

T  
241

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION  
ARCHIVO HISTORICO

84417

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

---

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION  
ARCHIVO HISTORICO



Casa abierta al tiempo

“ Estudio de las Reacciones de Aminólisis  
Catalizadas por Enzimas en Disolventes  
Orgánicos ”

T E S I S

Que para obtener el grado de:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS

p r e s e n t a:

GERARDO VALERIO ALFARO

México, D. F.

2001

 **XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION  
ARCHIVO HISTORICO**

**EL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA METROPOLITANA ESTÁ INCLUIDO EN EL PADRÓN  
DE POSGRADOS DE EXCELENCIA DEL CONACYT Y ADEMÁS  
CUENTA CON EL APOYO DEL MISMO CONSEJO CON EL  
CONVENIO NÚMERO PFP-200-93**

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó:

**M. en C GERARDO VALERIO ALFARO**

El día 7 de Junio del año 2001

Comite Tutorial:

Tutor: Dr. Héctor Manuel Luna Contla \_\_\_\_\_ 

Asesor: Dr. Raymundo Cruz Almanza \_\_\_\_\_ 

Asesor: Dr. Hugo Sergio García Galindo \_\_\_\_\_ 

Sinodal: Dr. Arturo Navarro Ocaña \_\_\_\_\_ 

Sinodal: Dr. Edmundo Castillo Rosales \_\_\_\_\_ 

## ***DEDICATORIA***

***a todos mis seres queridos***

*En especial a mi Madre por su amor y entrega a los suyos y por su valor y entereza.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A todos los miembros de mi comité tutorial a quienes agradezco su amable atención y colaboración, y particularmente al Dr. Héctor Luna quien ha sido tutor no sólo en la gestación, desarrollo y realización de este trabajo, sino más allá donde la amistad es tan importante como la responsabilidad tutorial, y me ha dejado conocer su enorme calidad humana, amén de su calidad como investigador*

*Al Dr. Vicente Gotor Santamaría que de igual forma me mostró que su sencillez y calidad humana son tan valiosas como su trabajo científico y me permitió mediante una ayuda económica, realizar una estancia en la Universidad de Oviedo en España*

*A mis alumnos-tesistas*

ÍNDICE	PÁGINA
Abreviaturas.....	i
ABSTRACT.....	iv
I. RESÚMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	5
1. EL CONCEPTO DE LA CATÁLISIS ENZIMÁTICA Y BIOTRANSFORMACIONES.....	5
2. ¿ENZIMAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS?.....	9
2.1. Papel del agua en la estructura y actividad de las enzimas en disolventes orgánicos.....	11
2.2. Papel del disolvente en la catálisis enzimática.....	12
3. VENTAJAS POTENCIALES DE EMPLEAR ENZIMAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS.....	14
3.1. Tipos de reacciones factibles en medios no acuosos.....	15
4. INVERSIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DEL SUSTRATO DE ENZIMAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS CON RESPECTO AL AGUA.....	16
5. ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y MECANISMO DE LA REACCIÓN DE LAS ENZIMAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS: UN ANÁLISIS DE HAMMET.....	19
5.1. LAS LIPASAS.....	19
6. JUSTIFICACIÓN DE LA ESTEREOSELECTIVIDAD DE LAS LIPASAS. ESTRUCTURAS DE ALGUNOS MODELOS PROPUESTOS.....	23
7. LA LIPASA B DE <i>Candida antarctica</i> .....	26
8. REGLAS, CRITERIOS Y SUGERENCIAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE PROCESOS BIOCATALÍTICOS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS.....	28
9. INGENIERÍA DEL DISOLVENTE: CONTROL DE LA ENANTIOSELECTIVIDAD DE LA ENZIMA POR EL MEDIO DE REACCIÓN.....	28
III. ANTECEDENTES.....	31
1. ESTUDIOS INICIALES EN LA AMINÓLISIS ENZIMÁTICA DE ÉSTERES Y DERIVADOS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS.....	32
2. RESOLUCIÓN DE AMINAS.....	33
3. AMINÓLISIS Y RESOLUCIÓN DE ÉSTERES SIMPLES.....	41

