) a dimetoxiacetaldehído (**6**), catalizado por BAL, en un sistema homogéneo. **7a** en rojo y **8a** en verde. Reacción (2 mL) contiene **5a** (0,2 mmol), **6** (0,4 mmol), DMSO (20 % v/v), BAL (50 U mL<sup>-1</sup>), tampón carbonato de sodio (50 mM pH 8,0, MgSO<sub>4</sub> 2,5 mM y ThDP 0,15 mM) a 25 °C. La cantidad de producto formado se determinó por el área de los picos en el cromatograma de HPLC utilizando un estándar externo.

En el caso de la vainillina (5t), después de 24 h de reacción hubo una mezcla de aldehído de partida, producto de autoadición (7t) y producto de adición cruzada (8t) (Figura 3.27). Fue necesario utilizar más biocatalizador para alcanzar la conversión total de 8t a las 72 h de reacción (3 adiciones de enzima cada 24 h) (Figura 3.27).



**Figura 3.27** Reacción de adición benzoínica cruzada de vainillina (**5t** en azul) a dimetoxiacetaldehído (**6**), catalizado por BAL, en un sistema homogéneo. **7t** en rojo y **8t** en verde. Reacción (2 mL) contiene **5t** (0,2 mmol), **6** (0,4 mmol), DMSO (20 % v/v), BAL (50 U mL<sup>-1</sup>), tampón carbonato de sodio (50 mM pH 8,0, MgSO<sub>4</sub> 2,5 mM y ThDP 0,15 mM) a 25 °C. Cada 24 h fueron añadidas 100 U de enzima. La cantidad de producto formado se determinó por el área de los picos en el cromatograma de HPLC utilizando un estándar externo.

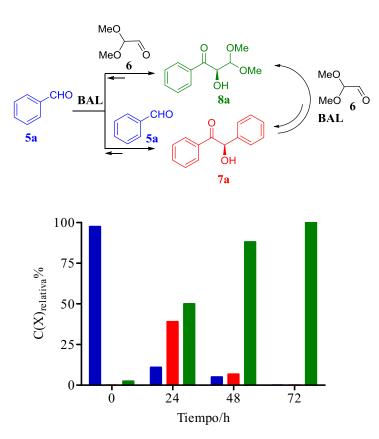
De acuerdo con estos resultados, en un medio con cosolventes la BAL catalizó la autoadición benzoínica a una velocidad de reacción mayor que la formación del producto de adición cruzada con el dimetoxiacetaldehído. Esto se debe a la elevada selectividad de la enzima hacia aldehídos aromáticos tanto en el sitio del dador como en

el del aceptor. En un medio de reacción con cosolventes se establecen una serie de equilibrios entre los sustratos de partida, la benzoina de autoadición y el producto de adición cruzada (Figura 3.28). En este medio ocurre un "secuestro químico" del sustrato dador en forma de producto de autoadición, por lo que la velocidad de la reacción benzoínica cruzada vendrá determinada por: la actividad del biocatalizador en la adición del complejo aldehído aromático-ThDP (I) al dimetoxiacetaldehído, las velocidades de los procesos de síntesis y escisión de la benzoina de autoadición y la solubilidad de los productos de autoadición (Figura 3.28).

Para disminuir la formación del producto de autoadición se debe utilizar un exceso de dimetoxiacetaldehído (6) para favorecer la reacción benzoínica cruzada. Un sistema bifásico resulta muy apropiado para este fin teniendo en cuenta que se logra un exceso de 6, en la fase acuosa, a través de la relación molar entre los sustratos añadidos a la reacción y el reparto mayoritario hacia el solvente orgánico del aldehído aromático.

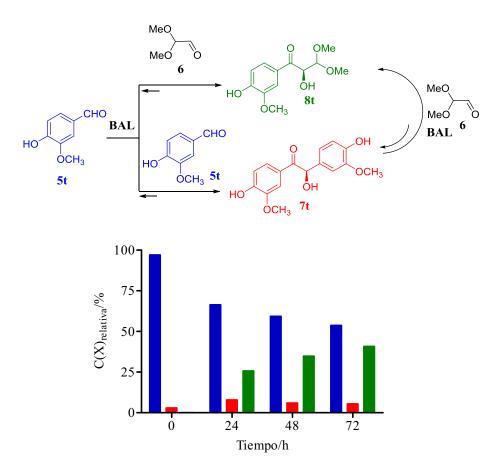
**Figura 3.28** Representación de las reacciones competitivas de adición benzoínica, catalizado por BAL, en un medio de reacción homogéneo (DMSO 20 % v/v) con benzaldehído y dimetoxiacetaldehído como sustratos. Se representa en rojo un fragmento de la molécula de cofactor, pirofosfato de tiamina.

Considerando lo anterior se estudiaron las reacciones de adición benzoínicas cruzadas, catalizadas por BAL, en un sistema bifásico tampón:MTBE (1:1 v/v). Cuando se utilizó benzaldehído, después de 24 h la reacción no se completó quedando sustrato de partida y producto de autoadición sin transformar (**Figura 3.29**). Por ello fue necesaria la adición de más enzima cada 24 h. Después de 72 h sólo se detectó producto de adición cruzada en el medio de reacción (**Figura 3.29**).



**Figura 3.29** Reacción de adición benzoínica cruzada de benzaldehído (**5a** en azul) a dimetoxiacetaldehído (**6**), catalizado por BAL, en un sistema bifásico. **7a** en rojo y **8a** en verde. Reacción (2 mL fase acuosa, 2 mL MTBE) contiene **5a** (0,2 mmol), **6** (0,4 mmol), BAL (50 U mL<sup>-1</sup>), tampón carbonato de sodio (50 mM pH 8,0, MgSO<sub>4</sub> 2,5 mM and ThDP 0,15 mM) a 25 °C. Cada 24 h fueron añadidas 100 U de enzima. La cantidad de producto formado se determinó por el área de los picos en el cromatograma de HPLC utilizando un estándar externo.

Un comportamiento similar se observó para la reacción entre la vainillina y el dimetoxiacetaldehído. Para este sustrato después de 72 h y adiciones sucesivas de enzima (3 cada 24 h) la conversión no fue completa (**Figura 3.30**).



**Figura 3.30** Reacción de adición benzoínica cruzada de vainillina (**5t** en azul) a dimetoxiacetaldehído (**6**), catalizado por BAL, en un sistema bifásico. **7t** en rojo y **8t** en verde. Reacción (2 mL fase acuosa, 2 mL MTBE) contiene **5t** (0,2 mmol), **6** (0,4 mmol). BAL (50 U mL<sup>-1</sup>), tampón carbonato de sodio (50 mM pH 8,0, MgSO<sub>4</sub> 2,5 mM y ThDP 0,15 mM) y 25 °C. Cada 24h fueron añadidas 100 U de enzima. La cantidad de producto formado se determinó por el área de los picos en el cromatograma de HPLC utilizando un estándar externo.

Los resultados obtenidos en un sistema tampón:MTBE demuestran que se favorece la reacción directa entre el aldehído aromático y el dimetoxiacetaldehído (**Figura 3.31**) debido a la mayor solubilidad del aldehído aromático en la fase orgánica, ejemplo:  $C(5t)_{fase\ acuosa} \approx 6\ mM$  y  $C(5t)_{fase\ orgánica} \approx 94\ mM$  y  $C(6)_{tampón} \approx 0,2\ M$ , lo que hace que en la

fase acuosa hayan 33 equivalentes de 6 respecto a 5t. La disminución de la concentración del sustrato dador en la fase acuosa también provocó que la reacción de adición benzoínica cruzada fuera más lenta, necesitándose más biocatalizador para alcanzar la máxima conversión en producto con respecto a un medio con cosolventes. Por otra parte, el producto de adición cruzada también se repartió entre la fase orgánica y la fase acuosa contribuyendo a desplazar los equilibrios de reacción hacia su formación y facilitando su separación del medio de reacción (Figura 3.31).

**Figura 3.31** Representación esquemática de la reacción de adición benzoínica, catalizado por BAL, de benzaldehído a dimetoxiacetaldehído en tampón:MTBE (1:1, v/v). Se representa en rojo un fragmento de la molécula de cofactor, pirofosfato de tiamina.

Considerando los aspectos del proceso y la viabilidad de recuperar el producto directamente del medio de reacción se decidió utilizar un sistema bifásico para la adición benzoínica cruzada entre aldehídos aromáticos y el dimetoxiacetaldehído catalizada por BAL. La idea

prioritaria fue utilizar directamente el producto de reacción en la fase orgánica en el siguiente paso de síntesis. De esta forma se minimiza el uso de solventes orgánicos en comparación con un sistema homogéneo que requeriría utilizar un cosolvente para la reacción y un solvente inmiscible en agua para la extracción del producto.

Los altos rendimientos en la expresión y purificación de la BAL, 12 000 U L<sup>-1</sup> (300 mg L<sup>-1</sup>), hacen que la cantidad de biocatalizador no sea una variable limitante en la selección del medio de reacción. Además la enzima puede utilizarse en síntesis orgánica sin pasos previos de purificación disminuyendo el coste económico del biocatalizador en vista a una futura aplicación industrial.<sup>100</sup>

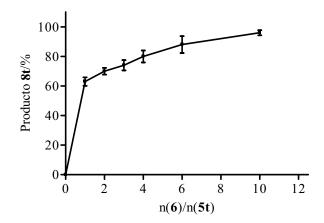
Las condiciones de reacción en un medio bifásico se optimizaron para alcanzar la máxima conversión de producto de adición cruzada en 24 h. Para ello se estudió el efecto de las siguientes variables: relación molar dimetoxiacetaldehído-aldehído aromático, concentración de enzima y concentración de dimetoxiacetaldehído.

Como sustrato modelo se seleccionó la vainillina, que resultó menos activo que el benzaldehído. Con ello se garantizó que las mejores condiciones de reacción encontradas permitirían abarcar un espectro mayor de sustratos con los cuales se obtenga un máximo rendimiento en la formación de producto de adición cruzada.

# 3.2.2.1 Efecto de la relación molar 6:5t en la formación de (*R*)-2-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3,3-dimetoxipropan-1-ona (8t) catalizado por BAL.

Se estudió el efecto de la relación molar entre el dimetoxiacetaldehído y la vainillina en la formación del producto de adición benzoínica

cruzada catalizado por BAL. Para ello se varió la relación molar de ambos sustratos desde 1 hasta 10 equivalentes de aldehído alifático respecto al aromático. Un exceso molar de 10 equivalentes de dimetoxiacetaldehído frente a la vainillina permitió la formación de 8t con valores de conversión del 96 % en 24 h (Figura 3.32).



**Figura 3.32** Formación de **8t** en la adición benzoínica cruzada de vainillina (**5t**) a dimetoxiacetaldehído (**6**), catalizado por BAL, con diferentes relaciones molares de los reaccionantes. Reacción (2 mL fase acuosa, 2 mL MTBE), **5t** (0,1 mmol), **6** (cantidad variable). BAL (500 U mL<sup>-1</sup>), tampón carbonato de sodio (50 mM pH 8,0, MgSO<sub>4</sub> 2,5 mM y ThDP 0,15 mM) a 25 °C. La cantidad de producto formado se determinó por el área de los picos en el cromatograma de HPLC utilizando un estándar externo.

A pesar de utilizar un exceso real de dimetoxiacetaldehído de 167 equivalentes debido al equilibrio de partición de la vainillina entre la fase acuosa y la orgánica  $(C(5t)_{tampón} \approx 3 \text{ mM}, C(5t)_{MTBE} \approx 47 \text{ mM y}$   $C(6)_{tampón} \approx 0,5 \text{ M})$ , no se detectó formación de producto de autoadición del dimetoxiacetaldehído. Esto se debió a la elevada selectividad del

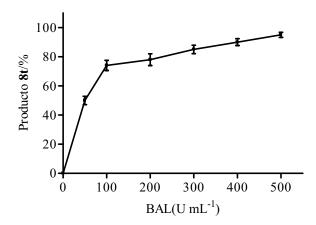
sitio del dador, en el centro activo de la enzima, por aldehídos aromáticos.

De manera general, la adición benzoínica catalizada por la BAL de aldehídos aromáticos a aldehídos alifáticos requiere utilizar un exceso molar de los segundos para alcanzar altos valores de conversión del producto de adición cruzada. 94,104,172

# 3.2.2.2 Efecto de la concentración de biocatalizador en la formación de (R)-2-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3,3-dimetoxipropan-1-ona (8t).

En un proceso biocatalítico la actividad del biocatalizador no se mantiene constante durante toda la reacción. En el caso de un sistema bifásico a menudo ocurre la inactivación de la enzima en la interface entre ambos solventes. Es de señalar que en nuestro caso no se adicionó tensoactivos al medio de reacción debido a los problemas de aislamiento y purificación del producto de reacción en presencia de estos aditivos.

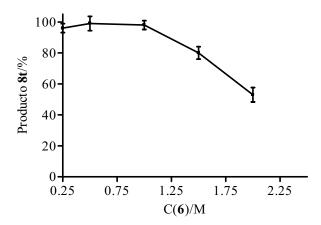
De acuerdo con lo anterior se estudió el efecto de la concentración de enzima en la formación de producto de adición benzoínica cruzada entre la vainillina y el dimetoxiacetaldehído. En este caso se requirió una concentración de BAL de 500 U mL<sup>-1</sup> de reacción para la formación de (*R*)-2-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3,3-dimetoxi propan-1-ona (8t) a valores de conversión de 96 % en 24 h (Figura 3.33).



**Figura 3.33** Formación de **8t** en la adición benzoínica cruzada de vainillina (**5t**) a dimetoxiacetaldehído (**6**) catalizada a diferentes concentraciones de BAL. Reacción (2 mL fase acuosa, 2 mL MTBE), **5t** (0,1 mmol), **6** (1,0 mmol). BAL (cantidad variable), tampón carbonato de sodio (50 mM pH 8,0, MgSO<sub>4</sub> 2,5 mM y ThDP 0,15 mM) a 25 °C. La cantidad de producto formado se determinó por el área de los picos en el cromatograma de HPLC utilizando un estándar externo.

# 3.2.2.3 Efecto de la concentración de dimetoxiacetaldehído en la formación de (R)-2-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3,3-dimeto xipropan-1-ona (8t) catalizado por BAL.

Con el objetivo de incrementar el rendimiento de **8t** se varió la concentración de **6** entre 0,25 M y 2,0 M manteniendo un exceso molar de 10 equivalentes frente a **5t**. A concentración de 1 M de aldehído alifático se alcanzaron conversiones de producto de adición cruzada de 96 % en 24 h. A mayores concentraciones disminuyó la formación del **8t** debido probablemente a la inactivación de la enzima (**Figura 3.34**).



**Figura 3.34** Formación de **8t** en la adición benzoínica cruzada de vainillina (**5t**) a dimetoxiacetaldehído (**6**) catalizado por BAL a diferentes concentraciones de **6**, manteniendo la relación n(**6**)/n(**5t**) igual a 10. Reacción (2 mL fase acuosa, 2 mL MTBE) contiene **5t** (variable), **6** (variable). BAL (500 U mL<sup>-1</sup>), tampón carbonato de sodio (50 mM pH 8,0, MgSO<sub>4</sub> 2,5 mM y ThDP 0,15 mM) a 25 °C. La cantidad de producto formado se determinó por el área de los picos en el cromatograma de HPLC utilizando un estándar externo.

En resumen, se sintetizó el producto **8t** con conversiones del 96 % en 24 h de reacción en un sistema tampón:MTBE (50 % v/v). Para alcanzar estas conversiones de reacción fue necesario utilizar un exceso de 10 equivalentes molares de dimetoxiacetaldehído (**6**) respecto a la vainillina (5**t**) y 500 U mL<sup>-1</sup> de BAL. El biocatalizador toleró concentraciones de dimetoxiacetaldehído de 1 M, incrementándose la cantidad de producto obtenido por unidad de enzima utilizada. En este trabajo no se estudio el efecto de la relación entre la fase acuosa y la fase orgánica en la formación de **8t**. 100

El análisis de la reacción mostró que el producto de adición cruzada (8t) se repartió equitativamente entre la fase acuosa y el solvente orgánico  $(C(8t)_{MTBE} \approx C(8t)_{tampón} \approx 50 \text{ mM})$ . Para favorecer el reparto

hacia la fase orgánica se añadió NaCl hasta saturación encontrándose **8t** mayoritariamente en el MTBE ( $C(\mathbf{8t})_{\text{MTBE}} = 96 \text{ mM y } C(\mathbf{8t})_{\text{tampón}} = 4 \text{ mM}$ ). En las condiciones descritas anteriormente la formación del producto de adición cruzada fue casi cuantitativa, no detectándose subproductos y **8t** se localizó mayoritariamente en el MTBE mientras que el dimetoxiacetaldehído (**6**) permaneció en la fase acuosa ( $C(\mathbf{6})_{\text{tampón}} = 0.86 \text{ M y } C(\mathbf{6})_{\text{MTBE}} = 41.4 \text{ mM}$ ). De este modo fue posible separar el producto de adición cruzada del medio de reacción y se utilizó directamente en la siguiente etapa sin pasos de purificación adicionales.

## 3.2.3 Síntesis de (R)-1-aril-2-hidroxi-3,3-dimetoxipropan-1-ona catalizado (8) por BAL.

En las condiciones de reacción encontradas en el apartado anterior se estudió la reacción benzoínica cruzada de diferentes aldehídos aromáticos al dimetoxiacetaldehído catalizado por BAL (**Figura 3.35**).

**Figura 3.35** Aldehídos aromáticos estudiados en la adición benzoínica cruzada a dimetoxiacetaldehído catalizado por BAL.

A partir de las conversiones de las reacciones se determinó que los derivados del benzaldehído con sustituciones en *meta* formaron producto de adición cruzada (entre 83-98 %) (**Tabla 3.13**). Los

aldehídos con sustituciones en *para* aportaron conversiones de moderada a bajas (27-64 %), mientras que los *orto* sustituidos no formaron producto de adición cruzada (**Tabla 3.13**). Dos excepciones a estas generalizaciones fueron el 2-fluorbenzaldehído y la vainillina con los que se alcanza una alta conversión de producto de interés (**8**).

En el caso de aldehídos aromáticos policíclicos, el 2-naftalaldehído (5z) fue sustrato de la enzima. Otros aldehídos como el 1-naftalaldehído (5aa) y el 9-fenantrenocarbaldehído (5ab) no son sustratos en esta reacción (Tabla 3.13).

Por otro lado aldehídos como el furfuraldehído (**5w**), el tiofeno-2-carbaldehído (**5x**) y el 1*H*-indazol-5-carboxaldehído (**5ad**) dieron excelentes resultados en la síntesis de producto de adición cruzada (98 %). Sin embargo el pirrol-2-carbaldehído no fue sustrato de la enzima (**Tabla 3.13**).

Las reacciones con los aldehídos **5a,b,g-k,t,w,x** y **ad** fueron escaladas (de 4 mL a 40 mL). Los productos se separaron en la fase orgánica y se utilizaron en el siguiente paso de síntesis sin ninguna etapa de purificación.

**Tabla 3.13** Productos formados en la reacción de adición benzoínica de aldehídos aromáticos a dimetoxiacetaldehído catalizada por BAL en un sistema tampón:MTBE (1:1 v/v). Aparecen señalados en rojo los sustratos seleccionados para la síntesis de *C*-arilmonosacáridos.**Conv.** conversión de la reacción en 24 h.

	Conv[a]	/% 24 h		Conv <sup>[a</sup>	]/% 24 h		Conv <sup>[a]</sup>	/% 24 h
5	8	7	5	8	7	5	8	7
a	95	0	k	98	2	u	31	0
b	80	0	1	28	0	v	0	0
c	0	31	m	0	0	w	98	0
d	0	20	n	27	39	X	98	0
e	0	0	0	64	0	y	0	0
f	0	0	p	52	7	Z	27	34
g	95	0	q	27	0	aa	0	0
h	98	0	r	0	53	ab	0	0
i	83	11	S	0	0	ac	0	0
j	98	0	t	98	0	ad	98	0

[a] Tampón:MTBE (1:1 v/v, 2 mL de cada fase), n(5):n(6) 1:10, C(6) = 1,0 M, 500 U BAL mL<sup>-1</sup>, T = 25°C. Tampón carbonato de sodio (50 mM pH 8,0, MgSO<sub>4</sub> 2,5 mM y ThDP 0,15 mM). La cantidad de producto formado se determinó por el área de los picos en el cromatograma de HPLC utilizando un estándar externo.

Las diferencias de reactividades en la formación de 8, en las condiciones de reacción utilizadas, pueden ser interpretadas desde un punto de vista estructural analizando la disposición espacial de los grupos en el centro activo de la enzima. Las cadenas laterales de los aminoácidos crean una cavidad que se estrecha hacia el interior del centro activo (Figura 3.36 B-D). Modelos construidos con 7c muestran que los anillos *o*-clorofenil adoptan una disposición casi paralela con los átomos de cloro interaccionando con la parte más estrecha de la cavidad (Figura 3.36 B). A esto se añade que la sustitución del anillo aromático en el sitio del aceptor por el sustituyente voluminoso (dimetoxi)metil (2) puede causar repulsiones estéricas con los grupos

de la enzima afectando la formación del producto de adición cruzada. El menor tamaño del átomo de flúor, en comparación con otros aldehídos con sustituyentes más voluminosos en posición orto, puede explicar la reactividad del 2-fluorbenzaldehído (5b) hacia la formación de **8b** al minimizarse las repulsiones estéricas Por otro lado modelos de 8k muestran que el átomo de cloro, en posición meta, puede acomodarse en una subcavidad opuesta al sitio del aceptor permitiendo la unión de 2 con menos restricciones estéricas (Figura 3.36 C). Este hecho puede explicar la diferencia de reactividad en la formación de 8 que se observa al aumentar el tamaño del sustituyente en posición *meta*:  $-OH(5g) \approx -OMe(5h) > -OPh(5l)$ . Un grupo voluminoso como el fenoxi muy probablemente no pueda ser unido adecuadamente en esta subcavidad afectando la formación del producto de adición cruzada. Finalmente modelos con 8n (Figura 3.36 D) muestran que el grupo en posición para puede presentar limitaciones estéricas sobre todo si el sustituyente es un grupo voluminoso como lo demuestra el orden de formación de producto de adición benzoínica cruzada:  $-OH(50) \approx OMe(5p) > -Cl(5n) = -NO_2(5q) >>> -N(Me)_2(5s).$ 

La reactividad de los aldehídos aromáticos policíclicos hacia la formación del producto de adición benzoínica cruzada puede ser explicada analizando las posiciones de la fusión entre los anillos respecto al grupo carbonilo. Así el 2-naftalaldehído (m, p sustituido) es sustrato de la enzima mientras que el 1-naftalaldehído (o, m sustituido) y el 9-fenantrenocarbaldehído (o, m, p, m' sustituido) no lo son (**Figura 3.37**). Un razonamiento similar se puede seguir con los aldehídos **5ac** y **5ad**. El primero no es sustrato de la BAL, muy probablemente al presentar el grupo más voluminoso en posición para, mientras que **5ad**, sustrato de la enzima, posee el sustituyente más voluminoso en

posición *meta* (**Figura 3.37**) pudiendo ser acomodado en la subcavidad del centro activo.

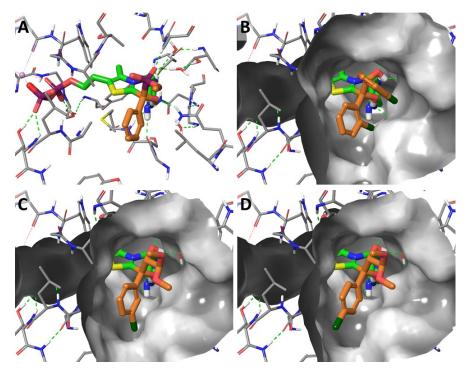
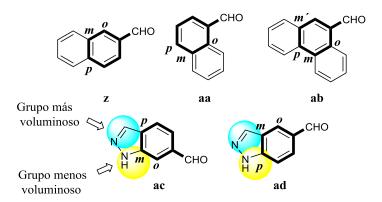


Figura 3.36. A: Estructura tridimensional del centro activo de la BAL formando un complejo con el inhibidor benzoilfosfonato de metilo (código PDB 3D7K). B-D: Modelos de los intermediarios 7c (B), 8k (C) y 8n (D) en el centro activo de la enzima. Los residuos de aminoácidos aparecen en gris, el pirofosfato de tiamina en verde y los productos en anaranjado. También se muestra la cavidad en el centro active en gris (B-D). Los modelos fueron construidos a partir de la estructura de A y fueron optimizados con el software Macromodel.

Con los aldehídos derivados del furano, tiofeno y pirrol la interpretación de los resultados obtenidos resulta más compleja porque pueden estar involucrados efectos electrónicos que modulan la reactividad de los reaccionantes o los intermediarios de reacción.



**Figura 3.37** Análisis de la reactividad de diferentes aldehídos policíclicos en la formación del producto de adición benzoínica cruzada con dimetoxiacetaldehído (2) catalizado por BAL.

#### 3.2.4 Síntesis de (1*S*,2*S*)-1-aril-3,3-dimetoxipropano-1,2-diol (10).

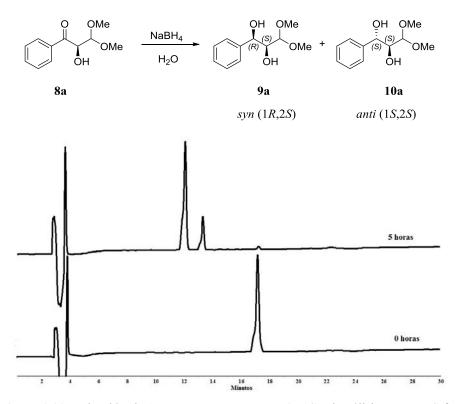
El próximo paso de síntesis consistió en la reducción estereoselectiva de (*R*)-1-aril-2-hidroxi-3,3-dimetoxipropan-1-ona. Para ello se estudio como reacción modelo la reducción enzimática de (*R*)-2-hidroxi-1-fenil-3,3-dimetilpropan-1-ona (8a) utilizando alcohol deshidrogenasa de *Ralstonia sp* (RasADH). Este biocatalizador es reportado en la literatura en la reducción de cetonas con grupos voluminosos.<sup>174</sup> A pesar de esto hay una disminución muy significativa de la actividad de la enzima a medida que se incrementa el volumen de los sustituyentes unidos al grupo carbonilo (**Figura 3.38**).<sup>175</sup> A pesar de la baja actividad de la enzima con el sustrato 8a se detectó formación de productos después de 24 h de reacción a escala analítica con un 10 % de

conversión. Para regenerar la forma reducida del cofactor (NADH) se utilizó la reacción catalizada por formiato deshidrogenasa (EC 1.2.1.2) o glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.47) pero en ninguno caso se pudo reducir **8a** con cantidades catalíticas de NADH (**Figura 3.38**).

**Figura 3.38** Actividad enzimática (AE) de la alcohol deshidrogenasa de *Ralstonia sp* (RasADH) en la reducción de derivados del (*R*)-1-fenil-2-hidroxipropan-1-ona. <sup>175</sup> Reacción de reducción de (*R*)-2-hidroxi-1-fenil-3,3-dimetilpropan-1-ona (**8a**) catalizado por alcohol deshidrogenasa de *Ralstonia sp* (RasADH). No se encontró un sistema de regeneración eficaz para reducir el cofactor necesario durante el proceso biocatalítico. FDH, formiato deshidrogenasa. GDH, glucosa deshidrogenasa.

La reducción biocatalítica también se estudio con *Saccharomyces cerevisiae*<sup>176</sup> y 12 alcohol deshidrogenasas suministradas por la compañía Johnson & Matthey (X-Zyme biocatalysts Catalog # ADHK-1, www.jmcatalysts.com/pharma). En estos casos tampoco se encontró un biocatalizador eficaz en la reducción de **8a**.

En este punto se paso a estudiar la estereoselectividad en la reducción de **8a** por medios químicos. Para ello se utilizó como agente reductor NaBH<sub>4</sub> en agua alcanzándose una conversión superior al 95 % (5 h de reacción) y se obtuvo una mezcla de diastereómeros (27:73) (**Figura 3.39**).



**Figura 3.39** Reducción de **8a** con NaBH<sub>4</sub> en agua a 25 °C. El análisis por HPLC fue realizado con una columna RP-HPLC XBridge<sup>®</sup> C18, 5  $\mu$ m, 4.6 × 250 mm (Waters). Solvente (A): 0.1% (v/v) ácido trifluoracético (TFA) en H<sub>2</sub>O y solvente (B): 0.095% (v/v) TFA en CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 4:1, 1 mL min<sup>-1</sup>, detección a 215 nm (30 °C). Se utilizó un gradiente de 10-70 % de B en 30 minutos. Las cantidades de producto formado se determinaron por el área de los picos en el cromatograma de HPLC utilizando un estándar externo.

Para asignar la estereoquímica de los productos se escaló la reacción y se purificaron los diastereómeros en un HPLC preparativo. Los estereoisómeros de 1-fenil-3,3-dimetoxipropan-1,2-diol se ciclaron con trifosgeno en medio básico formando 1,3-dioxalan-2-onas (**Figura 3.40**).

**Figura 3.40** Síntesis de 1,3-dioxalan-2-ona de **9a** y **10a. i.** trifosgeno, Et<sub>3</sub>N, THF, 25 °C, 12 h.

El producto cíclico derivado de **9a** ( $t_R = 12,3$  minutos) mostró una  ${}^3J(H_4,H_5)$  de 4,9 Hz, mientras que para el producto de **10a** ( $t_R = 11,4$  min) la  ${}^3J(H_4,H_5)$  fue de 8,0 Hz (**Tabla 3.14**). También hay diferencia en los desplazamientos químicos de los  $H_3$  y  $H_4$  y los grupos metoxi debido al entorno químico creado por el anillo aromático (**Tabla 3.14**).

**Tabla 3.14** Desplazamientos químicos ( $\delta$  ppm) de  $^{1}$ H y  $^{13}$ C y constantes de acoplamiento  $^{3}J(^{1}\text{H-}^{1}\text{H})$  (Hz) en **S9a** y **S10a**.

	<sup>1</sup> H RMN			<sup>13</sup> C RMN	
	S9a (4S,5R)	S10a (4S,5S)		S9a (4S,5R)	S10a (4S,5S)
$\delta(CH_3)$	3,49; 3,57	2,94; 3,29	δ(CH <sub>3</sub> )	56,2; 57,8	54,1; 54,8
δ(H <sub>3</sub> )	4,55	3,81	$\delta(C_3)$	103,4	100,8
$\delta(H_4)$	4,47	4,80	$\delta(C_4)$	81,8	78,3
δ(H <sub>5</sub> )	5,63	5,70	$\delta(C_5)$	77,8	79,2
$^{3}J(H_{3},H_{4})$	3,6	6,7			
$^{3}J(H_{4},H_{5})$	4,9	8,0			

Una vez asignada la estereoquímica de cada uno de los productos (**9a**  $t_R$  = 12,3 min, **10a**  $t_R$  = 11,4 min), se estudiaron varias condiciones de reducción (**Tabla 3.15**). La estereoselectividad más elevadas se alcanzó con NaBH<sub>4</sub> en MTBE a 25 °C (10:90 *syn:anti*) y Zn(BH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> en THF a – 78 °C (6:94 *syn:anti*) (**Tabla 3.15**).

**Tabla 3.15** Reducción de (*R*)-1-fenil-2-hidroxi-3,3-dimetoxipropan-1-ona (8a) en diferentes condiciones.

$$Reductor$$
 $Reductor$ 
 $Redu$ 

Agente reductor	Solvente	Temperatura/°C	Conversión <sup>[a]</sup> (%)	syn:anti <sup>[a]</sup>
NaBH <sub>4</sub>	H <sub>2</sub> O	25	> 95	27:73
NaBH <sub>4</sub>	THF	25	> 95	15:85
NaBH <sub>4</sub>	MTBE	25	> 95	10:90
$Zn(BH_4)_2^{[b]}$	MTBE	25	48	6:94
$Zn(BH_4)_2$	THF	<b>- 78</b>	> 95	10:90
L-Selectride <sup>[c]</sup>	MTBE	25	_[d]	_

<sup>[a]</sup>La cantidad de producto formado se determinó por el área de los picos en el cromatograma de HPLC utilizando un estándar externo. <sup>[b]</sup>Preparado a partir de ZnCl<sub>2</sub> y NaBH<sub>4</sub> en THF<sup>177</sup>. <sup>[c]</sup>Li(*sec*-butyl)<sub>3</sub>BH 1M en THF. <sup>[d]</sup>No hubo reacción.

Por la simplicidad del proceso se seleccionó la reducción con NaBH<sub>4</sub> en MTBE a 25 °C. Después de la adición benzoínica cruzada, catalizada por BAL, los productos se separaron en la fase orgánica, se secó el solvente y se procedió a la reducción con NaBH<sub>4</sub>. Pasadas 4 h no se detectó cetona por HPLC, se eliminó el solvente por evaporación y las sales en una columna Amberlite<sup>®</sup> XAD 1180. Los productos se utilizaron en el siguiente paso de síntesis sin etapas de purificación adicionales.

Con el resto de los sustratos la reducción procedió con formación predominante del producto de adición *anti* (> 90%, sólo menor para **8g** y **8t**, asumiendo que  $t_r$  (1S,2S) <  $t_r$  (1R,2S)) y con conversiones superiores al 90 % en la mayoría de los casos (**Tabla 3.16**).

**Tabla 3.16** Reducción de (R)-1-aril-2-hidroxi-3,3-dimetoxipropan-1-onas con NaBH<sub>4</sub> en MTBE a 25 °C.

Reaccionantes	Razón 9:10,(1R,2S):(1S,2S) <sup>[a]</sup>	Conversión <sup>[a]</sup> /%
8a	10:90	93
8b	4:96	89
8g	26:84	85
8h	3:97	98
8i	6:94	76
8j	4:96	98
8k	4:96	98
8t	23:87	98
8w	7:93	90
8x	8:92	93
8ad	6:94	96

<sup>[a]</sup>NaBH<sub>4</sub>(2eq), MTBE a 25 °C. La cantidad de producto formado se determinó por el área de los picos en el cromatograma de HPLC utilizando un estándar externo y considerando que  $t_r$  (anti, 1S,2S)  $< t_r$  (syn, 1R,2S). En todos los casos se utilizaron las condiciones de elusión descritas para 9a y 10a (**Figura 3.39**).

#### 3.2.5 Síntesis de (2S,3S)-3-aril-2,3-dihidroxipropanal (11).

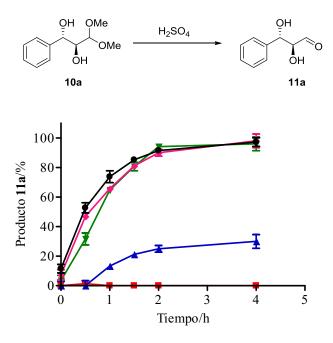
$$Ar^{1} \xrightarrow{OH} OMe \qquad H^{+} \qquad OH \qquad OH$$

$$10 \qquad 11$$

Los sustratos de las reacciones de adición aldólicas finales, en la síntesis de *C*-arilmonosacáridos, se obtuvieron por hidrólisis de los acetales **10**. Inicialmente se estudió la reacción de **10a** en medio ácido y calor (pH 1,0 HCl, 60 °C). En estas condiciones ocurrieron reacciones de descomposición del aldehído formándose resinas de color rojo. Por otro lado a 25 °C y medio ácido (HCl pH 1,0) no se detectó formación de aldehído incluso después de 48 h de reacción.

Para aumentar la velocidad del proceso de hidrólisis del dimetilacetal, a 25 °C, se realizó un estudio de la reacción a diferentes concentraciones de ácido. En este caso se utilizó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> porque su neutralización con CaCO<sub>3</sub> permitiría obtener el producto en solución con baja concentración de sales, pudiendo utilizarse directamente en el siguiente paso de síntesis enzimática.

A concentraciones 0,1 M de ácido no se detectó hidrólisis mientras que a 0,5 M hubo un 20 % de conversión en 4 h. A concentraciones entre 1 y 2 M se hidrolizó todo el acetal en 4 h de reacción a 25 °C. También se observó que a mayor concentración de ácido el procedimiento es más consistente y conduce a resultados reproducibles disminuyendo la formación de productos secundarios (**Figura 3.41**).



**Figura 3.41** Efecto de la concentración de  $H_2SO_4$  en la hidrólisis del dimetilacetal **10a** a 25 °C. La reacción se realizó en una mezcla  $H_2SO_4$  (x M):CH<sub>3</sub>CN (5:1 v/v), a diferentes concentraciones de ácido: 0,1 M (■), 0,5 M (▲), 1,0 M (▼), 1,5 M (♦) y 2,0 M (•). Las cantidades de producto formado se determinaron por el área de los picos en el cromatograma de HPLC utilizando un estándar externo.

Para el resto de los acetales se realizó la hidrólisis en una mezcla H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 M):CH<sub>3</sub>CN (5:1 v/v) a 25 °C durante 4 h. Pasado este tiempo se neutralizó con CaCO<sub>3</sub> sólido, se filtró y el aldehído en solución se utilizó directamente en la siguiente etapa de síntesis.

Las conversiones en la reacción oscilaron entre un 59 y un 98 %. Una excepción fue 11w que dio una mezcla compleja de subproductos en medio ácido probablemente por la apertura del anillo de furano en estas condiciones (Tabla 3.17).

**Tabla 3.17** Conversiones de reacción en la formación de (2*S*,3*S*)-3-aril-2,3-dihidroxipropanal (11).

Producto	Conversión [a],[b]/%	Producto	Conversión[a],[b]/%
11a	98	11k	48
11b	80	11t	78
11g	97	11w	_[c]
11h	97	11x	43
11i	97	11ad	98
11j	59		

<sup>[a]</sup>Las cantidades de producto formado se determinaron por el área de los picos en el cromatograma de HPLC utilizando un estándar externo. <sup>[b]</sup>Se asumió que la relación *syn* (2*S*,3*R*):*anti* (2*S*,3*S*) no varió durante la reacción de hidrólisis. <sup>[c]</sup>Formación de una mezcla compleja de subproductos.

# 3.2.6 Síntesis de *C*-arilmonosacáridos catalizado por D-frustosa-6-fosfato aldolasa (FSA) y L-ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA) de *E.coli*.

La última etapa de síntesis de *C*-arilmonosacáridos comprendió la adición aldólica de dihidroxiacetona (DHA), hidroxiacetona (HA), y glicolaldehído (GO) a (2*S*,3*S*)-3-aril-2,3-dihidroxipropanal. Por la experiencia que se tenía en nuestro grupo de investigación en el trabajo con varias aldolasas se decidió utilizar como biocatalizadores D-frustosa-6-fosfato aldolasa (FSA) y L-ramnulosa-1-fosfato aldolasa (RhuA) de *E.coli*. En el caso de la FSA se dispone de diferentes variantes del biocatalizador diseñadas para catalizar con elevada eficiencia reacciones de adición aldólica con diferentes

dadores, <sup>111,113,114,117,120</sup> lo que contribuye a generar diversidad estructural en los productos finales (**Figura 3.42**).

Pador

OH

HO

OH

HO

OH

HO

OH

HO

OH

HO

OH

FSA A129S

$$(6S)$$
-6- $C$ -aril-L-sorbosa.

OH

Ar<sup>1</sup>

OH

FSA nativa

OH

HO

OH

FSA A129T

OH

HO

OH

 $(6S)$ -1-desoxi-6- $C$ -aril-L-sorbosa.

OH

HO

OH

 $(5S)$ -5- $C$ -aril-L-xilosa.

**Figura 3.42** Síntesis de diferentes monosacáridos a través de la adición aldólica de dihidroxiacetona (DHA), hidroxiacetona (HA) o glicoaldehído (GO) a **11**. Como biocatalizador se utiliza FSA nativa o las variantes A129S y A129T.

También se puede generar diversidad configuracional modificando la estereoquímica de los centro estereogénicos creados durante la reacción de adición aldólica. La RhuA cataliza la adición aldólica de DHA a aldehídos formando productos con estereoquímica (3R,4R), mientras que la FSA cataliza la misma reacción pero con diferente estereoselectividad (3S,4S) (**Figura 3.43**).

**Figura 3.43** Síntesis de diferente (6*S*)-6-*C*-arilmonosacáridos a partir de DHA y **11** utilizando biocatalizadores estereocomplementarios.

## 3.2.6.1 Síntesis de (6S)-6-C-aril- $\alpha$ -L-sorbopiranosas (12) catalizado por FSA A129S.

Con la adición de DHA a los aldehídos 11, catalizado por FSA A129S, se sintetizaron los derivados de (6*S*)-6-*C*-aril-L-sorbosas. En todos los casos la conversión en la reacción de adición aldólica fue superior al 95 % y los rendimientos de producto aislado después de las 4 etapas de síntesis oscilaron entre un 20 y un 58 % (**Tabla 3.18**).

**Tabla 3.18**. Rendimiento de producto aislado de (6S)-6-C-aril- $\alpha$ -L-sorbopiranosas (12).

Producto	Rendimiento [a]/%	Producto	Rendimiento [a]/%
12a	49	12j	48
12b	38	12k	39
12g	49	12t	25
12h	58	12x	18
12i	20	12ad	22

lal Rendimiento de producto aislado a partir del aldehído inicial (después de 4 etapas de síntesis). En todos los casos la conversión de la reacción de adición aldólica fue superior al 95 %.

La caracterización estructural de los productos (espectros RMN material suplementario) mostró únicamente la forma piranósica con los protones en posición axial ( ${}^{3}J(H_{axial}-H_{axial}) \approx 10 \text{ Hz})$  y los hidroxilos y el grupo aromático en posición ecuatorial, conformación  ${}^{1}C_{4}$  (**Tabla 3.19**)<sup>155</sup>. No hubo señal de nOe entre los protones del grupo hidroximetilo y los protones 4 y 6 y si con el protón 3 (material

suplementario electrónico), por lo que este grupo está en posición ecuatorial (anómero  $\alpha$ ) minimizando las repulsiones 1,3-diaxiales (**Tabla 3.19**). 155

**Tabla 3.19** Constantes de acoplamiento  ${}^{3}J({}^{1}H-{}^{1}H)$  (Hz) en las (6S)-6-C-aril- $\alpha$ -L-sorbopiranosas sintetizadas.

Producto	$^{3}J(H_{3},H_{4})$	$^{3}J(H_{4},H_{5})$	$^{3}J(H_{5},H_{6})$
12a	9,5	9,5	9,9
12b	9,4	9,4	10,1
12g	9,7	9,2	9,9
12h	10,5	9,2	9,9
12i	9,4	9,4	9,9
12j	9,1	9,1	10,0
12k	9,4	9,4	9,9
12t	9,1	9,1	10,4
12x	9,4	9,4	10,0
12ad	8,8	9	10,7

## 3.2.6.2 Síntesis de (6S)-1-desoxi-6-C-aril- $\alpha$ -L-sorbopiranosas (13) catalizado por FSA nativa.

La FSA nativa es un catalizador muy eficiente en la adición aldólica de HA a varios aldehídos aceptores<sup>111</sup>. La reacción de adición adólica de esta cetona a (2*S*,3*S*)-3-aril-2,3-dihidroxipropanal (11) catalizado por

FSA nativa permitió sintetizar derivados de (6S)-1-desoxi-6-C-aril-L-sorbosas (13). En los productos obtenidos se alcanzó más de un 95 % de conversión en la reacción de adición aldólica y los rendimientos de producto aislado fueron del 68 % (13a) y 82 % (13h) después de 4 etapas de síntesis (Tabla 3.20).

**Tabla 3.20** Rendimiento de productos aislado de (6S)-1-desoxi-6-C-aril- $\alpha$ -L-sorbopiranosas (13).

Producto	Rendimiento <sup>[a]</sup> /%
13a	68
13h	82

<sup>&</sup>lt;sup>[a]</sup>Rendimiento de producto aislado a partir del aldehído inicial (después de 4 etapas de síntesis). En todos los casos la conversión de la reacción de adición aldólica fue superior al 95 %. Sólo se escalaron las reacciones con los aldehídos 11a y 11h, para el resto de los sustratos (11) se alcanzó conversiones similares a escala analítica.

Al igual que las (6*S*)-6-*C*-aril-L-sorbosas ambos productos aparecen únicamente en forma piranósica ( ${}^{1}C_{4}$ ) y sólo se detectó el anómero  $\alpha$  (espectros de RMN espectros material suplementario).

## 3.2.6.3 Síntesis de (5S)-5-C-aril- $\alpha/\beta$ -L-xilopiranosas (14) catalizado por FSA A129T.

La adición de GO a 11 fue catalizada por FSA A129 $T^{113}$  (otras variantes como la A129G o A129V fueron igualmente efectivas). En estas reacciones fue difícil determinar las conversiones de la reacción por HPLC. Después de 24 h de reacción aparecen picos anchos en el cromatograma, con  $t_R$  similares al del aldehído de partida (11). El comportamiento cromatográfico del producto nos hizo sospechar la existencia de una mezcla de anómeros en equilibrio, que luego se comprobó por RMN.

Las conversiones de reacción se estimaron superiores al 50 % y los rendimientos de producto aislado (después de 4 etapas de síntesis) oscilaron entre un 9 y un 25 % (**Tabla 3.21**).