4. AMINÓLISIS Y RESOLUCIÓN DE COMPUESTOS BIFUNCIONALES: DIÉSTERES Y DIAMINAS.....	46
4.1. QUIMIOSELECTIVIDAD EN ÉSTERES $\alpha,\beta$ -INSATURADOS.....	46
4.2. AMINÓLISIS ENANTIOSELECTIVA DE HIDROXIÉSTERES Y AMINO ÉSTERES.....	48
4.3. REACCIONES DE AMONÓLISIS ENZIMÁTICA.....	57
4.4. AMINÓLISIS QUIMIOSELECTIVA DE CETO-ÉSTERES.....	59
4.5. QUIMIO- Y REGIOSELECTIVIDAD EN LA AMINÓLISIS DE AMINO ALCOHOLES.....	61
4.6. REGIO- Y ESTEREOSELECTIVIDAD EN LA AMINÓLISIS DE DIÉSTERES.....	64
5. AMINÓLISIS CON SELECTIVIDAD PROQUIRAL.....	71
6. PROCESOS DE DOBLE RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA.....	72
7. SÍNTESIS ASIMÉTRICA MEDIANTE PROCESOS DE AMINÓLISIS.....	73
7.1. Síntesis de (R)-GABOB.....	73
7.2. Síntesis de Azamacrociclos ópticamente activos.....	74
7.3. Síntesis de un sintón heterocéflico quiral.....	75
8. OTROS PROCESOS RELACIONADOS A LA AMINÓLISIS ENZIMÁTICA.....	76
8.1. TRANSAMIDACIÓN.....	76
8.2. ALCOXICARBONILACIÓN ENZIMÁTICA.....	77
8.3. PROCESOS DE HIDRAZINÓLISIS Y OXIMÓLISIS ENZIMÁTICA.....	79
9. SUSTRATOS “NO ACÍLICOS” DE LA LIPASA DE <i>Candida antarctica</i> EN PROCESOS DE AMINÓLISIS.....	82
IV. JUSTIFICACIÓN.....	85
V. HIPÓTESIS.....	87
VI. OBJETIVOS.....	89
1. GENERAL.....	90
2. PARTICULARES.....	90
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	91
1. PROTOCOLO GENERAL PARA LA OBTENCIÓN DE SUSTRATOS Y PRODUCTOS MEDIANTE SÍNTESIS QUÍMICA, O CON EL USO DE ENZIMAS.....	92



2. AMINÓLISIS QUÍMICA: PREPARACIÓN DE SUSTRATOS Y PRODUCTOS (NO ASEQUIBLES) MEDIANTE SÍNTESIS QUÍMICA.....	94
3. AMINÓLISIS ENZIMÁTICA PRELIMINAR.....	99
4. AMINÓLISIS MEDIANTE CATÁLISIS CON ESTERASAS.....	102
5. AMINÓLISIS ENZIMÁTICA DE 2-HIDROXIPROPANOATO DE <i>n</i> -BUTILO CON DIFERENTES AMINAS EN DIOXANO.....	103
6. AMINÓLISIS DE ÉSTERES DEL ÁCIDO 2-HIDROXIPROPANOICO CON <i>n</i> -BUTILAMINA CATALIZADA POR CAL EN DIOXANO.....	107
7. AMINÓLISIS DE 2-HIDROXIÉSTERES CON <i>n</i> -BUTILAMINA CATALIZADA POR CAL EN DISOLVENTES ORGÁNICOS.....	109
a) Estudio preliminar del efecto de la estructura del sustrato acilante y del disolvente en la velocidad de la aminólisis catalizada por CAL.....	109
b) La reacción general de aminólisis de 2-hidroxiésteres catalizada por CAL.....	111
8. EFECTO DE LA AMINA EN LA AMINÓLISIS CATALIZADA POR CAL DE 2-HIDROXIÉSTERES EN DIOXANO.....	113
9. EFECTO DE LA ENZIMA EN LA AMINÓLISIS CATALIZADA DE 2-HIDROXIÉSTERES EN DIOXANO.....	115
10. EFECTO DEL DISOLVENTE EN LA AMINÓLISIS CATALIZADA POR CAL DE 2-HIDROXIÉSTERES.....	118
11. ESTUDIO DE LA ESTEREOSELECTIVIDAD DE LA AMINÓLISIS DE 2-HIDROXIÉSTERES CATALIZADA POR CAL EN DIOXANO.....	119
a) Mediante derivatización química: método de Mosher.....	119
b) Efecto de la modificación del sustituyente en la posición $\alpha$ en la reacción de aminólisis de 2-hidroxiésteres con bencilamina y CAL: análisis mediante CLAR quiral.....	126
c) Estudio de la estereoselectividad de la aminólisis de 2-hidroxiésteres catalizada por CAL mediante CG-EM.....	130
12. ESTEREO- Y REGIOSELECTIVIDAD DE LA AMINÓLISIS CATALIZADA POR LIPASAS DE DIÉSTERES FUNCIONALIZADOS.....	135
a) Regio- y estereoselectividad en la aminólisis enzimática del hidroxisuccinato de dimetilo.....	135

b) Regioselectividad en la aminólisis enzimática del 2-metilidenglutarato de dimetilo.....	138
VIII. CONCLUSIONES.....	140
IX. PARTE EXPERIMENTAL.....	143
IX.1. MATERIALES Y MÉTODOS.....	143
IX.2. DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE ALGUNOS COMPUESTOS.....	153
X. BIBLIOGRAFÍA.....	159

**Lista de Abreviaturas**

aa	aminoácido
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de Etilo
Ac <sub>2</sub> O	Anhidrido acético
7-ADCA	Ácido-7-aminodesacetoxicefalosporínico
Ala	Alanina
ANL	Lipasa de <i>Aspergillus niger</i>
6-APA	Acido-6-aminopenicilámico
Ar	Grupo arilo
Cbz	Grupo protector benciloxicarbonilo
CC	Cromatografía en Columna
CAL	Lipasa de <i>Candida antarctica</i>
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CCL	Lipasa de <i>Candida cylindracea</i> , ahora lipasa de <i>Candida rugosa</i>
CG-EM	Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
CLEC	Enzimas Cristalinas Entrecruzadas (Cross-Linked Enzyme Crystals)
CLL	Lipasa de <i>Candida lipolitica</i>
CRL	Lipasa de <i>Candida rugosa</i> , antes CCL
CVL	Lipasa de <i>Chromobacterium viscosum</i> (PGL)
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
E	Valor estimado de la Enantioselectividad
$E_a$	Energía de Activación
<i>e.d.</i>	Exceso diastereomérico
<i>e.e.</i>	Exceso enantiomérico
EM	Espectrometría de Masas
<i>eV</i>	electrón-volt

GCL	Lipasa de <i>Geotrichum candidum</i>
HATR	Reflectancia totalmente atenuada horizontal
His	Histidina
HLL	Lipasa de <i>Humicola lanuginosa</i>
Ile	Isoleucina
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
Log P	Una manera de estimar la Hidrofobicidad del disolvente orgánico
LPL	Lipasa lipoproteínica de <i>Pseudomonas sp.</i>
meq	miliequivalente
MTPA-amida	Amida de (S)-3,3,3-trifluoro-2-metoxi-2-fenil propanoilo
MTPA-Cl	Cloruro de (S)-3,3,3-trifluoro-2-metoxi-2-fenil propanoilo
MTPA-éster	Éster de (S)-3,3,3-trifluoro-2-metoxi-2-fenil propanoilo
OPTIM	OPTIMASA-440, proteinasa de <i>Bacillus licheniformis</i>
OPTICLEAN	proteinasa de <i>Bacillus alcalophyllus</i>
PAL	Lipasa de <i>Pseudomonas aeuroginosa</i>
PaL	Lipasa de <i>Pseudomonas alcaligenes</i>
PCL	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> , ó de <i>Burkholdeleria cepacia</i>
PFL	Lipasa de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
PGL	Lipasa de <i>Pseudomonas glumae</i> (CVL)
Phe	Fenilalanina
PLE	Esterasa de Hígado de cerdo
PPL	Lipasa de páncreas porcino
% C	Por ciento de conversión
PsL	Lipasa de especies de <i>Pseudomonas</i> (y Lipasa "P" de Amano)
$\alpha$ -QTP	Proteinasa $\alpha$ -Quimiotripsina
RAL	Lipasa de <i>Rhizopus arrhizus</i>
RDL	Lipasa de <i>Rhizopus delemar</i>
RML	Lipasa de <i>Rhizomocur miehei</i>
RNL	Lipasa de <i>Rhizopus niveus</i>
ROL	Lipasa de <i>Rhizopus oryzae</i>

RMN- <sup>19</sup> F	Resonancia Magnética Nuclear de Flúor
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
Ser	Serina
T <sub>R</sub>	Tiempo de Retención
TMS	Tetrametilsilano
μm	micrómetros

**ABSTRACT**

*Candida antarctica* lipase CAL, catalyzed the aminolysis reaction of 2-hydroxy esters with amines in organic solvents to yield the corresponding 2-hydroxy amides. This enzyme accepts several 2-hydroxy esters and amines. The reactions proceeded at 28-30°C in dioxane for 6 h with 3 mM substrates with yields ranging between 45 % (w/w) (for branched substrates) to 88% (w/w)(for linear substrates) in mild conditions, to give the corresponding amides. Although the biocatalytic process was not enantioselective (except to methyl mandelate), according our results by the analysis of the corresponding Mosher's derivatives by RMN-<sup>19</sup>F and RMN-<sup>1</sup>H spectra, and HPLC and CG-MS quiral techniques, because of its simplicity it represents an alternative method for the synthesis of simple and functionalised amides.