De acuerdo a resultados anteriores la síntesis de los derivados de xilosa se realizó con una adición lenta de GO (flujo de 0,25 ml h<sup>-1</sup>) para minimizar la reacción de autoadición del sustrato dador con formación de D-treosa. Para algunos aldehídos (11) la adición de todo el GO al inicio de la reacción significó una mejora notable en el rendimiento de producto aislado (14h y 14ad), mientras que en otro caso no hubo variación significativa entre las dos metodologías de síntesis (14b) (Tabla 3.21). Los sustratos 11, sólo en presencia de la enzima, muestran una disminución notable de la señal en HPLC después de 24

h. Probablemente ocurran reacciones de descomposición, polimerización y agregación con la enzima. Esto explicaría el aumento en los rendimientos de producto aislado cuando se adicionó todo el GO al inicio de la reacción, si bien, este efecto no es general y dependió de la naturaleza de 11.

**Tabla 3.21** Rendimiento de productos aislado de (5S)-5-C-aril- $\alpha/\beta$ -L-xilopiranosas (14).

Producto	Rendimiento [a]/%	Producto	Rendimiento[a]/%
14a	25 <sup>[b]</sup>	14j	23 <sup>[b]</sup>
14b	$8^{[b]}(11)^{[c]}$	14k	24 <sup>[b]</sup>
14g	16 <sup>[b]</sup>	14t	12 <sup>[b]</sup>
14h	$22^{[b]}(50)^{[c]}$	14x	13 <sup>[b]</sup>
14i	23 <sup>[b]</sup>	14ad	$9^{[b]}(30)^{[c]}$

<sup>[</sup>a]Rendimiento de producto aislado a partir del aldehído inicial (después de 4 etapas de síntesis). [b]GO adicionado a un flujo de 0,25 mL h<sup>-1</sup>.

La caracterización estructural de los monosacáridos (espectros de RMN en material suplementario) mostró la forma piranósica con los hidroxilos y el grupo aromático en posición ecuatorial ( ${}^{3}J$  ( $H_{axial}$ - $H_{axial}$ )  $\approx$ 10 Hz, conformación  ${}^{1}C_{4}$ ) (**Tabla 3.22**). Al sustituir los grupos del carbono anomérico, hidroximetilo (**12**) y metilo (**13**), por un protón aparecen en estos productos mezcla de anómeros ( ${}^{3}J(H_{1},H_{2})_{\beta}$ ) > ${}^{3}J(H_{1},H_{2})_{\alpha}$ ) (**Tabla 3.22**). También fue posible identificar la señal de cada anómero por el desplazamiento químico del protón del carbono anomérico al aparecer más blindados los  $H_{axial}$  (anómero  $\beta$ ) respecto al  $H_{ecuatorial}$  (anómero  $\alpha$ ) (**Tabla 3.22**).

<sup>[</sup>c]Todo el GO adicionado al inicio de la reacción.

**Tabla 3.22** Desplazamiento químico de los protones anoméricos (δ ppm) y constantes de acoplamiento  ${}^3J({}^1\text{H}-{}^1\text{H})$  (Hz) en las (5S)-5-C-aril-α/β-L-xilopiranosas sintetizadas.

Productos		δ(H <sub>1</sub> )	$^3J(\mathrm{H}_1,\mathrm{H}_2)$	$^3J(\mathrm{H}_2,\mathrm{H}_3)$	$^{3}J(H_{3},H_{4})$	$^{3}J(H_{4},H_{5})$	α:β
14a	α	5,30	3,6	9,9	9,6	9,8	37:63
114	β	4,81	7,9	8,2		9,3	27.02
14b	α	5,31	3,6	9,5	9,5	10,0	36:64
1.0	β	4,84	8,6	9,1	9,5	9,7	30.04
14g	α	5,30	3,5	9,9	9,6	9,4	37:63
8	β	4,80	8,2	7,9		8,8	27,102
14h	α	5,31	3,7	9,8	9,8	10,2	37:63
1	β	4,81	8,1	8,9		9,7	37.03
14i	α	5,35	3,8	10,3	9,6	10,2	40:60
1.1.	β	4,85	7,9	9,7		9,3	.0.00
14j	α	5,33	4,0	10,2	9,8		32:68
- ·J	β	4,82	7,8	9,3		9,3	32.00
14k	α	5,31	3,9	9,9	9,9	10,0	39:61
1 111	β	4,80	9,1	9,5		9,1	57.01
14t	α	5,29	3,7	9,3	9,7	10,3	35:65
1.0	β	4,79	9,0	8,6		9,2	
14x	α	5,28	3,7	9,7	9,8	10,0	40:60
IIA	β	4,82	8,3	9,0		9,2	10.00
14ad	α	5,02	4,5	9,3	8,3	10,3	44:56
	β	4,48	7,1	8,1		9,1	

En los espectros de <sup>13</sup>C aparecen claras diferencias entre los desplazamientos químicos de los C3 y C5 en ambos anómeros. El efecto gamma (gauche), presente en el anómero α, provocó un blindaje de estos carbonos con respecto al anómero β. También hubo diferencias en los desplazamientos químicos de los C1. Esta magnitud fue menor

para el carbono anomérico en el isómero  $\alpha$  (mayor blindaje) en relación con el  $\beta$  (Tabla 3.23).  $^{178}$ 

**Tabla 3.23** Desplazamiento químico de  $^{13}$ C ( $\delta$  ppm) en las (5S)-5-C-aril- $\alpha/\beta$ -L-xilopiranosas sintetizadas.

Productos		$\delta(C_1)$	$\delta(C_2)$	$\delta(C_3)$	$\delta(C_4)$	$\delta(C_5)$	α:β
14a	α	92,41	71,59	72,61	74,07	73,81	37:63
1	β	96,21	74,27	73,90	75,43	78,21	27.02
14b	α	92,48	71,54	72,66	73,28	67,27	36:64
110	β	96,31	74,19	75,42	73,28	71,54	30.04
14g	α	92,39	71,55	72,58	74,04	73,60	37:63
8	β	96,18	74,04	73,89	75,39	77,97	27.02
14h	α	92,41	71,56	72,59	74,08	73,68	37:63
1111	β	96,20	74,24	73,89	75,41	78,06	27.02
14i	α	92,54	71,42	72,42	74,25	72,93	40:60
1 11	β	96,27	74,15	73,99	72,25	77,16	10.00
14j	α	92,50	71,47	72,42	75,24	72,98	32:68
- ·J	β	96,25	74,15	73,96	75,24	77,23	32.00
14k	α	92,45	71,51	72,49	75,30	73,24	39:61
	β	96,21	74,14	73,94	75,30	77,54	33.01
14t	α	92,33	71,59	72,60	73,96	73,75	35:65
1.0	β	96,17	75,35	73,75	74,27	78,03	22.02
14x	α	92,37	71,43	72,49	74,90	69,28	40:60
112	β	96,09	74,08	74,66	75,15	73,56	10.00
10ad	α	93,21	72,95	73,71	76,12	73,71	44:56
1044	β	97,73	75,37	75,37	77,25	78,38	

#### 3.2.6.4 Síntesis de (6S)-6-C-aril-L-fructosa (15) y (6S)-6-C-aril-L-tagatosa (16) catalizado por RhuA.

En nuestro grupo de investigación se había estudiado la adición aldólica de DHA a diferentes aldehídos aceptores catalizado por RhuA en tampón borato. Esta reacción se realizó con los aldehídos 11a y 11k con conversiones superiores al 95 %, después de 24 h, en ambos casos y los rendimientos de producto aislado fueron del 54 y 43 % respectivamente (después de 4 etapas de síntesis) (Tabla 3.24).

Los productos obtenidos fueron caracterizados por técnicas de RMN (espectros material suplementario). Para ambos casos la enzima no fue estereoselectiva en la formación del centro quiral que proviene del aldehído aceptor. Por tanto, se obtuvieron monosacáridos derivados de la L-fructosa (3R,4R) y L-tagatosa (3R,4S). Para ambos azúcares la formación del hemiacetal cíclico originó la forma piranósica y furanósica en equilibrio (**Tabla 3.24**). En los productos derivados de L-frutosa (**15a** y **15k**) predomina la forma furanósica respecto a la piranósica (**Tabla 3.24**). Esto se debe a las repulsiones 1,3-diaxiales creadas por los hidroxilos en el C3 y C4 en la conformación  ${}^{1}C_{4}$  de la forma piranósica. Sin embargo para los derivados de L-tagatosa (**16a** y **16k**) predomina la forma piranósica sobre la furanósica (**Tabla 3.24**), debido a que en la conformación  ${}^{1}C_{4}$  de la primera sólo aparece el hidroxilo del C3 en posición axial.

**Tabla 3.24**. Rendimiento y razón diastereomérica de los productos sintetizados con la adición aldólica de DHA a **11** catalizado por RhuA.

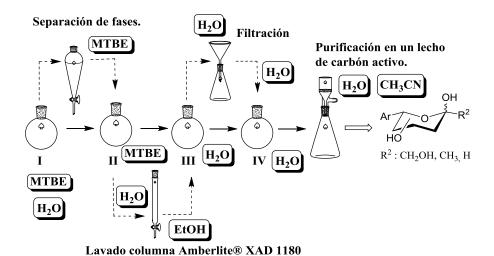
Aldehído	Producto	Rendimiento [a]/%	15:16 <sup>[b]</sup>	furano:pirano <sup>[b]</sup>
11a	15a	54	74:26	71:29
	16a			40:60
11k	15k	43	54:46	71:29
	16k			17:83

[a]Rendimiento de producto aislado a partir del aldehído aromático inicial (después de 4 etapas de síntesis). [b]Determinado por RMN. En todos los casos la conversión de la reacción de adición aldólica fue superior al 95 %. Sólo se escalaron las reacciones con los aldehídos 11a y 11k, para el resto de los sustratos (11) se alcanzó conversiones similares a escala analítica.

La promiscuidad estereoquímica de la RhuA ya se había observado con otros sustratos. Por ejemplo la adición aldólica de DHA a (*R*)-Cbz-alaninal produjo una mezcla de productos con un 70 % de adición *syn*. <sup>54</sup> Con su sustrato natural, DHAP, la enzima también forma mezcla de diastereómero en dependencia del aldehído aceptor. Por ejemplo, con el (*S*)-*N*-Cbz-2-formilpiperidina se forma predominantemente el producto de adición *syn* (97 %), mientras que con el otro enantiómero se obtienen mezclas de ambos diastereómeros (40:60 *syn:anti*). <sup>126</sup>

#### 3.2.7 Resumen.

Con el objetivo de sintetizar *C*-arilmonosacáridos se desarrolló una ruta de síntesis acoplando dos reacciones enzimáticas por medio de dos etapas químicas sencillas (**Figura 3.44**).



**Figura 3.44** Esquema del proceso general de síntesis de *C*-arilmonosacáridos con los solventes utilizados. **I**. Reacción de adición benzoínica catalizado por BAL, **II**. Reducción, **III**. Hidrólisis de los dimetilacetales y **IV**. Reacción aldólica catalizada por FSA y RhuA.

La estrategia sintética permitió generar diversidad estructural en los productos finales a través de la variación de los sustratos en la reacción de adición benzoínica y aldólica catalizada por BAL, FSA o RhuA respectivamente. Los intermediarios de síntesis se aislados del medio de reacción a través de pasos sencillo y se utilizaron directamente sin engorrosas etapas de purificación. Además sólo se utilizó como solvente orgánico MTBE en las dos primeras etapas de síntesis y etanol y acetonitrilo en las etapas de purificación.

La reacción de adición benzoínica intramolecular, catalizada por BAL, entre varios aldehídos aromáticos y el dimetoxiacetaldehído se realizó en un sistema bifásico con MTBE como solvente orgánico. Este medio de reacción permitió aislar el producto con un menor empleo de solventes orgánicos en comparación con un sistema con cosolvente. Sin embargo, presentó como desventaja que requirió utilizar altas concentraciones de enzima.

La etapa de reducción química se realizó en MTBE utilizando NaBH4 como agente reductor. En esta reacción se alcanzó elevadas estereoselectividades (*anti*) en la reducción de (*R*)-1-aril-2-hidroxi-3,3-demitoxipropan-2-onas (8) debido a la inducción de asimetría creada por el centro estereogénico adyacente al grupo carbonilo.

A continuación la reacción de hidrólisis de los acetales se realizó en medio ácido (2 M) y temperatura ambiente. Los hidroxialdehídos (11) obtenidos son moléculas lábiles que se descomponen al calentarse o aislarse del medio de reacción. Por esta razón se utilizaron directamente en solución después de neutralizar el ácido sulfúrico con CaCO<sub>3</sub>.

Finalmente a través de la adición aldólica de DHA, HA o GO a los hidroxialdehídos, catalizado por diferentes variantes de FSA, se sintetizaron derivados de L-sorbosa y L-xilosa. Estos azúcares

aparecieron en forma piranósica debido a los anillos aromáticos que favorecen la formación de los hemiacetales cíclicos. Los rendimientos de los productos finales en algunos casos llegaron a ser superiores al 50 %, siendo menores para los productos derivados de xilosa debido a las condiciones de reacción con GO y a la menor hidrofobicidad de estos productos.

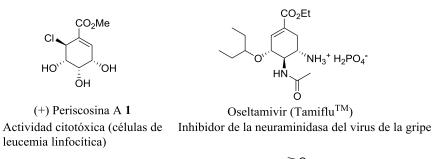
La adición aldólica de DHA a los hidroxialdehídos, catalizado por RhuA en tampón borato, cursó con formación de productos epímeros en el C4: L-frutosa (adición *syn*) y L-tagatosa (adición *anti*).

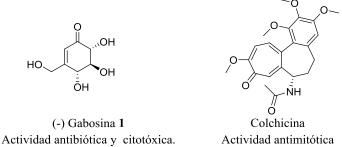
En este trabajo se describió por primera vez la síntesis de monosacáridos utilizando las potencialidades sintéticas de las enzimas tiamin dependientes y aldolasas. Los productos sintetizados pueden presentar actividad biológica como inhibidores selectivos del cotransportador Na<sup>+</sup>/glucosa 2 ya que presentan analogía estructural con otros reportados en la literatura.<sup>150</sup>

Adición benzoínica intramolecular catalizada por benzaldehído liasa de *Pseudomonas fluorescens* biovar I. Nuevas aplicaciones del biocatalizador en síntesis orgánica.

### 3.3.1 Reacciones intramoleculares catalizadas por benzaldehído liasa de *Pseudomonas fluorescens* biovar I (BAL).

La formación estereoselectiva de enlaces C-C intramolecular son reacciones con importante aplicaciones en síntesis orgánica, permitiendo el acceso a moléculas con variadas actividades biológicas como por ejemplo: inhibidores enzimáticos, antibióticos y citotóxicos (**Figura 3.45**). Para este tipo de reacciones se dispone de diferentes estrategias sintéticas como: la anulación de Robinson, la reacción de Hajos-Parrish-Eder-Sauer-Wiechert y reacciones de ciclación catalizadas por metales. 187,188





**Figura 3.45** Ejemplo de compuesto sintetizados a través de reacciones de carboligación intramoleculares. 179-182

En el metabolismo celular encontramos ejemplos de enzimas que median reacciones de ciclación a través de la formación de enlaces C-C, como por ejemplo: en la síntesis de *mio*-inositol, <sup>189</sup> en la ruta

metabólica del siquimato, <sup>190</sup> en la síntesis de esteroles <sup>191</sup> y en el metabolismo secundario (biosíntesis de terpenos) (**Figura 3.46**). <sup>192</sup>

**Figura 3.46** Ejemplo de reacciones intramoleculares de formación de enlaces C-C encontradas en el metabolismo celular. **A**, síntesis de 1-D-*mio*-inositol-3-fosfato catalizado por inositol-3-fosfato sintasa (EC 5.5.1.4). **B**, síntesis de 3-deshidroquinato catalizada por 3-dehidroquinato sintasa (EC 4.2.3.4). **C**, síntesis de lanosterol catalizado por lanosterol sintasa (EC 5.4.99.7). **D**, síntesis de taxa-4,11-dieno catalizado por taxadieno sintasa (EC 4.2.3.17).

A pesar de existir una variedad de enzimas que catalizan reacciones de carboligación intramoleculares son escasos los ejemplos de aplicación de biocatalizadores en síntesis orgánica en la formación de enlaces C-C intramoleculares. Por esta razón creímos relevante estudiar las potencialidades sintéticas de la benzaldehído liasas de *Pseudomonas fluorescens* biovar I (BAL) en la obtención de moléculas cíclicas por adición benzoínica intramolecular. Para este tipo de reacción existe en la literatura precedentes de su aplicación en la síntesis de moléculas cíclicas por medios no enzimáticos utilizando como catalizadores carbenos quirales derivados de 4*H*-1,2,4-triazol (**Figura 3.47**). <sup>193,194</sup>

**Figura 3.47** Ejemplo de reacciones de adición benzoínica intramoleculares catalizadas por carbenos quirales derivados de 4*H*-1,2,4-triazol. En estos ejemplos el grupo aldehído actúa como sustrato dador mientras que la cetona lo hace como sustrato aceptor. <sup>193,194</sup>

## 3.3.1 Síntesis de aldehídos bifuncionales y su estudio como sustratos en reacciones benzoínicas intramoleculares catalizadas por BAL.

La BAL cataliza la adición benzoínica intermolecular entre aldehídos aromáticos con una alta estereoselectividad (configuración R). En base a esto se decidió sintetizar sustratos 2,2'; 3,3'y 4,4'-(alcano-1,n-diilbis(oxy))dibenzaldehído (17) y evaluarlos como sustratos en la reacción benzoínica intramolecular catalizada por BAL para dar 18. (**Figura 3.48**).

Figura 3.48 Esquema general de la reacción intramolecular catalizada por BAL.

La síntesis de los dialdehídos (17) se llevó a cabo por reacción de los 2; 3 ó 4-hidroxibenzaldehído (19a-c) y el 1,*n*-dibromoalcano (20a-f) correspondiente en presencia de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a reflujo por 48 h (Figura 3.49). Los rendimientos de producto dependieron de la longitud de la cadena carbonada del dibromoalcano y variaron entre un 31 y un 97 % (Tabla 3.25).

**Figura 3.49** Síntesis de los dialdehídos **17**. **i** 1,*n*-dribromoalcano, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN reflujo 48 h.

**Tabla 3.25** Rendimientos de producto aislado (**Rend**) en la síntesis de **17** a partir de **19** y **20**.

Producto	Rend/%	Producto	Rend/%	Producto	Rend/%
17aa	_[a]	17ba	_[a]	17ca	31
17ab	63	17bb	87	17cb	70
17ac	92	17bc	85	17cc	97
17ad	90	17bd	86	17cd	_[b]
17ae	95	17be	56	17ce	_[b]
17af	92	17bf	_[b]	17cf	_[b]

<sup>[a]</sup>No se formó el producto buscado. <sup>[b]</sup>Dialdehídos no sintetizados.

Los dialdehídos sintetizados fueron evaluados como sustratos en la adición benzoínica intramolecular catalizada por BAL. Las reacciones fueron monitorizadas por HPLC y en aquellas que hubo desaparición de la señal del sustrato con aparición de nuevas señales se escalaron, de 1 mL a 70 mL. Los productos se purificaron y caracterizaron por técnicas de RMN (espectros material suplementario) (**Tabla 3.26**).

**Tabla 3.26** Formación de productos en la reacción de adición benzoínica de dialdehídos (17) catalizada por BAL (**Conv**, conversión de la reacción).

Sustrato	Conv <sup>[a]</sup> /%	Sustrato	Conv <sup>[a]</sup> /%	Sustrato	Conv <sup>[a]</sup> /%
				17ca	<b>_</b> [b]
17ab	<b>_</b> [b]	17bb	$82^{[c]}(40 \ 21bb)^{[d]}$	17cb	56 <sup>[e]</sup> (77 <b>18cb</b> ) <sup>[f]</sup>
17ac	<b>_</b> [b]	17bc	82 <sup>[c]</sup> (53 <b>21bc</b> ) <sup>[d]</sup>	17cc	<b>_</b> [b]
17ad	<b>_</b> [b]	17bd	70 <sup>[c]</sup>		
17ae	<b>_</b> [b]	17be	<b>-</b> [b]		
17af	<b>_</b> [b]				

<sup>[a]</sup>La conversión de la reacción fue determinada por HPLC utilizando la disminución del área del pico del cromatograma del sustrato respecto al área inicial. <sup>[b]</sup>Se recupera el sustrato sin modificación después de 24 h de reacción. <sup>[c]</sup>Volumen de reacción 1 mL, **17bb-be** 10 mM, 2,5 U BAL mL<sup>-1</sup>, DMSO (20 % v/v) a 25°C. Tampón carbonato de sodio (50 mM pH 8,0, MgSO<sub>4</sub> 2,5 mM y ThDP 0,15 mM), 1 h de reacción. <sup>[d]</sup>Rendimiento de producto aislado en reacciones de 70 mL, sólo se forma el producto **21**. <sup>[e]</sup> Volumen de reacción 1 mL, **17ca-cc** 10 mM, 80 U BAL mL<sup>-1</sup>, DMSO (20 % v/v) a 25°C. Tampón carbonato de sodio (50 mM pH 8,0, MgSO<sub>4</sub> 2,5 mM y ThDP 0,15 mM), 24 h de reacción. <sup>[f]</sup>Rendimiento de producto aislado en reacciones de 70 mL, sólo se forma el producto **18**.

De los resultados obtenidos se observó que el sustrato **17cb** formó el producto de adición benzoínica intramolecular **(18cb)** con rendimientos de producto aislado del 77 %. El resto de dialdehídos derivados del 2-hidroxibenzaldehído **(17ac y 17cc)** no fueron sustratos de la enzima, recuperándose sin modificación después de 24 h de reacción **(Tabla 3.26)**.

Un resultado muy diferente se observó con los sustratos derivados de 3-hidroxibenzaldehído donde se formaron los productos de adición benzoínica intermolecular (**Tabla 3.26**). Estos dialdehídos mostraron formación de una mezcla compleja de productos con desaparición de las señales en HPLC (polimerización, precipitación, entrecruzamiento con la enzima, etc.). Esto se acentuó a tiempos largos de reacción (24 h) y altas concentraciones de enzima (80 U mL<sup>-1</sup>). Por esta razón los productos de adición intermolecular se aislaron de reacciones que se realizaron durante 1 h a bajas concentraciones del biocatalizador (2,5 U mL<sup>-1</sup>).

Por último, los dialdehídos derivados del 4-hidroxibenzaldehído (17aa-af) no fueron sustratos de la enzima independientemente de la longitud de la cadena carbonada que une los anillos aromáticos (Tabla 3.26).

Utilizando varios diseños de sustratos se encontró los requerimientos estructurales necesarios para la adición benzoínica intramolecular catalizada por BAL. Así, el derivado del 2-hidroxibenzaldehído (17cb) permite una disposición en el centro activo de la enzima con una conformación adecuada para la adición benzoínica intramolecular. Para los sustratos 17ca (n = 2, brazo espaciador corto) y 17cc (n = 4 brazo espaciador largo) no hay reacción, recuperándose el dialdehído de partida después de 24 h en contacto con la enzima. Estudios computacionales para modelar los sustratos en el centro activo de la enzima se están desarrollando en estos momentos.

La síntesis de **18cb** puede realizarse a través de dos estrategias quimioenzimáticas alternativas (**Figura 3.50**). Utilizando la segunda ruta de síntesis se obtuvo (*rac*)**18cb** que fue aislado y caracterizados por RMN, obteniéndose espectros idénticos a los de **18cb** (**Figura 3.51**).

#### Ruta de síntesis I

**Figura 3.50** Síntesis de **18cb** a través del intermediario **17cb** o **22. i** 1,3-dibromopropano (0,5 eq), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 eq), CH<sub>3</sub>CN (50 mL), reflujo 48 h. **ii** Volumen de reacción, 70 mL, 10mM sustrato, 80 U BAL mL<sup>-1</sup>, DMSO (20 % v/v) a 25 °C. Tampón carbonato de sodio (50 mM pH 8,0, MgSO<sub>4</sub> 2,5 mM y ThDP 0,15 mM), 24 h de reacción. **iii** Volumen de reacción, 35 mL, 0,5 M sustrato, 40 U BAL mL<sup>-1</sup>, DMSO (20 % v/v) a 25°C. Tampón carbonato de sodio (50 mM pH 8,0, MgSO<sub>4</sub> 2,5 mM y ThDP 0,15 mM), 24 h de reacción. **iv** 1,3-dibromopropano (1 eq), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 eq), CH<sub>3</sub>CN (50 mL), reflujo 12 h.

Con la ruta de síntesis I se obtuvo un producto quiral (**Tabla 3.27**). Sin embargo, la estrategia de síntesis alternativa cursa con la formación de la benzoina **22**. Este intermediario sintético muestra tendencia a la racemización por enolización de la  $\alpha$ -hidroxicetona (rearreglo de  $\alpha$ -cetoles) (**Tabla 3.27**). <sup>197</sup> La racemización de **22** es completa en las condiciones de reacción enzimática (pH 8-9 a 25 °C) después de 48 h.

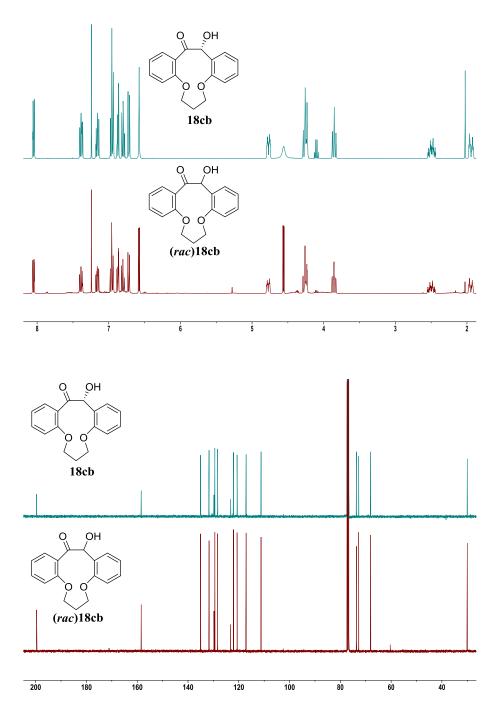


Figura 3.51 Espectros RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de 18cb y (*rac*)18cb en CDCl<sub>3</sub>.

**Tabla 3.27** Rendimiento de producto aislado en la síntesis de **18cb** y (*rac*)**18cb** y excesos enantioméricos (*ee*) de los productos e intermediario de síntesis (**22**).

Síntesis I			Síntesis II		
Producto	Rendimiento/%	<i>ee</i> /%	Producto	Rendimiento/%	ee/%
17cb	70	-	22	82	50(24h) <sup>[c]</sup>
18cb	77(54) <sup>[a]</sup>	90 <sup>[b]</sup>	(rac)-18cb	53(43) <sup>[a]</sup>	$0_{[p]}$

<sup>[a]</sup>Rendimiento de producto aislado en los dos pasos de síntesis. <sup>[b]</sup>Columna CHIRALPAK<sup>®</sup> ID, Hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 80/10/10 (v/v/v), flujo 1 mL min<sup>-1</sup> a 20 °C,  $t_R(R) = 17.3$  min y  $t_R(S) = 18.7$  min. <sup>[c]</sup>Columna CHIRALPAK<sup>®</sup> ID, Hexano/Isopropanol, 90/10 (v/v), flujo 1 mL min<sup>-1</sup> a 20 °C,  $t_R(R) = 16.9$  min y  $t_R(S) = 18.5$  min.

La susceptibilidad a la racemización de **22** puede deberse al incremento de la reactividad del grupo carbonilo causado por el grupos hidroxilos en posición *orto*. La racemización puede ocurrir por abstracción del protón del grupo  $\alpha$  hidroxilo (mecanismo A) o por abstracción del protón en el C $\alpha$  (mecanismo B) (**Figura 3.52**). Resultados experimentales con varias benzoinas apuntan a que el rearreglo de  $\alpha$ -cetoles cursa a través del segundo mecanismo. 197

Mecanismo A

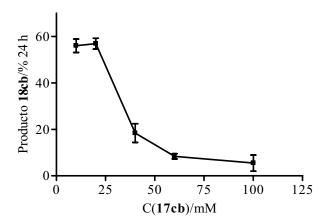
B:

$$\delta^ \delta^ \delta^+$$
 $\delta^ \delta^+$ 
 $\delta^ \delta^+$ 
 $\delta^ \delta^+$ 
 $\delta^ \delta^+$ 
 $\delta^ \delta^ \delta^ \delta^+$ 
 $\delta^ \delta^ \delta^ \delta^+$ 
 $\delta^ \delta^ \delta^ \delta^ \delta^+$ 
 $\delta^ \delta^ \delta^-$ 

Figura 3.52 Mecanismos propuestos para la racemización de 22.<sup>197</sup>

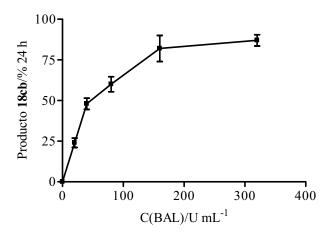
En resumen, la ruta de síntesis de II, a través del intermediario 22, da lugar a un producto racemizado, (*rac*)18cb, mientras que la ruta de síntesis I produce un producto enantioméricamente puro, 18cb.

A continuación se realizó un estudio del efecto de la concentración de **17cb** y la concentración de biocatalizador en la formación de **18cb**. Para ello se evaluaron concentraciones de dialdehído **17cb** entre 10 y 100 mM, encontrándose que a concentraciones superiores a 20 mM disminuyó la formación de **18cb** (**Figura 3.53**). Con el incremento de la concentración de dialdehído **17cb** posiblemente se dieron reacciones de entrecruzamiento con la enzima lo que provocó la inactivación del biocatalizador. <sup>198</sup>



**Figura 3.53** Efecto de la concentración de **17cb** en la formación de **18cb**. Volumen de reacción, 1 mL, **17cb** variable, 80 U BAL mL<sup>-1</sup>, DMSO (20 % v/v) a 25 °C. Tampón carbonato de sodio (50 mM pH 8,0, MgSO<sub>4</sub> 2,5 mM y ThDP 0,15 mM), 24 h de reacción. La cantidad de producto formado se determinó por HPLC utilizando la disminución del área del pico del cromatograma del sustrato respecto al área inicial.

Partiendo de estos resultados se estudió el efecto de la concentración de enzima en la formación de **18cb** utilizando 20 mM de sustrato **17cb**. Se utilizó un rango de concentración de BAL de 25 a 300 U mL<sup>-1</sup> alcanzándose conversiones superiores al 75 % cuando se adicionó 160 U mL<sup>-1</sup> de biocatalizador en el medio de reacción (**Figura 3.54**).



**Figura 3.54** Efecto de la concentración de BAL en la formación de **18cb**. Volumen de reacción, 1 mL, **17cb** 20 mM, enzima variable, DMSO (20% v/v) a 25°C. Tampón carbonato de sodio (50 mM pH 8,0, MgSO<sub>4</sub> 2,5 mM y ThDP 0,15 mM), 24 h de reacción. La cantidad de producto formado se determinó por HPLC utilizando la disminución del área del pico del cromatograma del sustrato respecto al área inicial.

## 3.3.2 Síntesis de nuevos aldehídos bifuncionales y su estudio en la reacción benzoínica intramolecular catalizada por BAL.

A continuación se planteó un estudio sobre la influencia de las modificaciones estructurales del sustrato **17cb** en la adición benzoínica intramolecular catalizada por BAL. Con este fin se introdujeron sustituciones en el anillo aromático y en la cadena espaciadora que une los grupos aromáticos (**Figura 3.55**).

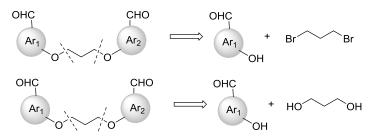
#### Dialdehídos simétricos.

#### Dialdehídos asimétricos.

#### Dialdehídos con modificaciones en la cadena espaciadora.

Figura 3.55 Sustratos diseñados a partir de la estructura del dialdehído 17cb.

En la obtención de los nuevos dialdehídos se utilizó dos estrategias sintéticas generales diferentes (**Figura 3.56**). Un grupo de sustratos se obtuvieron a partir del 1,3-dibromopropano en condiciones básicas y reflujo utilizando acetonitrilo como solvente de manera similar a la síntesis de **17cb** (Síntesis de Williamson). Para otros sustratos se utilizó como precursor sintético el 1,3-propanodiol. Este dialcohol se acopló a los hidroxialdehídos aromáticos por medio de la reacción de Mitsunobu. En este caso la reacción se realizó a 25 °C evitándose la formación de subproductos que aparecieron al utilizar las condiciones de síntesis de **17cb** (eliminación, isomerización, polimerización, etc.).



**Figura 3.56** Esquema general de síntesis de los dialdehídos ensayados como sustratos en la reacción benzoínica intramolecular catalizada por BAL.

La síntesis de los compuestos **24a-d**; **26**; **28**; **31** y **34** se realizó utilizando 1,3-dibromopropano como precursor de la cadena espaciadora entre los grupos aromáticos (**Figura 3.57**). Para los dialdehídos **31** y **34** se partió del alcohol correspondiente, (2-mercaptofenil)metanol (**29**) y 2-(2-hidroxietil)fenol (**32**) respectivamente, siendo necesario una etapa adicional de oxidación de los dialcholes **30** y **33**. Además en el caso del precursor **29** no se utilizó reflujo porque el grupo tiol es suficientemente reactivo como para que la reacción proceda a temperatura ambiente.

**Figura 3.57** Síntesis de los dialdehídos **24a-d**; **26**; **28**; **31** y **34**. **i** 1,3-dibromopropano, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, (**ia**) reflujo 24 h; (**ib**) 25 °C 12 h. **ii** MnO<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, reflujo 48 h. <sup>199</sup> **iii** IBX AcOEt, reflujo 6 h.

Por otro lado los dialdehídos 38; 42; 46 y 51a-b (Figura 3.58) se sintetizaron utilizando la reacción de Mitsunobu. En este trabajo se empleó como reactivos el azodicarboxilato dimorfolina y *n*-tributilfosfina.<sup>200</sup> La elevada polaridad de estos compuesto y de los subproductos de la reacción, la hidrazida y el óxido de tributilfosfina; facilita la purificación de los productos de interés por cromatografía en columna con gel de sílice.

**Figura 3.58** Síntesis de los dialdehídos **38**; **42**; **46** y **51a,b**. i 2-metil-1,3-propanodiol (ia), 1,3-propanodiol (ib), azodicarboxilato dimorfolina, *n*-Bu<sub>3</sub>P, THF, 25 °C 12 h. ii DIBAL-H (1 M en tolueno), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, – 78 °C 4 h. iii IBX AcOEt, reflujo 6 h.

**Figura 3.58 (Continuación)** Síntesis de los dialdehídos **38**; **42**; **46** y **51a,b**. **ib** 1,3-propanodiol, azodicarboxilato dimorfolina, *n*-Bu<sub>3</sub>P, THF, 25 °C 12 h. **ii** DIBAL-H (1 M en tolueno), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, – 78 °C 4 h. **iii** IBX AcOEt, reflujo 6 h. v MeOH, SOCl<sub>2</sub>, 25 °C, 12 h.

Las síntesis descritas hasta el momento permitieron obtener dialdehídos simétricos, pero los sustratos asimétricos resultaban interesantes porque nos permitiría evaluar la selectividad de la BAL respecto a la porción de la molécula que actuaría como sustrato dador y aceptor. Para obtener estos dialdehídos se utilizó la reacción de Mitsunobu desarrollándose estrategia de síntesis intermediario una a partir del 2-(3hidroxipropoxi)benzoato de metilo (52). De esta manera se obtuvieron los dialdehídos asimétricos 55; 58; 61a,b (Figura 3.59).

**Figura 3.59** Síntesis de los dialdehídos **55**; **58**; **61a,b. i** 1,3-propanodiol, azodicarboxilato dimorfolina, *n*-Bu<sub>3</sub>P, THF, 25 °C 12 h. **ii** tiosalicilato de metilo (**iia**), 3-hidroxitiofen-2-carboxilato de metilo (**iib**), **48a** ó **48b** (**iic**), azodicarboxilato dimorfolina, Bu<sub>3</sub>P, THF, 25 °C 12 h. **iii** DIBAL-H (1 M en tolueno), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, – 78 °C 4 h. **iv** MnO<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, reflujo 48 h. <sup>199</sup> **v** IBX AcOEt, reflujo, 6 h.

Por último, la síntesis del dialdehído asimétrico 67 se realizó por medio de una combinación de las reacciones generales descritas anteriormente en la síntesis de los diferentes dialdehídos. La alquilación del 2-hidroxinicotinato de metilo (63) se realizó con Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en tolueno bajo reflujo para favorecer la *O*-alquilación (Figura 3.60).<sup>201</sup> Posteriormente se utilizó la reacción de Mitsunobu en la síntesis del diéster 65 que fue reducido y oxidado para dar el producto de interés. Es de señalar que en nuestras manos no fue posible la síntesis del diéster simétrico derivado de 63. En este caso se obtuvo un producto con *N*-alquilación en uno de los extremos y *O*-alquilación en el otro, a pesar de utilizar las condiciones de síntesis que eventualmente sugerían favorecer la modificación sobre el átomo de oxígeno.

**Figura 3.60** Esquema de síntesis de **67 i** MeOH, SOCl<sub>2</sub>, 25 °C, 12h. **ii** 3-bromo-1-propanol, Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, tolueno, reflujo 12 h. **iii** salicilato de metilo, azodicarboxilato dimorfolina, *n*-Bu<sub>3</sub>P, THF, 25 °C 12 h. **iv** DIBAL-H (1 M en tolueno), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, – 78 °C 4 h. **v** IBX AcOEt, reflujo 6 h.

Una vez sintetizados los dialdehídos se paso a estudiar sus propiedades como sustratos en la reacción de adición benzoínica intramolecular catalizada por BAL. Los dialdehídos 24a, 24c, 28, 60a,b y 67 fueron sustratos de la enzima por lo que las reacciones fueron escaladas y los

productos purificados para su caracterización por técnicas de RMN (material suplementario) (**Tabla 3.28**).

**Tabla 3.28** Reacción de adición benzoínica intramolecular de diferentes dialdehídos catalizada por BAL. **Conv.** conversión de la reacción, **Rend**. rendimiento de producto aislado.

Sustrato	X; X′	Y	Conv <sup>[a]</sup> /% 24 h	Producto	Rend/%	ee <sup>[b]</sup> /%
17cb	X=X,= H	С	84	18cb	77	90 <sup>[f]</sup>
24a	X=X` 3;3'= OCH <sub>3</sub>	С	72	68	67	98 <sup>[f]</sup>
24c	X=X` 5;5'= OCH <sub>3</sub>	С	89	69	84	98 <sup>[f]</sup>
28	X=X` 3;3'= Cl	С	50(90) <sup>[c]</sup>	70	61	98 <sup>[g]</sup>
61a	X= H 5'-X'= Cl	C	70	<b>71e:71f</b> 2:3 <sup>[d]</sup>	58	_[h]
61b	X= H $5'-X'= Br$	С	35(75) <sup>[c]</sup>	<b>72e:72f</b> 1:1 <sup>[d]</sup>	65	_[h]
67	X=X,= H	N	98	<b>73e:73f</b> 3:7 <sup>[e]</sup>	26 ( <b>73e</b> ) 67 ( <b>73f</b> )	> 99 <sup>[f]</sup> > 99 <sup>[f]</sup>

la La conversión de la reacción fue determinada por HPLC utilizando la disminución del área del pico del cromatograma del sustrato respecto al área inicial. [b] El análisis se realizó en una columna CHIRALPAK® ID a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, 20 °C y detección a 254 nm. [c] 48 h de reacción después de adicionar más biocatalizador a las 24 h, 160 U mL<sup>-1</sup>. [d] Determinada por RMN. [e] Determinado por HPLC. [f] Sistema de elución: hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH, 80/10/10 (v/v/v). [g] Sistema de elución: hexano/EtOH, 96/4 (v/v). [h] No determinado por la complejidad de la muestra.

Para la mayoría de los sustratos anteriores las conversiones de la reacción fueron superiores al 50 % en 24 h. En los casos de los dialdehídos **28** y **60b** fue necesario añadir más biocatalizador a las 24 h de reacción, 160 U mL<sup>-1</sup>, para alcanzar conversiones del 90 % y 75 % respectivamente después de 48 h (**Tabla 3.26**).

Como sustratos de la BAL en la adición benzoínica intramolecular se encontraron también los dialdehídos asimétricos **60a-b** y **67**. Para **60a** y **67** la enzima posee selectividad hacia la formación del isómero **f** donde el grupo benzaldehído actuó como sustrato dador. Sin embargo, para **60b** la enzima no discriminó entre ambas fracciones de la molécula formándose **72e** y **72f** en igual proporción (**Tabla 3.26**). Los productos **71e-f** y **72e-f** no pudieron ser separados por cromatografía de fase normal ni fase reversa (C18), pero sí en columna CHIRALPAK<sup>®</sup> ID (Amilosa tris(3-clorofenilcarbamato) inmovilizado en gel de sílice,  $5\mu m$ ). Con esta fase estacionaria se separaron a escala analítica los isómeros de los productos **71** y **72** con  $\Delta t_R(\mathbf{71e-71f}) = 2,0$  minutos y  $\Delta t_R(\mathbf{72e-72f}) = 2,5$  minutos.

Para la caracterización estereoquímica de los productos se utilizó una columna CHIRALPAK<sup>®</sup> ID. Este tipo de fase estacionaria resultó muy eficiente en la separación de enantiómeros tanto de benzoinas lineales como de los productos cíclicos obtenidos en este trabajo. Los *ee* de las benzoinas cíclicas se corresponden con los valores descritos en la literatura para la enantioselectividad de la BAL (**Tabla 3.26**). 95-97,99-101,103-106,173 La preferencia estereoquímica de la enzima se debió a la estabilización del estado de transición que conduce a la configuración *R* respecto al S,  $\Delta(\Delta G(S-R))^{\neq} \geq 7,3$  kJ mol<sup>-1</sup> según los *ee* (**Figura 3.61**).

**Figura 3.61** Representación del estado de transición del sustrato **17cb** en el centro activo de la BAL. La figura se construyó a partir de la estructura cristalográfica de la enzima con el inhibidor benzoilfosfonato de metilo (3D7K).

Con el resto de los dialdehído, 24b,d; 26; 31; 34; 38; 42; 46; 51a,b; 55 y 58 la enzima no catalizó reacción de adición benzoínica (inter o

intramolecular) recuperándolos sin modificación después de 24 h de reacción.

Los resultados anteriores indican que la enzima nativa cataliza reacciones de adición benzoínica intramolecular con dialdehídos derivados del 2,2'-(propano-1,3-diilbis(oxi))dibenzaldehído (17cb) con sustituciones en posición 3 y 5 de los anillo aromático (Figura 3.62). Este planteamiento no es general y depende del tamaño de los sustituyentes ya que 51a,b no son sustratos de la enzima. Moléculas con anillo fusionados como los derivados del naftaleno 26 y 42 no son tolerados por la enzima. Tampoco heterociclos análogos del tiofeno (46 y 58) a pesar que el tiofeno-2-carboxaldehído es sustrato de la enzima en reacciones intermoleculares.<sup>202</sup>

Tampoco resultaron sustratos los dialdehídos con modificaciones en la cadena espaciadora que une los grupos aromáticos. Así por ejemplo, con los compuestos con átomos de azufre, 31 y 55, se recuperó los dialdehídos sin modificación después de 24 h en el medio de reacción. Esto ocurre tanto para la molécula simétrica como para la asimétrica lo que se debe, muy probablemente, a que las restricciones estéricas aparecen tanto en el sitio de unión del dador como del aceptor. De manera similar ocurre cuando se introduce un grupo metilo en la cadena espaciadora (38). Además el intento de sintetizar ciclos de mayor tamaño con el dialdehído 34 tampoco fue posible porque no fue sustrato de la enzima (Figura 3.62).

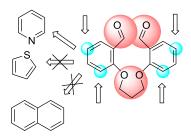


Figura 3.62 Representación de la molécula de 2,2'-(propano-1,3-diilbis(oxi))dibenzaldehído (17cb). En rojo aparecen las regiones que no admiten variación para conservar la capacidad de la molécula de actuar como sustrato en la adición benzoínica intramolecular catalizada por BAL. En azul las regiones de la molécula susceptibles de modificación manteniéndose en menor o mayor grado la capacidad de actuar como sustrato en la adición benzoínica intramolecular catalizada por BAL.

#### 3.3.3 Resumen.

Con el objetivo de estudiar nuevas aplicaciones de la BAL en síntesis orgánica se evaluó como biocatalizador en la síntesis de moléculas cíclicas a través de la adición benzoínica intramolecular. Al no existir precedentes para esta reacción se realizó un estudio sobre los requerimientos estructurales del sustrato para que la BAL catalizara una reacción de adición benzoínica intramolecular. Se sintetizaron diferentes dialdehídos obtenidos por reacción de los 2; 3 ó 4-hidroxialdehídos con 1,*n*-dibromoalcanos. De todas las moléculas estudiadas el 2,2'-(propano-1,3-diilbis(oxi))dibenzaldehído fue sustrato de la enzima para la reacción benzoínica intramolecular.

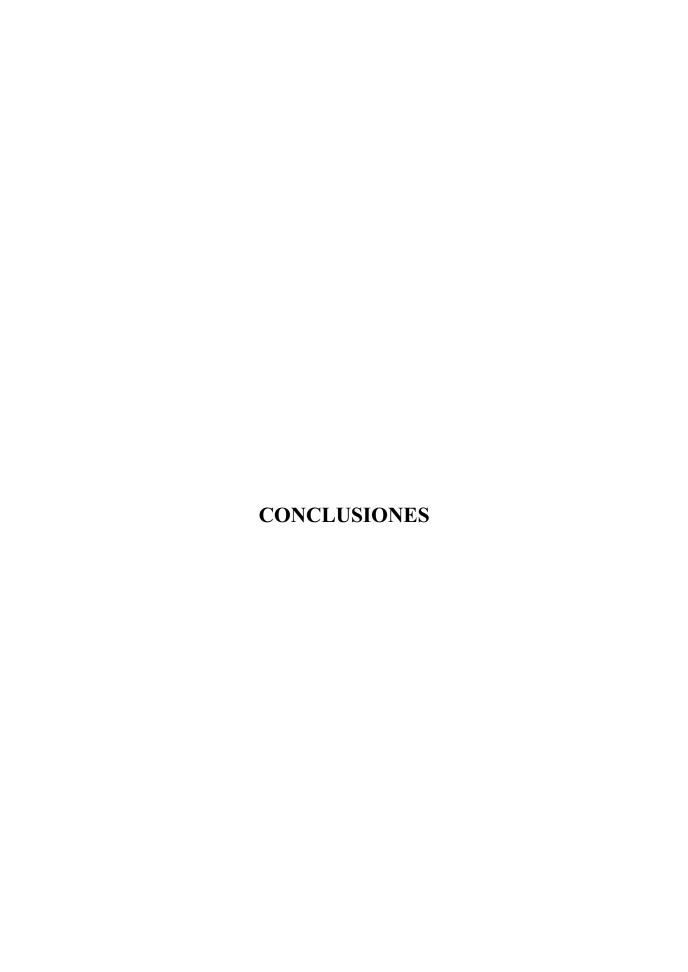
Utilizando al 2,2'-(propano-1,3-diilbis(oxi))dibenzaldehído como sustrato que cumple los requerimientos estructurales se diseñaron y sintetizaron derivados de este dialdehído que se ensayaron como sustratos en la adición benzoínica intramolecular catalizada por BAL.

La enzima tolera sustituciones en las posiciones 3 y 5 de los anillos aromáticos del sustrato. Esto se corresponde con su selectividad hacia aldehídos aromáticos con sustituciones en posición *meta* en la adición benzoínica intermolecular. También fue sustrato un derivado de la piridina a pesar que la enzima muestra una baja selectividad por piridincarbaldehídos en reacciones intermoleculares. Dialdehídos derivados del tiofeno no fueron sustratos mientras que el tiofeno-2-carbaldehído es sustrato aceptor/dador en reacciones intermoleculares. Esto demuestra que los requerimientos estructurales que rigen la adición benzoínica intermolecular no siempre son válidos para la reacción intramolecular.

La BAL no tolera modificaciones en la cadena espaciadora que une los grupos aromáticos en el 2,2'-(propano-1,3-diilbis(oxi))dibenzaldehído. Esto restringe el tamaño de los ciclos que se pueden formar a derivados del 7,8,14,15-tetrahidro-6*H*-dibenzo[*f,j*][1,5]dioxacicloundeceno. Es a destacar que todas las reacciones se realizaron con la enzima nativa por lo que queda abierta la posibilidad de sintetizar moléculas cíclicas con estructuras más variadas utilizando biocatalizadores optimizados por ingeniería de proteínas.

Con dialdehídos asimétricos se observó la formación de mezclas de productos isómeros e incluso para el 5-bromo-2-(3-(2-formilfenoxi) propoxi)benzaldehído (61b) la enzima no mostró ninguna selectividad en cuanto a la naturaleza del extremo dador y aceptor.

La estereoselectividad de la enzima en las reacciones de adición benzoínica intramolecular es del orden del 98 % con formación del estereoisómero R lo cual se corresponde con las preferencias estereoquímicas descritas en la reacción intermolecular.  $^{95-97,99-101,103-106,173}$ 



- 4.1 Síntesis enzimática de α,α-dialquil-α-aminoácidos utilizando L-serina hidroximetiltransferasa de *Streptococcus thermophilus* modificada por ingeniería de proteínas.
- Variantes en la posición 55 de la secuencia de la SHMT<sub>Sth</sub> (Y55T, Y55C, Y55S) catalizaron la adición aldólica de D-Ala y D-Ser a diferentes aldehídos. La variante Y55T resultó ser la más activa y adiciona D-Ser y D-Ala al (benciloxi)acetaldehído con una actividad 185 y 684 veces superior a lo que la enzima nativa adiciona Gly al mismo sustrato respectivamente. La SHMT<sub>Sth</sub> nativa cataliza la adición de D-Ala a varios aldehídos, actividad no descrita hasta el momento.
- La SHMT<sub>Sth</sub> es estable en medios de reacción con 50 % de DMSO (v/v). El solvente orgánico aumenta la solubilidad de los sustratos hidrofóbicos y posiblemente modifica la estructura de la enzima favoreciendo la catálisis. La reacción enzimática no requiere la adición de cofactor, lo que presupone una ventaja respecto a otras enzimas PLP dependientes por los costes económicos adicionales que implica el uso de cofactor en la reacción
- Se sintetizaron varios α,α-dialquil-α-aminoácidos a través de la adición aldólica de D-Ser y D-Ala a aldehídos alifáticos y aromáticos catalizados por la enzima nativa y la variante Y55T. La SHMT<sub>Sth</sub> Y55T mostró una elevada diastereoselectividad a 25 °C con ambos sustratos dadores (> 95 % adición *anti* (3)). En el caso de la enzima nativa la diastereoselectividad fue menor, si bien se aprecia que es mayor en los productos derivados de D-Ala en comparación con los derivados de Gly.

- 4.2 Desarrollo de una estrategia quimio-enzimática en la síntesis de C-arilmonosacáridos utilizando benzaldehído liasa de Pseudomonas fluorescens biovar I, D-frutosa-6-fosfato aldolasa y L-ramnulosa-1-fosfato aldolasa de E. coli.
- Las mejores condiciones para la adición benzoínica cruzada de aldehídos aromáticos al dimetoxiacetaldehído, catalizado por BAL, en un sistema bifásico tampón:MTBE (1:1 v/v) fueron: un exceso molar del aldehído alifático (10 equivalentes) y una concentración del biocatalizador de 500 U mL<sup>-1</sup>. En estas condiciones se alcanzan conversiones cercanas al 100 % y la enzima toleró altas concentraciones de dimetoxiacetaldehído (1 M), lo que aumenta el rendimiento de producto por unidades de enzima utilizada. En un sistema bifásico el producto de la reacción, (*R*)-1-aril-2-hidroxi-3,3-dimetoxipropan-1-ona (8), se distribuye preferencialmente en la fase orgánica lo que facilita su separación.
- La reducción de (R)-1-aril-2-hidroxi-3,3-dimetoxipropan-1-ona (8) se realizó por medios químicos utilizando como agente reductor NaBH<sub>4</sub> en MTBE. La reacción cursa con alta estereoselectividad y formación predominante del producto de adición *anti* ( $\geq$  90 %) en correspondencia con la inducción de asimetría creada por el centro quiral adyacente al grupo carbonilo. La hidrólisis de (1S,2S)-1-aril-3,3-dimetoxi-1,2-propanodiol (10) en medio ácido  $(2 \text{ M H}_2\text{SO}_4)$  a 25 °C permite obtener los dihidroxialdehídos que fueron utilizados directamente en las reacciones de adición aldólicas aldólica catalizadas por FSA y RhuA.
- La adición aldólica catalizada por FSA y sus variantes (A129S y A129T) permitió obtener derivados de L-sorbosa y L-xilosa con

rendimientos finales que oscilaron entre un 20 y un 50 %. Todos los C-arilmonosacáridos aparecen en forma piranósica y sólo en el caso de la L-xilosa se observa mezclas de anómeros (60 % anómero  $\beta$ ). La catálisis de la RhuA cursa con baja diastereoselectividad obteniéndose el producto de adición syn (L-fructosa) y anti (L-tagatosa).

# 4.3 Adición benzoínica intramolecular catalizada por benzaldehído liasa de *Pseudomonas fluorescens* biovar I. Nuevas aplicaciones del biocatalizador en síntesis orgánica.

- La BAL es capaz de catalizar reacciones de adición benzoínica intramolecular. Para esta reacción los sustratos deben ser derivados del 2-hidroxibenzaldehído donde los anillos aromáticos están unidos por una cadena espaciadora de 3 carbonos a través de sus grupos hidroxilos.
- A partir de la estructura básica del 2,2'-(propano-1,3-diilbis(oxi))dibenzaldehído se sintetizaron diferentes derivados con sustituciones en los anillos aromáticos y en la cadena espaciadora para observar su efecto sobre la catálisis de la BAL. La síntesis de los precursores dialdehídos se realizó utilizando la reacción de Williamson o la reacción de Mitsunobu aprovechando la acidez de los fenoles. La enzima no tolera sustituciones en la cadena espaciadora y debe estar formada por C y O. De forma general sustituciones en posición *meta* respecto al grupo carbonilo son toleradas por la enzima aunque dependen de la naturaleza del sustituyente. También son aceptadas sustituciones de tipo heterocíclica, como es el caso de la piridina.
- La reacción de adición benzoínica intramolecular catalizada por BAL permitió obtener derivados del 7,8,14,15-tetrahidro-6H-

dibenzo[f,j][1,5]dioxacicloundeceno. En el caso de dialdehídos asimétricos se obtuvieron mezclas de isómeros. Los *ee* obtenidos se corresponden con la alta estereoselectividad que muestra la enzima durante la catálisis.



#### 5.1 Reactivos

Todos los productos químicos empleados en este trabajo, fueron de calidad analítica. Los reactivos y enzimas utilizados para los ensayos de antibióticos. actividad biológica, reactivos realizar para las electroforesis, componentes para las soluciones tampón, D-Ala y D-Ser, (benciloxi)acetaldehído, glicolaldehído, aldehídos aromáticos reactivos para la síntesis química fueron provistos por Sigma-Aldrich. La hidroxiacetona, dihidroxiacetona y los solventes de HPLC fueron suministrados por Merck.

Los componentes para la preparación de los medios biológicos fueron adquiridos a la casa comercial Pronadisa.

### 5.2 Material biológico.

### 5.2.1 Microorganismos.

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo, junto a su procedencia y características más relevantes, se muestran en la **Tabla 5.**1.Las cepa de *E. coli* NovaBlue se empleó en los experimentos de clonación y mutagénesis. Las cepas de *E. coli* M15 se utilizó en la expresión de proteínas.

**Tabla 5.1** Cepas bacterianas utilizadas y sus características más importantes.

Cepa	Genotipo	Procedencia
E. coli		
NovaBlue	endA1 hsdR17 $(r_{K12}^- m_{K12}^+)$ supE44 thi-1 recA1 gyrA96	Novagen
	$relA1\ lac\ F'[proA^+B^+\ lacI^qZ\Delta M15::Tn10]\ (Tet^R).$	
M15	F-, Φ80∆lacM15, thi, lac-, mtl-, recA+, KmR, pREP4.	Quiagen

#### 5.2.2 Plásmidos

En la **Tabla 5.2** se describen los plásmidos utilizados en este trabajo y sus características más importantes.

 Tabla 5.2 Vectores y construcciones plasmídicas utilizadas en este trabajo.

Plásmido	Características
pQE40	Vector (4031 pb) de bajo número de copias con promotor T5 y elementos del represor lac. Cola de histidina (6xHis) en el <i>N</i> -terminal. Opción de expresar proteína fusionada a la dihidrofolato reductasa en el extremo <i>N</i> -terminal. Resistencia a ampicilina. Origen de replicación ColE 1. Región de terminación de la transcripción lambda <i>t</i> <sub>0</sub> . (Quiagen)
pQE60	Vector (3431 pb) de bajo número de copias con promotor T5 y elementos del represor lac. Cola de histidina (6xHis) en el $C$ - terminal. Resistencia a ampicilina. Origen de replicación ColE 1. Región de terminación de la transcripción lambda $t_{\theta}$ . (Quiagen)
pQE <i>shmt</i>	Gen glyA (1200 pb) clonado ( <i>BamHI</i> y <i>SalI</i> ) en pQE-40. <sup>92</sup>
pQEshmt Y55T	Gen glyA (1200 pb) clonado ( <i>BamHI</i> y <i>SalI</i> ) en pQE-40 con mutación Y55T (Este trabajo).
pQEshmt Y55C	Gen glyA (1200 pb) clonado ( <i>BamHI</i> y <i>SalI</i> ) en pQE-40 con mutación Y55C (Este trabajo).
pQE40shmt Y55S	Gen glyA de Streptococcus thermophilus (1200 pb) clonado (BamHI y SalI) en pQE-40 con mutación Y55S (Este trabajo).
pKK233- 2/bal	Plásmido donado por la Prof. Dr. Martina. Pohl (IBG-1: Biotechnology, Forschungszentrum Julich GmbH). 99
pQE <i>bal</i> pQE <i>fsa</i>	Gen <i>bal</i> de <i>Pseudomonas fluorescens</i> Biovar I (1700 pb) clonado ( <i>BseRI</i> y <i>BamHI</i> ) en pQE60 (Este trabajo). Gen <i>fsa</i> de <i>E. coli</i> (660bp) clonado en pQE-40 ( <i>BseRI</i> y <i>HindIII</i> ). La cola de histidina <i>N</i> -terminal fue eliminada. 111
pQEfsa A129S	Gen fsa con mutación A129S (660bp) clonado en pQE40. <sup>111</sup>
pQE <i>fsa</i> A129T	Gen fsa con mutación A129T (660bp) clonado en pQE40. <sup>113</sup>
pQE <i>rahD</i>	Gen rhaD de E. coli (820bp) clonado en pQE-40 (BamHI y HindIII) <sup>203</sup> .

### 5.2.3 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos diseñados para este estudio se detallan en la **Tabla 5.3**. Todos los oligonucleótidos fueron provistos por la casa comercial MWG-Biotech con un grado de pureza > 70 % a través del sistema de purificación HPSF (del inglés High Purity Salt Free).

**Tabla 5.3** Oligonucleótidos empleados en este trabajo. Aparecen señalados los codones modificados para el diseño de las variantes de SHMT<sub>Sth</sub> y los sitios de restricción de las enzimas (*BseRI*, BAL 53 y *BamHI*, BAL35) en la clonación de la BAL.

Oligonucleótidos	Secuencias (5'→3')
SHMT Y55T 53	GACTAACAAA <mark>ACC</mark> GCAGAAGGCTATCC
SHMT Y55T 35	GGATAGCCTTCTGC <mark>GGT</mark> TTTGTTAGTC
SHMT Y65H 53	CCAGGTAAACGTTAC <mark>CAC</mark> GGTGG
SHMT Y65H 35	CCACC <mark>GTG</mark> GTAACGTTTACCTGG
SHMT H229T 53	CAACTACAACAACC <mark>ACC</mark> AAGACACTTCGTG
SHMT H229T 35	CACGAAGTGTCTTGGTGGTTGTTGTAGTTG
SHMT Y55X 53	GACTAACAAANNKGCAGAAGGC
SHMT Y55X 35	CTGCMNNTTTGTTAGTCAAGAGC
BAL (53)	A <b>GAGGAG</b> AAATTAACCATGGCGATGATTACAGGCGG
BAL (35)	C <mark>GGATCC</mark> TGCGAAGGGGTCCATGCCGAT

#### 5.2.4 Medios de cultivo

<u>Medio LB (Luria-Bertani)</u>. Triptona (10 g  $L^{-1}$ ), Extracto de levadura (5 g  $L^{-1}$ ) y NaCl (10 g  $L^{-1}$ ). En caso de utilizar este medio en forma sólida se suplementó con agar bacteriológico (15 g  $L^{-1}$ ).

Medio SOB. Triptona (20 g L<sup>-1</sup>), extracto de levadura (5g L<sup>-1</sup>), NaCl (10 mM), KCl (2,5 mM), MgCl<sub>2</sub> (10 mM) y MgSO<sub>4</sub> (10 mM).

Medio SOC. Medio SOB suplementado con glucosa (20 mM).

### 5.3 Análisis por HPLC.

El análisis por HPLC (LaChrom Elite, VWR-Hitachi) se realizó en una columna RP-HPLC XBridge $^{\text{®}}$  C18, 5  $\mu$ m, 4,6  $\times$  250 mm (Waters) y el

sistema de solventes utilizado fue: <u>solvente (A)</u>: 0,1% (v/v) ácido trifluoracético (TFA) en  $H_2O$ , <u>solvente (B)</u>: 0,095% (v/v) TFA en  $CH_3CN:H_2O$  4: 1 o <u>solvente (C)</u>: 0,095% (v/v) TFA en  $CH_3CN$ , un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, la detección a 215 nm y la temperatura de la columna a 30 °C.

El análisis de los *ee* se realizó por UFLC (SHIMADZU) con una columna CHIRALPAC  $\mathrm{ID}^{\mathbb{R}}$ , 5 µm, 4,6 × 250 mm (DAICEL) utilizando un método de elución isocrático a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, la detección a 254 nm y la temperatura de la columna a 25 °C.

#### 5.4 Construcción de las diferentes variantes de la SHMT<sub>sth</sub>.

Para la introducción de sustituciones puntuales en el gen de la SHMT<sub>Sth</sub> se empleó el sistema de la casa comercial Stratagene (QuickChange® Site Directed Mutagenesis). La reacción de PCR (50 µL) consistió en una mezcla del plásmido pQEshmt (1 µL, 1 ng), los oligonucleótidos de interés (Tabla 5.3, (1 μL, 2 μM)), dNTP (1 μL, 250 μM), tampón de reacción 10X (5 μL, Tris-HCl 200 mM, pH 8,8 a 25°C, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100 mM), KCl (100 mM), BSA (1 mg mL<sup>-1</sup>), Triton X-100 (1 % v/v), MgSO<sub>4</sub> (20 mM)), H<sub>2</sub>O (40 μL) y Pfu polimerasa (1 μl, 2,5 U, Fermentas- Thermo Scientific). El gen fue amplificado en 24 ciclos (95 °C por 30 segundos, 55 °C por 1 minuto y 68 °C por 12 minutos), finalmente 68 °C por 30 minutos. La amplificación fue chequeada por electroforesis en gel de agarosa al 1 % en tampón TAE (Tris-base 40mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1mM, pH 8,1). Posteriormente el ADN parental fue digerido con *Dpn*I (0,5 U) directamente en la mezcla de PCR a 37 °C durante 4 h. Después de la digestión se transformaron células quimio-competentes<sup>204</sup> de *E.coli* NovaBlue (Novagen).

Para la transformación se adicionaron las células competentes (100  $\mu$ L) a la solución de ADN (1-3  $\mu$ L, hasta 150 ng de ADN), mezclándose la

solución suavemente para evitar romper las membranas celulares. La preparación se incubó en hielo durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo se realizó el choque térmico (30 segundos a 42°C, seguida de una incubación de 2 minutos a 4 °C). Posteriormente se agregó medio SOC (800 μL) y se agitó la mezcla a 250 rpm durante 1 h. Con esta solución se sembraron placas de medio LB en agar (suplementadas con ampicilina, 100 μg mL<sup>-1</sup>) y se incubaron toda la noche a 37°C.

Se seleccionaron varias colonias y se pasaron a medio LB líquido (10 mL con ampicilina, 100 μg mL<sup>-1</sup>) a 250 rpm y 37 °C durante toda la noche. De los cultivos de *E coli* se aisló y purificó el DNA plasmídico utilizando el kit de la casa comercial Quiagen (QIAGEN Plasmid Mini Kit). Finalmente se secuenció el DNA (Servicio de secuenciación de ADN del CRAG-CSIC) para determinar la presencia de la sustitución de bases buscada.

# 5.4.1 Construcción de la librería de variantes de SHMT<sub>Sth</sub> (Y55X) y su evaluación en la reacción de adición aldólica de D-Ser al (benciloxi)acetaldehído.

Utilizando los oligonucleótidos degenerados en la posición 55 (**Tabla 5.3**) se realizó una reacción de PCR y se digirió con DpnI. Se transformaron células quimio-competentes de *E.coli* NovaBlue (Novagen) y se sembraron placas de medio LB en agar (suplementadas con ampicilina, 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), como se describió anteriormente. Una vez crecidas las colonias se seleccionaron 94 clones que se crecieron en placas de 96 pocillos (2 mL volumen total) con medio LB (600  $\mu$ L, ampicilina, 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) a 37 °C y 1000 rpm durante toda la noche. Para la expresión de la proteína, una alícuota de este cultivo (100  $\mu$ L) fue inoculada en medio LB (500  $\mu$ L, ampicilina, 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) y se agitó a 1000 rpm y 37 °C durante 3 h (DO<sub>600</sub>  $\approx$  0,5). Seguidamente la

expresión de la proteína fue inducida por la adición de isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) (1 mM, concentración final), a 37 °C y 1000 rpm durante toda la noche. La expresión de proteínas fue chequeada aleatoriamente (20 pocillos) utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida (12 %) en condiciones desnaturalizantes.<sup>205</sup>

Posteriormente la placa fue centrifugada (12,000 *g* por 30 minutos) y el sobrenadante se descartó. Los pellet de células fueron congelados (–20°C) por 30 minutos y lisados por la adición de lisozima (100 μL, lisozima, 1 mg mL<sup>-1</sup>, en 10 mM Tris-HCl, pH 8,0). Después de agitar (1000 rpm) por 2 h a 37°C se centrifugó (12,000 *g* por 30 minutos). El sobrenadante (100 μL) fue añadido a una mezcla (900 μL) que contenía (benciloxi)acetaldehído (0,1 mmol), D-Ser (0,025 mmol) o D-Thr (0,025 mmol) en DMSO (500 μL) (DMSO:agua 1:1 v/v concentración final). La reacción fue agitada durante toda la noche a 1000 rpm y 25 °C. De las reacciones se tomaron muestras (100 μL) y se diluyeron con metanol (900 μL). Después de centrifugar (12,000 *g* por 5 minutos) fueron analizadas por HPLC, utilizando un método isocrático (25 % B por 12 minutos).

Los clones seleccionados fueron vueltos a ensayar a una escala de expresión de proteína mayor. Un inóculo de cada uno (200  $\mu$ L), fue añadido a medio LB (20 mL, ampicilina, 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) y se dejaron a 37 °C y 250 rpm durante toda la noche. Los pre-cultivos (600  $\mu$ L) fueron inoculados en medio LB (20 mL, ampicilina, 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) y puestos a 37 °C y 250 rpm durante 2 h (DO<sub>600</sub>  $\approx$  0,5). Las proteínas fueron inducidas por la adición de IPTG (0,05 mM, concentración final), a 30°C y 250 rpm durante toda la noche. Del resto de los cultivos se aisló y purificó el DNA plasmídico utilizando el kit de la casa comercial Quiagen (QIAGEN Plasmid Mini Kit). Se secuenció el DNA

(Servicio de secuenciación de ADN del CRAG-CSIC) para determinar el tipo de modificación en cada uno de los clones.

Luego de chequear al expresión de proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida (12 %) en condiciones desnaturalizantes<sup>205</sup> los cultivos fueron centrifugados (12,000 g por 30 minutos) y los sobrenadantes descartados. Los pellet de células fueron lisados como se describió anteriormente utilizando lisozima y se evaluó cada uno de las enzimas expresadas en la reacción de adición aldólica de D-Ser a (benciloxi)acetaldehído, como se describió anteriormente. El análisis por HPLC se realizó utilizando un gradiente de 10-70 % de B en 30 minutos. La cantidad de producto aldólico formado fue determinada por el área de los picos del cromatograma utilizando un estándar externo.

### 5.5 Clonación del gen bal en el plásmido pQE60.

5.5.1 Amplificación del gen *bal* a partir del plásmido pKK233-2/*bal*. En la reacción de PCR (50 μL) se añadió el plásmido pKK233-2/BAL (1 μL, 1 ng), los oligonucleótidos mencionados anteriormente (**Tabla 5.3**, BAL(53) y BAL(35)) (1 μL, 2 μM), dNTP (1μl, 250 μM de cada uno), tampón de reacción 10X (5 μL, Tris-HCl 200 mM, pH 8,8 a 25°C, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100 mM), KCl (100 mM), BSA (1 mg mL<sup>-1</sup>), Tritón X-100 (1 % v/v), MgSO<sub>4</sub> (20 mM)), H<sub>2</sub>O (40 μL) y *Pfu* polimerasa (1 μL, 2,5 U). El gen fue amplificado en 32 ciclos (95 °C por 30 segundos, 55 °C por 1 minuto y 68 °C por 2 minutos), finalmente 68 °C por 30 minutos, chequeándose la amplificación por electroforesis en gel de agarosa al 1 % en tampón TAE (Tris-base 40mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1mM, pH 8,1). El ADN obtenido fue purificado utilizando el kit comercial de la casa Quiagen (QIAquick PCR Purification Kit). La determinación de la concentración de ADN en solución se llevó a

cabo mediante el método espectrofotométrico descrito por Sambrook.<sup>206</sup> Las medidas de absorbancia se efectuaron en un espectrofotómetro NanoDrop Pharmacia LKB Ultraespec III.

### 5.5.2 Digestión del ADN con endonucleasas de restricción.

La digestión del ADN se realizó con las enzimas (*BseRI* y *BamHI*) y los tampones suministrados por la casa comercial New England Biolabs. Las reacciones de digestión del ADN (volumen total 50 μL) contenían ADN (amplicón del gen *bal* o plásmido pQE60) (1 μg), tampón 10X NE 3.1 (5 μL, NaCl 100mM, Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, BSA 100 μg mL<sup>-1</sup>, pH 7,9 a 25 °C), *BseRI* (1 μL, 10 U), *BamHI* (1 μL, 10 U) y H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 50 μL. Las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C durante 1 h y el ADN digerido se purificó por medio de una electroforesis en gel de agarosa (1 %) y el ADN se recuperó utilizando el kit suministrado por la casa comercial Quiagen (QIAquick Gel Extraction Kit).

### 5.5.3 Ligación del ADN (clonación del gen bal en pQE60).

Se utilizó la ADN ligasa del bacteriógafo T4 para unir covalentemente los fragmentos de ADN cohesivos originados por las enzimas de restricción en el paso anterior. En la reacción de ligación (20 μL) se añadió el inserto (50 ng) y vector (50 ng) (la relación molar inserto:vector fue aproximadamente 3:1) previamente digeridos, tampón de reacción 10X (2 μL, Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, 1 mM ATP, 10 mM DTT pH 7,5 a 25 °C), T4 ligasa (1 μL) y H<sub>2</sub>O hasta un volumen final de 20 μL. La reacción se realizó en un termociclador con un programa de 100 ciclos, que consistieron en 30 segundos a 30°C seguidos de 30 segundos a 10°C. Posteriormente se transformaron células quimio-competentes directamente con la mezcla de reacción, como se describió anteriormente.

Para chequear la presencia del inserto se realizó un PCR de colonias utilizando los mismos oligonucleótidos y un procedimiento similar al que se describe en **5.6.1**, pero utilizando como ADN molde una porción de cada colonia. Las colonias positivas se crecieron en medio LB (10 mL, ampicilina, 100 μg mL<sup>-1</sup>) a 250 rpm y 37 °C durante toda la noche. De los cultivos de *E coli* se aisló y purificó el DNA plasmídico utilizando el kit de la casa comercial Quiagen (QIAGEN Plasmid Mini Kit). Finalmente se secuenció el DNA (Servicio de secuenciación de ADN del CRAG-CSIC) determinándose la integridad de cada una de las secuencias.

### 5.6 Expresión y purificación de proteínas.

### 5.6.1 Expresión y purificación de la SHMT<sub>sth</sub> y sus variantes.

Los plásmidos con el gen de la SHMT<sub>sth</sub> nativa y sus variantes fueron transformados en E. coli M-15 [pREP-4] (QIAGEN) como se describe anteriormente y las células crecieron en medio LB sólido suplementado con ampicilina (100 µg mL<sup>-1</sup>) y kanamicina (25 µg mL<sup>-1</sup>) a 37°C. Se seleccionó una colonia y se pasó a medio LB líquido (150 mL, ampicilina, 100 μg mL<sup>-1</sup>, y kanamicina, 25 μg mL<sup>-1</sup>) agitándose a 250 rpm y 37 °C durante toda la noche ( $OD_{600} \approx 3-4$ ). Una alícuota de este pre-cultivo (25 mL) fue inoculado en un matraz de erlenmeyer (2 L) con medio LB líquido (1 L, ampicilina, 100 µg mL<sup>-1</sup>, y kanamicina, 25 μg mL<sup>-1</sup>) agitándose a 250 rpm y 37 °C. La expresión de la proteínas fue inducida por la adición de IPTG (0,05 mM concentración final en el cultivo) añadido durante la mitad de la fase exponencial de crecimiento  $(OD_{600} \approx 0.5)$ . Seguidamente se disminuyó la temperatura a 30 °C para evitar la formación de cuerpos de inclusión. Después de 12 h, los cultivos inducidos (6 L) fueron centrifugados (12,000 g por 30 minutos a 4°C) y el pellet de células fue suspendido en el tampón de lisis celular (50 mM fosfato de sodio, NaCl (300 mM), imidazol (10 mM) a pH 8,0) hasta una OD<sub>600</sub> máxima de 10. La suspensión celular fue lisada utilizando un disruptor celular (Constant Systems) y el lisado se centrifugó a 12,000 g por 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue purificado por una cromatografía de afinidad de quelatos metálicos (IMAC, Inmobilized-Metal Affinity Chromatography) utilizando un sistema de FPLC (Amersham biosciences), para lo cual se aplicó a una columna HR 16/40 (GE Healthcare) (3 mL min<sup>-1</sup>) a 4 °C v empacada con fase estacionaria (50 mL) HiTrap (Ni) (Amersham Biosciences). Seguidamente la columna fue lavada con tampón de lisis (500 mL) a 3 mL min<sup>-1</sup> y la proteína fue eluida (3 mL min<sup>-1</sup>) incrementando la concentración de imidazol (50 mM fosfato de sodio, NaCl (300 mM), imidazol (500 mM) a pH 8,0). Las fracciones con la proteína fueron dializadas (3 x 10 L, con cambios cada 24 h) a 4°C por 72 h utilizando tampón fosfato de potasio (10 mM) a pH 7.0, suplementado con PLP (0.01 mM). La solución dializada fue congelada a – 80 °C y liofilizada. Las proteína en forma de sólido amarillo fue conservada a - 20 °C y la concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford.<sup>207</sup>

### 5.6.2 Expresión y purificación de la BAL.

El plásmido pQE*bal* fue transformado en *E. coli* M-15 [pREP-4] (QIAGEN) como se describe anteriormente y crecido en placas con LB sólido suplementado con ampicilina (100 μg mL<sup>-1</sup>) y kanamicina (25 μg mL<sup>-1</sup>) a 37°C. Se seleccionó una colonia y se pasó a crecer en medio LB líquido (150 mL, ampicilina, 100 μg mL<sup>-1</sup>, y kanamicina, 25 μg mL<sup>-1</sup>)) a 250 rpm y 37 °C durante toda la noche (OD<sub>600</sub>  $\approx$  3–4). Una alícuota de este pre-cultivo (12 mL) fue inoculada en un matraz de erlenmeyer (2 L) con medio LB líquido (0,4 L, ampicilina, 100 μg mL<sup>-1</sup>

1) y kanamicina, 25 µg mL<sup>-1</sup>) e incubado a 37°C y 250 rpm. La expresión de la proteínas fue inducida por la adición de IPTG (0,05 mM concentración final en el cultivo) añadido durante la mitad de la fase exponencial de crecimiento (i.e.,  $OD_{600} \approx 0.5$ ). Seguidamente se disminuyó la temperatura a 25 °C y la agitación a 190 rpm para minimizar la formación de cuerpos de inclusión. Después de 12 h, los cultivos inducidos (4 L) fueron centrifugados (12,000 g por 30 minutos a 4°C) y el pellet de células fue suspendido en tampón de lisis celular (50 mM fosfato de sodio, NaCl (300 mM), imidazol (10 mM) a pH 8,0) hasta una OD<sub>600</sub> máxima de 10. Posteriormente la suspensión celular fue lisada utilizando un disruptor celular (Constant Systems) y el lisado se centrifugó a 12,000 g por 30 minutos a 4°C. El sobrenadante fue purificado por cromatografía de afinidad de quelatos metálicos (IMAC. Inmobilized-Metal Affinity Chromatography) como se describió anteriormente en la purificación de la SHMT<sub>sth</sub>. Las fracciones eluidas con la proteína fueron dializadas (3 x 10 L, cambios cada 24 h) a 4°C durante 72 h utilizando tampón fosfato de potasio (10 mM) a pH 7,0 suplementado con ThDP (0,15 mM) y MgSO<sub>4</sub> (2,5 mM). La solución dializada fue congelada a - 80 °C y liofilizada. Las proteína fue conservada a - 20 °C y la concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford.<sup>207</sup>

### 5.6.3 Expresión y purificación de la FSA y sus variantes.

Los plásmidos con el gen de la FSA nativa y sus variantes (A129S y A129T) fueron transformados en *E. coli* M-15 [pREP-4] (QIAGEN) como se describe anteriormente y crecidas en LB sólido suplementado con ampicilina (100 μg mL<sup>-1</sup>) y kanamicina (25 μg mL<sup>-1</sup>) a 37°C. Se seleccionó una colonia y se pasó a crecer en medio LB líquido (150 mL, ampicilina (100 μg mL<sup>-1</sup>) y kanamicina (25 μg mL<sup>-1</sup>)) a 250 rpm y

37 °C durante toda la noche (OD<sub>600</sub>  $\approx$  3–4). Una alícuota de este precultivo (25 mL) fue inoculada en un matraz de erlenmeyer (2 L) con medio LB líquido (1 L, ampicilina, 100 μg mL<sup>-1</sup>, y kanamicina, 25 μg mL<sup>-1</sup>) a 37°C y 250 rpm. La expresión de la proteínas fue inducida por la adición de IPTG (1 mM concentración final en el cultivo) añadido durante la mitad de la fase exponencial de crecimiento (i.e.,  $OD_{600} \approx$ 0,5). Seguidamente se disminuyó la temperatura a 30 °C para evitar la formación de cuerpos de inclusión. Después de 12 h, los cultivos inducidos (6 L) fueron centrifugados (12,000 g por 30 minutos a 4°C) y el pellet de células fue suspendido en el tampón de lisis celular (50 mM Gly-Gly, DTT (1mM) a pH 8,5) hasta una OD<sub>600</sub> máxima de 10. La suspensión celular fue lisada utilizando un disruptor celular (Constant Systems) y el lisado se centrifugó a 12,000 g por 30 minutos a 4 °C. Las proteínas se purificaron por tratamiento térmico a 70 °C durante 30 minutos. Una vez finalizada esta etapa, las soluciones proteicas se centrifugaron a 12000 g por 30 minutos a 4 °C. El precipitado fue descartado y el sobrenadante conteniendo las proteínas de interés fue dializado (3 x 10 L, cambios cada 24 h) 4°C durante 72 h con tampón Gly-Gly (5 mM, DTT, 0,1 mM, pH 8,5). La solución dializada fue congelada a – 80 °C y liofilizada. Las proteína fue conservada a – 20 °C y la concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford. 207

### 5.6.4 Expresión y purificación de RhuA.

El plásmido pQE*rahD* fue transformado en *E. coli* M-15 [pREP-4] (QIAGEN) como se describe anteriormente y crecido en medio LB sólido suplementado con ampicilina (100 μg mL<sup>-1</sup>) y kanamicina (25 μg mL<sup>-1</sup>) a 37°C. Se seleccionó una colonia y se pasó a crecer en medio LB líquido (150 mL, ampicilina, 100 μg mL<sup>-1</sup>, y kanamicina, 25

 $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) a 250 rpm y 37 °C durante toda la noche (OD<sub>600</sub> ≈ 3–4). Una alícuota de este pre-cultivo (25 mL) fue inoculada en un matraz de erlenmeyer (2 L) con medio LB líquido (1 L, ampicilina, 100 µg mL<sup>-1</sup>, y kanamicina, 25 μg mL<sup>-1</sup>) e incubado a 37°C y 250 rpm. La expresión de la proteínas fue inducida por la adición de IPTG (1 mM concentración final en el cultivo) añadido durante la mitad de la fase exponencial de crecimiento (OD<sub>600</sub>  $\approx$  0,5). Seguidamente se disminuyó la temperatura a 30 °C para evitar la formación de cuerpos de inclusión. Después de 12 h. los cultivos inducidos (6 L) fueron centrifugados (12,000 g por 30 minutos a 4°C) y el pellet de células fue suspendido en el tampón de lisis celular (50 mM fosfato de sodio, NaCl (300 mM), imidazol (10 mM) a pH 8) hasta una OD<sub>600</sub> máxima de 10. La suspensión celular fue lisada utilizando un disruptor celular (Constant Systems) y el lisado se centrifugó a 12,000 g por 30 minutos a 4°C. El sobrenadante fue purificado utilizando una cromatografía de afinidad de quelatos metálicos (IMAC, Inmobilized-Metal Affinity Chromatography) como se describió anteriormente en la purificación de la SHMT<sub>sth</sub>. Las fracciones con la proteína se unieron y se añadió CoCl<sub>2</sub> (1 mM). Después de 15 minutos se precipitó la proteína con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (40 % m/v). La solución fue centrifugada y el precipitado se lavó con una solución de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50 mL, 40 % m/v) y finalmente fue suspendido en una solución de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50 mL, 40 % m/v) y se conservó a 4 °C. La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método de Bradford.<sup>207</sup>

### 5.7 Determinación de la actividad enzimática de los diferentes biocatalizadores.

### 5.7.1 Determinación de la actividad treonina aldolasa de la $SHMT_{sth}$ .

La actividad treonina aldolasa de la SHMT<sub>Sth</sub> fue determinada espectrofotométricamente a 340 nm utilizando un ensayo enzimático acoplado con la alcohol deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH) (**Figura 5.1**).<sup>208</sup> La mezcla de reacción (0,3 mL) consistió en tampón fosfato de potasio (100 mM, pH 6,5), PLP (0,05 mM), NADH (0,15 mM), ADH (60 U mL<sup>-1</sup>), L-Thr (0,5 M) y la cantidad apropiada de enzima. La disminución de la absorbancia a 340 nm se registró de manera continua durante 5 minutos a intervalos de 30 segundos. Una unidad de actividad treonina aldolasa es definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 μmol min<sup>-1</sup> de acetaldehído a 37°C.

**Figura 5.1** Ensayo enzimático acoplado utilizado en la determinación de la actividad treonina aldolasa de la SHMT $_{Sth}$ . ADH, alcohol deshidrogenasa.

### 5.7.2 Determinación de la actividad ligasa de la BAL.

La velocidad inicial la formación de benzoina, catalizada por BAL, fue medida a 25 °C (**Figura 5.2**). La mezcla de reacción consistió en benzaldehído (100 mM) disuelto en tampón de reacción (2.5 mL, MOPS, 50 mM, ThDP, 0,15 mM, MgSO<sub>4</sub>, 2,5 mM, y DMSO, 25 % v/v, a pH 8,0). La reacción se inició por la adición de la enzima (0,00875-0,28 mg de sólido liofilizado) disueltos en tampón de

reacción. A diferentes intervalos de tiempo (0; 2; 5; 8; 10; 15 y 20 minutos) fueron tomadas muestras (100  $\mu$ L), diluidas con metanol (900  $\mu$ L) y analizadas por HPLC; utilizando un método de elución isocrático (55 % B en 10 minutos). Una unidad de actividad es definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1  $\mu$ mol de benzoina por minuto a 25 °C.

Figura 5.2 Reacción utilizada en la determinación de la actividad ligasa de la BAL.

#### 5.7.3 Determinación de la actividad de la FSA.

La actividad enzimática de FSA fue determinada espectrofotométricamente a 340 nm utilizando un ensayo enzimático acoplado. <sup>109</sup> La reacción consistió en medir la formación de D-fructosa-6-fosfato (F6P) a partir de D,L-gliceraldehído-3-fosfato (D,L-GAP) y dihidroxiacetona (DHA) siguiendo la reducción del NADP<sup>+</sup> por la enzima D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.49, G6PDH) (**Figura 5.3**).

**Figura 5.3** Ensayo enzimático acoplado utilizado en la determinación de la actividad enzimática de FSA. DHA, dihidroxiacetona; G3P, D-gliceraldehído-3-fosfato; F6P, D-fructosa-6-fosfato; G6P, D-glucosa-6-fosfato; 6PG, D-6-fosfoglucolactona; PGI, D-glucosa-6-fosfato isomerasa (EC 5.3.1.9); G6PDH, D-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

La reacción (0,3 mL) consistió en DHA (50 mM), NADP<sup>+</sup> (0,5 mM), PGI (6 U mL<sup>-1</sup>), G6PDH (6 U mL<sup>-1</sup>), D,L-G3P (2,8 mM) y FSA (1-100 μg de sólido liofilizado) en tampón de reacción (Gly-Gly 50mM, DTT 1 mM a pH 8,5). El incremento de la absorbancia a 340 nm se registró de manera continua durante 5 minutos a intervalos de 30 segundos. Se define 1 unidad de actividad como la cantidad de enzima capaz de convertir 1 μmol de D-gliceraldehído-3-fosfato en D-Fructosa-6-fosfato (equivalente a 1μmol de NADP<sup>+</sup> reducido) en un minuto a 30 °C.

#### 5.7.4 Determinación de la actividad de la RhuA.

La actividad enzimática de la RhuA fue determinada utilizando un ensayo enzimático continuo acoplado con una deshidrogenasa. <sup>209</sup> En la primera etapa la L-ramnulosa-1-fosfato sufre retro-aldólisis cataliza por RhuA produciendo L-lactaldehído y dihidroxiacetona fosfato. En una segunda reacción la cetona es reducida por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (EC 1.1.1.8), registrándose el consumo de NADH a 340 nm (**Figura 5.4**).

**Figura 5.4** Ensayo enzimático acoplado utilizado en la determinación de la actividad enzimática de RhuA. GPDH, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa.

La reacción (0,3 mL) contenía NADH (0,15 mM), bis(ciclohexilamina) -L-ramnulosa-1-fosfato (2,0 mM), GPDH (2,5 U mL<sup>-1</sup>) y cantidades variables de la enzima en tampón de reacción (Tris-HCl, 50 mM, KCl, 100 mM, a pH 7,5). La disminución de la absorbancia a 340 nm se registró de manera continua durante 5 minutos a intervalos de 30

segundos. Se define 1 unidad de actividad como la cantidad de enzima capaz de convertir 1  $\mu$ mol de L-ramnulosa-1-fosfato en dihidroxiacetona fosfato (equivalente a 1  $\mu$ mol de NADH oxidado) por minuto a 25 °C.

### 5.8 Determinación de la masa molecular de las variantes de SHMT $_{sth}$ Y55T, Y55C y Y55S.

Los espectros de masas de las variantes de SHMT<sub>Sth</sub> Y55T, Y55C y Y55S fueron realizados en el Servicio de Espectroscopia de Masas del CID-CSIC. Las proteínas (1 mg de sólido liofilizado) se disolvieron en de agua destilada (1 mL) y se añadió ácido fórmico (5 µL). Las muestras (10 µL) se analizaron por HPLC-ESI-MS empleando un Acquity UPLC<sup>TM</sup> BEH300 equipado con una columna C18 (1,7 µm, 2,1 x 100 mm) y un espectrómetro de masas ESI-TOF (LCT Waters). El tiempo de adquisición por cada espectro fue de 0,2 s y el intervalo de masas detectable fue de 1000-60000 Da. El sistema de solventes utilizados fue: solvente (A): ácido fórmico 0,1 % (v/v) y solvente (B): ácido fórmico 0,1 % (v/v) en acetonitrilo; con un gradiente de elución de 0 % de B durante 5 minutos, de 5 a 70 % de B en 12 minutos y 70 a 100 % de B en 1 minuto, a un flujo de 0,3 mL min<sup>-1</sup>. El programa MassLynx 4.1 (Waters) se utilizó para la adquisición y el procesamiento de los datos y el programa Magtran para el cálculo del peso molecular de las proteínas a partir de los espectros de masa.

### 5.9 Métodos computacionales: Modelaje molecular.

Todas las figuras de las estructuras proteicas se realizaron con el programa Schrödinger Suite a través de la interface gráfica Maestro. El programa Macromodel (Schrödinger) fue utilizado para los cálculos de las energías. Los modelos de unión proteína-sustrato fueron realizados por el Dr. J. Bujons.

### 5.10 Adiciones aldólicas catalizadas por SHMT<sub>Sth</sub> y sus variantes. 5.10.1 Reacciones a escala analítica.

Las reacciones (1 mL) fueron realizadas en placas de 96 pocillos (2 mL) y agitadas en un agitador vortex (VIBRAX VXR basic, Ika) a 1000 rpm y 25 °C. Los aldehídos (0,025 mmol) fueron disueltos en DMSO (0,5 mL). A esta solución se le añadió agua destilada (0,3 mL) y después D-Ser, D-Ala o Gly (0,1 mmol, 0,1 mL de una solución 1 M pH 6,0). El orden de adición es importante para evitar la precipitación del aminoácido. Finalmente para iniciar la reacción se adicionó el biocatalizador (0,1 mL de una solución 20 mg mL<sup>-1</sup> en agua destilada, concentración final en la reacción, 2 mg mL<sup>-1</sup>). Después de 24 h se tomaron muestras (100 μL), se diluyeron con metanol (900 μL) y se analizaron por HPLC utilizando un gradiente de 10 % a 70% B en 30 minutos. El grado de conversión de las reacciones fue determinado a partir de las áreas de los picos del cromatograma, utilizando un estándar externo.