## ***I. RESÚMEN***

Los 2-hidroxiácidos y sus derivados ópticamente activos, ésteres y amidas, son intermediarios versátiles e importantes usados como bloques de construcción quiral, compuestos bioactivos interesantes, y se pueden convertir fácilmente en halo-ésteres, glicoles, epóxidos y aminoácidos.

Las Lipasas (EC 3.1.1.3) pueden catalizar muchas reacciones orgánicas sintéticas importantes y se recomiendan para la resolución cinética de alcoholes, ácidos carboxílicos y ésteres racémicos, debido a su enantioselectividad en ambos medios, acuoso y orgánico. En disolventes orgánicos, también es posible la resolución enzimática de 2-hidroxiácidos bifuncionales mediante esterificación, y transesterificación de sus ésteres. Más aún, la síntesis química enantioselectiva de alquilamidas involucra condiciones de reacción drásticas, que no son compatibles con la mayoría de los grupos funcionales. Las Enzimas pueden catalizar la resolución *in situ* de ésteres ó aminas en disolventes orgánicos, con un alto grado de enantioselectividad.

En años recientes varios autores han mostrado la eficiencia catalítica de la lipasa B de *Candida antarctica* (CAL) para catalizar reacciones de aminólisis. CAL exhibe una alta eficiencia catalítica en la resolución de ésteres, aminas y diaminas quirales, a través de reacciones de aminólisis y amonólisis, incluyendo regio-, quimio-, y selectividad geométrica. La síntesis de 2-hidroxiamidas catalizada por enzimas a partir de 2-hidroxiésteres, hasta donde sabemos no ha sido reportada con esta enzima; razón por la cual, la lipasa se seleccionó para realizar la aminólisis de 2-hidroxiésteres con aminas en disolventes orgánicos para producir las correspondientes 2-hidroxiamidas.

En general, las reacciones de aminólisis de los 2-hidroxiésteres probados, con *n*-butilamina, procedieron con velocidades y rendimientos similarmente buenos. CAL fue capaz de catalizar la reacción de una amplia variedad de sustratos lineales y ramificados (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), así como también de mandelato de metilo, malato de metilo e itaconato de metilo (los dos últimos, 2-hidroxidiésteres). Las reacciones procedieron a 28-30°C en dioxano durante 6 h, tiempo en el cual se observa un balance adecuado de conversión/tiempo, con sustratos a una



concentración 3 mM, con rendimientos entre el 45 % (w/w) (para sustratos ramificados) al 88% (w/w)(para los sustratos lineales). Sustratos de cadena larga como 2-hidroxicaproato de etilo, 2-hidroxiocetanoato de metilo, y mandelato de metilo dieron las reacciones más lentas (probablemente debido a impedimento estérico). Comparando sustratos lineales y ramificados de 4 y 5 carbonos, se observaron conversiones y velocidades similares.

Para probar el efecto del grupo alcoxilo durante la aminólisis, varios derivados del ácido láctico se hicieron reaccionar con *n*-butilamina como nucleófilo. La reacción biocatalizada, fue rápida en todos los casos (conversiones por encima del 80%, en 6 h.), independientemente del grupo alcoxilo (-OMe, -OEt, -O-*isobutil*, -O-*bencil*), y de la configuración absoluta del 2-hidroxiéster. Aunque la reacción no fue enantioselectiva (excepto para el mandelato de metilo) de acuerdo con nuestros resultados de RMN-<sup>19</sup>F y RMN-<sup>1</sup>H de los espectros de los derivados de Mosher, y de las técnicas de HPLC y CG-EM quirales. Estos resultados están en contraste agudo con la alta enantioselectividad reportada para 3-hidroxiésteres ampliamente estudiados por Gotor y colaboradores. Aparentemente, la proximidad del grupo hidroxilo al sitio reactivo tiene un efecto importante sobre la velocidad y la estereoselectividad de la aminólisis.

La aminólisis del malato de dimetilo y de itaconato de dimetilo (el primero un 2-hidroxiésteres) fue regioselectiva hacia el grupo éster en la posición 1, pero también modestamente enantioselectiva para el hidroxidiéster. El tartrato de dimetilo (un dihidroxí diéster) no dió la reacción de aminólisis biocatalizada.

Para probar la selectividad de la enzima respecto al nucleófilo, se probaron varias aminas con lactato de *n*-butilo y 2-hidroxicaproato de etilo como los donadores de acilo. CAL acepta a una variedad de aminas como sustratos, sin embargo, con  $\alpha$ -metilbencilamina y *sec*-butilamina, las reacciones fueron más lentas que con las aminas lineales (*n*-butil y *n*-pentilamina), probablemente debido a impedimentos de tipo estérico. Con el 3-amino-1-propanol el proceso biocatalítico fue quimioselectivo hacia el grupo amino, pero reaccionó

más lentamente que las aminas alifáticas lineales, lo cual puede deberse a la disminuida nucleofilia del grupo amino en el aminopropanol.