### 5.10.2 Síntesis y purificación de los productos de adición aldólica catalizado por SHMT $_{Sth}$ y sus variantes.

Las reacciones (100 mL) se realizaron en un balón (250 mL) bajo agitación magnética. El aldehído correspondiente (2,5 mmol) fue disuelto en DMSO (50 mL). A esta solución se le añadió agua destilada (30 mL) seguido de D-Ser o D-Ala (10 mL de una solución 1 M pH 6,0, concentración final en la reacción 0,1 M). Finalmente para iniciar la reacción se añadió el biocatalizador (10 mL de una solución 20 mg mL<sup>-1</sup> en agua destilada, concentración final en la reacción 2 mg mL<sup>-1</sup>). La mezcla se agitó a 250 rpm y 25 °C durante 24 h. La formación del producto de adición aldólica fue medida como se describió anteriormente. Una vez alcanzada la máxima formación de producto se

añadió NaCl hasta saturar la solución y detener la reacción por precipitación de la enzima. La solución fue filtrada a través de Celite® y lavada con una solución saturada de NaCl (200 mL). El filtrado fue aplicado a un lecho de carbón activo y lavado con agua destilada (1000 mL). Los productos fueron eluidos con una mezcla CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (50:50 v/v, 400 mL). El acetonitrilo fue eliminado por evaporación a vacío y el pH de la muestra fue ajustado a 3,0 con ácido acético glacial. La solución fue lavada con AcOEt (3 x 50 mL), concentrada a 40 mL, congelada a – 80°C y liofilizada. Los sólidos blancos obtenidos fueron conservados a – 20 °C y caracterizados por RMN. Las propiedades físicas de los aminoácidos sintetizados se listan a continuación:

## Ácido (2S,3R)-2-amino-4-(benciloxi)-3-hidroxi-2-(hidroximetil)butí rico (3aa).

H OH O (S) COO-+H<sub>3</sub>N / 3aa HO El estereoisómero (2S,3R) (> 95 %) fue obtenido como un sólido blanco de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 179,4 mg

(28 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factor de retención: k = 2.0;  $[\alpha]^{20}_{D} = -42.5$  (c = 1 en H<sub>2</sub>O).  $^{1}$ H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.46 (m, 5H), 4.59 (s, 2H), 4.08 (t, J = 3.7 Hz, 1H), 4.03 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 3.90 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 3.73 (d, J = 3.7 Hz, 2H).  $^{13}$ C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  172.14 (COOH), 137.13 (C7 arom), 128.83 (C8;C10;C12 arom), 128.57 (C9 arom), 128.44 (C11 arom), 73.55 (C6), 71.54 (C5), 68.87 (C2), 68.37 (C4), 63.27 (C3). ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>] C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>5</sub>: 256,1184, experimental 256,1185.

## Ácido (2S,3S)-2-amino-6-(benciloxi)-3-hidroxi-2-(hidroximetil)hexa noico (3ab).

El estereoisómero (2*S*,3*S*) (> 95 %) fue obtenido como un sólido blanco de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 142,1 mg (20 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factor de retención: k = 2.8;  $[\alpha]^{20}_D = -30.0$  (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.44 (m, 5H), 4.57 (s, 2H), 4.03 (d, J = 11.8 Hz, 1H), 3.88 (dd, J = 7.3, 5.7 Hz, 1H), 3.86 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 3.61 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 1.84 (m, 1H), 1.67 (m, 1H), 1.54 (m, 2H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  172.37 (COOH), 137.28 (C9), 128.63 (C arom), 128.47 (C arom), 128.18 (C arom), 72.47 (C8), 70.00 (C4), 69.95 (C7), 69.91 (C2), 69.58

## Ácido (2S,3S)-2-amino-4-{[(benciloxi)carbonil]amino}-3-hidroxi-2-(hidroximetil)butírico (3ac).

(C3), 38.63, 27.58 (C5), 25.51 (C6), ESI-TOF: Calculado como

 $[M+H^{+}]$  C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>5</sub>: 284,1498, experimental 284,1499.

El estereoisómero (2S,3S) (> 95 %) fue obtenido como un sólido blanco de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 154,4 mg (21 %),  $\geq$  95 % pureza,

determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factor de retención: k = 2,6;  $[\alpha]^{20}_{D} = -45,0$  (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.44 (m, 5H), 5.13 (s, 2H), 4.03 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 3.98 (dd, J = 9.0, 3.8 Hz, 1H), 3.87 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 3.31 (m, 2H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  171.79 (COOH), 158.56 (CONH), 136.47(C8 arom), 128.86 (C arom), 128.82 (C arom), 128.47 (C arom), 127.80 (C arom), 69.22 (C4), 68.36 (C2), 67.15 (C7),

62.66 (C3), 42.32 (C5). ESI-TOF: Calculado como  $[M+H^+]$   $C_{13}H_{19}N_2O_6$ : 299,1243, experimental 299,1239.

# Ácido (2S,3S)-2-amino-5-{[(benciloxi)carbonil]amino}-3-hidroxi-2-(hidroximetil)pentanoico (3ad).

Rendimiento: 121,3 mg (16 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factor de retención: k = 2,7;  $[\alpha]^{20}_D = -5,0$  (c = 1 en  $H_2O$ ).  $^1H$  RMN (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  7.43 (m, 5H), 5.12 (s, 2H), 4.02 (d, J = 11.8 Hz, 1H), 3.93 (dd, J = 9.6, 3.9 Hz, 1H), 3.85 (d, J = 11.8 Hz, 1H), 3.28 (q, J = 7.4, 6.1 Hz, 2H), 1.67 (m, 2H).  $^{13}C$  RMN (101 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  172.44 (COOH), 158.50 (CONH), 136.56 (C9 arom), 128.86 (C arom), 128.42 (C arom), 127.73 (C arom), 70.01(C2), 67.73(C4), 66.96 (C8), 62.96 (C3), 37.32 (C6), 31.11(C5). ESI-TOF: Calculado como  $[M+H^+]$   $C_{14}H_{21}N_2O_6$ : 313,1399, experimental 313,1394.

# Ácido (2S,3S) y (2S,3R)-2-amino-4-fenil-3-hidroxi-2-(hidroximetil) butírico(3ag, 4ag).

procedimiento general. Rendimiento: 78 mg (14 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factor de retención: k = 1,4;  $[\alpha]^{20}_{D} = -45,0$  (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.40 (m, 2H), 7.32 (m, 3H), 4.23 (dd, J = 11.4, 2.4 Hz, 1H, (2*S*;3*S*)), 4.17 (dd, J = 11.0, 2.3 Hz, 1H,

(2S;3R)), 4.09 (d, J = 11.8 Hz, 1H, (2S;3R)), 3.94 (d, J = 11.9 Hz, 1H, (2S;3R)), 3.08 (dd, J = 14.0, 2.4 Hz, 1H, (2S;3S)), 2.90 (dd, J = 14.0, 2.3 Hz, 1H, (2S;3R)), 2.75 (m, 1H, (2S;3R)), 2.63 (dd, J = 14.0, 11.4 Hz, 1H, (2S;3S)). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  172.51(COOH), 138.00 (C6 arom), 129.37 (C7; C8; C10 arom), 128.78 (C9; C11 arom), 72.26 (C4 (2S;3S)), 71.47(C4 (2S;3R)), 70.08 (C2), 63.00 (C3 (2S;3R)), 60.77 (C3 (2S;3S)), 37.53 (C5 (2S;3R)), 37.34 (C5 (2S;3S)). ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>] C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>4</sub>: 226,1079, experimental 226,1069.

## Ácido (2S,3S) y (2S,3R)-2-amino-5-fenil-3-hidroxi-2-(hidroximetil) pentanoico (3ah, 4ah).

HOH HOH HOH El compuesto, sólido blanco, fue obtenido diastereómeros (94:6 
$$(2S,3S)$$
: $(2S,3R)$ ), de acuerdo al procedimiento

diastereomeros (94:6 (2*S*,3*S*):(2*S*,3*R*)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 138,8 mg (23 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factor de retención: k = 2,1;  $[\alpha]^{20}_D = -35,0$  (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.39 (m, 3H), 7.30 (m, 2H), 3.97 (d, J = 11.8 Hz, 1H), 3.82 (m, 2H), 2.91 (dt, J = 13.7, 8.6 Hz, 1H), 2.68 (dt, J = 13.8, 8.3 Hz, 1H), 1.80 (m, 2H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  172.58 (COOH), 141.42 (C7 arom), 128.76 (C8; C9; C11; C12 arom), 126.31 (C10 arom), 70.27 (C2), 69.28 (C4), 63.04 (C3), 32.57 (C5), 31.44 (C6). ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>] C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>4</sub>: 240,1236, experimental 240,1228.

# Ácido (2S,3R)-2-amino-4-(fenoxi)-3-hidroxi-2-(hidroximetil) butí rico (3ai).

El estereoisómero (2S,3R) (> 95 %) fue obtenido sólido blanco de acuerdo como un al procedimiento general. Rendimiento: 134,7 mg (22 %), > 95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factor de retención: k = 1,5;  $[\alpha]^{20}_{D} = -20.0 \ (c = 1 \text{ en H}_{2}\text{O}).$  H RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.23 (m. 2H), 6.88 (m. 3H), 4.11 (dd, J = 7.1, 3.1 Hz, 1H), 4.01 (m. 2H), 3.69 (d, J = 10.6 Hz, 1H), 3.59 (d, J = 10.6 Hz, 1H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  170.24 (COOH), 158.99 (C6 arom), 129.83(C8; C10 arom), 120.87 (C9 arom), 114.92 (C7; C11 arom), 69.86 (C5), 68.78 (C4), 65.63 (C2), 62.63 (C3). ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>] C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>5</sub>: 242,1028, experimental 242,1018.

# Ácido (2S,3S) y (2S,3R)-2-amino-3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-2-(hidroximetil) propanoico (3ak, 4ak).

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una mezcla de diastereómeros (95:5 (2*S*,3*S*): (2*S*,3*R*)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 30,9 mg (5 %), 
$$\geq$$
 95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factor de retención:  $k = 1,6$ ;  $[\alpha]^{20}_{D} = -20,0$  ( $c = 1$  en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.45 (m, 2H), 7.38 (m, 2H), 5.15 (s, 1H), 4.15 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1H), 4.01 (d,  $J = 11.9$  Hz, 1H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  171.33 (COOH), 136.09 (C5 arom), 133.84 (C8 arom), 128.74 (C arom), 128.48 (C

arom), 128.31 (C arom), 128.14 (C arom), 71.94 (C4), 71.51 (C2),

70.56 (C3). ESI-TOF: Calculado como  $[M+H^+]$   $C_{10}H_{13}CINO_4$ : 246,0533, experimental 246,0527.

# Ácido (2S,3S) y (2S,3R)-2-amino-3-(2-fluorofenil)-3-hidroxi-2-(hidroximetil)propanoico (3al, 4al).

(2S,3S):(2S,3R)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 49,5 mg (9 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 0 % a 60 % B en 30 minutos; factor de retención:  $k_I = 2,2$ ;  $[\alpha]^{20}_D = -10,0$  (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.45 (m, 2H), 7.21 (m, 2H), 5.34 (s, 1H), 4.12 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 3.98 (d, J = 11.9 Hz, 1H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  171.07 (COOH), 160.82 (C6 arom), 158.38 (C10 arom), 130.65 (C8 arom), 129.01 (C9 arom), 124.54 (C10 arom), 115.52 (C7 arom), 69.90 (C2), 67.32 (C4), 67.30 (C3). ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>] C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>FNO<sub>4</sub>: 230,0829, experimental 230,0824.

# Ácido (2S,3S) y (2S,3R)-2-amino-3-hidroxi-2-(hidroximetil)-3-(4-nitrofenil)propanoico (3an, 4an).

(101 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  170.98 (COOH), 147.65 (C8 arom), 145.21(C5 arom), 128.01(C arom), 127.83 (C arom), 123.82 (C arom), 123.57 (C arom), 71.36 (C4), 70.44 (C2), 62.76 (C3). ESI-TOF: Calculado como  $[M+H^+]$   $C_{10}H_{13}N_2O_6$ : 257,0774, experimental 257,0768.

Ácido (2S,3R) y (2S,3S)-2-amino-4-(benciloxi)-3-hidroxi-2-metilbutírico (3ba, 4ba).

### Sintetizado utilizando SHMT<sub>Sth</sub> Y55T como catalizador.

El estereoisómero (2*S*,3*R*) (> 95 %) fue obtenido como un sólido blanco de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 216,0 mg (36 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factor de retención: k = 2,1;  $[\alpha]_D^{20} = -22,5$  (c = 1 en H<sub>2</sub>O). HRMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.45 (m, 5H), 4.58 (s, 2H), 4.02 (dd, J = 4.1, 3.1 Hz, 1H), 3.73 (m, 2H), 1.53 (s, 3H). RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  174.45 (COOH), 136.96 (C7 arom), 128.65 (C arom), 128.37 (C arom), 128.25 (C arom), 73.35 (C6), 71.32 (C5), 71.09 (C4), 64.10 (C2), 20.46 (C3). ESI-TOF: Calculado como [M+H+] C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>4</sub>: 240,1236, experimental 240,1232.

### Sintetizado utilizando SHMT<sub>Sth</sub> nativa como catalizador.

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una mezcla de diastereómeros (5:95 (2*S*,3*S*):(2*S*,3*R*)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 126,1 mg (21 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factor de retención: k = 2,1;  $[\alpha]_D^{20} = -17,5$  (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.44 (m, 5H), 4.58 (s, 2H, (2*S*,3*R*)), 4.02 (dd,

J = 4.0, 3.2 Hz, 1H, (2S,3R)), 3.73 (m, 2H, (2S,3R)), 1.54 (s, 3H, (2S,3R)), 1.40 (s, 3H, (2S,3S)). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  174.44 (COOH), 136.97 (C7 arom), 128.68 (C arom), 128.49 (C arom), 128.38 (C arom), 128.32 (C arom), 128.26 (C arom), 73.36 (C6, (2S,3R)), 71.33 (C5, (2S,3R)), 71.09 (C4, (2S,3R)), 64.11 (C2, (2S,3R)), 20.46 (C3, (2S,3R)), 17.88 (C3, (2S,3S)). ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>] C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>4</sub>: 240,1236, experimental 240,1224.

Ácido (2S,3S) y (2S,3R)-2-amino-6-(benciloxi)-3-hidroxi-2-metilhexanoico (3bb, 4bb).

### Sintetizado utilizando SHMT<sub>Sth</sub> Y55T como catalizador.

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una mezcla de diastereómeros (95:5 (2S,3S):(2S,3R)). Rendimiento: 147,7 mg (22 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factor de retención:  $k_{(2S,3S)} = 3.0$ ;  $[\alpha]^{20}_{D} = -22.5$  (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.43 (m, 5H), 4.57 (s, 2H), 3.81 (dd, J = 10.6, 2.3 Hz, 1H), 3.61 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 1.85 (m, 1H), 1.68 (m, 1H), 1.51 (m, 5H), 1.39 (s, 3H, (2S,3R)). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  174.83 (COOH), 137.29 (C9 arom), 128.63 (C arom), 128.47 (C arom), 128.18 (C arom), 73.02 (C4), 72.46 (C8), 69.62 (C7), 65.16 (C2), 27.49 (C5), 25.76 (C6), 25.46 (C3), 20.02 (C3, (2S,3R)) . ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>] C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub>: 268,1549, experimental 268,1544.

#### Sintetizado utilizando SHMT<sub>Sth</sub> nativa como catalizador.

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una mezcla de diastereómeros (72:28 (2S,3S):(2S,3R)), de acuerdo al procedimiento

general. Rendimiento: 70,4 mg (11 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factores de retención:  $k_{(2S,3S)} = 3.0$ ,  $k_{(2S,3R)} = 3.1$ ;  $[\alpha]^{20}_{D} = -22,5$  (c = 1 en  $H_2O$ ).  $^1H$  RMN (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  7.43 (m, 5H), 4.58 (s, 2H, (2S,3R)), 4.57 (s, 2H, (2S,3S)), 3.92 (dd, J = 11.2, 1.8 Hz, 1H, (2S,3R)), 3.81 (dd, J = 10.6, 2.3 Hz, 1H, (2S,3S)), 3.63 (t, J = 6.4 Hz, 2H, (2S,3R)), 3.61 (t, J = 6.6 Hz, 2H, (2S,3S)), 1.85 (m, 1H, (2S,3S)), 1.68 (m, 1H, (2S,3S)), 1.51 (m, 5H, (2S,3S)), 1.39 (s, 3H, (2S,3R)).  $^{13}C$  RMN (101 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  174.84 (COOH), 137.29 (C9 arom), 128.64 (C arom), 128.63 (C arom), 128.47 (C arom), 128.19 (C arom), 128.18 (C arom), 73.02 (C4, (2S,3S)), 72.69 (C4, (2S,3R)), 72.46 (C8, (2S,3S)), 69.62 (C7, (2S,3S)), 65.21 (C2, (2S,3S)), 27.49 (C5, (2S,3S)), 26.66 (C5, (2S,3R)), 25.76 (C6, (2S,3S)), 25.45 (C6, (2S,3R)), 20.02 (C3, (2S,3S)), 16.61 (C3, (2S,3R)). ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>]  $C_{14}H_{22}NO_4$ : 268,1549, experimental 268,1538.

Ácido (2S,3S) y (2S,3R)-2-amino-4-{[(benciloxi)carbonil]amino}-3-hidroxi-2-metilbutírico (3bc,4bc).

### Sintetizado utilizando SHMT<sub>Sth</sub> Y55T como catalizador.

El estereoisómero (2*S*,3*S*) (> 95 %) fue obtenido como un sólido blanco de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 159,0 mg (23 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factor de retención: k = 2,6;  $[\alpha]^{20}_{D} = -40,0$  (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.44 (m, 5H), 5.13 (s, 2H), 3.89 (dd, J = 9.7, 2.7 Hz, 1H), 3.37 (d, J = 13.6 Hz, 1H), 3.24 (dd, J = 14.4, 9.5 Hz, 1H), 1.53 (s, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)

δ 173.97 (COOH), 158.39 (CONH), 136.32 (C8 arom), 128.69 (C arom), 128.30 (C arom), 127.63 (C arom), 72.34 (C4), 66.96 (C7), 63.47 (C2), 42.16 (C5), 19.95 (C3). ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>] C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 283,1294, experimental 283,1293.

### Sintetizado utilizando SHMT<sub>Sth</sub> nativa como catalizador.

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una mezcla de diastereómeros (93:7 (2S,3S):(2S,3R)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 125,2 mg (18 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factor de retención: k = 2.6;  $[\alpha]_{D}^{20} = -45.0$  (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  7.44 (m, 5H), 5.13 (s, 2H, (2S,3S)), 4.03 (dd, J = 9.9, 2.9 Hz, 1H, (2S,3R), 3.89 (dd, J = 9.5, 3.2 Hz, 1H, (2S,3S)),3.50 (d, J = 15.6 Hz, 1H, (2S,3R)), 3.37 (m, 1H, (2S,3S)), 3.24 (dd, J = 15.6 Hz, 1H, (2S,3R))14.3, 9.6 Hz, 1H, (2S,3S)), 3.14 (m, 1H, (2S,3R)), 1.53 (s, 3H, (2S,3S)), 1.44 (s, 3H, (2S,3R)). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  174.00 (COOH), 158.40 (CONH), 136.33 (C8 arom), 128.69 (C arom), 128.30 (C arom), 127.63 (C arom), 72.35 (C4, (2S,3R)) 66.97 (C7, (2S,3R)), 63.48 (C2, (2S,3R)), 42.17 (C5, (2S,3R)), 19.97 (C3, (2S,3R)) .ESI-TOF: Calculado como  $[M+H^{\dagger}]$   $C_{13}H_{19}N_2O_5$ : 283,1294, experimental 283,1290.

## Ácido (2S,3S) y (2S,3R)-2-amino-5-{[(benciloxi)carbonil]amino}-3-hidroxi-2-metilpentanoico (3bd, 4bd).

### Sintetizado utilizando SHMT<sub>Sth</sub> Y55T como catalizador.

El estereoisómero (2S,3S) (>95 %) fue obtenido como un sólido blanco de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 42,0 mg (6 %),  $\geq$  95

% pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factor de retención: k = 2.8;  $[\alpha]^{20}_{D} = -12.5$  (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.43 (qd, J = 7.0, 2.6 Hz, 5H), 5.12 (s, 2H), 3.85 (dd, J = 10.4, 2.6 Hz, 1H), 3.28 (q, J = 7.5, 6.8 Hz, 2H), 1.64 (m, 2H), 1.49 (s, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  174.74 (COOH), 158.32 (CONH), 136.42 (C9 arom), 128.70 (C arom), 128.26 (C arom), 127.56 (C arom), 70.73 (C4), 66.78 (C2), 65.03 (C8), 37.41 (C6), 30.90 (C5), 19.99 (C3) ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>] C<sub>14</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 297,1450, experimental 297,1436.

### Sintetizado utilizando SHMT<sub>Sth</sub> nativa como catalizador.

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una mezcla de diastereómeros (91:9 (2S,3S):(2S,3R)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 65,0 mg (9 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factor de retención:  $k_{(2S,3S)} = 2.8$ ,  $k_{(2S,3R)} = 2.9$ ;  $[\alpha]_{D}^{20} = -35.0$  $(c = 1 \text{ en H}_2\text{O})$ . H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.43 (m, 5H), 5.12 (s, 2H, (2S,3S)), 3.97 (dd, J = 11.3, 1.9 Hz, 1H, (2S,3R)), 3.84 (dd, J = 10.4, 2.6 Hz, 1H, (2S,3S)), 3.29 (p, J = 7.5 Hz, 2H, (2S,3S)), 1.63 (m, 2H, (2S,3S)), 1.49 (s, 3H, (2S,3S)), 1.37 (s, 3H, (2S,3R)). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 174.80 (COOH), 158.32 (CONH), 136.42 (C9 arom), 128.70 (C arom), 128.26 (C arom), 127.56 (C arom), 70.75 (C4, (2S,3S)), 66.78 (C8, (2S,3S)), 65.00 (C2, (2S,3S)), 37.41 (C6 (2S,3S)), 30.90 (C5, (2S,3S)), 20.02 (C3, (2S,3S)), 16.81 (C3, (2S,3R)).ESI-TOF: como  $[M+H^+]$   $C_{14}H_{21}N_2O_5$ : 297,1450, experimental Calculado 297,1447.

Ácido (2S,3S) y (2S,3R)-2-amino-4-fenil-3-hidroxi-2-metilbutírico (3bg, 4bg).

### Sintetizado utilizando SHMT<sub>Sth</sub> Y55T como catalizador.

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una mezcla de diastereómeros (86:14 (2S,3S):(2S,3R)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 114,5 mg (22 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factores de retención:  $k_{(2S,3S)} = 1,8, k_{(2S,3R)} = 1,9; [\alpha]^{20}_{D} = -$ 37,5 (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.40 (m, 2H), 7.33 (m, 3H), 4.16 (dd, J = 11.2, 2.0 Hz, 1H, (2S,3R)), 4.09 (dd, J = 10.8, 1.7 Hz, 1H, (2S,3S)), 3.09 (dd, J = 14.1, 2.2 Hz, 1H, (2S,3R)), 2.91 (dd, J = 14.0, 2.2 Hz, 1H, (2S,3S)), 2.68 (m, 1H, (2S,3S)), 2.61 (dd, J = 14.0,11.2 Hz, 1H, (2S,3R)), 1.58 (s, 3H, (2S,3S)), 1.53 (s, 3H, (2S,3R)). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 192.96 (COOH), 174.83 (C6 arom), 137.95 (C arom), 129.22 (C arom), 129.09 (C arom), 128.62 (C arom), 126.64 (C9 arom), 74.49 (C4, (2S,3S)), 74.18 (C4, (2S,3R)), 65.16 (C2, (2S,3S), 37.30 (C5, (2S,3S)), 36.78 (C5, (2S,3R)), 20.09 (C3, (2S,3S)), 16.43 (C3, (2S,3R)). ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>]  $C_{11}H_{16}NO_3$ : 210,1130, experimental 210,1127.

Ácido (2S,3S) y (2S,3R)-2-amino-5-fenil-3-hidroxi-2-metilpentanoico (3bh,4bh).

### Sintetizado utilizando SHMT<sub>Sth</sub> Y55T como catalizador.

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una mezcla de diastereómeros (85:15 (2S,3S):(2S,3R)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 197,6 mg (35 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factores de retención:  $k_{(2S,3S)} = 2,6, k_{(2S,3R)} = 2,7; [\alpha]^{20}_{D} = -$ 40.0 (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.39 (m, 2H), 7.31 (m, 3H), 3.89 (dd, J = 11.0, 1.9 Hz, 1H, (2S,3R)), 3.74 (dd, J = 9.5, 3.3 Hz, 1H, (2S,3S)), 2.91 (m, 1H, (2S,3S)), 2.69 (m, 1H, (2S,3S)), 1.97 (m, 1H, (2S,3R)), 1.77 (m, 2H, (2S,3S)), 1.65 (m, 1H, (2S,3R)), 1.46 (s, 3H, (2S,3S)), 1.37 (s, 3H, (2S,3R)). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  174.85 (COOH), 141.58 (C7 arom), 128.60 (C arom), 128.58 (C arom), 128.51 (C arom), 126.13 (C arom), 126.12 (C10 arom), 72.19 (C4, (2S,3R)), 72.16 (C4, (2S,3S)), 65.22 (C2), 32.35 (C5, (2S,3S)), 31.86 (C5, (2S,3R), 31.53 (C6, (2S,3S)), 31.40 (C6, (2S,3R)), 19.97 (C3, (2S,3S)), 16.58 (C3, (2S.3R)).ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>]  $C_{12}H_{18}NO_3$ : 224,1287, experimental 224,1276.

### Sintetizado utilizando SHMT<sub>Sth</sub> nativa como catalizador.

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una mezcla de diastereómeros (65:35 (2S,3S):(2S,3S)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 171,8 mg (31 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factores de retención:  $k_{(2S,3S)} = 2$ ,6,  $k_{(2S,3R)} = 2$ ,7;  $[\alpha]^{20}_D = -20$ ,0 (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.39 (m, 2H), 7.31 (m, 3H), 3.89 (dd, J = 11.1, 1.9 Hz, 1H, (2S,3S)), 3.74 (dd, J = 9.4, 3.4 Hz, 1H, (2S,3S)), 2.91 (m, 1H, (2S,3S)), 2.68 (m, 1H, (2S,3S)), (2S,3S)), 1.97 (m, 1H, (2S,3S)), 1.77 (m, 1H, (2S,3S)), 1.69 (m, 1H, (2S,3S)), 1.46 (s, 3H, (2S,3S)), 1.38 (s, 3H, (2S,3S)). <sup>13</sup>C RMN (101

MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  175.27 (COOH, (2*S*,3*R*)), 174.81(COOH (2*S*,3*S*)), 141.57 (C7 arom, (2*S*,3*R*)), 141.36 (C7 arom, (2*S*,3*S*)), 128.64 (C arom), 128.60 (C arom), 128.58 (C arom), 128.51 (C arom), 126.14 (C10 arom), 72.18 (C4, (2*S*,3*R*)), 72.16 (C4, (2*S*,3*S*)), 65.22 (C2), 32.35 (C5, (2*S*,3*S*)), 31.86 (C5, (2*S*,3*R*)), 31.53 (C6, (2*S*,3*S*)), 31.40 (C6, (2*S*,3*R*)), 19.96 (C3, (2*S*,3*S*)), 16.57 (C3, (2*S*,3*R*)).ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>] C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>3</sub>: 224,1287, experimental 224,1275.

Ácido (2S,3R) y (2S,3S)-2-amino-4-(fenoxi)-3-hidroxi-2-metil butírico (3bi, 4bi).

### Sintetizado utilizando SHMT<sub>Sth</sub> Y55T como catalizador.

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una mezcla de diastereómeros (5:95 (2S,3S):(2S,3R)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 111,3 mg (20%),  $\geq 95\%$  pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factores de retención:  $k_{(2S,3R)} = 1,8$ ,  $k_{(2S,3S)} = 2,0$ ;  $[\alpha]^{20}_D = -32,5$  (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.27 (m, 2H), 6.91 (m, 3H), 4.00 (m, 3H, (2S,3R)), 1.33 (s, 3H,(2S,3R)), 1.29 (s,3H,(2S,3S)). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  171.37 (COOH), 159.04 (C6 arom), 129.86 (C8;C10 arom), 120.90 (C9 arom), 115.00 (C7;C11 arom), 71.98 (C4,(2S,3R)), 69.79 (C5, (2S,3R)), 62.29 (C2,(2S,3R)), 20.98 (C3,(2S,3R)), 18.83 (C3,(2S,3S)). ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>] C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>4</sub>: 226,1079, experimental 226,1069.

#### Sintetizado utilizando SHMT<sub>Sth</sub> nativa como catalizador.

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una mezcla de diastereómeros (14:86 (2S,3S):(2S,3R)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 120,9 mg (21%),  $\geq 95\%$  pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factores de retención:  $k_{(2S,3R)}=1,8, k_{(2S,3S)}=2,0; [\alpha]^{20}_{D}=-35,0 (c=1\text{ en H}_2\text{O}). ^1\text{H RMN (}400\text{ MHz, DMSO-}d_6) \delta 7.27 (m, 2H), 6.91 (m, 3H), 4.31 (dd, <math>J=10.3, 2.8$  Hz, 1H, (2S,3S)), 4.00 (m, 3H, (2S,3R)), 3.84 (dd, J=10.3, 7.4 Hz, 1H, (2S,3S)), 1.33 (s, 3H, (2S,3R)), 1.29 (s, 3H, (2S,3S)).  $^{13}\text{C RMN (}101\text{ MHz, DMSO-}d_6$  )  $\delta$  171.45 (COOH), 159.01 (C6 arom), 129.82 (C8;C10 arom), 120.90 (C9 arom), 114.96 (C7;C11 arom), 71.99 (C4,(2S,3R)), 71.73 (C4,(2S,3S)), 69.77 (C5, (2S,3R)), 62.24 (C2,(2S,3R)), 61.79 (C2,(2S,3S)), 21.00 (C3,(2S,3R)), 19.27 (C3,(2S,3S)). ESI-TOF: Calculado como [M+H $^+$ ] C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>4</sub>: 226,1079, experimental 226,1070.

Ácido (2S,3S) y (2S,3R)-2-amino-3-fenil-3-hidroxi-2-metil propanoico (3bj,4bj).

### Sintetizado utilizando SHMT<sub>Sth</sub> nativa como catalizador.

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una mezcla de diastereómeros (42:58 (2*S*,3*S*):(2*S*,3*R*)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 78,1 mg (16 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 0 % a 60 % B en 30 minutos; factores de retención:  $k_{(2S,3S)} = 2,3$ ,  $k_{(2S,3R)} = 2,7$ ;  $[\alpha]_D^{20} = -37,5$  (c = 1 en H<sub>2</sub>O). HRMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.44 (m, 5H), 5.15 (s, 1H, (2*S*,3*R*)), 5.08 (s, 1H, (2*S*,3*S*)), 1.64 (s, 3H, (2*S*,3*S*)), 1.30 (s, 3H,

(2S,3R)). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  175.27 (COOH, (2S,3R)), 174.17 (COOH, (2S,3S)), 137.41 (C5 arom, (2S,3S)), 137.15 (C5 arom, (2S,3R)), 128.78 (C arom), 128.61 (C arom), 128.55 (C arom), 127.17 (C arom), 126.61 (C arom), 74.86 (C4, (2S,3R)), 74.56 (C4, (2S,3S)), 65.85 (C2, (2S,3S)), 64.93 (C2, (2S,3R)), 19.85 (C3, (2S,3S)), 18.60 (C3, (2S,3R)). ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>] C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>3</sub>: 196,0974, experimental 196,0969.

Ácido (2S,3S) y (2S,3R)-2-amino-3-(4-clorofenil)-3-hidroxi-2-metilpropanoico (3bk, 4bk).

### Sintetizado utilizando SHMT<sub>Sth</sub> Y55T como catalizador.

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una mezcla de diastereómeros (71:29 (2S,3S):(2S,3R)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 70,2 mg (12 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 90 % B en 30 minutos; factores de retención:  $k_{(2S,3S)} = 1,7$ ,  $k_{(2S,3R)} = 1,8$ ;  $[\alpha]^{20}_D = -20,0$  (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.25 (m, 4H), 4.98 (s, 1H, (2S,3R)), 4.90 (s, 1H, (2S,3S)), 1.46 (s, 3H, (2S,3S)), 1.14 (s, 3H, (2S,3R)). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  173.96 (COOH), 136.21 (C5 arom), 133.90 (C8 arom), 128.66 (C arom), 128.50 (C arom), 128.45 (C arom), 128.19 (C arom), 74.25 (C4, (2S,3R)), 74.05 (C4, (2S,3S)), 65.77 (C2, (2S,3S)), 64.82 (C2, (2S,3R)), 19.87 (C3, (2S,3S)), 18.37 (C3, (2S,3R)). ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>] C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>ClNO<sub>3</sub>: 230,0584, experimental 230,0577.

#### Sintetizado utilizando SHMT<sub>Sth</sub> nativa como catalizador.

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una mezcla de diastereómeros (40:60 (2*S*,3*S*):(2*S*,3*R*)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 113,7 mg (20 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando utilizando un gradiente de elución de 10 % a 90 % B en 30 minutos; factores de retención:  $k_{(2S,3S)} = 1,7$ ,  $k_{(2S,3R)} = 1,8$ ;  $[\alpha]^{20}_{D} = -10,0$  (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.42 (m, 4H), 5.14 (s, 1H, (2*S*,3*R*)), 5.06 (s, 1H, (2*S*,3*S*)), 1.62 (s, 3H, (2*S*,3*S*)), 1.30 (s, 3H, (2*S*,3*R*)). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  175.02 (COOH, (2*S*,3*R*)), 173.93 (COOH, (2*S*,3*S*)), 136.20 (C5 arom, (2*S*,3*S*)), 135.89 (C5 arom, (2*S*,3*R*)), 133.91(C8 arom, (2*S*,3*R*)), 133.79 (C8 arom, (2*S*,3*S*)), 128.66 (C arom), 128.64 (C arom), 128.50 (C arom), 128.45 (C arom), 74.24 (C4, (2*S*,3*R*)), 74.04 (C4, (2*S*,3*S*)), 65.75 (C2, (2*S*,3*S*)), 64.80 (C2, (2*S*,3*R*)), 19.86 (C3, (2*S*,3*S*)), 18.35 (C3, (2*S*,3*R*)).ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>] C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>ClNO<sub>3</sub>: 230,0584, experimental 230,0576.

Ácido (2S,3S) y (2S,3R)-2-amino-3-(2-fluorofenil)-3-hidroxi-2-metilpropanoico (3bl, 4bl).

### Sintetizado utilizando SHMT<sub>Sth</sub> Y55T como catalizador.

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una mezcla de diastereómeros (76:24 (2S,3S):(2S,3R)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 141,1 mg (26 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC, utilizando un gradiente de elución de 0 % a 60 % B en 30 minutos; factores de retención:  $k_{(2S,3S)} = 2$ ,8,  $k_{(2S,3R)} = 3$ ,0;  $[\alpha]^{20}_D = -12$ ,5 (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.51 (td, J =

7.6, 1.8 Hz, 1H), 7.30 (dddd, J = 8.2, 7.3, 5.3, 1.9 Hz, 1H), 7.13 (m, 2H), 5.26 (s, 1H, (2*S*,3*R*)), 4.99 (s, 1H, (2*S*,3*S*)), 1.14 (s, 3H, (2*S*,3*S*)), 1.12 (s, 3H, (2*S*,3*R*)). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  172.49 (COOH, (2*S*,3*R*)), 171.69 (COOH, (2*S*,3*S*)), 161.33 (C6 arom, (2*S*,3*R*)), 158.90 (C6 arom, (2*S*,3*S*)), 130.41 (C8 arom), 129.54 (C10 arom), 127.47 (C5 arom), 124.18 (C9 arom), 115.38 (C7 arom), 69.14 (C4, (2*S*,3*S*)), 67.94 (C4, (2*S*,3*R*)), 63.33 (C2, (2*S*,3*R*)), 61.46 (C2, (2*S*,3*S*)), 20.43 (C3, (2*S*,3*R*)), 18.85 (C3, (2*S*,3*S*)). ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>] C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>FNO<sub>3</sub>: 214,0879, experimental 214,0879.

#### Sintetizado utilizando SHMT<sub>Sth</sub> nativa como catalizador.

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una mezcla de diastereómeros (29:71 (2*S*,3*S*):(2*S*,3*R*)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 152,1 mg (29 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 0 % a 60 % B en 30 minutos; factores de retención:  $k_{(2S,3S)} = 2,8, k_{(2S,3R)} = 3,0; \left[\alpha\right]^{20}_{D} = -10,0 (c = 1 \text{ en H}_{2}\text{O}). ^{1}\text{H RMN (400 MHz, DMSO-d}_{6}) \delta \delta 7.51 (td, <math>J = 7.6, 1.8 \text{ Hz}, 1\text{H}), 7.30 \text{ (dddd}, } J = 8.2, 7.3, 5.3, 1.9 Hz, 1\text{H}), 7.13 (m, 2\text{H}), 5.26 (s, 1\text{H, } (2S,3R)), 4.99 (s, 1\text{H, } (2S,3S)), 1.14 (s, 3\text{H, } (2S,3S)), 1.12 (s, 3\text{H, } (2S,3R)). ^{13}\text{C RMN (101 MHz, DMSO-d}_{6}) \delta 172.49 (COOH, (2S,3R)), 171.69 (COOH, (2S,3S)), 161.33 (C6 arom, (2S,3R)), 158.90 (C6 arom, (2S,3S)), 130.41 (C8 arom), 129.54 (C10 arom), 127.47 (C5 arom), 124.18 (C9 arom), 115.38 (C7 arom), 69.14 (C4, (2S,3S)), 67.94 (C4, (2S,3R)), 63.33 (C2, (2S,3R)), 61.46 (C2, (2S,3S)), 20.43 (C3, (2S,3R)), 18.85 (C3, (2S,3S)). ESI-TOF: Calculado como [M+H+] C10H13FNO3: 214,0879, experimental 214,0863.$ 

Ácido (2S,3S) y (2S,3R)-2-amino-3-hidroxi-2-metil-3-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)propanoico (3bm,4bm).

#### Sintetizado utilizando SHMT<sub>Sth</sub> nativa como catalizador.

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una mezcla de diastereómeros (8:92 (2*S*,3*S*):(2*S*,3*R*)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 209,7 mg (29 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factor de retención: k = 2,2;  $[\alpha]_{D}^{20} = -27,5$  (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  5.64 (s, 1H, (2*S*,3*R*)), 5.37 (s, 1H, (2*S*,3*S*)), 1.63 (s, 3H, (2*S*,3*S*)), 1.35 (s, 3H, (2*S*,3*R*)). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  174.02 (COOH, (2*S*,3*R*)), 69.04 (C4, (2*S*,3*R*)), 65.21 (C2, (2*S*,3*R*)), 17.60 (C3, (2*S*,3*R*)). ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>] C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>F<sub>5</sub>NO<sub>3</sub>: 286,0503, experimental 286,0496.

Ácido (2S,3S) y (2S,3R)-2-amino-3-hidroxi-2-metil-3-(4-nitrofenil) propanoico (3bn, 4bn).

#### Sintetizado utilizando SHMT<sub>Sth</sub> Y55T como catalizador.

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una mezcla de diastereómeros (92:8 (2S,3S):(2S,3R)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 260,6 mg (43 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 0 % a 60 % B en 30

minutos; factores de retención:  $k_{(2S,3S)} = 2.9$ ,  $k_{(2S,3R)} = 3.1$ ;  $[\alpha]^{20}_{D} = -17.5$  (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8.31 (d, J = 8.8 Hz, 2H, (2S,3R)), 8.26 (d, J = 8.8 Hz, 2H, (2S,3S)), 7.67 (d, J = 9.0 Hz, 2H, (2S,3R)), 7.63 (d, J = 8.4 Hz, 2H, (2S,3S)), 5.28 (s, 1H, (2S,3R)), 5.17 (s, 1H, (2S,3S)), 1.65 (s, 3H, (2S,3S)), 1.33 (s, 3H, (2S,3R)). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  173.53 (COOH), 147.61 (C8 arom), 145.34 (C5 arom), 128.31(C arom), 127.89 (C arom), 123.59 (C arom), 123.53 (C arom), 74.06 (C4, (2S,3S)), 65.75 (C2, (2S,3S)), 20.50 (C3, (2S,3S)), 17.96 (C3, (2S,3R)). ESI-TOF: Calculado como[M+H<sup>+</sup>] C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 241,0824, experimental 241,0815.

#### Sintetizado utilizando SHMT<sub>Sth</sub> nativa como catalizador.

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una mezcla de diastereómeros (44:56 (2S,3S):(2S,3R)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 303,6 mg (51 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 0 % a 60 % B en 30 minutos; factores de retención:  $k_{(2S,3S)} = 2.9$ ,  $k_{(2S,3R)} = 3.1$ ;  $[\alpha]^{20}_{D} = -$ 25.0 (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8.32 (d, J = 8.8 Hz, 2H, (2S,3R)), 8.27 (d, J = 8.8 Hz, 2H, (2S,3S)), 7.68 (d, J = 9.0 Hz, 2H, (2S,3R)), 7.63 (d, J = 9.0 Hz, 2H, (2S,3S)), 5.28 (s, 1H, (2S,3R)), 5.17 (s, 1H, (2S,3S)), 1.65 (s, 3H, (2S,3S)), 1.33 (s, 3H, (2S,3R)). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  174.61 (COOH, (2S,3R)), 173.55 (COOH, (2S,3S)), 147.70 (C8 arom, (2S,3R), 147.61 (C8 arom, (2S,3S), 145.35 (C5 arom, (2S,3S), 145.05 (C5 arom, (2S,3R), 128.31 (C arom), 127.89 (C arom), 123.59 (C arom), 123.53 (C arom), 74.07 (C4, (2S,3R), 74.04 (C4, (2S,3S), 65.76 (C2, (2S,3S), 64.80 (C2, (2S,3R), 20.03 (C3, (2S,3S), 17.97 (C3, (2S,3R)). ESI-TOF: Calculado como  $[M+H^{+}]$   $C_{10}H_{13}N_{2}O_{5}$ : 241,0824, experimental 241,0814.

### Ácido (2S,3S) y (2S,3R)-2-amino-6-(benciloxi)-3-hidroxihexanoico (3cb, 4cb).

mezcla de diastereómeros (67:33 (2S,3S):(2S,3R)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 15,3 mg (5 %), ≥ 95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factor de retención: k = 3.0;  $[\alpha]_{D}^{20} = -17.5$  (c = 1en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.44 (m, 5H), 4.58 (s, 2H, (2S,3R)), 4.57 (s, 2H, (2S,3R)), 4.09 (ddt, J = 13.8, 10.0, 4.2 Hz, 1H, (2S,3S):(2S,3R)), 3.83 (d, J = 3.7 Hz, 1H, (2S,3S)), 3.63 (g, J = 6.3 Hz, 5H, (2S,3S):(2S,3R)), 1.81 (m, 2H, (2S,3S):(2S,3R)), 1.68 (m, 2H, (2S,3S):(2S,3R)), 1.58 (q, J = 7.9, 7.2 Hz, 4H, (2S,3S):(2S,3R)). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 137.29 (C8 arom, (2S,3S):(2S,3R)), 128.64 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 128.63 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 128.46 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 128.19 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 128.18 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 72.47 (C7, (2S,3R)), 72.46 (C7, (2S,3S)), 69.64 (C6, (2S,3S)), 69.59 (C6, (2S,3R)), 69.40 (C3, (2S,3R)), 69.29 (C3,(2S,3S), 59.36 (C2, (2S,3S):(2S,3R)), 29.94 (C4, (2S,3R)), 27.69 (C4, (2S,3S)), 25.39 (C5, (2S,3S)), 25.02 (C5, (2S,3R)). ESI-TOF: Calculado como[M+H<sup>+</sup>] C<sub>13</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>4</sub>: 254,1392, experimental 254,1385.

# Ácido (2S,3S) y (2S,3R)-2-amino-5-fenil-3-hidroxipentanoico (3ch,4ch).

(2S,3S):(2S,3R)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento:

59,3 mg (10 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factor de retención: k = 2,3;  $[\alpha]^{20}_{D} = -2,5$  (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.19 (m, 5H, (2S,3S):(2S,3R)), 3.91 (m, 1H, (2S,3S):(2S,3R)), 3.67 (dd, J = 3.8, 0.6 Hz, 1H, (2S,3S)), 3.49 (dd, J = 4.8, 0.6 Hz, 1H, (2S,3R)), 2.72 (m, 1H, (2S,3S):(2S,3R)), 2.57 (m, 1H, (2S,3S):(2S,3R)), 1.73 (m, 2H, (2S,3S):(2S,3R)). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  141.48 (C6 arom, (2S,3S):(2S,3R)), 128.66 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 128.62 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 128.50 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 128.47 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 59.44 (C2, (2S,3S):(2S,3R)), 35.04 (C4, (2S,3S):(2S,3R)), 31.29 (C5, (2S,3S):(2S,3R)). ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>] C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>NO<sub>3</sub>: 210,1130 , experimental 210,1122.

### Ácido (2S,3R) y (2S,3S)-2-amino-4-(fenoxi)-3-hidroxibutírico (3ci, 4ci).

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una 3ci 4ci mezcla de diastereómeros (27:73 (2
$$S$$
,3 $S$ ):(2 $S$ ,3 $S$ )), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 68,3 mg (13 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factor de retención:  $k = 3,1$ ;  $[\alpha]^{20}_D = -40,0$  ( $c = 1$  en H<sub>2</sub>O). H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.40 (m, 2H, (2 $S$ ,3 $S$ ), (2 $S$ ,3 $S$ )), 4.53 (m, 1H, (2 $S$ ,3 $S$ ), (2 $S$ ,3 $S$ )), 4.05 (d,  $J = 4.1$  Hz, 1H, (2 $S$ ,3 $S$ )), 3.97 (d,  $J = 4.1$  Hz, 1H, (2 $S$ ,3 $S$ )). RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  157.69 (C5 arom, (2 $S$ ,3 $S$ ):(2 $S$ ,3 $S$ )), 129.75 (C7, C9 arom, (2 $S$ ,3 $S$ ):(2 $S$ ,3 $S$ )), 121.72 (C8 arom, (2 $S$ ,3 $S$ ):(2 $S$ ,3 $S$ )), 114.76 (C6, C10 arom, (2 $S$ ,3 $S$ ):(2 $S$ ,3 $S$ )), 69.46

(C4, (2S,3R)), 68.76 (C4, (2S,3S)), 67.44 (C3, (2S,3R)), 67.34 (C4, (2S,3S)), 57.38 (C2, (2S,3R)), 56.84 (C2, (2S,3S)). ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>] C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>4</sub>: 212,0923, experimental 212,0917.

# Ácido (2S,3S) y (2S,3R)-2-amino-3-fenil-3-hidroxipropanoico (3cj,4cj).

El compuesto, sólido blanco. obtenido como una mezcla de 3ci 4ci diastereómeros (37:63 (2S,3S): (2S,3R)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 40,3 mg (10 %),  $\geq 95 \%$  pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 0 % a 60 % B en 30 minutos; factores de retención:  $k_{(2S,3S)}$ = 2,1,  $k_{(2S,3R)}$  = 2,2;  $[\alpha]_D^{20} = -37.5$  (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  7.47 (m, 5H), 5.37 (d, J = 4.2 Hz, 1H, (2S,3S)), 5.32 (d, J = 4.3Hz, 1H, (2S,3R)), 4.10 (d, J = 4.2 Hz, 1H, (2S,3S)), 3.93 (d, J = 4.4 Hz, 1H, (2S,3R)). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  171.89 (C1, (2S,3R)), 170.97 (C1, (2S.3S)), 139.06 (C4, (2S.3R)), 136.75 (C4, (2S.3S)), 128.85 (C, arom, (2S,3S):(2S,3R)), 128.76 (C, arom, (2S,3S):(2S,3R)), 128.71 (C, arom, (2S,3S):(2S,3R)), 126.22 (C, arom, (2S,3S):(2S,3R)), 125.78 (C, arom, (2S,3S):(2S,3R)), 71.20 (C3, (2S,3R)), 71.01 (C3, (2S,3S)), 60.79 (C2, (2S,3R)), 60.35 (C2, (2S,3S)). Calculado como [M+H<sup>+</sup>] C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>NO<sub>3</sub>: 182,0817, experimental 182,0812. Ácido (2S, 3S)(2S,3R)-2-amino-3-(4-clorofenil)-3-hidroxi V propanoico (3ck, 4ck).

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una mezcla de diastereómeros (50:50 (2S,3S): (2S,3R)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 80,9 mg

(15 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factor de retención: k = 1.8;  $[\alpha]^{20}_{D} = -2.5$  (c = 1 en  $H_2O$ ).  $^1H$  RMN (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  7.27 (m, 4H), 5.20 (d, J = 4.1 Hz, 1H, (2S,3S)), 5.13 (d, J = 4.5 Hz, 1H, (2S,3R)), 3.93 (d, J = 4.0 Hz, 1H, (2S,3S)), 3.75 (d, J = 4.4 Hz, 1H, (2S,3R)).  $^{13}C$  RMN (101 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  171.70 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 137.80 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 133.81 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 128.76 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 127.74 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 127.40 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 70.70 (C3, (2S,3S):(2S,3R)), 60.61 (C2, (2S,3S):(2S,3R)). ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>]  $C_9H_{11}CINO_3$ : 216,0426, experimental 216,0427.

# Ácido (2S,3S) y (2S,3R)-2-amino-3-(2-fluorofenil)-3-hidroxi propanoico (3cl, 4cl).

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como mezcla una de diastereómeros (33:67)3cl 4cl (2S,3S):(2S,3R)), de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 259,4 mg (48 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 0 % a 60 % B en 30 minutos; factor de retención: k = 2.4;  $[\alpha]^{20}_{D} = -25.0$  (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  7.16 (m, 4H), 5.37 (d, J = 4.4 Hz, 1H, (2S,3S):(2S,3R)), 3.95 (d, J = 4.0 Hz, 1H, (2S,3S)), 3.86 (d, J = 4.7 Hz, 1H, (2S,3R)). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  171.60 (C1, (2S,3R)), 170.64 (C1, (2S,3S)), 160.65 (C5 arom, (2S,3R)), 158.21 (C5 arom, (2S,3S)), 130.44 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 128.03 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 127.99 (C8 arom, (2S,3S)), 127.49 (C8 arom, (2S,3R)), 126.03 (C4 arom, (2S,3S)), 124.63 (C4 arom, (2S,3R)), 115.38 (C6 arom, (2S,3R)), 115.30 (C6 arom, (2S,3S)), 66.21 (C3, (2S,3S)), 66.18 (C3, (2S,3R)), 59.19 (C2, (2S,3S)), 59.00 (C2, (2S,3R)). ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>] C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>FNO<sub>3</sub>: 200,0723, experimental 200,0708.

### Ácido (2S,3S) y (2S,3R)-2-amino-3-hidroxi-3-(2,3,4,5,6-pentafluoro fenil)propanoico (3cm, 4cm).

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una mezcla de diastereómeros (87:13 (2*S*,3*S*):(2*S*,3*R*)), de acuerdo al

procedimiento general. Rendimiento: 437,1 mg (65 %),  $\geq$  95 % pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 10 % a 70 % B en 30 minutos; factor de retención:  $k_{(2S,3S)}=1,7,\ k_{(2S,3R)}=1,9;$  [ $\alpha$ ]<sup>20</sup><sub>D</sub> = -5,0 (c=1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  5.67 (d, J=5.2 Hz, 1H, (2S,3S)), 5.34 (d, J=9.0 Hz, 1H, (2S,3R)), 4.16 (d, J=5.1 Hz, 1H, (2S,3S)), 4.14 (s, 1H, (2S,3R)). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  170.13 (C1, (2S,3S)), 64.05 (C3, (2S,3S)), 58.43 (C2, (2S,3S)). ESITOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>] C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>F<sub>5</sub>NO<sub>3</sub>: 272,0346, experimental 272,0333.

# Ácido (2S,3S) and (2S,3R)-2-amino-3-hidroxi-3-(4-nitrofenil) propanoico (3cn, 4cn).

El compuesto, sólido blanco, fue obtenido como una mezcla de diastereómeros (50:50 (2*S*,3*S*):

(2S,3R)), de acuerdo al procedimiento general Rendimiento: 349,5 mg (56 %),  $\geq 95 \%$  pureza, determinado por HPLC utilizando un gradiente de elución de 0 % a 60 % B en 30 minutos; factor de retención: k = 2,6;  $[\alpha]^{20}_{D} = -12,5$  (c = 1 en H<sub>2</sub>O). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8.13 (m, 2H), 7.55 (m, 1H), 7.48 (m, 1H), 5.33 (d, J = 3.8 Hz, 1H, (2S,3S)), 5.26 (d, J = 4.4 Hz, 1H, (2S,3R)), 4.00 (d, J = 3.9 Hz, 1H, (2S,3S)), 3.82 (d,

J = 4.4 Hz, 1H, (2S,3R)). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  171.41 (C1, (2S,3S):(2S,3R)), 147.57 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 146.92 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 127.24 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 127.04 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 123.95 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 123.70 (C arom, (2S,3S):(2S,3R)), 70.63 (C3, (2S,3S):(2S,3R)), 60.40 (C2, (2S,3S):(2S,3R)). ESI-TOF: Calculado como [M+H<sup>+</sup>] C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 227,0668, experimental 227,0657.

# 5.10.3 Determinación de la estereoquímica de los productos obtenidos en la adición aldólica de Gly, D-Ala y D-Ser a varios aldehídos catalizado por SHMT<sub>Sth</sub> Y55T y la enzima nativa.

Para los productos aldólicos derivados de D-Ala y Gly se sintetizaron las 1,3-oxazolidin-2-onas y las configuraciones relativas fueron determinadas por efectos nOe y constantes de acoplamiento respectivamente. El producto de adición aldólica (20 mg) se disolvió en acetonitrilo (5 mL) y se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (50 mg). Después de 15 minutos se adicionó trifosgeno (100 mg). La reacción fue seguida por HPLC como se describió anteriormente para cada producto y cuando no se detectó material de partida el solvente fue eliminado por evaporación a vacío. El residuo fue analizado directamente por técnicas de RMN sin pasos adicionales de purificación.

La estereoquímica de los productos derivados de D-Ser se determinó por experimentos NOESY 1D selectivos, por correlación con los desplazamientos químicos (<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C) de los productos derivados de D-Ala y Gly y por técnicas de difracción de rayos X de cristales del producto **3ah**. La cristalización de **3ah** se realizó como se describe a continuación: 100 mg de producto fueron disueltos en agua (3 mL) y fue añadido HCl 1 M (0.5 mL) para disolver completamente al aminoácido. La solución fue aplicada a una columna de carbón activo

(2 mL), empacada en una jeringa (10 mL) en un sistema de vacío. Después de aplicar la muestra se lavó la fase estacionaria con agua destilada (20 mL) y el producto fue eluido con un gradiente discontinuo 5:95 a 100:0 de CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (v/v) (20 etapas de 2 mL, incrementando un 5 % de acetonitrilo en cada una y colectando las fracciones en tubos de cristal (10 x 1.4 cm). Las fracciones fueron mantenidas a 30 °C y se dejaron crecer los cristales por evaporación del solvente durante 10 días. Después de este tiempo los cristales en la fracción eluida con un 30:70 de CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (v/v) fueron colectados para su análisis por difracción de rayos X.

### 5.11 Síntesis de (R)-1-aril-2-hidroxi-3,3-dimetoxipropan-1-ona (8) catalizado por BAL.

Escala analítica: Las reacciones (4 mL, volumen total) fueron realizadas a 25 °C y agitación magnéticas (250 rpm). El aldehído aromático (0,2 mmol) fue disuelto en MTBE (2 mL) y posteriormente se añadió la enzima (1000 U) disuelta en el tampón de reacción (1,66 mL carbonato de sodio (50 mM, pH 8,0, MgSO<sub>4</sub>, 2,5 mM, y ThDP, 0,15 mM). La reacción se inició por la adición de dimetoxiacetaldehído (2 mmol, 345  $\mu$ L a partir de una solución acuosa comercial 5,8 M). Después de 24 h de reacción se tomaron muestras de la fase orgánica (10  $\mu$ L) y la fase acuosa (10  $\mu$ L) y se diluyeron con metanol (500  $\mu$ L). Las muestras se analizaron por HPLC utilizando para la elución un gradiente de 10 % a 70 % B en 30 minutos.

**Escalado**: Las reacciones (40 mL volumen total) fueron realizadas a 25 °C y agitación magnéticas (250 rpm). El aldehído aromático (2 mmol) fue disuelto en MTBE (20 mL) y posteriormente se añadió la enzima (10 000 U) disuelta en el tampón de reacción (16,6 mL carbonato de sodio (50 mM, pH 8,0, MgSO<sub>4</sub>, 2,5 mM, y ThDP, 0,15

mM). La reacción se inició por la adición de dimetoxiacetaldehído (2 mmol, 3,45 mL a partir de la solución acuosa comercial 5,8 M). Después de 24 h de reacción se tomaron muestras de la fase orgánica y la fase acuosa y se analizaron como se describió anteriormente. Una vez alcanzada la máxima conversión en la reacción (24 h) se añadió NaCl sólido hasta saturar la fase acuosa y se separó la fase orgánica. La fase acuosa se lavó con MTBE (3 x 20 mL), teniendo cuidado de no agitar para evitar la formación de emulsiones. Se unieron todas las fracciones orgánicas y se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Una vez filtrada la solución se utilizó el producto disuelto en MTBE sin ningún paso de purificación adicional.

5.12 Síntesis de (1S,2S)-1-aril-3,3-dimetoxipropan-1,2-diol (10).

# 5.12.1 Síntesis y purificación del (1S,2R) y (1S,2S)-3,3-dimetoxi-1-fenilpropan-1,2-diol (9 y 10).

El (*R*)-2-hidroxi-3,3-dimetoxi-1-fenilpropan-1-ona (**8a**) (1,4 mmol), se disolvió en H<sub>2</sub>O (30 mL) y se añadió NaBH<sub>4</sub> (7,1 mmol). La reacción se mantuvo en agitación a 25 °C durante 5 h. Pasado este tiempo se analizó por HPLC como se describe anteriormente (**5.11**) no detectándose cetona de partida. Seguidamente se añadió HCl (0,5 M) hasta pH 3,0 y se dejó la reacción en agitación durante 1 h garantizando la descomposición de todo el agente reductor. Los productos se purificaron por HPLC semi-preparativo con columna de fase reversa Perkin-Elmer 250 x 25mm, con fase estacionaria C18 5 μm. La muestra se filtró (0,45 μm) y se aplicó a la columna previamente equilibrada con H<sub>2</sub>O. Las sales fueron eliminadas con esta fase móvil (100 mL) y el producto se eluyó con un gradiente de CH<sub>3</sub>CN (0 a 50 % v/v en 60 minutos). Se utilizó un flujo de 10 mL min<sup>-1</sup> y los productos se detectaron a 215 nm. Las muestras colectadas se analizaron por HPLC

y las fracciones con los productos de interés se unieron y liofilizaron para su posterior modificación y caracterización por RMN.

### 5.12.2 Síntesis de (4S,5R) y (4S,5S)-4-(dimetoximetil)-5-fenil-1,3-dioxalan-2-ona (S9a y S10a).

#### (4S,5R)-4-(dimetoximetil)-5-fenil-1,3-dioxalan-2-ona (S9a).

El (1S,2R)-3,3-dimetoxi-1-fenilpropan-1,2-diol (9a)O OMe (20 mg, 0,09 mmol) se disolvió en THF (5 mL) y a esta solución se le añadió Et<sub>3</sub>N (80 µL, 0,6 mmol) seguido de trifosgeno (28 mg, 0.09 mmol). La reacción se mantuvo en agitación por 24 h a 25 °C. Pasado este tiempo la mezcla se analizó por HPLC, utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente (5.11), no detectándose diol de partida. La reacción se concentró a vacío v se añadió HCl (20 mL pH 3,0). La solución acuosa se extrajo con AcOEt (3 x 20 mL) y las fracciones orgánicas se unieron y secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Después de filtrar se concentró a vacío y se obtuvo el producto como un aceite incoloro, 20 mg (93 %). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.36 (m, 5H), 5.63 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 4.55 (d, J= 3.5 Hz, 1H, 4.47 (dd, J = 4.9, 3.5 Hz, 1H), 3.57 (s, 3H), 3.49 (s, 3H).<sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 154.34 (CO), 137.35 (C<sub>arom</sub>), 129.07 (C<sub>arom</sub>), 129.01 (C<sub>arom</sub>), 128.99 (C<sub>arom</sub>), 125.40 (C<sub>arom</sub>), 125.38 (C<sub>arom</sub>), 103.40 (-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 81.77 (-CH-), 77.72 (PhCH-), 57.84 (-OCH<sub>3</sub>), 56.14 (-OCH<sub>3</sub>).

#### (4S,5S)-4-(dimetoximetil)-5-fenil-1,3-dioxalan-2-ona (S10a).

Para la obtención de este producto se siguió un procedimiento similar al anterior partiendo de **10a**. La 1,3-dioxalan-2-ona **S10a** se obtuvo como un aceite incoloro, 19 mg (89 %). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.41 (m, 3H), 7.28 (m, 2H), 5.70 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.80 (dd, J = 8.1, 6.7 Hz, 1H),

3.81 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 3.29 (s, 3H), 2.94 (s, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  154.25 (CO), 132.97 (C<sub>arom</sub>), 129.36 (C<sub>arom</sub>), 128.54 (C<sub>arom</sub>), 126.63 (C<sub>arom</sub>), 102.49 (C<sub>arom</sub>), 100.89 (-CH(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 79.31 (PhCH-), 78.38 (-CH-), 54.78 (-OCH<sub>3</sub>), 54.14 (-OCH<sub>3</sub>).

#### 5.12.3 Síntesis de (1S,2S)-1-aril-3,3-dimetoxipropan-1,2-diol (10).

Al (*R*)-1-aril-2-hidroxi-3,3-dimetoxipropan-1-ona (2 mmol) disuelto en MTBE (100 mL) se le añadió NaBH<sub>4</sub> (4 mmol) y la reacción se agitó a 250 rpm y 25 °C. Después de 4 h no se detectó cetona de partida por HPLC, siguiendo el procedimiento que se describió anteriormente (5.11). Se concentró a vacío y el residuo fue disuelto en H<sub>2</sub>O (50 mL) bajo agitación (250 rpm) por 1 h. La purificación de los productos de la reducción se realizó por cromatografía en columna (50 x 2 cm) utilizando como fase estacionaria AMBERLITE® XAD 1180 (volumen final de 110 mL). El crudo de la reacción (50 mL) fue aplicado en la columna y las impurezas fueron eliminadas lavando con H<sub>2</sub>O (500 mL). El producto se eluyó con etanol anhidro (75 mL) y una vez eliminado el solvente por evaporación a vacío el producto fue utilizado en el siguiente paso de síntesis sin etapas de purificación adicionales.

#### 5.13 Síntesis de (2S,3S)-3-aril-2,3-dihidroxipropanal (11).

Los (1S,2S)-1-aril-3,3-dimetoxipropan-1,2-diol fueron disueltos en acetonitrilo (2 mL) y a las soluciones se les añadió H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 mL de una solución acuosa 2 M). Las reacciones se mantuvieron bajo agitación (250 rpm) y 25 °C. La formación de los aldehídos fue seguida por HPLC utilizando el procedimiento descrito en **5.11**. Después de 3 h se detuvieron las reacciones por adición de CaCO<sub>3</sub> sólido. El precipitado de CaSO<sub>4</sub> fue eliminado por filtración y lavado con H<sub>2</sub>O (4

x 10 mL). Los aldehídos fueron utilizados en solución (50 mL) en el siguiente paso de síntesis si etapas adicionales de purificación.

### 5.14 Síntesis de (6S)-6-C-aril-L-sorbosas (12). Procedimiento general.

La dihidroxiacetona (4 mmol) fue añadida a una solución de (2S,3S)-3aril-2,3-dihidroxipropanal (2 mmol disueltos en 50 mL agua) y el pH fue ajustado a pH 7,5 con NaHCO<sub>3</sub> (1 M pH 8,0). La reacción se inició con la adición del biocatalizador FSA A129S (47 U mL<sup>-1</sup>) y la reacción se realizó en agitación magnética a 25 °C. La formación de producto se monitorizó por HPLC utilizando un gradiente de elución de 0 % a 40 % de B en 30 minutos. Cuando todo el aldehído de partida se consumió la reacción se detuvo añadiendo HCl (1 M) hasta pH 3,0 precipitando parte de la enzima. Posteriormente se añadió K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hasta saturación para precipitar completamente al biocatalizador. La mezcla se filtró sobre Celite® y se lavó con agua (200 mL). Para la purificación el producto fue absorbido en un lecho de carbón activo (60 mL) previamente equilibrado con agua. Se lavó la fase estacionaria con agua (1 L) y los productos se eluyeron utilizando un gradiente discontinuo de 5:95 a 60:40 CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (v/v), 12 etapas (30 mL cada una) con incrementos del 5 % de CH<sub>3</sub>CN. Las fracciones fueron analizadas por HPLC y las que contenían el producto se unieron y concentraron a 40 mL por evaporación a vacío. Posteriormente se congelaron a −80 °C y liofilizaron. Los sólidos obtenidos fueron conservados a - 20 °C y caracterizados por técnicas de RMN. Las propiedades físicas de los monosacáridos sintetizados se listan a continuación:

#### (6S)-6-C-fenil- $\alpha$ -L-sorbopiranosa (12a).

El compuesto fue obtenido de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 251,6 mg (sólido blanco, 49 %), > 95 % pureza, determinado por HPLC; factor de retención, k=2,1 (Análisis por HPLC como se describió anteriormente);  $\left[\alpha\right]^{20}_{D}=-43,3$  (c=5 en H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.31 (m, 5H), 4.55 (d, J=9.9 Hz, 1H), 3.72 (t, J=9.4 Hz, 1H), 3.60 (d, J=9.7 Hz, 1H), 3.57 (d, J=11.7 Hz, 1H), 3.49 (dd, J=9.9, 9.2 Hz, 1H), 3.38 (d, J=11.8 Hz, 1H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  137.43 (C7 arom), 128.57(C arom), 97.89 (C2), 74.69 (C6) 74.21 (C5), 73.59 (C4), 70.47 (C3), 63.62 (C1). ESI-TOF m/z: Calculado de  $[M+Na^+]$  C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>Na: 279,0845 y  $[2M+Na^+]$  C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O<sub>12</sub>Na: 535,1791, encontradas  $[M+Na^+]$ : 279,0840 y  $[2M+Na^+]$ : 535,1793.

#### (6S)-6-C-(2-fluorfenil)-α-L-sorbopiranosa (12b).

determinado por HPLC; factor de retención, k = 3,4 (Análisis por HPLC como se describió anteriormente);  $[\alpha]^{20}_{D} = -44,0$  (c = 5 en H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.42 (m, 1H), 7.29 (dddd, J = 8.3, 7.3, 5.4, 1.8 Hz, 1H), 7.13 (td, J = 7.6, 1.2 Hz, 1H), 7.04 (ddd, J = 10.7, 8.3, 1.2 Hz, 1H), 4.95 (d, J = 10.1 Hz, 1H), 3.73 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.59 (d, J = 11.8 Hz, 1H), 3.57 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.56 (dd, J = 9.1 Hz, J = 9.9 1H), 3.38 (d, J = 11.8 Hz, 1H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  162.11 (C8 arom), 159.67 (C7 arom), 130.68 (C10 arom), 129.12 (C12 arom), 124.57 (C11 arom), 115.60 (C9 arom), 98.04 (C2), 73.58 (C5, C4), 70.43 (C3), 67.74 (C6), 63.52 (C1). ESI-TOF m/z: Calculado

de  $[M+Na^+]$   $C_{12}H_{15}FO_6Na$ : 297.0750 y  $[2M+Na^+]$   $C_{24}H_{30}F_2O_{12}Na$ : 571,1603, encontradas  $[M+Na^+]$ : 297,0747 y  $[2M+Na^+]$ : 571,1607.

#### (6S)-6-C-(3-hidroxifenil)-α-L-sorbopiranosa (12g).

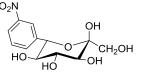
El compuesto fue obtenido de acuerdo al НО procedimiento general. Rendimiento: 264,7 mg (sólido blanco, 49 %), > 95 % pureza, determinado por HPLC; factor de retención, k = 0.4 (Análisis por HPLC como se describió anteriormente);  $[\alpha]^{20}_{D} = -55.3$  (c = 5 en H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.17 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.88 (dt, J= 7.7, 1.2 Hz, 1H), 6.82 (dd, J = 2.5, 1.6 Hz, 1H), 6.76 (ddd, J = 8.2, 1.6 Hz) 2.6, 1.0 Hz, 1H), 4.48 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 3.69 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 3.59 (d, J = 11.8 Hz, 1H), 3.56 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 3.44 (dd, J = 9.9, 9.2 Hz, 1H), 3.37 (d, J = 11.8 Hz, 1H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ 155.60 (C9 arom), 139.35 (C7 arom), 130.06 (C11 arom), 120.28 (C12 arom), 115.79 (C10 arom), 114.76 (C8 arom), 97.47 (C2), 74.45 (C6), 73.75 (C5), 73.54 (C4), 70.23 (C3), 63.56 (C1). ESI-TOF m/z:  $[M+Na^{+}]$   $C_{12}H_{16}O_{7}Na$ : de 295,0794  $[2M+Na^{+}]$ Calculado C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O<sub>14</sub>Na: 567,1690, encontradas [M+Na<sup>+</sup>]: 295,0793 y [2M+Na<sup>+</sup>]: 567,1685.

#### (6S)-6-C-(3-metoxifenil)- $\alpha$ -L-sorbopiranosa (12h).

El compuesto fue obtenido de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 330,9 mg (sólido blanco, 58 %), > 95 % pureza, determinado por HPLC; factor de retención, k = 3,7 (Análisis por HPLC como se describió anteriormente);  $[\alpha]^{20}_D = -48,0$  (c = 5 en H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.25 (dd, J = 8.3, 7.5 Hz, 1H), 6.97 (t, J = 1.2 Hz, 1H), 6.94 (m, 2H), 6.88 (ddd, J = 8.3, 2.7, 1.0 Hz, 1H), 4.53 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.70 (t, J = 9.7 Hz, 1H), 3.59 (d,

J = 11.9 Hz, 1H), 3.57 (d, J = 9.5 Hz, 1H) 3.46 (dd, J = 9.9, 9.2 Hz, 1H), 3.38 (d, J = 11.8 Hz, 1H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  158.94 (C9 arom), 139.24 (C7 arom), 129.93 (C11 arom), 120.95 (C12 arom), 114.50 (C10 arom), 113.51 (C8 arom), 97.91 (C2), 74.55 (C6), 74.11 (C5), 73.56 (C4), 70.44 (C3), 63.57 (C1), 55.30 (C13). ESI-TOF m/z: Calculado de [M+Na<sup>+</sup>] C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub>Na: 309,0950 y [2M+Na<sup>+</sup>] C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>O<sub>14</sub>Na: 595,2003, encontradas [M+Na<sup>+</sup>]: 309,0952 y [2M+Na<sup>+</sup>]: 595,2005.

#### (6S)-6-C-(3-nitrofenil)- $\alpha$ -L-sorbopiranosa (12i).



El compuesto fue obtenido de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 118,0 mg (sólido blanco, 20 %), > 95 % pureza,

determinado por HPLC; factor de retención, k = 3.8 (Análisis por HPLC como se describió anteriormente);  $[\alpha]^{20}_D = -46.0$  (c = 5 en H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8.21 (m, 1H), 8.11 (ddd, J = 8.3, 2.4, 1.1 Hz, 1H), 7.72 (m, 1H), 7.51 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 4.69 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 3.74 (t, J = 9.5 Hz, 1H), 3.63 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 3.60 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 3.43 (dd, J = 9.3 Hz, J = 9.2 Hz, 1H), 3.42 (d, J = 11.9 Hz, 1H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  147.90 (C9 arom), 139.75 (C7 arom), 134.73 (C12 arom), 129.68 (C11 arom), 123.61 (C10 arom), 122.74 (C8 arom), 98.08 (C2), 74.34 (C5), 73.77 (C6), 73.38 (C4), 70.39 (C3), 63.53 (C1). ESI-TOF m/z: Calculado de [M+Na<sup>+</sup>]  $C_{12}H_{15}NO_8Na$ : 324,0695, encontrada [M+Na<sup>+</sup>]: 324,0693.

### (6S)-6-C-(3-cianofenil)- $\alpha$ -L-sorbopiranosa (12j).

El compuesto fue obtenido de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 271,1 mg (sólido blanco, 48 %), > 95 % pureza,

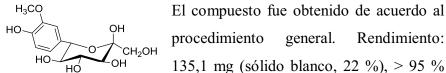
determinado por HPLC; factor de retención, k = 3.0 (Análisis por

HPLC como se describió anteriormente);  $[\alpha]^{20}_{D} = -52.7$  (c = 5 en H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.73 (ddt, J = 1.7, 1.0, 0.5 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.44 (ddd, J = 8.1, 7.4, 0.6 Hz, 1H), 4.59 (d, J = 9.8 Hz, 1H), 3.72 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 3.61 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 3.58 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.40 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 3.38 (dd, J = 9.2 Hz, J = 9.4 Hz, 1H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 139.10 (C7 arom), 133.01 (C12 arom), 132.58 (C10 arom), 131.77 (C8 arom), 129.43 (C11 arom), 119.33 (C13), 111.29 (C9 arom), 98.02 (C2), 74.30 (C5), 73.81 (C6), 73.36 (C4), 70.23 (C3), 63.53 (C1). ESITOF m/z: Calculado de [M+Na<sup>+</sup>] C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>6</sub>Na: 304,0797, encontrada [M+Na<sup>+</sup>]: 304,0800.

#### (6S)-6-C-(3-clorofenil)-α-L-sorbopiranosa (12k).

El compuesto fue obtenido de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 225.9 mg (sólido blanco, 39 %), > 95 % pureza, determinado por HPLC; factor de retención, k = 4,9 (Análisis por HPLC como se describió anteriormente);  $[\alpha]^{20}_D = -43,3$  (c = 5 en H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.30 (m, 4H), 4.53 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 3.71 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 3.60 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 3.57 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 3.42 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 3.39 (d, J = 11.9 Hz, 1H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  139.68 (C7 arom), 133.75 (C9 arom), 130.07 (C11 arom), 128.76 (C8 arom), 127.84 (C12 arom), 126.49 (C10 arom), 97.96 (C2), 74.21 (C6) 74.09 (C5), 73.44 (C4), 70.24 (C3), 63.56 (C1). ESI-TOF m/z: Calculado de [M+Na<sup>+</sup>]  $C_{12}H_{15}ClO_6Na$ : 313.0455 y [2M+Na<sup>+</sup>]  $C_{24}H_{30}Cl_2O_{12}Na$ : 603.1012, encontradas [M+Na<sup>+</sup>]: 313.0452

#### (6S)-6-C-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-α-L-sorbopiranosa (12t).



general. Rendimiento: 135,1 mg (sólido blanco, 22 %), > 95 % pureza, determinado por HPLC; factor de retención, k = 0,1 (Análisis

por HPLC como se describió anteriormente);  $[\alpha]^{20}_{D} = -43.3$  (c = 5 en H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  6.98 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.80 (m, 2H), 4.48 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.69 (t, J = 9.5 Hz, 1H), 3.59 (d, J = 11.3 Hz, 1H), 3.56 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 3.47 (dd, J = 9.2Hz, J = 9.3 Hz, 1H), 3.37 (d, J = 11.8 Hz, 1H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  147.39 (C9 arom), 145.14 (C10 arom), 129.69 (C7 arom), 121.56 (C12 arom), 115.33 (C11 arom), 112.09 (C8 arom), 97.84 (C2), 74.54 (C6), 73.98 (C5), 73.53 (C4), 70.45 (C3), 63.59 (C1), 56.21 (C13). ESI-TOF m/z: Calculado de [M+Na<sup>+</sup>] C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>Na: 325,0899 y [2M+Na<sup>+</sup>] C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>O<sub>16</sub>Na: 627,1901, encontradas [M+Na<sup>+</sup>]: 325.0895 v  $[2M+Na^{+}]: 627,1904.$ 

#### (6S)-6-C-(2-tiofen)- $\alpha$ -L-sorbopiranosa (12x).

El compuesto fue obtenido de acuerdo al El compuesto fue obtenido de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 95,5 mg (sólido blanco, 18 %), > 95 % pureza, determinado por HPLC; factor de retención, k = 2,3 (Análisis por HPLC como se describió anteriormente);  $[\alpha]_{D}^{20} = -41.3$  (c = 5 en H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H RMN (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  7.35 (m, 1H), 7.08 (m, 1H), 6.94 (m, 1H), 4.86 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 3.69 (t, J = 9.5 Hz, 1H), 3.57 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 3.54 (d, J = 9.5Hz, 1H), 3.46 (dd, J = 9.6 Hz, J = 9.2 Hz, 1H), 3.38 (d, J = 11.8 Hz, 1H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 140.34 (C7 arom), 127.63 (C8 arom), 127.02 (C9 arom), 126.73 (C10 arom), 97.94 (C2), 74.87 (C5), 73.45 (C4), 70.33 (C6), 70.12 (C3), 63.45 (C1), ESI-TOF m/z: Calculado de  $[M+Na^+]$   $C_{10}H_{14}O_6SNa$ : 285,0409 y  $[2M+Na^+]$   $C_{20}H_{28}O_{12}S_2Na$ : 547,0920, encontrada  $[M+Na^+]$ : 285,0404 y  $[2M+Na^+]$ : 547,0915.

#### (6S)-6-C-[5-(1-H-indazol)]- $\alpha$ -L-sorbopiranosa (12ad).

El compuesto fue obtenido de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 132,0 mg (sólido blanco, 49 %), > 95 % pureza,

determinado por HPLC; factor de retención, k = 1,3 (Análisis por HPLC como se describió anteriormente);  $[\alpha]^{20}_{D} = -35,3$  (c = 5 en DMSO);  $^{1}$ H RMN (400 MHz, DMSO- $d_{6}$ )  $\delta$  12.91 (s, 1H, -NH), 7.99 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.68 (dt, J = 1.4, 0.7 Hz, 1H), 7.41 (dt, J = 8.6, 0.9 Hz, 1H), 7.35 (dd, J = 8.7, 1.5 Hz, 1H), 5.44 (s, 1H, -OH), 4.68 (d, J = 4.8 Hz, 1H, -OH), 4.64 (d, J = 5.8 Hz, 1H, -OH), 4.56 (m, 2H), 4.44 (d, J = 6.7 Hz, 1H, -OH), 3.55 (ddd, J = 9.4, 8.7, 4.8 Hz, 1H), 3.42 (m, 2H), 3.28 (m, 2H), 3.11 (ddd, J = 9.6, 8.7, 5.8 Hz, 1H).  $^{1}$ H RMN (400 MHz,  $^{13}$ C RMN (101 MHz, DMSO- $d_{6}$ )  $\delta$  139.92 (C13 arom), 133.82 (C10 arom), 133.07 (C7 arom), 127.05 (C11 arom), 122.92 (C9 arom), 119.88 (C8 arom), 109.42 (C12 arom), 98.19 (C2), 76.08 (C5), 74.74 (C4), 74.56 (C6), 71.23 (C3), 64.61 (C1). ESI-TOF m/z: Calculado de  $[M+H^{+}]$   $C_{13}H_{17}N_{2}O_{6}$ : 297,1087, encontrada  $[M+H^{+}]$ : 297,1083.

# 5.15 Síntesis de (6S)-1-desoxi-6-C-aryl-L-sorbosas (13). Procedimiento general.

La hidroxiacetona (4 mmol) fue añadida a una solución de (2*S*,3*S*)-3-aril-2,3-dihidroxipropanal (2 mmol disueltos en 50 mL agua) y el pH fue ajustado a 7,5 con NaHCO<sub>3</sub> (1 M pH 8,0). La reacción se inició con la adición de FSA nativa (1 U mL<sup>-1</sup>). La mezcla se agitó a 250 rpm a 25 °C y la formación de producto se monitorizó por HPLC utilizando un gradiente de elución de 0 a 40 % de B en 30 minutos. Los productos

obtenidos se purificaron de manera similar a los derivados de (6S)-6-C-aril-L-sorbosa. Después de la purificación los sólidos obtenidos fueron conservados a -20 °C y caracterizados por RMN. Las propiedades físicas de los monosacáridos sintetizados se listan a continuación:

#### (6S)-1-desoxi-6-C-fenil-α-L-sorbopiranosa (13a).

OH El compuesto fue obtenido de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 328,5 mg (sólido blanco, 68 %), > 95 % pureza, determinado por HPLC; factor de retención, k = 4,1 (El análisis por HPLC se realizó como se describió anteriormente);  $[\alpha]^{20}_{D} = -49,3$  (c = 5 en H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.31 (m, 5H), 4.53 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 3.64 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 3.54 (dd, J = 9.9, 9.2 Hz, 1H), 3.34 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 1.33 (s, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 137.16 (C7 arom), 128.96, 128.76, 128.25 8 (C arom), 98.00 (C2), 75.09 (C3), 74.75 (C6), 74.08 (C5), 73.42 (C4), 24.56 (C1). ESI-TOF m/z: Calculado de  $[M+Na^+]$  C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>5</sub>Na: 263,0895 y  $[2M+Na^+]$  C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O<sub>10</sub>Na: 503,1893, encontrada  $[M+Na^+]$ : 263,0897 y  $[2M+Na^+]$ : 503,1895.

### (6S)-1-desoxi-6-C-(3-metoxifenil)-α-L-sorbopiranosa (13h).

El compuesto fue obtenido de acuerdo al procedimiento general. rendimiento: 442,6 mg (sólido blanco, 82 %), > 95 % pureza, determinado por HPLC; factor de retención, k = 5,0 (El análisis por HPLC se realizó como se describió anteriormente);  $[\alpha]^{20}_{D} = -46,0$  (c = 5 en H<sub>2</sub>O); <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.24 (ddd, J = 8.2, 7.6, 0.5 Hz, 1H), 6.91 (m, 3H), 4.51 (d, J = 9.9 Hz, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.63 (t, J = 9.4 Hz, 1H), 3.51 (dd, J = 9.9, 9.2 Hz, 1H), 3.33 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 1.33 (s, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  158.95 (C9 arom), 139.21 (C7 arom), 129.91 (C11 arom), 121.07 (C12 arom), 114.56 (C8 arom),

113.50 (C10 arom), 97.98 (C2), 75.06 (C3), 74.75 (C6), 74.11 (C5), 73.40 (C4), 55.27(C13), 24.55 (C1). ESI-TOF m/z: Calculado de [M+Na<sup>+</sup>] C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>Na: 293,1001 y [2M+Na<sup>+</sup>] C<sub>26</sub>H<sub>36</sub>O<sub>12</sub>Na: 563,2104 encontrado [M+Na<sup>+</sup>]: 293,1004 y [2M+Na<sup>+</sup>]: 563,2106.

### 5.16 Síntesis de las (5S)-5-aril-L-xilosas (14). Procedimiento general.

El glicolaldehído (4 mmol disuelto en 5 mL de agua) fue añadido (0,25 mL h<sup>-1</sup>; 0,2 mmol h<sup>-1</sup>)<sup>112</sup> a 50 mL de una solución de (2*S*,3*S*)-3-aril-2,3-dihidroxipropanal (2 mmol disueltos en agua a pH 7,5 ajustada con NaHCO<sub>3</sub> 1 M pH 8,0) y FSA A129T (2,7 U mL<sup>-1</sup>). Las reacciones se realizaron a 25 °C con agitación magnética (250 rpm) y monitorizadas por HPLC utilizando un gradiente de 0 % a 40 % B en 30 min. En algunos ejemplos de este trabajo se obtuvieron mejores resultados adicionando todo el glicolaldehído al inicio de la reacción. La purificación de los productos se realizó de manera similar a los derivados de (6*S*)-6-*C*-aril-L-sorbosa. Después de la purificación los sólidos obtenidos fueron conservados a – 20 °C y caracterizados por RMN. Las propiedades físicas de los monosacáridos sintetizados se listan a continuación:

#### (5S)-5-C-fenil- $\alpha/\beta$ -L-xilopiranosa (14a).

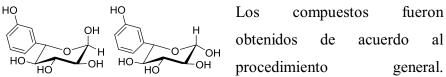
1H, β anómero), 3.69 (dd, J = 9.8, J = 9.1 Hz, 1H, α anómero), 3.59 (dd, J = 9.8, J = 3.8 Hz, 1H, α anómero), 3.51 (dd, J = 9.8, J = 9.1 Hz, 1H, α anómero), 3.48 (m, 3H), 3.27 (dd, J = 9.1, J = 8.1 Hz, 1H, β anómero). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 137.22 (C6 arom, α anómero), 136.97 (C6 arom, β anómero), 128.44 (C arom), 96.21 (C1, β anómero), 92.41 (C1, α anómero), 78.21 (C5, β anómero), 75.43 (C4, β anómero), 74.27 (C2, β anómero), 74.07 (C4, α anómero), 73.90 (C3, β anómero), 73.81 (C5, α anómero), 72.61 (C3, α anómero), 71.59 (C2, α anómero). ESI-TOF m/z: Calculada de [M+Na<sup>+</sup>] C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>Na: 249,0739 y [2M+Na<sup>+</sup>] C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>O<sub>10</sub>Na: 475,1580, encontradas [M+Na<sup>+</sup>]: 249,0737 y [2M+Na<sup>+</sup>]: 475,1582.

#### (5S)-5-C-(2-fluorofenil)- $\alpha/\beta$ -L-xilopiranosa (14b).

Rendimiento: 54,1 mg (sólido blanco, 11 %), > 95 % pureza, determinada por HPLC; factores de retención,  $k_I = 3,1$ ,  $k_2 = 3,7$  (El análisis por HPLC se realizó como se describió anteriormente);  $[\alpha]^{20}_D = -32,0$  (c = 5 en H<sub>2</sub>O, α:β 36:64); HRMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7.37 (m, 1H), 7.29 (dddd, J = 8.3, 7.3, 5.4, 1.8 Hz, 1H), 7.13 (tt, J = 7.6, 1.5 Hz, 1H), 7.04 (ddd, J = 10.7, 8.3, 1.2 Hz, 1H), 5.15 (d, J = 3.9 Hz, 1H, α anómero), 4.97 (d, J = 10.0 Hz, 1H, α anómero), 4.68 (d, J = 8.0 Hz, 1H, β anómero), 4.59 (d, J = 9.8 Hz, 1H, β anómero), 3.71 (dd, J = 9.8, 9.1 Hz, 1H, α anómero), 3.59 (m, 3H), 3.48 (t, J = 9.2 Hz, 1H, β anómero), 3.27 (dd, J = 9.4, 8.0 Hz, 1H, β anómero). CRMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 162.18 (C7 arom, α anómero), 161.86 (C7 arom, β anómero), 159.74 (C6 arom, α anómero), 159.41 (C6 arom,

β anómero), 130.68 (C9 arom), 129,17 (C11 arom, , β anómero), 128.83 (C11 arom, α anómero), 124.71 (C10), 115.50 (C8), 96.31 (C1, β anómero), 92.48 (C1, α anómero), 75.42 (C3, β anómero), 74.19 (C2, β anómero), 73.31 (C4), 72.66 (C3, α anómero), 71.52 (C2, C5), 67.27(C5, α anómero). ESI-TOF m/z: Calculada de [M+Na<sup>+</sup>] C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>FO<sub>5</sub>Na: 267,0645 y [2M+Na<sup>+</sup>] C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>F<sub>2</sub>O<sub>10</sub>Na: 511,1392, encontradas [M+Na<sup>+</sup>]: 267,0640 y [2M+Na<sup>+</sup>]:511,1393.

#### (5S)-5-C-(3-hidroxifenil)- $\alpha/\beta$ -L-xilopiranosa (14g).



Rendimiento: 76,8 mg (sólido blanco, 16 %), > 95 % pureza, determinada por HPLC; factores de retención,  $k_1 = 1.9$ ,  $k_2 = 2.4$  (El análisis por HPLC se realizó como se describió anteriormente); [α]<sup>20</sup>D = -26.0 (c = 5 en H<sub>2</sub>O,  $\alpha$ : $\beta$  37:63); <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.18 (ddd, J = 8.0, 7.6, 0.5 Hz, 1H), 6.86 (m, 1H), 6.78 (m, 2H), 5.14 (d, J =3.8 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero), 4.64 (d, J = 9.5 Hz, 1H,  $\beta$  anómero), 4.53 (d, J= 9.9 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero), 4.15 (d, J = 9.4 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero), 3.68  $(dd, J = 9.8, 9.1 \text{ Hz}, 1H, \alpha \text{ anómero}), 3.58 (dd, J = 9.8, 3.8 \text{ Hz}, 1H,$  $\alpha$  anómero), 3.46 (m, 3H), 3.26 (dd, J = 9.4, 8.0 Hz, 1H, β anómero). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 155.60 (C8 arom), 139.17( C6 arom, α anómero), 138.89 (C6 arom, β anómero), 130.10 (C10 arom), 120.22 (C11 arom, α anómero), 119.99 (C11 arom, β anómero), 115.84 (C7 arom), 114.76 (C9 arom, α anómero), 114.51 (C9 arom, β anómero), 96.18 (C1, β anómero), 92.39 (C1, α anómero), 77.97 (C5, β anómero), 75.39 (C4, β anómero), 74.24 (C2, β anómero), 74.04 (C4, α anómero), 73.88 (C3, β anómero), 73.60 (C5, α anómero), 72.58 (C3, α anómero), 71.55 (C2,  $\alpha$  anómero). ESI-TOF m/z: Calculada de [M+Na<sup>+</sup>]  $C_{11}H_{14}O_6Na$ : 265,0688 y [2M+Na<sup>+</sup>]  $C_{22}H_{28}O_{12}Na$ : 507,1478, encontradas [M+Na<sup>+</sup>]: 265,0689 y [2M+Na<sup>+</sup>]: 507,1475.