Finalmente, probamos la actividad catalítica de otras hidrolasas para la aminólisis de los 2-hidroxiésteres; entre las enzimas comercialmente disponibles, las lipasas de *Pseudomonas cepacia*, *Candida cylindraceae*, y *Rhizomocur miehei*, y las proteinasas subtilisina y de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus subtilis*; sin embargo, la lipasa de *Candida antarctica* dió los mejores resultados en la conversión de los 2-hidroxiésteres a las amidas.

En conclusión, esta investigación describe un método biocatalítico sencillo para la obtención de 2-hidroxiámidas a partir de sus ésteres, bajo condiciones de reacción suaves. Aunque la lipasa de *Candida antarctica* acepta un amplio rango de 2-hidroxiésteres y aminas como sustratos, esta biotransformación no muestra enantioselectividad, probablemente debido al efecto electrónatrayerente del grupo hidroxilo en los 2-hidroxiésteres.

Optically active 2-hydroxy acids and their esters and amides derivatives are versatile and important intermediates used as chiral auxiliary building blocks, bioactive compounds, and can easily be converted into chiral halo-esters, glycols, epoxides, and amino acids.

Lipases (EC 3.1.1.3) can catalyze many synthetic organic reactions and are suitable for the kinetic resolution of racemic alcohols, carboxylic acids and esters, due to their enantioselectivity in both, aqueous and organic media. In organic solvents, the enzymatic resolution of bifunctional 2-hydroxy acid by esterification, and by transesterification of their esters, is possible. Furthermore, chemical enantioselective synthesis of alkylamides involves drastic reaction conditions, which are not compatible with most functional groups. Enzymes can catalyze the *in situ* resolution of either, esters, or amines, in organic solvents with high degree of enantioselectivity.

In recent years several authors have shown the efficiency of the lipase B from *Candida antarctica* (CAL) to catalyze aminolysis reactions. CAL has a high catalytic efficiency in the resolution of chiral esters, amines, and diamines through aminolysis and ammonolysis, including regio-, chemo-, and geometric selectivity. The enzyme-catalyzed synthesis of 2-hydroxy amides from 2-hydroxy esters, to the best of our knowledge has not been reported with this enzyme, for this reason, the lipase was selected to achieve the aminolysis of 2-hydroxy esters with amines in organic solvents to yield the corresponding 2-hydroxy amides.

In general, the aminolysis of the 2-hydroxy esters tested, with *n*-butylamine proceeded with similar rate and good yields. CAL was able to catalyze the reaction of a wide range of substrates including linear and branched substrates (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>), and also methyl mandelate, methyl malate and methyl itaconate (last two, 2-hydroxy diesters). The reactions proceeded at 28-30°C in dioxane for 6 h with 3 mM substrates with yields ranging between 45 % (w/w) (for branched substrates) to 88% (w/w)(for linear substrates). Long chain substrates as ethyl 2-hydroxy caproate, methyl-2-hydroxy octanoate, and methyl mandelate gave slower reactions (probably due to steric hindrance). Comparing linear and branched substrates, similar conversion rates were observed.

To prove the effect of the alcoxyl group during the aminolysis, several lactic acid esters were reacted with *n*-butyl amine as nucleophile. The biocatalyzed reaction was fast in all cases (conversions over 80% in 6 h), regardless the alcoxyl group (-OMe, -OEt, -O-*i*-butyl, -O-benzyl), and the 2-hydroxy ester absolute configuration. Although, the reaction was not enantioselective (except to methyl mandelate) according our results by the analysis of the corresponding Mosher's derivatives by RMN-<sup>19</sup>F and RMN-<sup>1</sup>H spectra, and HPLC and CG-MS quiral techniques. These results are in sharp contrast with the high enantioselectivity reported for 3-hydroxy esters widely reported by Gotor *et al.* Apparently, the proximity of the hydroxyl group to the reactive site has an important effect on the stereoselectivity of the aminolysis.

The aminolysis of methyl malate and methyl itaconate (two 2-hydroxy diesters) was regioselective toward the ester group at position 1, but modestly enantioselective too.

In order to prove the enzyme selectivity with respect to the nucleophile, several amines were tested with *n*-butyllactate and ethyl 2-hydroxy caproate like acyl donors. CAL accepts a variety of amines as substrates, however, with  $\alpha$ -methyl benzylamine and *sec*-butylamine, the reactions were slower than with the other amines (*n*-butyl and *n*-pentyl), probably due to steric hindrance. The biocatalytic process with 3-amino-1-propanol was chemoselective toward the amino group, but it reacted slower than with the other amines, maybe because of decrease in nucleophilicity of the amino group in this compound.