#### (5S)-5-C-(3-metoxifenil)- $\alpha/\beta$ -L-xilopiranosa (14h).

Rendimiento: 256,4 mg (sólido blanco, 50 %), > 95 % pureza, determinada por HPLC; factores de retención,  $k_1 = 3.6$ ,  $k_2 = 4.1$  (El análisis por HPLC se realizó como se describió anteriormente);  $[\alpha]^{20}$ <sub>D</sub> = -26.0 (c = 5 en H<sub>2</sub>O,  $\alpha$ : $\beta$  37:63); <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.25 (ddt, J = 8.1, 7.5, 0.8 Hz, 1H), 6.91 (m, 3H), 5.15 (d, J = 4.1 Hz, 1H) $\alpha$  anómero), 4.63 (d, J = 8.7 Hz, 1H,  $\beta$  anómero), 4.57 (d, J = 9.9 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero), 4.19 (d, J = 9.2 Hz, 1H,  $\beta$  anómero), 3.70 (s, 1H), 3.68 (d, J = 9.8 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero), 3.59 (dd, J = 9.8, 3.8 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero), 3.48 (m, 3H), 3.28 (dd, J = 9.8, 8.9 Hz, 1H,  $\beta$  anómero). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 158.96 (C8 arom), 139.08 (C6 arom, α anómero), 138.78 (C6 arom, β anómero), 129.98 (C10 arom), 120.88 (C11 arom, α anómero), 120.62 (C11 arom, β anómero), 114.54 (C7 arom), 113.87 (C9 arom, α anómero), 113.24 (C9 arom, β anómero), 96.20 (C1, β anómero), 92,41( C1, α anómero), 78.05 (C5, β anómero), 75.41 (C4, β anómero), 74.24 (C2, β anómero), 74.08 (C4, α anómero), 73.68 (C5,  $\alpha$  anómero), 72.59 (C3,  $\alpha$  anómero), 71.56 (C2,  $\alpha$  anómero), 55.29 (C12). ESI-TOF m/z: Calculada de  $[M+Na^{+}]$  $C_{12}H_{16}O_6Na$ : 279,0844 y  $[2M+Na^{+}]$   $C_{24}H_{32}O_{12}Na$ : 535,1791, encontradas [M+Na<sup>+</sup>]: 279,0840 y [2M+Na<sup>+</sup>]: 535,1790.

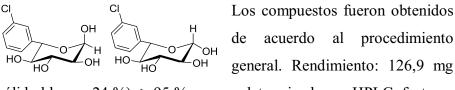
#### (5S)-5-C-(3-Nitrofenil)- $\alpha/\beta$ -L-xilopiranosa (14i).

Rendimiento: 119,2 mg (sólido blanco, 23 %), > 95 % pureza, determinada por HPLC; factores de retención,  $k_1 = 4.0$ ,  $k_2 = 4.7$  (El análisis por HPLC se realizó como se describió anteriormente);  $[\alpha]^{20}$ <sub>D</sub> = -23.3 (c = 5 en H<sub>2</sub>O,  $\alpha$ : $\beta$  40:60); <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  8.18 (dddt, J = 7.7, 2.2, 1.7, 0.5 Hz, 1H), 8.12 (dddd, J = 8.3, 2.3, 1.7, 1.1 Hz, 1H), 7.70 (m, 1H), 7.52 (dddd, J = 8.2, 7.7, 2.4, 0.4 Hz, 1H). 5.20 (d, J = 4.2 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero), 4.72 (d, J = 10.0 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero), 4.69 (d, J = 9.7 Hz, 1H,  $\beta$  anómero), 4.37 (d, J = 9.32 Hz, 1H, β anómero), 3.72 (t, J = 10.1, 1H, α anómero), 3.62 (dd, J = 9.8, J = 4.2Hz, 1H,  $\alpha$  anómero), 3.49 (m, 3H), 3.30 (t, J = 9.5, 1H,  $\beta$  anómero).  $^{13}$ C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  147.90 (C8 arom), 139.58 (C6 arom, α anómero), 139.17 (C6 arom, β anómero), 134.68 (C11 arom, α anómero), 134.38 (C11 arom, β anómero), 129.82 (C10 arom), 123.76 (C9 arom), 122.79 (C7 arom, α anómero), 122.57 (C7 arom, β anómero), 96.27 (C1, β anómero), 92.54 (C1, α anómero), 77.16 (C5, β anómero), 75.25 (C4, β anómero), 74.25 (C4, α anómero), 74.15 (C2,  $\beta$  anómero), 73.99 (C3,  $\beta$  anómero), 72.93 (C5,  $\alpha$  anómero), 72.42 (C3,  $\alpha$  anómero), 71.48 (C2,  $\alpha$  anómero). ESI-TOF m/z: Calculada de  $[M+Na^{+}]$  C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>7</sub>Na: 294,0590, encontrada  $[M+Na^{+}]$ : 294,0592.

#### (5S)-5-C-(3-cianofenil)- $\alpha/\beta$ -L-xilopiranosa (14j).

Rendimiento: 116,2 mg (sólido blanco, 23 %), > 95 % pureza, determinada por HPLC; factores de retención,  $k_1 = 3.7$ ,  $k_2 = 4.3$  (El análisis por HPLC se realizó como se describió anteriormente);  $[\alpha]^{20}$ <sub>D</sub> = -18.7 (c = 5 en H<sub>2</sub>O,  $\alpha$ : $\beta$  32: $\delta$ 8); <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.70 (m, 1H), 7.63 (m, 2H), 7.46 (m, 1H), 5.17 (d, J = 4.2 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero), 4.67 (d, J = 8.0 Hz, 1H,  $\beta$  anómero), 4.65 (s, 1H,  $\alpha$  anómero), 4.28 (d, J = 9.1 Hz, 1H,  $\beta$  anómero), 3.70 (dd, J = 9.8, 9.1 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero), 3.60 (dd, J = 9.8, 3.8 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero), 3.45 (m, 2H), 3.28 (dd, J = 8.8, 8.3 Hz, 1H,  $\beta$  anómero). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  138.92 (C6 arom,  $\alpha$  anómero), 138.56 (C6,  $\beta$  anómero), 132.99 (C9, C11 arom, α anómero), 132.71 (C9, C11 arom, B anómero), 131.80 (C7 arom, α anómero), 131.52 (C7 arom, β anómero), 129.55 (C10 arom), 119.26 (C12), 111.39 (C8 arom), 96.25 (C1, β anómero), 92.50 (C1, α anómero), 77.23 (C5, β anómero), 75.24 (C4), 74.15 (C2, β anómero), 73.96 (C3, β anómero), 72.98 (C5,  $\alpha$  anómero), 72.42 (C3,  $\alpha$  anómero), 71.47 (C2,  $\alpha$  anómero). ESI-TOF m/z: Calculada de [2M+Na<sup>+</sup>] C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>Na: 525,1485, encontrada [2M+Na<sup>+</sup>]: 525,1483.

### (5S)-5-C-(3-clorofenil)- $\alpha/\beta$ -L-xilopiranosa (14k).



(sólido blanco, 24 %), > 95 % pureza, determinada por HPLC; factores

de retención,  $k_1 = 5.8$ ,  $k_2 = 6.4$  (El análisis por HPLC se realizó como se describió anteriormente);  $\left[\alpha\right]_{D}^{20} = -26.0 \ (c = 5 \text{ en H}_{2}\text{O}, \alpha:\beta \ 39:61); \ ^{1}\text{H}$ RMN (400 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  7.28 (m, 4H), 5.15 (d, J = 3.8 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero), 4.64 (d, J = 9.0 Hz, 1H, β anómero), 4.57 (d, J = 9.7 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero), 4.20 (d, J = 8.9 Hz, 1H,  $\beta$  anómero), 3.68 (t, J = 9.8, 1H,  $\alpha$  anómero), 3.58 (dd, J = 9.8, J = 4.5 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero), 3.44 (m, 3H), 3.27 (dd, J = 9.1, J = 8.1 Hz, 1H,  $\beta$  anómero). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz,  $D_2O$ )  $\delta$  139.53 (C6 arom,  $\alpha$  anómero), 139.14 (C6 arom, β anómero), 133.71 (C8 arom), 130.13 (C10 arom), 128.87 (C11 arom),127.89 (C7 arom, α anómero), 127.59 (C7 arom, β anómero), 126.45 (C9 arom, α anómero), 126.18 (C9 arom, β anómero), (C1, β anómero), 92.45 (C1, α anómero), 77.54 (C5, β anómero), 75.30 (C4), 74.19 (C2, β anómero), 73.91 (C3, β anómero), 73.24 (C5,  $\alpha$  anómero), 72.49 (C3,  $\alpha$  anómero), 71.51 (C2,  $\alpha$  anómero). ESI-TOF m/z: Calculada de [M+Na<sup>+</sup>] C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>ClO<sub>5</sub>Na: 283,0349 y [2M+Na<sup>+</sup>]  $C_{22}H_{26}Cl_2O_{10}Na$ : 543,0801, encontradas [M+Na<sup>+</sup>]: 283,0347 y  $[2M+Na^{+}]: 543,0805.$ 

#### (5S)-5-C-(4-hidroxi-3-metoxifenil)- $\alpha/\beta$ -L-xilopiranosa (14t).

Rendimiento: 65,3 mg (sólido blanco, 12 %), > 95 % pureza, determinada por HPLC; factores de retención,  $k_I = 0.1$ ,  $k_2 = 0.2$  (El análisis por HPLC se realizó como se describió anteriormente);  $[\alpha]^{20}_{D} = -20.0$  (c = 5 en H<sub>2</sub>O,  $\alpha$ : $\beta$  35:65); <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  6.95 (m, 1H), 6.80 (m, 2H), 5.13 (d, J = 4.0 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero), 4.63 (d, J = 8.9 Hz, 1H,  $\beta$  anómero), 4.52 (d, J = 10.7 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero), 4.14

(d, J = 9.6 Hz, 1H,  $\beta$  anómero), 3.79 (s, 1H), 3.69 (t, J = 10.7, 1H,  $\alpha$  anómero), 3.57 (dd, J = 9.8, J = 4.0 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero), 3.47 (m, 3H), 3.25 (dd, J = 10.4, J = 8.9, 1H,  $\beta$  anómero). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  147.39 (C8 arom), 145.17 (C9 arom), 129.58 (C6 arom), 121.22 (C11 arom), 115.35 (C10 arom), 111.79 (C7 arom), 96.12 (C1,  $\beta$  anómero), 92.23 (C1,  $\alpha$  anómero), 78.03 (C5,  $\beta$  anómero), 75.40 (C2,  $\beta$  anómero), 74.27 (C4,  $\beta$  anómero), 73.96 (C4,  $\alpha$  anómero), 73.75 (C3,  $\beta$  anómero), 73.65 (C5,  $\alpha$  anómero), 72.60 (C3,  $\alpha$  anómero), 71.59 (C2,  $\alpha$  anómero), 55.88 (C12). ESI-TOF m/z: Calculada de [M+Na<sup>+</sup>] C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>Na: 295,0794 y [2M+Na<sup>+</sup>] C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O<sub>14</sub>Na: 567,1690, encontradas [M+Na<sup>+</sup>]: 295,0795 y [2M+Na<sup>+</sup>]: 567,1691.

#### (5S)-5-C-(2-tiofen)- $\alpha/\beta$ -L-xilopiranosa (14x).

OH HO HO OH OH Obtenidos compuestos fueron de procedimiento general. Rendimiento: 58,9 mg (sólido blanco, 13 %), > 95 % pureza, determinada por HPLC; factores de retención,  $k_1 = 2,4, k_2$ 3,1 (El análisis por HPLC se realizó como se describió anteriormente);  $[\alpha]_{D}^{20} = -33.3$  (c = 5 en H<sub>2</sub>O,  $\alpha$ : $\beta$  40:60); <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.36 (m, 1H), 7.08 (tdd, J = 3.6, 1.3, 0.5 Hz, 1H), 6.95 (m, 1H), 5.12 (d, J = 3.6 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero ), 4.91 (d, J = 9.9 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero), 4.66 (d, J = 8.0 Hz, 1H,  $\beta$  anómero), 4.55 (d, J = 9.4Hz, 1H,  $\beta$  anómero), 3.67 (dd, J = 9.8, 9.1 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero), 3.55  $(dd, J = 9.8, 3.7 \text{ Hz}, 1H, \alpha \text{ anómero}), 3.46 (m, 2H), 3.25 (dd, <math>J = 9.3,$ 8.0 Hz, 1H,  $\beta$  anómero). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  140.20 (C6 arom, α anómero), 139.55 (C6 arom, β anómero), 127.73 (C7 arom, α anómero), 127.53 (C7 arom, β anómero), 127.07 (C8 arom), 126.78 (C9, arom), 96.09 (C1, β anómero), 92.37 (C1, α anómero), 75.28 (C4, β anómero), 74.90 (C4, α anómero), 74.66 (C3, β anómero), 74.08 (C2, β anómero), 73.56 (C5, β anómero), 72.49 (C3, α anómero), 71.43 (C2, α anómero), 69.28 (C5, α anómero). ESI-TOF m/z: Calculada de [M+Na<sup>+</sup>] C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>SNa: 255,0303 y [2M+Na<sup>+</sup>] C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub>Na: 487,0709, encontradas [M+Na<sup>+</sup>]: 255,0305 y [2M+Na<sup>+</sup>]: 487,0706.

#### (5S)-5-C-[5-(1-H-indazol)]- $\alpha/\beta$ -L-xilopiranosa (14ad).

Los compuestos fueron obtenidos de acuerdo al procedimiento general.

Rendimiento: 160,6 mg (sólido blanco, 30 %), > 95 % pureza, determinada por HPLC; factores de retención,  $k_1 = 0.8$ ,  $k_2 = 1.4$  (El análisis por HPLC se realizó como se describió anteriormente);  $[\alpha]^{20}$ <sub>D</sub> = -46.7 (c = 5 en DMSO,  $\alpha:\beta$  44:56); <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.94 (s, 1H, -NH), 8.00 (d, 1.2 Hz, 1H), 7.64 (ddd, J = 2.5, 1.6, 0.8Hz, 1H), 7.43 (ddt, J = 7.3, 6.4, 1.0 Hz, 1H), 7.30 (dd, J = 8.7, 1.5 Hz, 1H), 6.63 (d, J = 6.2 Hz, 1H,  $\beta$  anómero, -OH), 6.34 (d, J = 4.5, 1H,  $\alpha$  anómero, -OH), 5.00 (t, J = 4.0 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero), 4.92 (dd, J =6.6, 4.5 Hz, 2H,  $\beta$  anómero, -OH), 4.72 (m, 2H, -OH), 4.66 (d, J = 5.9Hz, 1H,  $\alpha$  anómero, -OH), 4.60 (d, J = 9.7 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero), 4.55 (d, J = 6.6 Hz, 1H,  $\alpha$  anómero, -OH), 4.46 (dd, J = 7.7, 6.1 Hz, 1H,  $\beta$  anómero), 4.13 (d, J = 8.8 Hz, 1H,  $\beta$  anómero), 3.55 (m, 1H, α anómero), 3.33 (m, 1H, α anómero), 3.23 (m, 2H, β anómero), 3.14 (m, 1H,  $\alpha$  anómero), 3.06 (ddd, J = 8.7, 7.6, 4.5 Hz, 1H,  $\beta$  anómero).  $^{13}$ C RMN (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  139.94 (C10 arom ), 133.36 (C9 arom), 132.95 (C6, arom, α anómero), 132.41 (C6 arom, β anómero), 126.73 (C12 arom, α anómero), 126.51 (C12 arom, β anómero), 122.94 (C8 arom), 119.82 (C7 arom), 109.66 (C11 arom), 97.73 (C1,

β anómero), 93.21 (C1, α anómero), 78.38 (C5, β anómero), 77.25 (C4, β anómero), 76.12 (C4, α anómero), 75,42 (C2,C3, β anómero), 73.77 (C3,C5, α anómero), 72.95 (C2, α anómero). ESI-TOF m/z: Calculada de [M+H<sup>+</sup>] C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 267,0981, encontrada [M+H<sup>+</sup>]:267,0982.

# 5.17 Síntesis de (6S)-6-aril-L-fructosa (15) y (6S)-6-aril-L-tagatosa (16). Procedimiento general.

La dihidroxiacetona (4 mmol) fue disuelta en 50 mL de solución del (2S,3S)-3-aril-2,3-dihidroxipropanal (2 mmol en tampón borato de sodio 0,2 M pH 7,5). La reacción se inició por adición de RhuA nativa (46 U mL<sup>-1</sup>) en agitación magnética (250 rpm) a 25 °C. La formación de producto se monitorizó por HPLC utilizando un gradiente de elución de 0 % a 40 % de B en 30 minutos. La purificación de los productos se realizó de manera similar a los derivados de (6S)-6-C-aril-L-sorbosa. Después de la purificación los sólidos obtenidos fueron conservados a – 20 °C y caracterizados por RMN. Las propiedades físicas de los monosacáridos sintetizados se listan a continuación:

#### (6S)-6-C-Fenil-L-fructose (15a) y (6S)-6-C-Fenil-L-tagatose (16a).

forma piranósica. ESI-TOF m/z: Calculado de [M+Na<sup>+</sup>]

 $C_{12}H_{16}O_6Na$ : 279,0845 y [2M+Na<sup>+</sup>]  $C_{24}H_{32}O_{12}Na$ : 535,1791, encontrados [M+Na<sup>+</sup>]: 279,0846 y [2M+Na<sup>+</sup>]: 535,1795.

#### (6S)-6-C-fenil-α-L-fructopiranosa (15a:pirano)

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) 
$$\delta$$
 4.81 (d,  $J$  = 10.3 Hz, 1H), 4.04 (m, 1H), 3.97 (dd,  $J$  = 3.3, 0.5 Hz, 1H), 3.91 (m, 1H), 3.66 (d,  $J$  = 11.8 Hz, 1H), 3.28 (d,  $J$  = 11.6 Hz, 1H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  104.85 (C2), 71.03 (C4), 70.98 (C6), 68.16 (C3), 67.78 (C5), 63.94 (C1).

#### (6S)-6-C-fenil-β-L-fructofuranosa (11a:furano).

HO HO CH<sub>2OH</sub> 1H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) 
$$\delta$$
 4.68 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 1H), 4.16 (dd,  $J$  = 7.8, 6.8 Hz, 1H), 3.93 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 3.87 (dd,  $J$  = 6.8, 6.3 Hz, 1H), 3.37 (d,  $J$  = 10.9 Hz, 2H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  101.55 (C2), 83.04 (C5), 75.82 (C3), 75.78 (C4), 74.46 (C6), 62.34 (C1).

### (6S)-6-C-fenil- $\alpha$ -L-tagatopiranosa (12a:pirano)

J = 17.4 Hz, 1H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  98.31 (C2), 75.36 (C6) 70.98 (C5), 70.90 (C4), 69.83 (C3), 62.57 (C1).

### (6S)-6-C-fenil- $\beta$ -L-tagatofuranosa (12a:furano).

HO HO CH<sub>2</sub>OH 1H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) 
$$\delta$$
 4.72 (d,  $J$  = 5.5 Hz, H), 4.12 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 4.02 (m, 1H), 3.91 (m, 1H), 3.61 (d,  $J$  = 11.6 Hz, 1H), 3.34 (d,  $J$  = 8. Hz, 1H),  $\frac{13}{13}$ C PMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  98.55 (C2), 85.02 (C5)

17.8 Hz, 1H).  $^{13}$ C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  98.55 (C2), 85.03 (C5), 81.35 (C3), 76.77 (C4), 73.12 (C6), 63.91 (C1).

### (6S)-6-C-(3-clorofenil)-L-fructosa (11k) y (6S)-6-C-(3-clorofenil)-L-tagatosa (12k).

formada por un 54 % de **15k** y un 46 % de **16k** de acuerdo al procedimiento general. Rendimiento: 251,3 mg (sólido blanco 43 %), > 95 % pureza, determinado por HPLC; factores de retención,  $k_1 = 5,0$ ,  $k_2 = 5,4$ ;  $[\alpha]^{20}_D = -10,0$  (c = 5 en H<sub>2</sub>O). El compuesto **15k** existe como una mezcla en equilibrio con un 71 % de forma furanósica y un 29 % de forma piranósica. Por otro lado **16k** aparece como un 17 % en forma furanósica y un 83 % en forma piranósica. ESI-TOF m/z: Calculado de  $[M+Na^+]$  C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>ClO<sub>6</sub>Na: 313,0455 y  $[2M+Na^+]$  C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>12</sub>Na: 603,1012, encontradas  $[M+Na^+]$ : 313,0457 y  $[2M+Na^+]$ : 603,1010.

### (6S)-6-C-(3-clorofenil)-α-L-fructopiranosa (11k:pirano)

CI

H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) 
$$\delta$$
 4.79 (d,  $J = 10.3$  Hz, 1H), 4.02 (m, 1H), 3.89 (m, 1H), 3.86 (m, 1H), 3.63 (d,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 3.29 (d,  $J = 11.6$  Hz, 1H).  $^{13}$ C RMN (101 MHz,

D<sub>2</sub>O) δ 104.88 (C2), 72.99 (C4), 70.48 (C6), 68.14 (C3), 67.88 (C5), 63.87 (C1).

#### (6S)-6-C-(3-clorofenil)-β-L-fructofuranosa (11k:furano).

HO H CH<sub>2</sub>OH CH<sub>2</sub>OH 1H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) 
$$\delta$$
 4.68 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 1H), 4.14 (dd,  $J$  = 7.8, 6.8 Hz, 1H), 3.93 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 3.83 (dd,  $J$  = 6.8, 6.2 Hz, 1H), 3.37 (d,  $J$  = 9.4 Hz, 2H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  101.62 (C2), 82.89 (C5), 75.70 (C3), 75.66 (C4), 73.76 (C6), 62.30 (C1).

#### (6S)-6-C-(3-clorofenil)-α-L-tagatopiranosa (12k:pirano).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O) 
$$\delta$$
 4.53 (d,  $J = 9.8$  Hz, 1H), 3.90 (m, 2H), 3.69 (t,  $J = 9.4$  Hz, 1H), 3.43 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 3.38 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz,

 $D_2O$ )  $\delta$  98.60 (C2), 74.78 (C6), 71.11 (C5), 70.77 (C4), 69.80 (C3), 63.87 (C1).

#### (6S)-6-C-(3-clorofenil)-β-L-tagatofuranosa (12k:furano).

J = 7.7 Hz, 1H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  98.33 (C2), 84.83 (C5), 81.36 (C3), 76.63 (C4), 72.48 (C6), 62.57 (C1).

# 5.18 Síntesis química de dialdehídos ensayados como sustratos en la reacción de adición benzoínica intramolecular catalizada por BAL. a) n,n'-(alcano-1,m-diilbis(oxi))dibenzaldehídos.

A una solución del *n*-hidroxibenzaldehído correspondiente (16,0 mmol) en acetonitrilo (50 mL) anhidro se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4,4 g, 32.0 mmol). La reacción se mantuvo en agitación y reflujo bajo atmósfera de nitrógeno durante 1 h. Pasado este tiempo se adicionó el 1,*m*-dibromoalcano correspondiente (8,0 mmol) y se continuó la reacción hasta que no se detectó fenol por TLC (hexano:AcOEt 1:1, v/v) utilizando como revelador una solución de FeCl<sub>3</sub> (1 % m/v en H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH, 1:1 v/v). La mezcla de reacción fue enfriada a temperatura ambiente y se filtró para eliminar el exceso de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. El filtrado se absorbió en gel de sílice (40 g) y se purificó utilizando una cromatografía en columna de sílice (5.0 x 46.0 cm, 120 g de gel de sílice, Merck, 35-70 μm, 200-500 mesh). El producto fue eluído con un

gradiente escalonado de hexano:AcOEt: 100:0, 200 mL, 80:20, 200 mL, 65:35, 200 mL y 50:50, 1000 mL. Las fracciones que contenían el producto de interés fueron unidas y se concentraron por evaporación a vacío. Las propiedades físicas de los dialdehídos sintetizados se listan a continuación:

#### 4,4'-(propano-1,3-diilbis(oxi))dibenzaldehído (17ab).

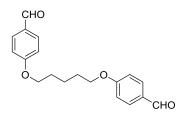
El compuesto fue obtenido de acuerdo al procedimiento general. Sólido blanco, 1,5 g, 63 %.  $^{1}$ H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.87 (s, 2H), 7.82 (m, 4H), 7.00 (m, 4H), 4.25 (t, J = 6.0 Hz,4H), 2.33 (p, J = 6.0 Hz, 2H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  190.72 (-CHO), 163.71 (C<sub>arom</sub>), 131.98 (C<sub>arom</sub>), 130.07 (C<sub>arom</sub>), 114.71 (C<sub>arom</sub>), 64.49 (-OCH<sub>2</sub>-), 28.94 (-CH<sub>2</sub>-).

#### 4,4'-(butano-1,4-diilbis(oxi))dibenzaldehído (17ac).

El compuesto fue obtenido de acuerdo al procedimiento general. Sólido blanco, 2,2 g, 92 %. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.87 (s, 2H), 7.81 (m, 4H), 6.97 (m, 4H), 4.12 (m,

4H), 2.02 (m, 4H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 190.73 (-CHO), 163.91 (Carom), 131.98 (Carom), 129.93 (Carom), 114.68 (Carom), 67.72 (-OCH<sub>2</sub>-), 25.77 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

#### 4,4'-(pentano-1,5-diilbis(oxi))dibenzaldehído (17ad).



El compuesto fue obtenido de acuerdo al procedimiento general. Sólido blanco, 2,3 g, 90 %. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.86 (s, 2H), 7.81 (m, 4H), 6.98 (m, 4H), 4.07 (t, J = 6.3 Hz, 4H), 1.89 (m, 4H), 1.68 (m, 2H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  190.74 (-CHO), 164.03 (C<sub>arom</sub>), 131.96 (C<sub>arom</sub>), 129.85 (C<sub>arom</sub>), 114.68 (C<sub>arom</sub>), 68.03 (-OCH<sub>2</sub>-), 28.77 (-CH<sub>2</sub>-), 22.65 (-CH<sub>2</sub>-).

#### 4,4'-(hexano-1,6-diilbis(oxi))dibenzaldehído (17ae).

El compuesto fue obtenido de acuerdo al procedimiento general. Sólido blanco, 2,5 g, 95 %.  $^{1}$ H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.86 (s, 2H), 7.81 (m, 4H), 6.97 (m, 4H), 4.04 (t, J = 6.4 Hz, 4H), 1.84 (m, 4H), 1.55 (m, 4H).  $^{13}$ C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  190.73 (-CHO), 164.10 (C<sub>arom</sub>), 131.95 (C<sub>arom</sub>), 129.81 (C<sub>arom</sub>), 114.69 (C<sub>arom</sub>), 68.14 (-OCH<sub>2</sub>-), 28.96 (-CH<sub>2</sub>-), 25.75 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

#### 4,4'-(heptano-1,7-diilbis(oxi))dibenzaldehído (17af).



68.25 (-OCH<sub>2</sub>-), 28.98 (-CH<sub>2</sub>-), 25.89 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

#### 3,3'-(propano-1,3-diilbis(oxi))dibenzaldehído (17bb).

CHO El compuesto fue obtenido de acuerdo al procedimiento general. Sólido blanco, 2,0 g, 88 %. Los datos de espectroscopia RMN se corresponden con los reportados en la literatura. HRMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.95 (s, 2H), 7.42 (m, 6H), 7.17 (dt, J = 6.5, 2.7 Hz, 2H), 4.22 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 2.30 (p, J = 6.1 Hz, 2H). HZC RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  192.05 (-CHO), 159.34 (C<sub>arom</sub>), 137.77 (C<sub>arom</sub>), 130.06

 $(C_{arom})$ , 123.64  $(C_{arom})$ , 121.91  $(C_{arom})$ , 112.64  $(C_{arom})$ , 64.49  $(-OCH_2-)$ , 29.04  $(-CH_2-)$ .

## 3,3'-(butano-1,4-diilbis(oxi))dibenzaldehído (17bc).

СНО

El compuesto fue obtenido de acuerdo al procedimiento general. Sólido blanco, 2,0 g, 85 %. Los datos de espectroscopia

RMN se corresponden con los reportados en la literatura. <sup>196</sup> <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.96 (s, 2H), 7.41 (m, 6H), 7.16 (dt, J = 6.3, 2.8 Hz, 2H), 4.09 (m, 4H), 2.01 (m, 4H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  192.09 (-CHO), 159.48 (C<sub>arom</sub>), 137.77 (C<sub>arom</sub>), 130.03 (C<sub>arom</sub>), 123.51 (C<sub>arom</sub>), 121.89 (C<sub>arom</sub>), 112.65 (C<sub>arom</sub>), 67.67 (-OCH<sub>2</sub>-), 25.84 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

### 3,3'-(pentano-1,5-diilbis(oxi))dibenzaldehído (17bd).

СНО

El compuesto fue obtenido de acuerdo al procedimiento general. Sólido blanco, 2,2 g, 86 %. Los datos de espectroscopia RMN

se corresponden con los reportados en la literatura. <sup>196</sup> <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.95 (s, 2H), 7.40 (m, 6H), 7.16 (dt, J = 5.8, 2.8 Hz, 2H), 4.04 (t, J = 6.3 Hz, 4H), 1.89 (m, 4H), 1.68 (m, 2H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  192.16 (-CHO), 159.56 (C<sub>arom</sub>), 137.75 (C<sub>arom</sub>), 130.00 (C<sub>arom</sub>), 123.45 (C<sub>arom</sub>), 121.93 (C<sub>arom</sub>), 112.65 (C<sub>arom</sub>), 67.97 (-OCH<sub>2</sub>-), 28.84 (-CH<sub>2</sub>-), 22.68 (-CH<sub>2</sub>-).

## 3,3'-(hexano-1,6-diilbis(oxi))dibenzaldehído (17be).

El compuesto fue obtenido de acuerdo al procedimiento general. Sólido blanco, 1.,5 g, 56 %. Los

datos de espectroscopia RMN se corresponden con los reportados en la literatura. <sup>210</sup> H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.95 (s, 2H), 7.40 (m, 6H),

7.15 (dddd, J = 5.8, 3.4, 2.3, 1.0 Hz, 2H), 4.02 (t, J = 6.4 Hz, 4H), 1.83 (p, J = 6.7 Hz, 4H), 1.55 (m, 4H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  192.15 (-CHO), 159.61 (C<sub>arom</sub>), 137.75 (C<sub>arom</sub>), 129.98 (C<sub>arom</sub>), 123.38 (C<sub>arom</sub>), 121.92 (C<sub>arom</sub>), 112.66 (C<sub>arom</sub>), 68.06 (-OCH<sub>2</sub>-), 29.03(-CH<sub>2</sub>-), 25.78 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

## 2,2'-(etano-1,2-diilbis(oxi))dibenzaldehído (17ca).

El compuesto fue obtenido de acuerdo al procedimiento general. Aceite amarillo, 673,3 mg; 31 %. Los datos de espectroscopia RMN se corresponden con los reportados en la literatura. <sup>195</sup> H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.42 (s, 2H), 7.83 (ddd, J = 7.7, 1.9, 0.5 Hz, 2H), 7.56 (ddd, J = 8.4, 7.4, 1.8 Hz, 2H), 7.05 (m, 4H), 4.52 (s, 4H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  189.27 (-CHO), 160.67 (C<sub>arom</sub>), 135.87 (C<sub>arom</sub>), 128.66 (C<sub>arom</sub>), 125.19 (C<sub>arom</sub>), 121.47 (C<sub>arom</sub>), 112.67 (C<sub>arom</sub>), 66.99 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

## 2,2'-(propano-1,3-diilbis(oxi))dibenzaldehído (17cb).

El compuesto fue obtenido de acuerdo al procedimiento general. Sólido blanco, 1,6 g; 70 %. Los datos de espectroscopia RMN se corresponden con los reportados en la literatura. <sup>195</sup> H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.48 (s, 2H), 7.81 (dd, J = 7.7, 1.8 Hz, 2H), 7.53 (ddd, J = 8.4, 7.3, 1.9 Hz, 4H), 7.01 (m, 2H), 4.31 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 2.41 (p, J = 6.0 Hz, 2H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  189.39 (-CHO), 160.90 (C<sub>arom</sub>), 136.01 (C<sub>arom</sub>), 128.67 (C<sub>arom</sub>), 124.84 (C<sub>arom</sub>), 120.95 (C<sub>arom</sub>), 112.37 (C<sub>arom</sub>), 64.60 (-OCH<sub>2</sub>-), 29.07 (-CH<sub>2</sub>-).

## 2,2'-(butano-1,4-diilbis(oxi))dibenzaldehído (17cc).

El compuesto fue obtenido de acuerdo al procedimiento general. Sólido blanco, 2,7 g; 97 %. Los datos de espectroscopia RMN se corresponden con los reportados en la literatura. HRMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.48 (s, 2H), 7.81 (dd, J = 7.7, 1.8 Hz, 2H), 7.52 (ddd, J = 8.4, 7.3, 1.8 Hz, 2H), 7.00 (m, 4H), 4.18 (m, 4H), 2.09 (m, 4H).  $^{13}$ C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  189.51 (-CHO), 161.11 (C<sub>arom</sub>), 135.94 (C<sub>arom</sub>), 128.51 (C<sub>arom</sub>), 124.85 (C<sub>arom</sub>), 120.74 (C<sub>arom</sub>), 112.33 (C<sub>arom</sub>), 67.82 (-OCH<sub>2</sub>-), 25.90 (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

### b) 2,2'-(propane-1,3-diilbis(oxi))bis(3-metoxibenzaldehído) (24a).

El compuesto se obtuvo de acuerdo al procedimiento general descrito para los n,n'- (alcano-1,m-diilbis(oxi))dibenzaldehído utilizando como aldehído aromático 2-hidroxi-3-metoxibenzaldehído. Sólido blanco, 1,4 g, 63 %.  $^{1}$ H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.44 (s, 2H), 7.40 (dd, J = 6.6, 2.8 Hz, 2H), 7.13 (m, 4H), 4.36 (t, J = 6.2 Hz, 4H), 3.87 (s, 6H), 2.30 (p, J = 6.2 Hz, 2H).  $^{13}$ C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  190.15 (-CHO), 152.95 (C<sub>arom</sub>), 151.58 (C<sub>arom</sub>), 129.87 (C<sub>arom</sub>), 124.10 (C<sub>arom</sub>), 119.21 (C<sub>arom</sub>), 118.02 (C<sub>arom</sub>), 71.42 (-OCH<sub>2</sub>-), 56.00 (-OCH<sub>3</sub>), 30.88 (-CH<sub>2</sub>-).

### c) 2,2'-(propane-1,3-diilbis(oxi))bis(4-metoxibenzaldehído) (24b).

4-metoxibenzaldehído. Sólido blanco, 2,0 g, 88 %.  $^{1}$ H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.29 (s, 2H), 7.78 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.54 (ddd, J = 8.7,

2.3, 0.8 Hz, 2H), 6.44 (d, J = 2.2 Hz, 2H), 4.26 (t, J = 5.9 Hz, 4H), 3.84 (s, 6H), 2.39 (p, J = 5.9 Hz, 2H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  187.90 (-CHO), 166.16 (C<sub>arom</sub>), 162.68 (C<sub>arom</sub>), 130.73 (C<sub>arom</sub>), 118.97 (C<sub>arom</sub>), 106.19 (C<sub>arom</sub>), 98.55 (C<sub>arom</sub>), 64.52 (-OCH<sub>2</sub>-), 55.63 (-OCH<sub>3</sub>), 28.93 (-CH<sub>2</sub>-).

## d) 6,6'-(propano-1,3-diilbis(oxi))bis(3-metoxibenzaldehído) (24c).

El compuesto se obtuvo de acuerdo СНО CHO al procedimiento general descrito n.n'-(alcano-1.mpara los H<sub>2</sub>CO diilbis(oxi))dibenzaldehídos utilizando como aldehído aromático 2hidroxi-5-metoxibenzaldehído. Sólido blanco, 1,6 g, 72 %. H RMN  $(400 \text{ MHz}, \text{CDCl}_3) \delta 10.44 \text{ (s, 2H)}, 7.30 \text{ (d, } J = 3.2 \text{ Hz, 2H)}, 7.11 \text{ (dd, } J$ = 9.0, 3.3 Hz, 2H), 6.94 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 4.25 (t, J = 6.0 Hz, 4H),3.78 (s, 6H), 2.35 (p, J = 6.0 Hz, 2H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 189.15 (-CHO), 155.75 (C<sub>arom</sub>), 153.79 (C<sub>arom</sub>), 125.08 (C<sub>arom</sub>), 123.52 (C<sub>arom</sub>), 114.28 (C<sub>arom</sub>), 110.48 (C<sub>arom</sub>), 65.35 (-OCH<sub>2</sub>-), 55.79 (-OCH<sub>3</sub>), 29.28 (-CH<sub>2</sub>-).

### e) 6,6'-(propano-1,3-diilbis(oxi))bis(2-metoxibenzaldehído) (24d).

El compuesto se obtuvo de acuerdo al procedimiento general descrito para los n,n'-(alcano-1,m-diilbis(oxi))dibenzaldehídos utilizando como aldehído aromático 2-hidroxi-6-metoxibenzaldehído. Sólido blanco, 765,0 mg, 68 %.  $^{1}$ H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.48 (s, 2H), 7.41 (t, J = 8.4 Hz, 2H), 6.58 (m, 4H), 4.27 (t, J = 5.9 Hz, 4H), 3.86 (s, 6H), 2.32 (p, J = 5.9 Hz, 2H).  $^{13}$ C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  189.14 (-CHO), 161.95 (C<sub>arom</sub>), 161.48 (C<sub>arom</sub>), 135.94 (C<sub>arom</sub>), 114.40 (C<sub>arom</sub>), 104.84 (C<sub>arom</sub>), 103.88 (C<sub>arom</sub>), 64.92 (-OCH<sub>2</sub>-), 56.01 (-OCH<sub>3</sub>), 28.98 (-CH<sub>2</sub>-).

## f) 2,2'-(propano-1,3-diilbis(oxi))bis(1-naftaldehído) (26)

El compuesto se obtuvo de acuerdo al procedimiento general descrito para los n,n'-(alcano-1,m-diilbis(oxi))dibenzaldehídos utilizando como aldehído aromático 2-hidroxi-1-naftalaldehído. Sólido blanco, 763,7 mg, 34 %.  $^{1}$ H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.94 (s, 2H), 9.23 (dq, J = 8.7, 0.8 Hz, 2H), 8.05 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 7.76 (m, 2H), 7.61 (ddd, J = 8.6, 6.9, 1.4 Hz, 2H), 7.41 (ddd, J = 8.1, 6.9, 1.1 Hz, 2H), 7.30 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 4.49 (t, J = 5.9 Hz, 4H), 2.49 (p, J = 5.9 Hz, 2H).  $^{13}$ C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  191.50 (-CHO), 163.01 (C<sub>arom</sub>), 137.72 (C<sub>arom</sub>), 131.49 (C<sub>arom</sub>), 129.95 (C<sub>arom</sub>), 128.63 (C<sub>arom</sub>), 128.25 (C<sub>arom</sub>), 124.91 (C<sub>arom</sub>), 124.85 (C<sub>arom</sub>), 116.85 (C<sub>arom</sub>), 113.22 (C<sub>arom</sub>), 65.61 (-OCH<sub>2</sub>-), 29.52 (-CH<sub>2</sub>-).

## g) 2,2'-(propano-1,3-diilbis(oxi))bis(3-clorobenzaldehído) (28).

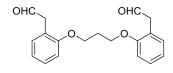
El compuesto se obtuvo de acuerdo al procedimiento general descrito para los n,n'- (alcano-1,m-diilbis(oxi))dibenzaldehídos utilizando como aldehído aromático 3-cloro-2-hidroxibenzaldehído. Sólido blanco, 691,0 mg, 61 %.  $^{1}$ H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10,37 (s, 2H), 7,75 (dd, J = 7,8; 1,7 Hz, 2H), 7,63 (dd, J = 7,9; 1,7 Hz, 2H), 7,19 (td, J = 7,8; 0,8 Hz, 2H), 4,36 (t, J = 6,2 Hz, 4H), 2,45 (p, J = 6,3 Hz, 2H).  $^{13}$ C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  188,89 (-CHO), 157,79 (C<sub>arom</sub>), 136,38 (C<sub>arom</sub>), 130,92 (C<sub>arom</sub>), 128,82 (C<sub>arom</sub>), 127,34 (C<sub>arom</sub>), 125,21 (C<sub>arom</sub>), 72,71 (-OCH<sub>2</sub>-), 30,59 (-CH<sub>2</sub>-).

#### h) 2,2'-(propano-1,3-diilbis(sulfanodiil))dibenzaldehído (31).

CHO CHO A una solución de 2-mercaptobencilalcohol (1,5 g, 11,0 mol) en acetonitrilo anhidro (50 mL) se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,5 g 11,0 mmol). La reacción se mantuvo en

agitación bajo atmósfera de nitrógeno y temperatura ambiente durante 1 h. Posteriormente se adicionó 1,3-dibromopropane (538,0 µL 5,5 mmol) y se continuó la reacción durante 12 h. Pasado este tiempo se monitorizó la formación de producto por TLC (hexano:AcOEt 1:1, v/v) y el compuesto se purificó de manera similar a los productos anteriores. El dialcohol 30 se obtuvo como un aceite incoloro (1,3 g, 73 %). Los datos de espectroscopia RMN se corresponden con los reportados en la literatura.<sup>211</sup> H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (7.33, 8H), 4.72 (s, 4H), 3.00 (t, J = 7.0 Hz, 4H), 1.92 (p, J = 7.1 Hz, 4H), El 2.2'-((propano-1.3diilbis(sulfanodiil))bis(2,1-fenilen))bis(etan-1-ol) (30) (1,1 g 3,3 mmol) fue disuelto en cloroformo (120 mL) y se añadió MnO<sub>2</sub> (12,8 g, 147,4 mmol). La reacción se agitó a reflujo por 48 h. Pasado este tiempo se enfrió a temperatura ambiente, se filtró en un lecho de Celite<sup>®</sup> y se lavó con cloroformo caliente (3 x 100 mL). La solución se concentró a vacío obteniéndose el dialdehído (líquido viscoso de color rojo, 581,3 mg, 56 %) el cual fue utilizado sin pasos adicionales de purificación. Los datos de espectroscopia RMN se corresponden con los reportados en la literatura. H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.34 (s, 2H), 7.81 (dd, J =7.7, 1.6 Hz, 2H), 7.47 (m, 2H), 7.38 (dd, J = 8.1, 1.2 Hz, 2H), 7.29 (td, J = 7.5, 1.1 Hz, 2H), 3.10 (t, J = 7.0 Hz, 4H), 2.07 (p, J = 7.0 Hz, 2H).  $^{13} C$  RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  191.39 (-CHO), 140.96 (C $_{arom}$ ), 134.06 (C<sub>arom</sub>), 133.97 (C<sub>arom</sub>), 132.38 (C<sub>arom</sub>), 128.15 (C<sub>arom</sub>), 125.58 (C<sub>arom</sub>), 31.93 (-SCH<sub>2</sub>-), 27.24 (-CH<sub>2</sub>-).

## i) 2,2'-((propano-1,3-diilbis(oxi))bis(2,1-fenilen))diacetaldehído(34).



A una solución de 2-(2-hidroxietil)fenol (1,7 mL, 14,5 mmol) en acetonitrilo (50 mL) anhidro se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4,0 g, 29,0 mmol).

La reacción se mantuvo en agitación a reflujo y atmósfera de nitrógeno durante 1 h. Pasado este tiempo se adicionó 1,3-dibromopropano (734,3 μL, 7,2 mmol) y la reacción se continuó de manera similar al procedimiento general de síntesis descrito para los n,n'-(alcano-1,mdiilbis(oxi))dibenzaldehidos. El 2,2'-((propano-1,3-diilbis(oxi))bis(2,1fenilen))bis(etan-1-ol) (33) se obtuvo como un aceite amarillo (1,4 g) con un 62 % de rendimiento de producto aislado. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.17 (m, 4H), 6.89 (m, 4H), 4.18 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 3.79 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 4H, 4H = 6.5 Hz, 4H), 2.88 (t, J = 6.5 Hz, 4H), 2.30 (p, J = 6.0 Hz, 2H). Posteriormente 33 (1,4 g, 4,5 mmol) fue disuelto en AcOEt (150 mL) y se añadió ácido 2-iodoxibenzoico (IBX 7,5 g, 26,7 mmol). La reacción se mantuvo en agitación y reflujo durante 6 h. pasado este tiempo se enfrió a temperatura ambiente, se filtró, se lavó la fase orgánica con una solución NaHCO<sub>3</sub> 10 % (3 x 50 mL) y se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Después de concentrar a vacío se obtuvo el producto 34 como un aceite amarillo (1.3 g, 94 %) y fue utilizado sin pasos adicionales de purificación. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.64 (t, J = 2.3 Hz, 2H), 7.27 (m, 2H), 7.14 (m, 2H), 6.93 (m, 4H), 4.13 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 3.60 (d, J = 2.2 Hz, 4H), 2.22 (p, J = 6.0 Hz, 2H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  200.19 (-CHO), 156.82 (C<sub>arom</sub>), 131.34 (C<sub>arom</sub>), 129.08 (C<sub>arom</sub>), 121.17 (C<sub>arom</sub>), 120.94 (C<sub>arom</sub>), 111.24 (C<sub>arom</sub>), 64.29 (-OCH<sub>2</sub>-), 45.67 (-CH<sub>2</sub>CHO), 29.16 (-CH<sub>2</sub>-).

## j) 6,6'-(propano-1,3-diilbis(oxi))bis(3-clorobenzaldehído) (51a).

A una solución de ácido 5-cloro-2hidroxibenzoico (5.0 g, 29 mmol) en metanol (100 mL) a - 80 °C se le

adicionó lentamente SOCl<sub>2</sub> (10,6 mL, 144,9 mmol). Después de agitar la reacción durante 12 h a temperatura ambiente se concentró a vacío. Posteriormente se añadió una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> (100 ml) y el pH fue ajustado a 9,5 con NaOH (1 M). La solución acuosa fue extraída con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 mL) y las fases orgánicas se unieron y secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Después de concentrar a vacío quedó un sólido blanco, 5-cloro-2-hidroxibenzoato de metilo (48a) (4,7 g, 87 %). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.65 (s, 1H, -OH), 7.78 (dd, J = 2.7, 0.4Hz, 1H), 7.38 (ddd, J = 8.9, 2.7, 0.5 Hz, 1H), 6.91 (dd, J = 8.9, 0.4 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H). El éster **48a** (2,0 g, 10,7 mmol) se disolvió en THF anhidro (50 mL) y se añadió 1,3-propanodiol (388,4 µL, 5,4 mmol), ntributilfosfina (5,4 mL, 21,4 mmol) y azodicarboxilato dimorfolina<sup>200</sup> (4,1 g 16,1 mmol) en agitación y bajo atmósfera de nitrógeno. Después de 12 h la reacción se filtró y el filtrado se absorbió sobre gel de sílice (40 g) y se purificó utilizando una cromatografía en columna de gel de sílice (5.0 x 46.0 cm, 120 g de gel de sílice, Merck, 35-70 um, 200-500 mesh). Los productos fueron eluidos con un gradiente of hexano:Et<sub>2</sub>O: 100:0, 200 mL, 90:10, 200 mL, 65:35, 200 mL, 50:50, 200 mL v 0:100, 1000 mL. Las fracciones con el producto fueron unidas y se obteniéndose el concentraron vacío 6,6'-(propano-1,3diilbis(oxi))bis(3-clorobenzoato de metilo) (49a) como un sólido blanco (1.6 g 70 %). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.73 (d, J = 2.7 Hz, 2H), 7.37 (dd, J = 8.9, 2.7 Hz, 2H), 6.95 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 4.25 (t, J =5.9 Hz, 4H), 3.82 (s, 6H), 2.31 (p, 2H). El diéster obtenido anteriormente (1,6 g, 3,8 mmol) se disolvió en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) y se añadió hidruro de diisobutilaluminio (DIBAL-H) en tolueno (1 mol L<sup>-</sup>  $^{1}$ , 30 mL, 30 mmol) a - 80 °C. Después de 4 h la mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente y se añadió lentamente una solución saturada de NH<sub>4</sub>Cl (200 mL). La emulsión formada se filtró a través de un lecho de gel de sílice v se lavó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 100 mL). Seguidamente la fase orgánica fue separada y se extrajo la fase acuosa con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 50 mL). Una vez unidas las fases orgánicas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentró a vacío obteniéndose el ((propano-1,3diilbis(oxi))bis(5-cloro-2,1-fenilen)) dimetanol (50a) como un sólido blanco (1,1 g, 79 %). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.31 (dt, J =2.7, 1.0 Hz, 2H), 7.19 (dd, J = 8.7, 2.8 Hz, 2H), 6.95 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.43 (s, 4H), 4.10 (t, J = 6.1 Hz, 4H), 2.12 (p, J = 6.1 Hz, 2H). E1 dialcohol 50a (1,1 g, 3,0 mmol) fue oxidado con ácido 2iodoxybenzoico (IBX) (5,0 g, 17,8 mmol) de manera similar a como se describió para el compuesto 33. El producto final, 51a, se obtuvo como un sólido amarillo con un 54 % de rendimiento (988,7 mg). Este dialdehído se utilizó sin pasos adicionales de purificación. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.28 (s, 2H), 7.65 (dd, J = 8.9, 2.8 Hz, 2H), 7.57 (d, J = 2.8 Hz, 2H), 7.29 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 4.32 (t, J = 6.1 Hz, 4H), 2.28 (p, J = 6.1 Hz, 2H).

#### k) 6,6'-(propano-1,3-diilbis(oxi))bis(3-bromobenzaldehído) (51b).

El compuesto (sólido de color blanco, 1,5 g, 47 %) se obtuvo siguiendo el procedimiento general descrito para **51a** 

partiendo del ácido-5-bromo-2-hidroxibenzoico.  $^{1}$ H RMN (400 MHz, DMSO- $d_{6}$ )  $\delta$  10.26 (s, 2H), 7.77 (dd, J = 8.9, 2.7 Hz, 2H), 7.69 (d, J =

2.6 Hz, 2H), 7.24 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 4.32 (t, J = 6.1 Hz, 4H), 2.27 (p, J = 6.1 Hz, 2H).

## l) 1,1'-(propano-1,3-diilbis(oxi))bis(2-naftalaldehído) (42).

El compuesto (sólido de color amarillo, 729,5 CHO CHO mg, 38 %) se obtuvo siguiendo el procedimiento general descrito para 51a partiendo del ácido 1-hidroxi-2-naftoico. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.61 (s, 2H), 8.25 (ddd, J = 8.4, 1.4, 0.7 Hz, 2H), 7.87 (dd, J = 8.2, 3.2 Hz, 4H), 7.62 (m, 6H), 4.54 (t, J = 6.3 Hz, 4H), 2.64 (p, J = 6.3 Hz, 2H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 189.42 (-CHO), 161.16 (C<sub>arom</sub>), 138.07 (C<sub>arom</sub>), 129.44 (C<sub>arom</sub>), 128.45 (C<sub>arom</sub>), 127.96 (C<sub>arom</sub>), 126.98 (C<sub>arom</sub>), 124.95 (C<sub>arom</sub>), 124.84 (C<sub>arom</sub>), 123.10 (C<sub>arom</sub>), 122.94 (C<sub>arom</sub>), 75.06 (-OCH<sub>2</sub>-), 31.12 (-CH<sub>2</sub>-).

## m) 3,3'-(propano-1,3-diilbis(oxi))bis(tiofeno-2-carbaldehído) (46).

El compuesto (sólido de color rojo, 369,3 mg, 20 %) se obtuvo siguiendo el procedimiento general descrito para **51a** partiendo del 3-hidroxitiofeno-2-carboxilato de metilo.  $^{1}$ H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.98 (s, 2H), 7.63 (dd, J = 5.4, 1.2 Hz, 2H), 6.85 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 4.35 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 2.33 (p, J = 6.0 Hz, 2H).  $^{13}$ C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  180.90 (-CHO), 163.76 (C<sub>arom</sub>), 135.29 (C<sub>arom</sub>), 121.66 (C<sub>arom</sub>), 116.12 (C<sub>arom</sub>), 67.61 (-OCH<sub>2</sub>-), 29.30 (-CH<sub>2</sub>-).

#### n) 2,2'-((2-metilpropano-1,3-diil)bis(oxi))dibenzaldehído (38).

El compuesto (sólido de color rojo, 648,0 mg, 22 %) se obtuvo siguiendo el procedimiento general descrito para **51a** partiendo del 2-hidroxibenzoato de metilo y metil-1,3-propanodiol.  $^{1}$ H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.49 (s, 2H), 7.81 (dd, J = 7.7, 1.8 Hz, 2H), 7.53 (ddd, J = 8.4, 7.4, 1.9 Hz, 2H), 7.01

(m, 4H), 4.16 (d, J = 6.1 Hz, 4H), 2.60 (dt, J = 12.3, 6.2 Hz, 1H), 1.26 (d, J = 7.0 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  189.30 (-CHO), 161.00 (C<sub>arom</sub>), 136.03 (C<sub>arom</sub>), 128.65 (C<sub>arom</sub>), 124.89 (C<sub>arom</sub>), 120.92 (C<sub>arom</sub>), 112.39 (C<sub>arom</sub>), 69.60 (-OCH<sub>2</sub>-), 33.72 (-CH<sub>2</sub>-), 14.06 (-CH<sub>3</sub>).

## o) 2-((3-(2-formilfenoxi)propil)tio)benzaldehído (55).

A una solución de 2-hidroxibenzoato de metilo CHO (1,7 mL, 13,2 mmol) en THF anhidro (50 mL) se añadió 1,3-propanadiol (1,4 mL, 19,7 mmol), n-tributilfosfina (3,9 mL, 15,8 mmol) y azodicarboxilato dimorfolina (4,0 g, 15,8 mmol) en agitación y bajo atmósfera de nitrógeno. La reacción se continuó de manera similar a síntesis de 49a y se obtuvo el 2-(3hidroxipropoxi)benzoato de metilo (52) como un aceite incoloro (2,0 g, 74 %). Este intermediario sintético fue utilizado en la síntesis de otros dialdehídos asimétricos. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.89 (ddd, J =7.8, 1.8, 0.4 Hz, 1H), 7.47 (ddd, J = 8.4, 7.4, 1.8 Hz, 1H), 6.97 (m, 2H), 4.21 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 3.89 (t, J = 5.0 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 2.10 (m, 2H). El producto 52 (1,2 g, 5,5 mmol) se disolvió en THF anhidro (50 mL) y a esta solución se le añadió 2-mercaptobenzoato de metilo (1,0 g, 6,0 mmol), n-tributilfosfina (1,6 mL, 6,6 mmol) y azodicarboxilato dimorfolina (1,7 g, 6,8 mmol) en agitación y bajo atmósfera de nitrógeno. La reacción se continuó de manera similar a síntesis de 49a y se obtuvo el 2-((3-(2-(metoxicarbonil)fenoxi)propil)tio)benzoato de metilo (53) como un aceite incoloro (1,6 g, 80 %). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.93 (m, 1H), 7.78 (dd, J = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.42 (m, 3H), 7.13 (ddd, J = 7.8, 5.9, 2.5 Hz, 1H), 6.95 (m, 2H), 4.16 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.21 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.22 (ddd, J =12.7, 7.2, 5.9 Hz, 2H). La reducción de 53 (1,6 g 4,4 mmol) se realizó de manera similar a la síntesis del dialcohol (50a). El producto se obtuvo como un aceite incoloro, 1,1 g, 84 %. H RMN (400 MHz,CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.38 (m, 2H), 7.24 (m, 4H), 6.93 (td, J = 7.4, 1.0 Hz, 1H), 6.84 (m, 1H), 4.76 (s, 2H), 4.66 (s, 2H), 4.12 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 3.12 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.28 (s, 2H (-OH)), 2.14 (tt, J = 7.0, 5.8 Hz, 1H). El (2-((3-(2-(hidroximetil)fenoxi)propil)tio)fenil)metanol (1,1 g 3,7 mmol) se oxidó con MnO<sub>2</sub> (14,4 g, 165,6 mmol) de manera similar a la oxidación del dialcohol 30. El dialdehído 55 (sólido de color rojo, 288,1 mg; 26 %) fue utilizado sin etapas adicionales de purificación. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.48 (s, 1H), 10.35 (s, 1H), 7.82 (m, 2H), 7.49 (m, 3H), 7.30 (td, J = 7.3, 1.2 Hz, 1H), 7.02 (tt, J = 7.5, 0.9 Hz, 1H), 6.95 (m, 1H), 4.21 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 3.19 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.25 (tt, J = 7.0, 5.8 Hz, 2H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCI<sub>3</sub>)  $\delta$  191.41(-CHO) 189.40 (-CHO) 160.86 (C<sub>arom</sub>), 141.11 (C<sub>arom</sub>), 135.94 (C<sub>arom</sub>), 134.03 (C<sub>arom</sub>), 133.99 (C<sub>arom</sub>), 132.52 (C<sub>arom</sub>), 128.66 (C<sub>arom</sub>), 127.91  $(C_{arom})$ , 125.52  $(C_{arom})$ , 124.86  $(C_{arom})$ , 120.93  $(C_{arom})$ , 112.36  $(C_{arom})$ , 66.46 (-OCH<sub>2</sub>-), 29.57 (-SCH<sub>2</sub>-), 28.27 (-CH<sub>2</sub>-).

## p) 3-(3-(2-formilfenoxi)propoxi)tiofeno-2-carbaldehído (58).

El compuesto (sólido de color amarillo, 667,5 mg, 30 %) se obtuvo siguiendo el procedimiento general descrito para 55 utilizando 3-hidroxitiofeno-2-carboxilato de metilo (la etapa de oxidación se realizó con IBX).  $^{1}$ H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.46 (s, 1H), 9.98 (s, 1H), 7.81 (m, 1H), 7.62 (dd, J = 5.4, 1.2 Hz, 1H), 7.54 (ddd, J = 8.4, 7.3, 1.9 Hz, 1H), 7.02 (m, 2H), 6.86 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 4.39 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 4.28 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 2.37 (p, J = 6.0 Hz, 2H).  $^{13}$ C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  189.34 (-CHO), 180.98 (-CHO), 163.91 (C<sub>arom</sub>), 160.78 (C<sub>arom</sub>), 136.02 (C<sub>arom</sub>), 135.24 (C<sub>arom</sub>), 128.86 (C<sub>arom</sub>), 124.84 (C<sub>arom</sub>),

121.61 (C<sub>arom</sub>), 121.03 (C<sub>arom</sub>), 116.17 (C<sub>arom</sub>), 112.35 (C<sub>arom</sub>), 67.93 (-OCH<sub>2</sub>-), 64.30 (-OCH<sub>2</sub>-), 29.18 (-OCH<sub>2</sub>-).

## q) 5-cloro-2-(3-(2-formilfenoxi)propoxi)benzaldehído (61a).

El compuesto (sólido de color amarillo, 1,2 g, 78 %) se obtuvo siguiendo el procedimiento general descrito para 55 utilizando el éster

metílico **48a** (la etapa de oxidación se realizó con IBX).  $^{1}$ H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10.47 (s, 1H), 10.40 (s, 1H), 7.80 (m, 2H), 7.51 (m, 2H), 7.00 (m, 3H), 4.30 (td, J = 6.0, 2.6 Hz, 4H), 2.41 (p, J = 6.0 Hz, 2H).  $^{13}$ C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 189.33 (-CHO), 188.03 (-CHO), 160.78 (C<sub>arom</sub>), 159.34 (C<sub>arom</sub>), 136.01 (C<sub>arom</sub>), 135.48 (C<sub>arom</sub>), 128.84 (C<sub>arom</sub>), 128.16 (C<sub>arom</sub>), 126.65 (C<sub>arom</sub>), 125.67 (C<sub>arom</sub>), 124.84 (C<sub>arom</sub>), 121.04 (C<sub>arom</sub>), 114.04 (C<sub>arom</sub>), 112.34 (C<sub>arom</sub>), 65.12 (-OCH<sub>2</sub>-), 64.46 (-OCH<sub>2</sub>-), 29.00 (-CH<sub>2</sub>-).

## r) 5-bromo-2-(3-(2-formilfenoxi)propoxi)benzaldehído (61b).

El compuesto (sólido de color amarillo, 1,4 g, 58 %) se obtuvo siguiendo el procedimiento general descrito para 55

utilizando el éster metílico **48b** (la etapa de oxidación se realizó con IBX).  $^{1}$ H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.46 (s, 1H), 10.38 (s, 1H), 7.90 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.81 (dd, J = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.61 (dd, J = 8.9, 2.6 Hz, 1H), 7.53 (ddd, J = 8.4, 7.4, 1.9 Hz, 1H), 7.01 (m, 2H), 6.91 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 4.30 (td, J = 6.0, 1.8 Hz, 4H), 2.41 (p, J = 6.0 Hz, 2H).  $^{13}$ C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  189.33 (-CHO), 187.92 (-CHO), 160.77 (C<sub>arom</sub>), 159.80 (C<sub>arom</sub>), 138.35 (C<sub>arom</sub>), 136.02 (C<sub>arom</sub>), 131.18 (C<sub>arom</sub>), 128.85 (C<sub>arom</sub>), 126.07 (C<sub>arom</sub>), 124.84 (C<sub>arom</sub>), 121.04 (C<sub>arom</sub>), 114.45 (C<sub>arom</sub>), 113.74 (C<sub>arom</sub>), 112.34 (C<sub>arom</sub>), 65.08 (-OCH<sub>2</sub>-), 64.45 (-OCH<sub>2</sub>-), 28.99 (-CH<sub>2</sub>-).

## s) 2-(3-(2-formilfenoxi)propoxi)nicotinaldehído (67).

CHO La esterificación del ácido 2-hidroxinicotínico (5,0 g, 36,0 mmol) se realizó en metanol (100 mL) utilizando SOCl<sub>2</sub> (13,1 mL, 179,7 mmol)

de manera similar a la síntesis de 48a. De esta manera se obtuvo el 2hidroxinicotinato de metilo (63) como un sólido de color blanco (3,6 g, 65 %). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.26 (dd, J = 7.3, 2.2 Hz, 1H), 7.76 (dd, J = 6.2, 2.2 Hz, 1H), 6.42 (dd, J = 7.3, 6.2 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H). La O-alquilación de 63 (1,5 g, 9,8 mmol) se realizó en tolueno anhidro (50 mL) a reflujo en atmósfera de nitrógeno durante 12 h. A una solución del éster se añadió Ag<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5,4 g, 19,6 mmol) y después de 1 h se adicionó el 3-bromo-1-propanol (885.8 µL, 9.8 mmol) en estas condiciones.<sup>201</sup> Después de 12 h la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente, se filtró y el filtrado se absorbió sobre gel de sílice (40 g) y se purificó utilizando una cromatografía en columna de sílice (5.0 x 46.0 cm, 120 g de gel de sílice, Merck, 35-70 µm, 200-500 mesh). El producto fue eluido con un gradiente de hexano:AcOEt: 100:0, 200 mL, 65:35, 200 mL, 50:50, 200 mL, 25:75, 200 mL y 0:100, 1000 mL. Las fracciones con el producto se unieron y se concentraron a vacío obteniéndose el 2-(3-hidroxi-1-propoxi)nicotinato de metilo (64) como un aceite de color amarillo (1,6 g, 75 %). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.29 (dd, J = 4.9, 2.0 Hz, 1H), 8.22 (dd, J = 7.6, 2.0 Hz, 1H), 6.96 (dd, J = 7.6, 4.9 Hz, 1H), 4.57 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.85 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 2.06 (m, 2H). Posteriormente la síntesis del 2-(3-(2-(metoxicarbonil) fenoxi)propoxi) nicotinato de metilo (65) (aceite incoloro, 1,1 g, 65 %) se realizó de manera similar a la síntesis de 53 utilizando 2-(3-hidroxi-1-propoxi)nicotinato de metilo (1,0 g, 4,7 mmol) y 2-hidroxibenzoato de metilo (613,6 µL, 4,7 mmol).

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.26 (dd, J = 4.9, 2.0 Hz, 1H), 8.12 (dd, J = 7.5, 2.0 Hz, 1H), 7.75 (dd, J = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.41 (ddd, J = 8.3, 7.4, 1.8 Hz, 1H), 7.00 (m, 1H), 6.93 (m, 2H), 4.63 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 4.27 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 2.32 (p, J = 6.2 Hz, 2H). La reducción del diéster 65 (1,1 g, 3,1 mmol) se realizó utilizando DIBAL-H (1 mol L<sup>-1</sup>, 25 mL, 25 mmol) de manera similar a la El dialcohol (2-(3-(2-(hidroximetil)fenoxi) reducción de 49a. propoxi)piridin-3-il)metanol (66) se obtuvo como un sólido de color blanco (575,2 mg) con un 65 % de rendimiento. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz. CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.03 (dd, J = 5.1, 1.9 Hz, 1H), 7.58 (ddd, J = 7.2, 1.8, 0.8 Hz, 1H), 7.25 (m, 3H), 6.92 (td, J = 7.5, 1.0 Hz, 1H), 6.86 (m, 1H), 4.67 (s, 2H), 4.60 (m, 4H), 4.17 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 2.30 (p, J = 6.0 Hz, 2H). Finalmente 66 (575.2 mg 2.0 mmol) fue oxidado utilizando IBX (3,3 g, 11,9 mmol) como se describió para el compuesto 33. El 2-(3-(2formilfenoxi)propoxi)nicotinaldehído (67) se obtuvo como un sólido de color rojo (435,1 mg) con un 77 % de rendimiento. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.51 (s, 1H), 10.36 (s, 1H), 8.34 (ddd, J = 4.9, 2.1, 0.5 Hz, 1H), 8.09 (m, 1H), 7.82 (dd, J = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 7.52 (m, 1H), 7.00 (m, 3H), 4.69 (t, J = 6.2 Hz, 2H), 4.28 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 2.40 (p, J = 6.2 Hz, 2H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  189.53 (-CHO), 188.82 (-CHO), 163.96 (Carom), 161.06 (Carom), 152.87 (Carom), 137.76 (Carom), 135.92 (Carom), 128.41 (Carom), 124.89 (Carom), 120.85 (Carom), 118.72 (Carom), 117.46 (Carom), 112.34 (Carom), 64.96 (-OCH<sub>2</sub>-), 62.98 (-OCH<sub>2</sub>-), 28.84 (-CH<sub>2</sub>-).

### 5.19 Reacciones de adición benzoínica catalizada por BAL.

### 5.19.1 Reacciones a escala analítica.

Las reacciones de adición benzoínica (1 mL volumen total) se realizaron a 25 °C y agitación magnética (250 rpm). El dialdehído correspondiente (0,02 mmol, 20 mM concentración final en la reacción) fue disuelto en DMSO (250  $\mu$ L). Posteriormente se añadió tampón carbonato de sodio (375  $\mu$ L, 50 mM, pH 8,0, MgSO<sub>4</sub>, 2,5 mM, y ThDP, 0,15 mM). La reacción se inició cuando se añadió la BAL (160 U mL<sup>-1</sup>, concentración final en la reacción) disuelta en tampón carbonato de sodio (375  $\mu$ L, 50 mM, pH 8,0, MgSO<sub>4</sub>, 2,5 mM, y ThDP, 0,15 mM). Después de 24 h se tomó una muestra de la reacción (10  $\mu$ L), se diluyó con metanol (500  $\mu$ L) y se analizó por HPLC utilizando un gradiente de 10 % a 100 % B en 30 minutos (para los dialdehídos con átomos de halógeno en su estructura se utilizó un gradiente de 10 a 100 % de C en 30 minutos).

# 5.19.2 Reacción de adición benzoínica intramolecular catalizada por BAL.

La reacciones anteriores que mostraron formación de producto por HPLC se escalaron (volumen total, 35 mL) a 25 °C y agitación magnética (250 rpm). Los sustratos (0,7 mmol, 20 mM concentración final en la reacción) se disolvieron en DMSO (8,8 mL). Posteriormente se añadió tampón carbonato de sodio (13,1 mL, 50 mM, pH 8,0, MgSO<sub>4</sub>, 2,5 mM, y ThDP, 0,15 mM). La reacción se inició cuando se añadió la BAL (160 U mL<sup>-1</sup>, concentración final en la reacción) disuelta en tampón carbonato de sodio (13,1 mL, 50 mM, pH 8,0, MgSO<sub>4</sub>, 2,5 mM, y ThDP, 0,15 mM). Después de 24 h la reacción se diluyó con acetona (300 mL) para precipitar la enzima y se filtró sobre Celite<sup>®</sup>. Se lavó con acetona (3 x 50 mL) y se concentró a vacío. La

solución se diluyó con NaCl (400 ml de una solución saturada) y se extrajo con AcOEt (3 x 50 mL). Las fases orgánicas se unieron, se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se absorbieron sobre gel de sílice (40 g). El producto se purificó utilizando una cromatografía en columna de gel de sílice (5.0 x 46.0 cm, 120 g de gel de sílice, Merck, 35-70 μm, 200-500 mesh) eluyéndose con un gradiente escalonado de hexano:AcOEt: 100:0, 200 mL, 65:35, 200 mL and 50:50, 1000 mL. Las fracciones con el producto de interés se unieron y se concentraron a vacío. Las propiedades físicas de los productos sintetizados se listan a continuación:

## (R)-15-hidroxi-7,8-dihidro-6H-dibenzo[f,j][1,5]dioxacicloundecen-14(15H)-ona (18cb).

El compuesto se obtuvo como un sólido de color blanco (153,7 mg 77 %) de acuerdo al procedimiento general descrito anteriormente. Análisis por HPLC: gradiente de elución de 10 a 100 % de B en 30

minutos; factor de retención, k = 6.1.  $[\alpha]_D^{20} = -294.6$  (c = 5.6 en MeOH). Análisis quiral por HPLC: elución isocrática hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 80/10/10 (v/v/v),  $k_R = 3.6$ ;  $k_S = 3.9$ ; 90 % ee. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.05 (dd, J = 7.9, 1.8 Hz, 1H), 7.39 (ddd, J= 8.4, 7.3, 1.8 Hz, 1H), 7.16 (ddd, J = 8.2, 7.2, 1.8 Hz, 1H), 6.95 (m,2H), 6.87 (dd, J = 7.7, 1.8 Hz, 1H), 6.80 (td, J = 7.4, 1.1 Hz, 1H), 6.72 (m, 1H), 6.58 (s, 1H), 4.77 (m, 1H), 4.25 (m, 2H), 3.85 (ddd, J = 11.2, 9.4, 1.8 Hz, 1H), 2.49 (m, 1H), 1.94 (dtt, J = 15.7, 4.3, 1.6 Hz, 1H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 199.65 (CO), 158.43 (C<sub>arom</sub>), 135.07 (C<sub>arom</sub>), 131.69 (C<sub>arom</sub>), 129.76 (C<sub>arom</sub>), 129.43 (C<sub>arom</sub>), 128.34 (C<sub>arom</sub>), 123.20 (C<sub>arom</sub>), 122.08 (C<sub>arom</sub>), 120.66 (C<sub>arom</sub>), 117.10 (C<sub>arom</sub>), 111.22 (C<sub>arom</sub>), 73.66 (-OCH<sub>2</sub>), 72.79 (-CHOH), 68.07 (-OCH<sub>2</sub>), 30.00 (-CH<sub>2</sub>-).

ESI-TOF m/z: Calculado de  $[2M+Na^{+}]$   $C_{34}H_{32}O_{8}Na$ : 591,1995, encontrado  $[2M+Na^{+}]$ : 591,2018.

# (R)-15-hidroxi-4,10-dimetoxi-7,8-dihidro-6H-dibenzo[f,j][1,5]dioxa cicloundecen-14(15H)-ona (68).

El compuesto se obtuvo como un sólido de color blanco (134,0 mg, 67 %) de acuerdo al procedimiento general descrito anteriormente.

Análisis por HPLC: gradiente de elución de 10 a 100 % de B en 30 minutos; factor de retención, k = 6,3.  $[\alpha]^{20}_D = +18,3$  (c = 5,9 en MeOH). Análisis quiral por HPLC: elución isocrática hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 80/10/10 (v/v/v),  $k_R = 4,6$ ;  $k_S = 5,0$ ; 98 % ee. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.28 (dd, J = 7.6, 1.7 Hz, 1H), 7.05 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.00 (dd, J = 8.1, 1.7 Hz, 1H), 6.96 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.86 (dd, J = 8.2, 1.5 Hz, 1H), 6.71 (dd, J = 7.6, 1.5 Hz, 1H), 5.87 (s, 1H), 4.52 (ddd, J = 9.9, 7.2, 4.1 Hz, 1H), 4.45 (ddd, J = 10.5, 6.9, 3.4 Hz, 1H), 4.29 (ddd, J = 10.5, 6.9, 3.3 Hz, 1H), 4.22 (ddd, J = 10.1, 6.4, 4.1 Hz, 1H), 2.13 (m, 2H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  152.27 (C<sub>arom</sub>), 152.15 (C<sub>arom</sub>), 146.90 (C<sub>arom</sub>), 146.07 (C<sub>arom</sub>), 133.28 (C<sub>arom</sub>), 123.69 (C<sub>arom</sub>), 123.63 (C<sub>arom</sub>), 121.33 (C<sub>arom</sub>), 120.93 (C<sub>arom</sub>), 116.20 (C<sub>arom</sub>), 112.97 (C<sub>arom</sub>), 72.54 (-OCH<sub>2</sub>-), 71.66 (-OCH<sub>2</sub>-), 55.99 (-OCH<sub>3</sub>), 55.84 (-OCH<sub>3</sub>), 30.23 (-CH<sub>2</sub>-). ESI-TOF m/z: Calculado de  $[2M+Na^+]$  C<sub>38</sub>H<sub>40</sub>O<sub>12</sub>Na: 711,2417, encontrado  $[2M+Na^+]$ : 711,2436.

# (R)-15-hidroxi-2,12-dimetoxi-7,8-dihidro-6H-dibenzo[f,j][1,5]dioxa cicloundecen-14(15H)-ona (69).

El compuesto se obtuvo como un sólido de color blanco (168,6 mg, 84 %) de acuerdo al procedimiento general descrito anteriormente. Análisis por HPLC:

gradiente de elución de 10 a 100 % de B en 30 minutos, factor de retención, k = 8.0.  $[\alpha]^{20}_{D} = -269.1$  (c = 5.1 en MeOH). Análisis quiral por HPLC: elución isocrática hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 80/10/10 (v/v/v),  $k_R = 7.0$ ;  $k_S = 8.4$ , 98 % ee. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.58 (d, J =3.3 Hz, 1H), 6.98 (dd, J = 9.0, 3.3 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 6.72 (dd, J = 8.9, 3.1 Hz, 1H), 6.67 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 6.56 (s, 1H). 6.39 (d, J = 3.1 Hz, 1H), 4.74 (dddd, J = 11.9, 4.3, 2.5, 1.2 Hz, 1H), 4.17 (m, 2H), 3.81 (m, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.61 (s, 3H), 2.45 (dtt, J =16.1, 10.7, 2.8 Hz, 1H), 1.91 (dddd, J = 15.7, 5.9, 3.6, 1.6 Hz, 1H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 199.29 (CO), 154.27 (C<sub>arom</sub>), 153.32 (C<sub>arom</sub>), 153.20 (C<sub>arom</sub>), 152.60 (C<sub>arom</sub>), 130.34 (C<sub>arom</sub>), 123.05 (C<sub>arom</sub>), 122.33 (C<sub>arom</sub>), 118.23 (C<sub>arom</sub>), 115.19 (C<sub>arom</sub>), 114.39 (C<sub>arom</sub>), 112.75 (C<sub>arom</sub>), 112.26 (C<sub>arom</sub>), 74.14 (-OCH<sub>2</sub>-), 72.88 (-CHOH), 68.12 (-OCH<sub>2</sub>-), 55.80 (-OCH<sub>3</sub>), 55.55 (-OCH<sub>3</sub>), 30.12 (-CH<sub>2</sub>-). ESI-TOF *m/z*: Calculado  $[2M+Na^{+}]$   $C_{38}H_{40}O_{12}Na$ : 711,2417, encontrado  $[2M+Na^{+}]$ : 711,2449.

## (R)-4,10-dichloro-15-hidroxi-7,8-dihidro-6H-dibenzo[f,j][1,5]dioxa cicloundecin-14(15H)-ona (70).

El compuesto se obtuvo como un sólido de color blanco (121,8 mg, 61 %) de acuerdo al procedimiento general descrito anteriormente. Análisis por HPLC: gradiente de elución de 10 % a 100 % de C en 30

minutos, factor de retención, k = 6,7.  $[\alpha]^{20}_{D} = + 145,8$  (c = 5,9 en MeOH). Análisis quiral por HPLC: elución isocrática hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 85/5/10 (v/v/v),  $k_R = 1,1$ ;  $k_S = 1,4$ , 98 % ee. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.49 (ddd, J = 11.1, 7.8, 1.7 Hz, 2H), 7.35 (dd, J = 8.0, 1.7 Hz, 1H), 7.15 (m, 2H), 7.05 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 5.74 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 4.45 (dddd, J = 17.3, 9.3, 6.3, 4.8 Hz, 2H), 4.25

(dddd, J = 14.2, 9.3, 6.5, 4.7 Hz, 2H), 4.11 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 2.23 (ttd, J = 6.3, 4.6, 2.8 Hz, 2H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  153.23 (C<sub>arom</sub>), 152.55 (C<sub>arom</sub>), 134.61 (C<sub>arom</sub>), 134.11 (C<sub>arom</sub>), 133.88 (C<sub>arom</sub>), 130.95 (C<sub>arom</sub>), 128.24 (C<sub>arom</sub>), 127.78 (C<sub>arom</sub>), 127.51 (C<sub>arom</sub>), 125.30 (C<sub>arom</sub>), 124.85 (C<sub>arom</sub>), 72.16 (-OCH<sub>2</sub>-), 69.94 (-OCH<sub>2</sub>-), 28.96 (-CH<sub>2</sub>-). ESI-TOF m/z: Calculado de [2M+Na<sup>+</sup>] C<sub>34</sub>H<sub>28</sub>O<sub>8</sub>Cl<sub>4</sub>Na: 727.0436, encontrado [2M+Na<sup>+</sup>]: 727.0414.

(R)-12-cloro-15-hidroxi-7,8-dihidro-6H-dibenzo[f,j][1,5]dioxaciclo undecen-14(15H)-ona (71e) y (R)-2-cloro-15-hidroxi-7,8-dihidro-6H-dibenzo[f,j][1,5]dioxacicloundecen-14(15H)-ona (71f).

El producto se obtuvo como un sólido de color blanco (172,6 mg, 58 %) formado por una mezcla de

regioisómeros (40 % **71e** y 60 % **71f** determinado por <sup>1</sup>H RMN). Análisis por HPLC: gradiente de elución de 10 a 100 % de C en 30 minutos, factor de retención,  $k(\mathbf{71f}) = \mathbf{k}(\mathbf{71e}) = 5.8$ .  $[\alpha]^{20}_{\mathrm{D}} = -180.9$  (c = 8.1 en MeOH). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.08 (dd, J = 7.9, 1.8 Hz, 1H, **71e**, 8.00 (d, J = 2.8 Hz, 1H, **71f**), 7.43 (ddd, J = 8.8, 7.3, 1.9 Hz, 1H, **71e**), 7.32 (dd, J = 8.9, 2.8 Hz, 1H, **71f**), 7.18 (ddd, J = 8.3, 6.7, 2.4 Hz, 1H, **71e**), 7.12 (dd, J = 8.7, 2.6 Hz, 1H, **71f**), 6.99 (t, J = 7.5 Hz, 1H, **71e**), 6.95 (d, J = 7.7 Hz, 1H, **71f**), 6.88 (d, J = 8.8 Hz, 1H, **71e**), 6.84 (m, 3H, **71e** y **71f**), 6.75 (d, J = 8.5 Hz, 1H, **71e**), 6.67 (d, J = 8.9 Hz, 1H, **71f**), 6.55 (d, J = 5.5 Hz, 1H, **71f**), 6.50 (d, J = 5.4 Hz, 1H, **71e**), 4.78 (dddd, J = 11.7, 5.8, 2.8, 1.2 Hz, 2H, **71e** y **71f**), 4.61 (d, J = 5.5 Hz, 1H, OH, **71e**), 4.42 (d, J = 5.6 Hz, 1H, OH, **71f**), 4.24 (m, 4H, **71e** y **71f**), 3.85 (m, 2H, **71e** y **71f**), 2.50 (m, 2H, **71e** y **71f**), 1.95 (dddd, J = 14.2, 8.5, 4.3, 2.5 Hz, 2H, **71e** y **71f**). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz,

CDCl<sub>3</sub>) δ 198.82 (CO, **71e**) 198.57 (CO, **71f**), 158.51 (C<sub>arom</sub>, **71e**), 158.34 (C<sub>arom</sub>, **71e**), 157.06 (C<sub>arom</sub>, **71f**), 156.87 (C<sub>arom</sub>, **71f**), 135.47 (C<sub>arom</sub>, **71e**), 134.55 (C<sub>arom</sub>, **71f**), 131.97 (C<sub>arom</sub>, **71e**), 131.53 (C<sub>arom</sub>, **71e**), 131.13 (C<sub>arom</sub>, **71f**), 129.69 (C<sub>arom</sub>, **71f**), 129.42 (C<sub>arom</sub>, **71e**), 129.17 (C<sub>arom</sub>, **71f**), 128.33 (C<sub>arom</sub>, **71f**), 128.21 (C<sub>arom</sub>, **71e**), 126.96 (C<sub>arom</sub>, **71e**), 126.12 (C<sub>arom</sub>, **71f**), 124.34 (C<sub>arom</sub>, **71f**), 122.71 (C<sub>arom</sub>, **71e**), 122.21 (C<sub>arom</sub>, **71f**), 120.92 (C<sub>arom</sub>, **71e**), 118.54 (C<sub>arom</sub>, **71e**), 117.13 (C<sub>arom</sub>, **71f**), 112.77 (C<sub>arom</sub>, **71f**), 111.22 (C<sub>arom</sub>, **71e**), 74.07 (-CH<sub>2</sub>O-, **71e**), 73.56 (-CH<sub>2</sub>O-, **71f**), 72.82 (-CHOH, **71f**), 72.41 (-CHOH, **71e**), 68.53 (-CH<sub>2</sub>O-, **71f**), 68.03 (-CH<sub>2</sub>O-, **71e**), 29.90 (-CH<sub>2</sub>-, **71f**), 29.22 (-CH<sub>2</sub>-, **71e**). ESI-TOF *m/z*: Calculado de [2M+Na<sup>+</sup>] C<sub>34</sub>H<sub>30</sub>O<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>Na: 659,1215, encontrado [2M+Na<sup>+</sup>]: 659,1207.

(R)-12-bromo-15-hidroxi-7,8-dihidro-6H-dibenzo[f,j][1,5]dioxaciclo undecen-14(15H)-ona (72e) y (R)-2-bromo-15-hidroxi-7,8-dihidro-6H-dibenzo[f,j][1,5]dioxacicloundecen-14(15H)-ona (72f).

El producto se obtuvo como un sólido de color blanco (130,7 mg, 65 %) formado por una mezcla de regioisómeros

(50 % **72e** y 50 % **72f** determinado por <sup>1</sup>H RMN). Análisis por HPLC: gradiente de elución de 10 a 100 % de C en 30 minutos, factor de retención,  $k(72\mathbf{f}) = k$  ( $72\mathbf{e}$ ) = 5,9.  $[\alpha]^{20}_{D} = -201,6$  (c = 8,0 en MeOH). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.14 (d, J = 2.6 Hz, 1H, **72f**), 8.08 (dd, J = 7.9, 1.9 Hz, 1H, **72e**), 7.46 (dd, J = 8.9, 2.6 Hz, 1H, **72f**), 7.43 (m, 1H, **72e**), 7.26 (dd, J = 8.8, 2.6 Hz, 1H, **72e**), 7.18 (ddd, J = 8.3, 6.6, 2.5 Hz, 1H, **72f**), 6.97 (m, 3H, **72f** y **72e**), 6.83 (m, 3H, **72f** and **72e**), 6.75 (m, 1H, **72e**), 6.62 (d, J = 8.9 Hz, 1H, **72f**), 6.55 (d, J = 5.5 Hz, 1H, **72f**), 6.50 (d, J = 5.5 Hz, 1H, **72e**), 4.77 (m, 2H, **72f** and **72e**), 4.60

(d, J = 5.5 Hz, 1H, OH 72e), 4.41 (d, J = 5.6 Hz, 1H, OH, 72f), 4.23 (m, 4H, 72f and 72e), 3.84 (m, 2H, 72f and 72e), 2.50 (m, 2H, 72f and 72e), 1.95 (m, 2H, 72f and 72e).  $^{13}$ C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  198.79 (CO, 72e), 198.50 (CO, 72f), 158.52 (C<sub>arom</sub>, 72e), 158.34 (C<sub>arom</sub>, 72e), 157.56 (C<sub>arom</sub>, 72f), 157.35 (C<sub>arom</sub>, 72f), 137.44 (C<sub>arom</sub>, 72e), 135.46 (C<sub>arom</sub>, 72f), 134.10 (C<sub>arom</sub>, 72f), 132.34 (C<sub>arom</sub>, 72e), 132.02 (C<sub>arom</sub>, 72e), 131.15 (C<sub>arom</sub>, 72e), 129.68 (C<sub>arom</sub>, 72f), 129.19 (C<sub>arom</sub>, 72f), 128.34 (C<sub>arom</sub>, 72f), 124.76 (C<sub>arom</sub>, 72f), 122.72 (C<sub>arom</sub>, 72e), 122.22 (C<sub>arom</sub>, 72f), 120.94 (C<sub>arom</sub>, 72e), 119.00 (C<sub>arom</sub>, 72e), 117.12 (C<sub>arom</sub>, 72f), 114.39 (C<sub>arom</sub>, 72e), 113.20 (C<sub>arom</sub>, 72f), 111.24 (C<sub>arom</sub>, 72e), 73.99 (-OCH<sub>2</sub>- 72e), 73.55 (-OCH<sub>2</sub>- 72f), 72.82 (-CHOH 72f), 72.35 (-CHOH, 72e), 68.50 (-OCH<sub>2</sub>-, 72f), 68.04 (-OCH<sub>2</sub>-, 72e), 29.91 (-CH<sub>2</sub>-, 72f), 29.86 (-CH<sub>2</sub>-, 72e). ESI-TOF m/z: Calculado de [2M+Na<sup>+</sup>] C<sub>34</sub>H<sub>30</sub>O<sub>8</sub>Br<sub>2</sub>Na: 747,0205, encontrado [2M+Na<sup>+</sup>]: 747,0210.

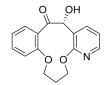
# (R)-14-hidroxi-7,8-dihidro-6H-benzo[10,11][1,5]dioxacicloundeceno [6,7-b]piridin-15(14H)-ona (73e).

El compuesto se obtuvo como un sólido de color blanco (52,9 mg, 26 %) de acuerdo al procedimiento general descrito anteriormente. Análisis por HPLC: gradiente de elución de 10 % a 100 % de B en 30

minutos, factor de retención, k = 5,3.  $[\alpha]^{20}_{D} = -230,4$  (c = 4,6 en MeOH). Análisis quiral por HPLC: elución isocrática hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 80/10/10 (v/v/v),  $k_R = 2,9$ ,  $k_S = 3,1$ , > 99 % ee. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.34 (dd, J = 7.6, 2.0 Hz, 1H), 8.20 (dd, J = 4.8, 2.0 Hz, 1H), 7.18 (ddd, J = 8.2, 7.1, 1.9 Hz, 1H), 6.98 (dd, J = 8.3, 1.1 Hz, 1H), 6.94 (dd, J = 7.6, 4.8 Hz, 1H), 6.86 (dd, J = 7.7, 1.9 Hz, 1H), 6.81 (td, J = 7.5, 1.1 Hz, 1H), 6.67 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 4.75 (dddd, J = 11.8, 5.7, 2.6, 0.9 Hz, 1H), 4.44 (m, 2H), 4.39 (d, J = 5.9 Hz,

1H), 4.34 (m, 1H), 2.36 (dtdd, J = 15.9, 9.3, 4.4, 2.5 Hz, 1H), 1.97 (m, 1H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  198.87 (CO), 161.48 (C<sub>arom</sub>), 157.85 (C<sub>arom</sub>), 152.00 (C<sub>arom</sub>), 141.01 (C<sub>arom</sub>), 129.66 (C<sub>arom</sub>), 129.00 (C<sub>arom</sub>), 128.14 (C<sub>arom</sub>), 121.99 (C<sub>arom</sub>), 117.51 (C<sub>arom</sub>), 117.19 (C<sub>arom</sub>), 117.04 (C<sub>arom</sub>), 73.02 (-OCH<sub>2</sub>-), 72.19 (-CHOH), 66.53 (-OCH<sub>2</sub>-), 29.06 (-CH<sub>2</sub>-). ESI-TOF m/z: Calculado de [2M+Na<sup>+</sup>] C<sub>32</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na: 593,1900, encontrado [2M+Na<sup>+</sup>]: 593,1950.

# (R)-15-hidroxi-7,8-dihidro-6H-benzo[10,11][1,5]dioxacicloundeceno [6,7-b]piridin-14(15H)-ona (73f).



El compuesto se obtuvo como un sólido de color blanco (133,3 mg, 67 %) de acuerdo al procedimiento general descrito anteriormente. Análisis por HPLC: gradiente de elución de 10 a 100 % de B en 30

minutos, factor de retención, k = 4.6.  $\left[\alpha\right]^{20}_{D} = -341.3$  (c = 4.6 en MeOH). Análisis quiral por HPLC: elución isocrática hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOH 80/10/10 (v/v/v),  $k_R = 3.7$ ,  $k_S = 4.0 > 99 \% ee.$  <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.05 (dd, J = 4.9, 1.9 Hz, 1H), 7.97 (dd, J = 7.9, 1.8 Hz, 1H), 7.39 (ddd, J = 8.4, 7.3, 1.9 Hz, 1H), 7.23 (m, 1H), 6.95 (ddd, J = 8.0, 7.3, 0.9 Hz, 1H), 6.74 (m, 2H), 6.37 (d, J = 4.3 Hz,1H), 5.12 (ddd, J = 12.3, 10.7, 1.8 Hz, 1H), 4.63 (d, J = 4.8 Hz, 1H, -OH), 4.58 (dddd, J = 12.0, 4.4, 3.1, 1.2 Hz, 1H), 4.27 (dddd, J = 9.0, 4.4, 2.8, 1.2 Hz, 1H), 3.88 (ddd, J = 11.2, 9.7, 1.7 Hz, 1H), 2.46 (dtt, J= 15.7, 10.8, 2.9 Hz, 1H), 1.97 (m, 1H).  $^{13}$ C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ 199.09 (CO), 162.97 (C<sub>arom</sub>), 158.24 (C<sub>arom</sub>), 147.20 (C<sub>arom</sub>), 137.80 (C<sub>arom</sub>), 135.21 (C<sub>arom</sub>), 131.59 (C<sub>arom</sub>), 123.80 (C<sub>arom</sub>), 123.15 (C<sub>arom</sub>), 120.75 (C<sub>arom</sub>), 118.11 (C<sub>arom</sub>), 111.53 (C<sub>arom</sub>), 72.91 (-CHOH), 68.91 (-OCH<sub>2</sub>-), 68.20 (-OCH<sub>2</sub>-), 29.42 (-CH<sub>2</sub>-). ESI-TOF m/z: Calculado de  $[2M+Na^{+}]$  C<sub>32</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na: 593.1900, encontrado  $[2M+Na^{+}]$ : 593.1899.