Finally, we tested the catalytic activity of other hydrolases for the aminolysis of the 2-hydroxy esters; lipases from *Pseudomonas cepacia*, *Candida cylindraceae*, and *Rhizomucor miehei*, and the proteases Subtilisin Carlsberg, *Bacillus lichueniformis* y *Bacillus alcalophyllus*; however, CAL gave better results for conversion of 2-hydroxy esters to the amides.

In conclusion, this research describes a biocatalytic method to prepare 2-hydroxy amides from their esters under mild conditions. Although the lipase from *Candida antarctica* was able to accept a wide range of 2-hydroxy esters and amines as substrates, this biotransformation did not show enantioselectivity, probably because of the electron withdrawing effect of the hydroxyl group in the 2-hydroxy esters.

## ***II. INTRODUCCIÓN***

## 1. EL CONCEPTO DE LA CATÁLISIS ENZIMÁTICA Y LAS BIOTRANSFORMACIONES

El potencial químico y biotecnológico de los sistemas bioquímicos, ha sido reconocido por el hombre desde la antigüedad, siendo la producción fermentativa del alcohol (etílico) y del vinagre dos ejemplos clásicos. Una vasta cantidad de productos naturales biológicamente activos, como los fármacos, se producen y se modifican mediante transformaciones enzimáticas o a través de fermentaciones.<sup>1</sup>

Los científicos que trabajan en la frontera entre la química y la biología, han usado transformaciones bioquímicas en sus investigaciones, aplicando enzimas y microorganismos para la solución de problemas mecanísticos y estereoquímicos o bien estudiando las reacciones químicas catalizadas por dichas enzimas y su posterior implementación a procesos biotecnológicos (Figura II.1).

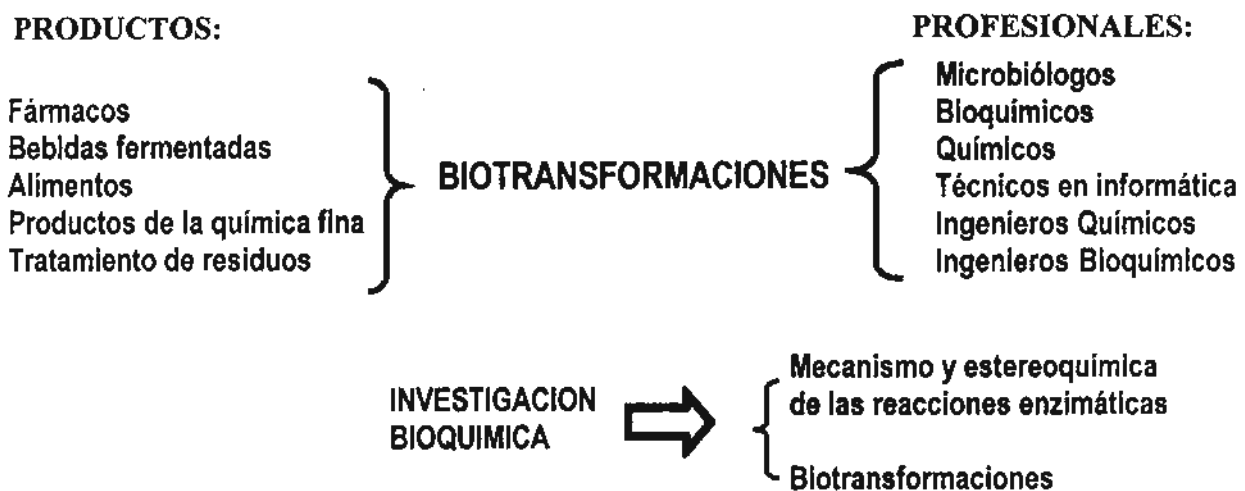


FIGURA II.1. Las Biotransformaciones y su interrelación con otras disciplinas.

Es en este contexto en el cual reside el interés de presentar este trabajo, y en virtud de que uno de los desarrollos más significativos en el campo de la química orgánica sintética ha sido la aplicación de sistemas biológicos; sean enzimas, extractos celulares o microorganismos viables, a las reacciones químicas orgánicas.<sup>2</sup>

Así entonces, las biotransformaciones ó bioconversiones, son las reacciones químicas catalizadas por enzimas ó sistemas enzimáticos, que exhiben altos niveles de especificidad y selectividad quimio-, regio- y estereoquímica, y que tienen como ventajas, trabajar en condiciones suaves, y que son las siguientes:<sup>3</sup>

- *Temperaturas moderadas*
- *pH's cercanos a la neutralidad*
- *Presión atmosférica,*
- *Son procesos ambientalmente aceptables*

Las reacciones químicas catalizadas por enzimas son esencialmente las mismas que se llevan a cabo en la química orgánica convencional; es decir, las enzimas incrementan la velocidad de una reacción disminuyendo la  $E_a$  del estado de transición, del mismo modo como lo hacen los catalizadores comunes. La diferencia fundamental entre estos y aquellas reside en la especificidad de sustrato (por uno sólo o unos cuantos sustratos), así como los niveles de selectividad (quimio-, regio- y estereo-) que se logra con las enzimas aisladas.<sup>4</sup>

De este modo, es posible que la principal aportación de las enzimas a los procesos químicos, particularmente los orgánicos, sea su capacidad para ejercer diversos niveles de especificidad y selectividad que no se logra tan fácilmente en la química orgánica convencional, y que se divide como sigue:<sup>5</sup>

- *Quimioselectividad*
- *Regioselectividad*
- *Estereoselectividad (Enantio y Diastero) y selectividad Proquiral*



Con la concomitante contribución a la determinación de configuraciones relativas, y al desarrollo de metodología para la síntesis de compuestos enantioméricamente puros (productos naturales, fármacos, drogas, saborizantes, fragancias, compuestos orgánicos de la química fina e industrial etc.).<sup>6</sup>

Para ilustrar esto, considérese el perfil energético (coordenada de reacción) de la esterificación de los enantiómeros del ácido láctico (1) (Figura II.2), catalizada por la lipasa de *Candida Cilindraceae* (CCL), ahora lipasa de *Candida rugosa* (CRL), en la que se observa que el enantiómero "S" reacciona más rápidamente que el enantiómero "R", por acomodarse mejor en el sitio activo de la enzima, conduciendo a una disminución de la  $E_a$  del estado de transición de dicho isómero con respecto a su enantiómero "R", con una diferencia de energía libre de activación ( $\Delta\Delta G$ ) suficiente que se traduce en la mayor producción del éster de la configuración correspondiente.<sup>7</sup>

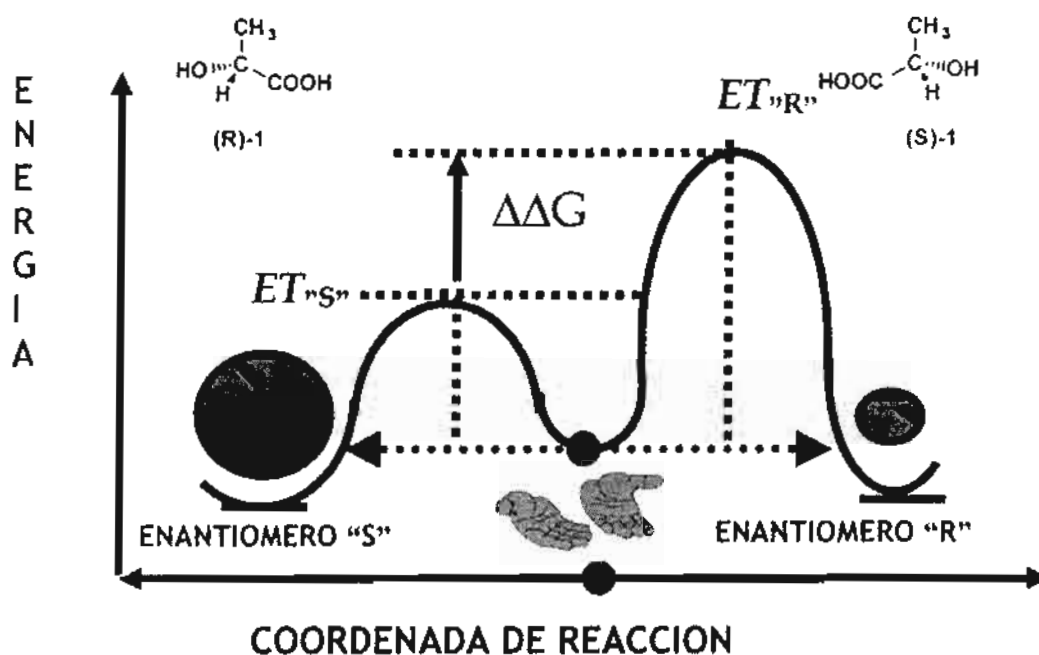


FIGURA II 2. La base de la enantio-diferenciación enzimática: Disminución de la  $E_a$  del estado de transición en la reacción de esterificación del ácido láctico ( $\pm$ )-(1), catalizada por la enzima CRL, en la que  $\Delta\Delta G$  corresponde a la diferencia de energía de activación abatida por una lipasa para el enantiómero "S" respecto del enantiómero "R"