# 5.19.3 Síntesis de benzoinas a partir de los dialdehídos 17bb y 17bc catalizado por BAL.

Las reacciones (35 mL volumen total) se realizaron a 25 °C y agitación magnética (250 rpm). Los sustratos (0,7 mmol, 20 mM concentración final en la reacción) se disolvieron en DMSO (8,8 mL). Posteriormente se añadió tampón carbonato de sodio (13,1 mL, 50 mM, pH 8,0, MgSO<sub>4</sub>, 2,5 mM, y ThDP, 0,15 mM). La reacción se inició con la adición de BAL (2,9 U mL<sup>-1</sup>, concentración final en la reacción) disuelta en tampón carbonato de sodio (13,1 mL, 50 mM, pH 8,0, MgSO<sub>4</sub>, 2,5 mM, y ThDP, 0,15 mM). Después de 1 h la reacción se diluyó con acetona (300 mL) para precipitar la enzima y se filtró a través de Celite<sup>®</sup>. Se lavó con acetona (3 x 50 mL) y se concentró a vacío. La solución se diluyó con NaCl (400 ml de una solución saturada) y se extrajo con AcOEt (3 x 50 mL). Las fases orgánicas se unieron y secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se absorbieron sobre gel de sílice (40 g). El producto se purificó utilizando una cromatografía en columna de gel de sílice (5.0 x 46.0 cm, 120 g de gel de sílice, Merck, 35-70 µm, 200-500 mesh) eluyéndose con un gradiente escalonado hexano:AcOEt: 100:0, 200 mL, 65:35, 200 mL and 50: 50, 1000 mL. Las fracciones con el producto de interés se unieron y se concentraron a vacío. Las propiedades físicas de los productos sintetizados se listan a continuación:

# (R)-3,3'-(((((1-hidroxi-2-oxoetano-1,2-diil)bis(3,1-fenilen))bis(oxi)) bis(propano-3,1-diil))bis(oxi))dibenzaldehído (21bb).

El compuesto se obtuvo como un aceite de color amarillo (80,0 mg, 40 %) de acuerdo al procedimiento general descrito anteriormente.

Análisis por HPLC: gradiente de elución de 10 a 100 % de B en 30 minutos, factor de retención, k = 7.8.  $[α]^{20}_{D} = -18.4$  (c = 3.8 en MeOH).  $^{1}$ H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.94 (d, J = 1.4 Hz, 2H), 7.42 (m, arom.), 7.21 (m, arom), 7.05 (m, arom), 6.91 (m, arom), 6.81 (m, arom), 5.86 (s, 1H), 4.15 (m, 8H), 2.25 (m, 4H).  $^{13}$ C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 198.55 (CO), 192.05 (CHO), 192.02 (CHO), 159.34 (C<sub>arom</sub>), 159.31 (C<sub>arom</sub>), 159.28 (C<sub>arom</sub>), 158.93 (C<sub>arom</sub>), 140.45 (C<sub>arom</sub>), 137.77 (C<sub>arom</sub>), 137.76 (C<sub>arom</sub>), 134.69 (C<sub>arom</sub>), 130.16 (C<sub>arom</sub>), 130.06 (C<sub>arom</sub>), 120.03 (C<sub>arom</sub>), 129.67 (C<sub>arom</sub>), 123.67 (C<sub>arom</sub>), 123.49 (C<sub>arom</sub>), 121.88 (C<sub>arom</sub>), 121.82 (C<sub>arom</sub>), 120.96 (C<sub>arom</sub>), 120.30 (C<sub>arom</sub>), 114.67 (C<sub>arom</sub>), 113.80 (C<sub>arom</sub>), 113.61 (C<sub>arom</sub>), 112.83 (C<sub>arom</sub>), 112.61(C<sub>arom</sub>), 76.12 (CHOH), 64.59 (-OCH<sub>2</sub>-), 64.45 (-OCH<sub>2</sub>-), 64.42 (-OCH<sub>2</sub>-), 64.21 (-OCH<sub>2</sub>-), 29.07 (-CH<sub>2</sub>-), 28.98 (-CH<sub>2</sub>-). ESI-TOF m/z: Calculado de [M+Na<sup>+</sup>] C<sub>34</sub>H<sub>32</sub>O<sub>8</sub>Na: 591,1995, encontrado [M+Na<sup>+</sup>]: 591,2027.

## (R)-3,3'-(((((1-hidroxi-2-oxoetano-1,2-diil)bis(3,1-fenilen))bis(oxi)) bis(butano-4,1-diil))bis(oxi))dibenzaldehído (21bc).

El compuesto se obtuvo como un sólido blanco (111,5 mg, 53 %) de acuerdo al procedimiento general. Análisis por HPLC: gradiente de elución de 10 a 100 % de B en 30 minutos, factor de retención, k = 8,4.  $[\alpha]^{20}_{\rm D} = -48,7$  (c = 5,9 en MeOH). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.95 (s, 2H), 7.40 (m, arom), 7.22 (m, arom), 6.90 (m, arom), 5.86 (s, 1H), 4.04 (m, 8H), 1.98 (m, 8H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  198.61(CO), 192.10 (-CHO), 192.07 (-CHO), 159.48 (C<sub>arom</sub>), 159.46 (C<sub>arom</sub>), 159.43 (C<sub>arom</sub>), 159.07 (C<sub>arom</sub>), 140.44 (C<sub>arom</sub>), 137.77 (C<sub>arom</sub>), 134.70 (C<sub>arom</sub>), 130.14 (C<sub>arom</sub>), 130.03 (C<sub>arom</sub>), 130.01 (C<sub>arom</sub>), 129.64

 $(C_{arom})$ , 123.54  $(C_{arom})$ , 123.41  $(C_{arom})$ , 121.88  $(C_{arom})$ , 121.85  $(C_{arom})$ , 121.74  $(C_{arom})$ , 120.95  $(C_{arom})$ , 120.16  $(C_{arom})$ , 114.65  $(C_{arom})$ , 113.81  $(C_{arom})$ , 113.62  $(C_{arom})$ , 112.74  $(C_{arom})$ , 112.59  $(C_{arom})$ , 76.15 (CHOH), 67.71  $(-OCH_2-)$ , 67.64  $(-OCH_2-)$ , 67.60  $(-OCH_2-)$ , 67.37  $(-OCH_2-)$ , 25.88  $(-CH_2-)$ , 25.84  $(-CH_2-)$ , 25.80  $(-CH_2-)$ . ESI-TOF m/z: Calculado de  $[M+Na^+]$   $C_{36}H_{36}O_8Na$ : 619,2308, encontrado  $[M+Na^+]$ : 619,2286.

# 5.19.4 Síntesis enzimática de (R)-2-hidroxi-1,2-bis(2-hidroxifenil) etan-1-ona (22).

La reacción de síntesis de **22** se realizó a 25 °C y agitación magnética (250 rpm) en un volumen total de reacción de 35 mL. El 2-hidroxibenzaldehído (1,8 mL,

16,4 mmol, 0,5 M concentración final en la reacción) se disolvió en DMSO (8,8 mL). Posteriormente se añadió tampón carbonato de sodio (13,1 mL, 50 mM, pH 8,0, MgSO<sub>4</sub>, 2,5 mM, y ThDP, 0,15 mM). La reacción se inició con la adición de BAL (40 U mL<sup>-1</sup>, concentración final en la reacción) disuelta en tampón carbonato de sodio (13,1 mL, 50 mM, pH 8,0, MgSO<sub>4</sub>, 2,5 mM y ThDP, 0,15 mM). Después de 24 h se añadió AcOH (2 mL) y acetona (300 mL) para precipitar la enzima y se filtró sobre Celite<sup>®</sup>. Se lavó con acetona (3 x 50 mL) y se concentró a vacío para eliminar el solvente volátil. La solución se diluyó con NaCl (400 mL de una solución saturada) y se extrajo con AcOEt (3 x 50 mL). Las fases orgánicas se unieron y secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se absorbieron sobre gel de sílice (40 g). El producto se purificó utilizando una cromatografía en columna de gel de sílice (5.0 x 46.0 cm, 120 g de gel de sílice, Merck, 35-70 µm, 200-500 mesh) eluyéndose con un gradiente escalonado de hexano:AcOEt: 100:0, 200 mL, 65:35, 200 mL and 50: 50, 1000 mL. Las fracciones con el producto de interés se unieron y concentraron a vacío obteniéndose el compuesto 22 (1,6 g, 82

%) como un sólido de color blanco;  $[\alpha]^{20}_{D} = -195,3$  (c = 6 en MeOH). Análisis quiral por HPLC: elución isocrática hexano/isopropanol 90/10 (v/v),  $k_R = 3,4$ ;  $k_S = 3,9$ , 50 % ee. <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  11.74 (s, 1H, -OH fenol), 9.77 (s, 1H, -OH fenol), 7.87 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 7.43 (ddd, J = 8.6, 7.2, 1.6 Hz, 1H), 7.18 (dd, J = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 7.06 (ddd, J = 8.1, 7.3, 1.7 Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 8.4, 1.1 Hz, 1H), 6.83 (ddd, J = 8.2, 7.2, 1.1 Hz, 1H), 6.75 (m, 2H), 6.25 (d, J = 5.4 Hz, 1H,-OH), 5.79 (d, J = 6.2 Hz, 1H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  205.12 (-CO), 161.33 (C<sub>arom</sub>), 154.47 (C<sub>arom</sub>), 136.37 (C<sub>arom</sub>), 130.66 (C<sub>arom</sub>), 129.42 (C<sub>arom</sub>), 128.65 (C<sub>arom</sub>), 126.61 (C<sub>arom</sub>), 119.54 (C<sub>arom</sub>), 119.39 (C<sub>arom</sub>), 119.04 (C<sub>arom</sub>), 118.11 (C<sub>arom</sub>), 115.78 (C<sub>arom</sub>), 69.79 (-CHOH). ESI-TOF m/z: Calculado de [M+Na<sup>+</sup>] C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>Na: 267,0633, encontrado [M+Na<sup>+</sup>]: 267,0634.

## 5.20 Cristalización de los productos 68, 69 y 70.

Los productos (30 mg) fueron disueltos en CHCl<sub>3</sub> (100 μL) y se les añadió 900 μL de hexano. Las soluciones se colocaron en tubos de RMN (20,3 cm x 0,5 cm) y se dejó evaporar el solvente a 25 °C. Después de 5 días los cristales formados fueron colectados y analizados por difracción de rayos X.



- 1. Purich, D.L (2010). Enzyme Kinetics: Catalysis & Control a Reference of Theory and Best Practice Methods. *ACADEMIC PRESS*, *ELSEVIER*. First edition.
- **2.** Voet, D.; Voet, J.G. (2011) Biochemistry, *Jhon Wiley & Sons*, *INC*, fourth edition
- 3. Kruger, K.; Grabowski, P.J.; Zaug, A.J.; Sands. J.; Gottschling, D.E.; Cech, T.R (1982). *Cell* 31,147.
- **4.** Guerrier-Takada, C.; Gardiner, K.; Marsh, T.; Pace, N.; Altman, S. (1983). *Cell.* **35**, 849.
- **5.** Attwater, J., Tagami, S., Kimoto, M., Butler, K., Kool, E. T., Wengel, J., Herdewijn, P., Hirao, I., and Holliger, P. (2013). *Chem. Sci.* **4,** 2804.
- **6.** Amyes, T. L., and Richard, J. P. (2013). *Biochemistry* **52**. 2021.
- 7. Zheng, M., and Xu, D. (2013). *J. Phys. Chem. B* 117, 10161.
- **8.** Dai, Y.-N., Chi, C.-B., Zhou, K., Cheng, W., Jiang, Y.-L., Ren, Y.-M., Ruan, K., Chen, Y., and Zhou, C.-Z. (2013). *J. Biol. Chem.* **288**, 22985.
- **9.** Daniels, A. D., Campeotto, I., van der Kamp, M. W., Bolt, A. H., Trinh, C. H., Phillips, S. E. V, Pearson, A. R., Nelson, A., Mulholland, A. J., and Berry, A. (2014). *ACS Chem. Biol.* **9**, 1025.
- **10.** Hall DR, Bond CS, Leonard GA, Watt CI, Berry A, Hunter WN (2002). *J. Biol. Chem.***277**, 22018.
- **11.** Dean SM, Greenberg WA, Wong CH (2007). *Adv. Synth. Catal.* **349**, 1308.
- **12.** Boer, J. L., Mulrooney, S. B., and Hausinger, R. P. (2014). *Arch. Biochem. Biophys.* **544**, 142.
- **13.** Amyes, T. L., Ming, S. a, Goldman, L. M., Wood, B. M., Desai, B. J., Gerlt, J. a, and Richard, J. P. (2012). *Biochemistry* **51**, 4630.
- **14.** Hammes-Schiffer, S. (2013). *Biochemistry* **52**, 2012.
- **15.** Van der Kamp, M. W, Chaudret, R, and. Mulholland, A. J.(2013). *FEBS Journal Special Issue: Catalytic Mechanisms by Biological Systems* **13**, 3120.
- **16.** Jimenez-Morales, D., Liang, J., and Eisenberg, B. (2012). *Eur. Biophys. J.* **41**, 449.
- 17. Hudlicky, T., and Reed, J. W. (2009). *Chem. Soc. Rev.* 38, 3117.
- **18.** International Union of Pure and Applied Chemistry. Compendium of Chemical Terminology Gold Book Version 2.3.3 (2014-02-24).
- **19.** Ouyang, Q., Wang, P., Huang, J., Cai, J., and He, J. (2013). *J. Microbiol. Biotechnol. Res.* **23**, 343.
- **20.** Savile, C. K., Janey, J. M., Mundorff, E. C., Moore, J. C., Tam, S., Jarvis, W. R., Colbeck, J. C., Krebber, a., Fleitz, F. J., Brands, J.,

- Devine, P. N., Huisman, G. W., and Hughes, G. J. (2010). *Science* **329**, 305.
- **21.** Truppo, M. D., and Hughes, G. (2011). *Org. Process Res. Dev.* **15**, 1033.
- **22.** You, Z.-Y., Liu, Z.-Q., Zheng, Y.-G., and Shen, Y.-C. (2013). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 29.
- **23.** Würges, K., Mackfeld, U., Pohl, M., Lütz, S., Wilhelm, S., Wiechert, W., and Kubitzki, T. (2011). *Adv. Synth. Catal.* **353**, 2431.
- **24.** Meyer, H.-P., Eichhorn, E., Hanlon, S., Lütz, S., Schürmann, M., Wohlgemuth, R., and Coppolecchia, R. (2013). *Catal. Sci. Technol.* **3**, 29.
- **25.** Takayama, S., McGarvey, G. J., and Wong, C. H. (1997). *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 285.
- **26.** Csajági, C., Szatzker, G., Rita Tőke, E., Ürge, L., Darvas, F., and Poppe, L. (2008). *Tetrahedron: Asymmetry* **19**, 237.
- **27.** Csajági, C., Szatzker, G., Rita Tőke, E., Ürge, L., Darvas, F., and Poppe, L. (2008). *Tetrahedron: Asymmetry* **19**, 237.
- **28.** García-Urdiales, E., Alfonso, I., and Gotor, V. (2005). *Chem. Rev.* **105**, 313.
- **29.** Oroz-Guinea, I., and García-Junceda, E. (2013). *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 236.
- **30.** Siirola, E., Mutti, F. G., Grischek, B., Hoefler, S. F., Fabian, W. M. F., Grogan, G., and Kroutil, W. (2013). *Adv. Synth. Catal.***355**, 1703.
- **31.** Köhler, V., Wilson, Y. M., Dürrenberger, M., Ghislieri, D., Churakova, E., Quinto, T., Knörr, L., Häussinger, D., Hollmann, F., Turner, N. J., and Ward, T. R. (2013). *Nat. Chem.* **5**, 93.
- 32. Klibanov, A. M. (2001). Nature 409, 241.
- 33. Doukyu, N., and Ogino, H. (2010). Biochem. Eng. J. 48, 270.
- **34.** Wu, X., Chu, J., Liang, J., and He, B. (2013). *RSC Adv.* **3**, 19027.
- **35.** Zheng, R. C., Zheng, Y. G., Li, A. P., and Li, X. J. (2014). *Biochem. Eng. J.* **83**, 97.
- **36.** Espelt, L., Parella, T., Bujons, J., Solans, C., Joglar, J., Delgado, A., and Clapés, P. (2003). *Chemistry.* **9**, 4887.
- **37.** Chen, Z.-G., Zhang, D.-N., Cao, L., and Han, Y.-B. (2013). *Bioresour. Technol.* **133**, 82.
- **38.** Pang, N., Gu, S.-S., Wang, J., Cui, H.-S., Wang, F.-Q., Liu, X., Zhao, X.-Y., and Wu, F.-A. (2013). *Bioresour. Technol.* **139**, 337.
- **39.** Mao, S., Hua, B., Wang, N., Hu, X., Ge, Z., Li, Y., Liu, S., and Lu, F. (2013). *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **88**, 287.
- **40.** Matsuda, T. (2013). *J. Biosci. Bioeng.* **115**, 233.
- **41.** Phillips, R. S. (1996). *Trends Biotechnol.* **14**, 141.
- **42.** Phillips, S. (1990). *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 3629.

- **43.** Gutierrez, M. L., Garrabou, X., Agosta, E., Servi, S., Parella, T., Joglar, J., and Clapés, P. (2008). *Chemistry* **14**, 4647.
- **44.** Richter, N., Neumann, M., Liese, A., Wohlgemuth, R., Eggert, T., and Hummel, W. (2009). *ChemBioChem* **10**, 1888.
- **45.** Lindberg, D., de la Fuente Revenga, M., and Widersten, M. (2010). *Biochemistry* **49**, 2297.
- **46.** Lummer, K., Rieks, a, Galunsky, B., and Kasche, V. (1999). *Biochim. Biophys. Acta* **1433**, 327.
- **47.** Secundo, F., and Phillips, R. S. (1996). *Enzyme Microb. Technol.* **19**, 487.
- **48.** Calveras, J., Bujons, J., Parella, T., Crehuet, R., Espelt, L., Joglar, J., and Clapés, P. (2006). *Tetrahedron* **62**, 2648.
- **49.** Sánchez-Moreno, I., García-García, J. F., Bastida, A., and García-Junceda, E. (2004). *Chem. Commun. (Camb.)* **14**, 1634.
- **50.** Jung S-H, Jeong J-H, Miller P, Wong C-H (1994). *J. Org. Chem.* **59**, 7182.
- **51.** Schümperli, M., Pellaux, R., and Panke, S. (2007). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 33.
- **52.** Drueckhammer, D. G., Durrwachter, J. R., Richard, L., Crans, D. C., Daniels, L., and Wong, C. H. (1989). *J. Org. Chem.* **54**, 70.
- **53.** Sugiyama, M., Hong, Z., Whalen, L. J., Greenberg, W. A., and Wong, C.-H. (2006). *Adv. Synth. Catal.* **348**, 2555.
- **54.** Garrabou, X., Joglar, J., Parella, T., Crehuet, R., Bujons, J., and Clapés, P. (2011) Redesign of the Phosphate Binding Site of L-Rhamnulose-1-Phosphate Aldolase towards a Dihydroxy acetone Dependent Aldolase. *Adv. Synth. Catal.* **353**, 89.
- **55.** Wang, B., Land, H., and Berglund, P. (2013). *Chem. Commun.* (*Camb.*) **49**, 161.
- **56.** Kara, S., Spickermann, D., Schrittwieser, J. H., Leggewie, C., van Berkel, W. J. H., Arends, I. W. C. E., and Hollmann, F. (2013). *Green Chem.* **15**, 330.
- **57.** Rodrigues, R. C., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., and Fernández-Lafuente, R. (2013). *Chem. Soc. Rev.* **42**, 6290.
- **58.** Singh, R. K., Tiwari, M. K., Singh, R., and Lee, J.-K. (2013). *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 1232.
- **59.** Eriksen, D. T., Lian, J., and Zhao, H. (2014). *J. Struct. Biol.* **185**, 234.
- **60.** Westphal, R., Vogel, C., Schmitz, C., Pleiss, J., Müller, M., Pohl, M., and Rother, D. (2014). *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 1.
- **61.** Jiang, L., Althoff, E. A., Clemente, F. R., Doyle, L., Röthlisberger, D., Zanghellini, A., and Baker, D. (2008). *Science*. **319**, 1387.

- **62.** Goddard, J.-P., and Reymond, J.-L. (2004). *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**, 314.
- **63.** Davids, T., Schmidt, M., Böttcher, D., and Bornscheuer, U. T. (2013). *Curr Opin Chem Biol* **17**, 215.
- **64.** Williams, G. J., Woodhall, T., Farnsworth, L. M., Nelson, A., and Berry, A. (2006). *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 16238.
- **65.** Arnold, F. H and Georgiou, G (2003). *Methods in molecular biology* **231.**
- **66.** Siloto, R. M. P., and Weselake, R. J. (2012). *Biocatal Agric Biotechnol* **1**, 181.
- **67.** Warren, M. S., and Benkovic, S. J. (1997). *Protein engineering* **10**, 63.
- **68.** Reetz, M. T., and Carballeira, J. D. (2007). *Nat. Protoc.* **2**, 891.
- **69.** Bougioukou, D., Kille, S., Taglieber, A., and Reetz, M. (2009). *Adv. Synth. Catal.* **351**, 3287.
- **70.** Champion, E., Guérin, F., Moulis, C., Barbe, S., Tran, T. H., Morel, S., Descroix, K., Monsan, P., Mourey, L., Mulard, L. a, Tranier, S., Remaud-Siméon, M., and André, I. (2012). *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 18677.
- **71.** Reetz, M. T., Bocola, M., Carballeira, J. D., Zha, D., and Vogel, A. (2005). *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 4192.
- **72.** Ramos, A., Olano, C., Braña, A. F., Méndez, C., and Salas, J. (2009). *J. Bacteriol.* **191**, 2871.
- **73.** Nestl, B. M., Hammer, S. C., Nebel, B. a, and Hauer, B. (2014). *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 3070.
- **74.** Fesko, K., and Gruber-Khadjawi, M. (2013). *ChemCatChem* **5**, 1248.
- **75.** Brovetto, M., Gamenara, D., Méndez, P. S., and Seoane, G. (2011). *Chem. Rev.* **111**, 4346.
- **76.** Clapes, P., and Garrabou, X. (2011). *Adv. Synth. Catal.* **353**, 2263.
- 77. Fessner, W.D. (2007), in Asymmetric Synthesis with chemical and biological methods. (Eds.: D. Enders, K. E. Jaeger). *Wiley-VCH, Weinheim*, pp 351-375.
- **78.** Jordan, F. (2003). Nat. Prod. Rep. **20**, 184.
- **79.** Müller, M., Gocke, D., and Pohl, M. (2009). *FEBS J.* **276**, 2894.
- **80.** Brovetto, M., Gamenara, D., Saenz Mendez, P., and Seoane, G. A. (2011). *Chem. Rev.* **111,** 4346.
- **81.** Müller, M., Sprenger, G. A., and Pohl, M. (2013). *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 261.
- **82.** Pohl, M., Sprenger, G. A., and Müller, M. (2004). *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**, 335.

- **83.** Ulevitch RJ, Kallen RG (1977). *Biochemistry* **16**, 5342.
- **84.** Schirch L, Gross T (1968). *J. Biol. Chem.* **243**, 5651.
- **85.** Schirch, V., and Szebenyi, D. M. (2005). *Curr. Opin. Chem. Biol.***9**, 482.
- **86.** Malthouse, J. P. G. (2003). *Biochim. Biophys. Acta* **1647**, 138.
- **87.** Szebenyi, D. M. E., Musayev, F. N., di Salvo, M. L., Safo, M. K., and Schirch, V. (2004). *Biochemistry* **43**, 6865.
- **88.** Contestabile, R., Angelaccio, S., Bossa, F., Wright, H. T., Scarsdale, N., Kazanina, G., and Schirch, V. (2000). *Biochemistry* **39**, 7492.
- **89.** Kreuzman, a J., Zock, J. M., Dotzlaf, J. E., Vicenzi, J. T., Queener, S. W., and Yeh, W. K. (1997). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 369.
- **90.** Jackson, B. G., Pedersen, S. W., Fisher, J. W., Misner, J. W., Gardner, J. P., Staszak, M. A., Doecke, C., Rizzo, J., Aikins, J., Farkas, E., Trinkle, K. L., Vicenzi, J., Reinhard, M., Kroeff, E. P., Higginbotham, C. A., Gazak, R. J., and Zhang, T. Y. (2000). *Tetrahedron* **56**, 5667.
- **91.** Zhao, G.-H., Li, H., Liu, W., Zhang, W.-G., Zhang, F., Liu, Q., and Jiao, Q.-C. (2011). *Amino acids* **40**, 215.
- **92.** Vidal, L., Calveras, J., Clapés, P., Ferrer, P., and Caminal, G. (2005). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 489.
- 93. González, B., and Vicuña, R. (1989). *J. Bacteriol.* 171, 2401.
- **94.** Demir, A. S., Ayhan, P., Igdir, A. C., and Duygu, A. N. (2004). *Tetrahedron* **60**, 6509.
- **95.** Demir, A. S., Seşenoglu, O., Dünkelmann, P., and Müller, M. (2003). *Org. Lett.* **5**, 2047.
- **96.** Ayhan, P., Şimşek, İ., Çifçi, B., and Demir, A. S. (2011). *Org. Biomol. Chem.* **9**, 2602.
- **97.** Domínguez de María, P., Pohl, M., Gocke, D., Gröger, H., Trauthwein, H., Stillger, T., Walter, L., and Müller, M. (2007). *European J. Org. Chem.* **2007**, 2940.
- **98.** Zavrel, M., Schmidt, T., Michalik, C., Ansorge-Schumacher, M., Marquardt, W., Büchs, J., and Spiess, A. C. (2008). *Biotechnol. Bioeng.* **101**, 27.
- **99.** Janzen, E., Müller, M., Kolter-Jung, D., Kneen, M. M., McLeish, M. J., and Pohl, M. (2006). *Bioorg. Chem.* **34**, 345.
- **100.** de María, P. D., Stillger, T., Pohl, M., Kiesel, M., Liese, A., Gröger, H., and Trauthwein, H. (2008). *Adv. Synth. Catal.***350**, 165.
- **101.** Sanchez-Gonzalez, M., and Rosazza, J. P. N. (2003). *Adv. Synth. Catal.* **345**, 819.

- **102.** Leuenberger, H. G. W., Matzinger, P. K., and Wirz, B. (1999). *Int. J. Chem.* **53**, 536.
- **103.** Kurlemann, N., and Liese, A. (2004). *Tetrahedron: Asymmetry* **15**, 2955.
- **104.** de María, P. D., Stillger, T., Pohl, M., Wallert, S., Drauz, K., Gröger, H., Trauthwein, H., and Liese, A. (2006). *J. Mol. Catal., B Enzym.* **38**, 43.
- **105.** Gala, D., DiBenedetto, D. J., Clark, J. E., Murphy, B. L., Schumacher, D. P., and Steinman, M. (1996). *Tetrahedron Lett.* **37**, 611-614.
- **106.** Shanmuganathan, S., Natalia, D., Greiner, L., and Domínguez de María, P. (2012). *Green Chem.* **14**, 94.
- **107.** Carda, M., Rodríguez, S., Castillo, E., Bellido, A., Díaz-Oltra, S., and Alberto Marco, J. (2003). *Tetrahedron*, **59**, 857.
- **108.** Melvin, J. Y., Zheng, W., and Seletsky, B. M. (2013). *Nat. Prod. Rep.* **30**, 1158.
- **109.** Schurmann, M., and Sprenger, G. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 11055.
- **110.** Thorell, S., Schürmann, M., Sprenger, G. a, and Schneider, G. (2002). *J. Mol. Biol.* **319**, 161.
- **111.** Castillo, J. A., Guérard-Hélaine, C., Gutiérrez, M., Garrabou, X., Sancelme, M., Schürmann, M., Inoue, T., Hélaine, V., Charmantray, F., Gefflaut, T., Hecquet, L., Joglar, J., Clapés, P., Sprenger, G. A., and Lemaire, M. (2010). *Adv. Synth. Catal.***352**, 1039.
- **112.** Garrabou, X., Castillo, José A., Guérard-Hélaine, C., Parella, T., Joglar, J., Lemaire, M. and Clapés, P. (2009). *Angew. Chem. Int. Ed.* **121**, 5629.
- **113.** Szekrenyi, A., Soler, A., Garrabou, X., Guérard-Hélaine, C., Parella, T., Joglar, J., Lemaire, M., Bujons, J., and Clapés, P. (2014). *Chemistry*, **20**, 1.
- **114.** Gutierrez, M., Parella, T., Joglar, J., Bujons, J., and Clapés, P. (2011). *Chem. Commun. (Camb.)* **47**, 5762.
- 115. Camps Bres, F., Guérard-Hélaine, C., Fernandes, C., Castillo, J. A., and Lemaire, M. (2013). *Tetrahedron: Asymmetry* 24, 1075.
- 116. Sánchez-Moreno, I., Hélaine, V., Poupard, N., Charmantray, F., Légeret, B., Hecquet, L., and Lemaire, M. (2012). *Adv. Synth. Catal.*, 354, 1725.
- **117.** Concia, A. L., Lozano, C., Castillo, J. A., Parella, T., Joglar, J., and Clapés, P. (2009). *Chem. Eur. J.* **15**, 3808.
- **118.** Guérard-Hélaine, C., Légeret, B., Fernandes, C., Prévot, V., Forano, C., and Lemaire, M. (2011). *New. J. Chem.* **35**, 776.

- **119.** Fessner, W. D., Heyl, D., and Rale, M. (2012). *Catal. Sci. Technol.* **2**, 1596.
- **120.** Castillo, J. a, Calveras, J., Casas, J., Mitjans, M., Vinardell, M. P., Parella, T., Inoue, T., Sprenger, G. a, Joglar, J., and Clapés, P. (2006). *Org. Lett.* **8**, 6067.
- **121.** Gómez, L., Molinar-Toribio, E., Calvo-Torras, M. Á., Adelantado, C., Juan, M. E., Planas, J. M. and Torres, J. L. (2012). *Br. J. Nutr.* **107**, 1739.
- **122.** Kroemer, M., Merkel, I., and Schulz, G. E. (2003). *Biochemistry* **42**, 10560.
- **123.** Hixon, M., Sinerius, G., Schneider, A., Walter, C., Fessner, W. D., and Schloss, J. V. (1996). *FEBS lett.* **392**, 281.
- **124.** Garrabou, X., Calveras, J., Joglar, J., Parella, T., Bujons, J., and Clapés, P. (2011). *Org. Biomol. Chem.* **9**, 8430.
- **125.** Calveras, J., Casas, J., Parella, T., Joglar, J., and Clapés, P. (2007). *Adv. Synth. Catal.* **349**, 1661.
- **126.** Gómez, L., Garrabou, X., Joglar, J., Bujons, J., Parella, T., Vilaplana, C., Cardona, P. J., and Clapés, P. (2012). *Org. Biomol. Chem.* **10**, 6309.
- 127. Concia, A. L., Gómez, L., Bujons, J., Parella, T., Vilaplana, C., Cardona, P. J., Joglar, J., and Clapés, P. (2013). *Org. Biomol. Chem.* 11, 2005.
- **128.** Ohfune, Y., and Shinada, T. (2005). *European J. Org. Chem.* **2005**, 5127.
- **129.** Demizu, Y., Doi, M., Kurihara, M., Okuda, H., Nagano, M., Suemune, H., and Tanaka, M. (2011). *Org. Biomol. Chem.* **9**, 3303.
- **130.** Soloshonok, V., and Sorochinsky, A. (2010). *Synthesis* **2010**, 2319.
- **131.** Grandel, R., and Kazmaier, U. (1998). *European J. Org. Chem.* **1998**, 409.
- **132.** Kitamura, M., Shirakawa, S., and Maruoka, K. (2005). *Angew. Chem. Int. Ed.* **117**, 1573.
- **133.** Fesko, K., Uhl, M., Steinreiber, J., Gruber, K., and Griengl, H. (2010). *Angew. Chem. Int. Ed.* **122**, 125.
- **134.** Nozaki, H., Kuroda, S., Watanabe, K., and Yokozeki, K. (2008). *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 7596.
- **135.** Nozaki, H., Kuroda, S., Watanabe, K., and Yokozeki, K. (2008). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 2580.
- **136.** Nozaki, H., Kuroda, S., Watanabe, K., and Yokozeki, K. (2008). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 3002.
- **137.** Nozaki, H., Kuroda, S., Watanabe, K., and Yokozeki, K. (2009). *J. Mol. Catal.*, *B Enzym.* **56**, 221.

- 138. Pancera, M., Shahzad-Ul-Hussan, S., Doria-Rose, N. a, McLellan, J. S., Bailer, R. T., Dai, K., Loesgen, S., Louder, M. K., Staupe, R. P., Yang, Y., Zhang, B., Parks, R., Eudailey, J., Lloyd, K. E., Blinn, J., Alam, S. M., Haynes, B. F., Amin, M. N., Wang, L.-X., Burton, D. R., Koff, W. C., Nabel, G. J., Mascola, J. R., Bewley, C. a, and Kwong, P. D. (2013). *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 804.
- **139.** Go, E. P., Liao, H.-X., Alam, S. M., Hua, D., Haynes, B. F., and Desaire, H. (2013). *J. Proteome Res.* **12**, 1223.
- **140.** Simone, G., Malara, N., Trunzo, V., Perozziello, G., Neuzil, P., Francardi, M., Roveda, L., Renne, M., Prati, U., Mollace, V., Manz, a, and Di Fabrizio, E. (2013). *Small.* **9**, 2152.
- **141.** Geng, Y., Takatani, T., Yeh, K., Hsu, J.-W., and King, M. R. (2013). *Cell. Mol. Bioeng.* **6**, 148.
- **142.** Gordon, S., and Martinez, F. O. (2010). *Immunity*. **32**, 593.
- **143.** Collin, M., and Ehlers, M. (2013). *Exp. Dermatol.* **22**, 511.
- **144.** Bruns, R., Wernicke, A., and Köll, P.(1999). *Tetrahedron* **55**, 9793.
- 145. Meng, W.; Ellsworth, B. A.; Nirschl, A. A.; McCann, P. J.; Patel, M.; Girotra, R. N.; Wu, G.; Sher, P. M.; Morrison, E. P.; Biller, S. A.; Zahler, R.; Deshpande, P. P.; Pullockaran, A.; Hagan, D. L.; Morgan, N.; Taylor, J. R.; Obermeier, M. T.; Humphreys, W. G.; Khanna, A.; Discenza, L.; Robertson, J. G.; Wang, A.; Han, S.; Wetterau, J. R.; Janovitz, E. B.; Flint, O. P.; Whaley, J. M.; Washburn, W. N.(2008). *J. Med. Chem.* 51, 1145.
- **146.** Orenitram, E. R. NEW DRUG APPROVALS Farxiga for Type-2 diabetes.
- **147.** Idris, I. (2013). News and Views. *Diabetes Obes. Metab.* **15**, 96.
- **148.** Nomura, S.; Kawanishi, E.; Ueta, K (2005). PCT Int. Appl. WO2005012326.
- **149.** US Food and Drug Administration. (2013). FDA approves Invokana to treat type 2 diabetes.
- **150.** Goodwin, N. C., Mabon, R., Harrison, B. a, Shadoan, M. K., Almstead, Z. Y., Xie, Y., Healy, J., Buhring, L. M., DaCosta, C. M., Bardenhagen, J., Mseeh, F., Liu, Q., Nouraldeen, A., Wilson, A. G. E., Kimball, S. D., Powell, D. R., and Rawlins, D. B. (2009). *J. Med. Chem.* **52**, 6201.
- **151.** Henderson, I., Sharpless, K. B., and Wong, C. (1994). *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 558.
- **152.** Schirch, L.V and Diller, A. (1971). *J. Biol. Chem.* **24**, 3961.
- **153.** Cai, K., Schirch, D. and Schirch, V. (1995). *J. Biol. Chem.* **270**, 19294.

- **154.** Zheng, L., Baumann, U., and Reymond, J.-L. (2004). *Nucleic Acids Res.* **32**, 115.
- **155.** Steffens, D. L., and Williams, J. G. K. (2007). *J. Biomol. Tech.* **18**, 147.
- **156.** Airaksinen, a, and Hovi, T. (1998). *Nucleic Acids Res.* **26**, 576.
- **157.** Kille, S., Acevedo-Rocha, C. G., Parra, L. P., Zhang, Z.-G., Opperman, D. J., Reetz, M. T., and Acevedo, J. P. (2013). *ACS Synth. Biol.* **2**, 83.
- **158.** Bhavani, B. S., Rajaram, V., Bisht, S., Kaul, P., Prakash, V., Murthy, M. R. N., Appaji Rao, N., and Savithri, H. S. (2008). *The FEBS J.* **275**, 4606.
- **159.** Shostak, K. and Schirch, V. (1988). *Biochemistry*, **27**.8007.
- **160.** Darby, N.J and. Creighton, T.E (1993) Protein structure. IRL Press at Oxford University Press.
- **161.** Alfonsi, K., Colberg, J., Dunn, P. J., Fevig, T., Jennings, S., Johnson, T. a., Kleine, H. P., Knight, C., Nagy, M. a., Perry, D. a., and Stefaniak, M. (2008). *Green Chem.* **10**, 31.
- **162.** Henderson, R. K., Jiménez-González, C., Constable, D. J. C., Alston, S. R., Inglis, G. G. a., Fisher, G., Sherwood, J., Binks, S. P., and Curzons, A. D. (2011). *Green Chem.* **13**, 854.
- **163.** Mattos, C., Bellamacina, C. R., Peisach, E., Pereira, A., Vitkup, D., Petsko, G. A., and Ringe, D. (2006). *J. Mol. Biol.* **357**, 1471.
- **164.** Park, E., Kim, M., and Shin, J.-S. (2010). *Adv. Synth. Catal.* **352**, 3391.
- **165.** Miller, D., Wang, Y., Xu, H., Harich, K., and White, R. H. (2014). *Biochemistry* **53**, 4635.
- **166.** Steinreiber, J., Fesko, K., Reisinger, C., Schürmann, M., van Assema, F., Wolberg, M., Mink, D., and Griengl, H. (2007). *Tetrahedron* **63**, 918.
- **167.** Baer, K., Dückers, N., Rosenbaum, T., Leggewie, C., Simon, S., Kraußer, M., Oßwald, S., Hummel, W., and Gröger, H. (2011). *Tetrahedron: Asymmetry* **22**, 925.
- **168.** Karplus, M. (1959). *J. Chem. Phys.* **30**, 11.
- 169. Karplus, M. (1963). J. Am. Chem. Soc. 85, 2870.
- 170. Papa, C. and Tomasini, C. (2000). Eur. J. Org. Chem. 8, 1569.
- **171.** Muramatsu, W., and Takemoto, Y. (2013). *The J. Org. Chem.* **78**, 2336.
- **172.** Shanmuganathan, S., Natalia, D., van den Wittenboer, A., Kohlmann, C., Greiner, L., and Domínguez de María, P. (2010). *Green Chem.* **12**, 2240.

- 173. Dünkelmann, P., Kolter-Jung, D., Nitsche, A., Demir, A. S., Siegert, P., Lingen, B., Baumann, M., Pohl, M., and Müller, M. (2002). *J. Am. Chem. Soc.* 124, 12084.
- 174. Lavandera, I., Kern, A., Ferreira-Silva, B., Glieder, A., de Wildeman, S., and Kroutil W.(2008). *J. Org. Chem.* 73, 6003.
- 175. Kulig, J., Simon, R. C., Rose, C. a., Husain, S. M., Häckh, M., Lüdeke, S., Zeitler, K., Kroutil, W., Pohl, M., and Rother, D. (2012). *Catal. Sci. Tech.* 2, 1580.
- **176.** Goldberg, K., Schroer, K., Lütz, S., and Liese, A. (2007). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **76**, 249.
- 177. Husain, S. M., Stillger, T., Dünkelmann, P., Lödige, M., Walter, L., Breitling, E., Pohl, M., Bürchner, M., Krossing, I., Müller, M., Romano, D., and Molinari, F. (2011). *Adv. Synth. Catal.* 353, 2359.
- **178.** Bubb, W. a. (2003). *Concepts. Magn. Reson.* **19A**, 1.
- **179.** Graening, T., Bette, V., Neudörfl, J., Lex, J., & Schmalz, H. G. (2005). *Org. Lett.* **7**, 4317.
- **180.** Arjona, O., Gomez, A. M., López, J. C., & Plumet, J. (2007). *Chem. Rev.* **107**, 1919.
- **181.** Shing, T. K., & Cheng, H. M. (2007). *The J. Org. Chem.* **72**, 6610.
- **182.** Usami, Y. (2014). Studies in Natural Products Chemistry **41**, 287.
- **183.** Acheson, R. M., & Robinson, R. (1952). *J. Chem. Soc.* **198**, 1127.
- **184.** Guillena, G., Najera, C., & Ramon, D. J. (2007). *Tetrahedron: Asymmetry* **18**, 2249.
- 185. Baldwin, J. E., & Lusch, M. J. (1982). Tetrahedron 38, 2939.
- **186.** Mukherjee, S., Yang, J. W., Hoffmann, S., & List, B. (2007). *Chem. Rev.* **107**, 5471.
- **187.** Yang, J. M., Zhu, C. Z., Tang, X. Y., & Shi, M. (2014). *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**, 5142.
- **188.** Felix, R. J., Munro-Leighton, C., & Gagné, M. R. (2014). *Acc. Chem. Res.* **47**, 2319.
- **189.** Cui, M., Liang, D., and Ma, F. (2013). *Mol. Biol. Rep.* **40**, 697.
- **190.** Maeda, H., and Dudareva, N. (2012). *Annu. Rev. Plant. Biol.* **63**, 73.
- **191.** Wu, T.-K., Liu, Y.-T., Chang, C.-H., Yu, M.-T., and Wang, H.-J. (2006). *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 6414.
- **192.** Rontein, D., Onillon, S., Herbette, G., Lesot, A., Werck-Reichhart, D., Sallaud, C., and Tissier, A. (2008). *J. Biol. Chem.* **283**, 6067.
- **193.** Takikawa, H., Hachisu, Y., Bode, J. W., and Suzuki, K. (2006). *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 3492.

- **194.** Enders, D., Niemeier, O., and Balensiefer, T. (2006). *Angew. Chem. Int. Ed.***45**, 1463.
- **195.** Khalil, N. S. a M. (2010). Eur. J. Med. Chem. **45**, 5265.
- **196.** Kamal, A., Shaheer Malik, M., Bajee, S., Azeeza, S., Faazil, S., Ramakrishna, S., Naidu, V. G. M., and Vishnuwardhan, M. V. P. S. (2011). *Eur. J. Med. Chem.* **46**, 3274.
- **197.** Karino, M., Kubouchi, D., Hamaoka, K., Umeyama, S., and Yamataka, H. (2013). *The J. Org. Chem.* **78**, 7194.
- **198.** Zannetti, M. T., Walter, C., Knorst, M., & Fessner, W. D. (1999). *Chem. Eur. J.* **5**, 1882.
- **199.** Taylor, M. K., Trotter, K. D., Reglinski, J., Berlouis, L. E. a., Kennedy, A. R., Spickett, C. M., and Sowden, R. J. (2008). *Inorg. Chim. Acta.* **361**, 2851.
- **200.** Lanning, M. E., and Fletcher, S. (2013). *Tetrahedron Lett.* **54**, 4624.
- **201.** George C., Hopkins, James P., Jonak, Harry J. Minnemeyer, and Howard T (1967). *J. Org. Chem.* **32**, 4040.
- **202.** Janzen, E., Kolter, D., Feldmann, R., and Pascal, D. (2002). *Adv. Synth. Catal.***344**, 96.
- **203.** Vidal, L., Durany, O., Suau, T., Ferrer, P., Benaiges, M., and Caminal, G. (2003). *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **78**, 1171.
- **204.** Hanahan, D., (1983). *J. Mol. Biol.* **166**, 557.
- **205.** Laemmli, U. K. (1970). *Nature*, **227**, 680.
- **206.** Sambrook, J.; Fritsch, E. F. a. M., T.(1989) Molecular Cloning: a laboratory manual; 2nd ed. N.Y ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- **207.** Bradford, M. M. (1976). *Anal. Biochem.* **72**, 248.
- **208.** Liu, J. Q., Nagata, S., Dairi, T., Misono, H., Shimizu, S., and Yamada, H. (1997). *Eur. J. Biochem.* **245**, 289.
- **209.** Chiu, T. H., & Feingold, D. S. (1969). *Biochemistry*, **8**, 98.
- **210.** Wagner, R. W., Johnson, T. E., and Lindsey, J. S. (1997). *Tetrahedron*, **53**, 6755.
- **211.** Taylor, M. K., Trotter, K. D., Reglinski, J., Berlouis, L. E. a., Kennedy, A. R., Spickett, C. M., and Sowden, R. J. (2008). *Inorg. Chim. Acta.* **361**, 2851.