Aunque como en el caso citado, un gran número de métodos se basan en el mejoramiento de los procesos clásicos de resolución cinética (reracemización, seguida de resolución repetida, resolución dinámica, estereoinversión), actualmente se tienen procesos más elegantes, en aras de obtener rendimientos químicos y excesos enantioméricos cercanos al 100%, empleando procesos enantioconvergentes y secuencias de desracemización mediante reacciones de oxidación–reducción cíclicas.<sup>8</sup>

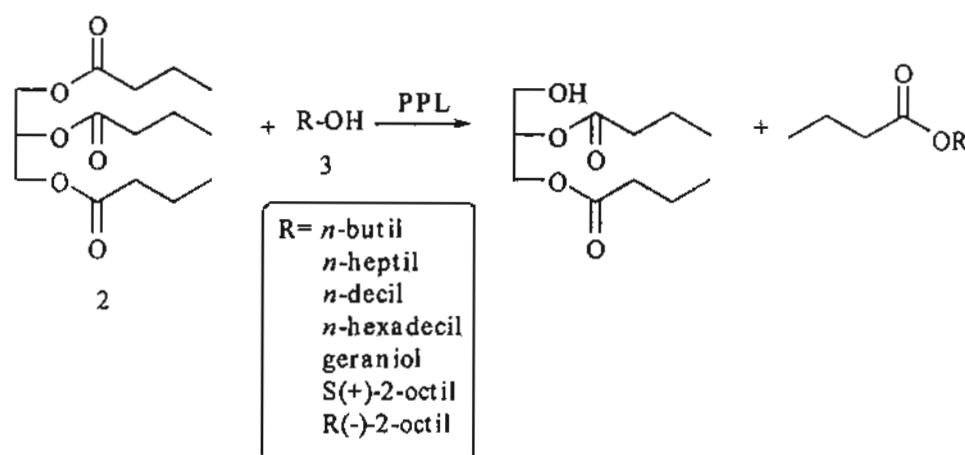
## 2. ¿ENZIMAS EN DISOLVENTES ORGANICOS?

Hace apenas unos cuantos años, había la creencia de que las enzimas solamente podrían tener actividad catalítica en soluciones acuosas. En verdad, se establece en los temas de bioquímica tradicional, que las enzimas trabajan en agua y que requieren de la misma para su actividad, y que los disolventes orgánicos, con pocas excepciones, sólo sirven para destruir la función enzimática.<sup>9,10</sup> Sin embargo, en 1966, Dastoli y Price observaron por primera vez, que algunas enzimas son activas en disolventes orgánicos.<sup>11</sup> Esto fue afortunado, porque el agua, aunque es un disolvente ideal para las especies predominantemente polares requeridas para la vida (por ejemplo aminoácidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, proteínas, cofactores y vitaminas hidrosolubles), es un disolvente muy pobre para casi todas las aplicaciones de la Industria química orgánica y farmacéutica que utilizan disolventes orgánicos principalmente.<sup>12</sup>

A principios de los 80's Alexander M. Klivanov,<sup>13</sup> reportó que además de las reacciones “naturales” de hidrólisis, algunas enzimas catalizan, en medios orgánicos “no naturales”, otros procesos no “tan naturales” tales como: esterificación, intercambio de acilo y la transesterificación, lo que permitió efectuar la preparación de ésteres y alcoholes ópticamente activos. En el trabajo pionero de Klivanov, se observó que la carboxilesterasa de hígado de perro, mostró una especificidad de sustrato nucleófilo limitada (sólo aceptó convenientemente a alcoholes primarios sin sustituyentes en los grupos metilenos adyacentes al grupo hidroxilo), la CCL (como ya se dijo también llamada CRL), mostró una mayor especificidad de sustrato, pero igual estereoselectividad que la esterasa mencionada. Sorprendentemente, Klivanov mostró que algunas enzimas no sólo pueden funcionar en

disolventes orgánicos lipofílicos con un bajo contenido de agua, sino que además pueden exhibir nuevas propiedades catalíticas, al ser deshidratadas.<sup>14</sup>

De esta manera, se observó que la lipasa pancreática porcina (PPL) catalizó la transesterificación entre tributirina (2) y alcoholes primarios y secundarios (3) en un medio 99% orgánico (Esquema II.1). Asimismo, la lipasa seca (0.015% de contenido de agua), en contraste a la enzima “húmeda” (con 0.8 % de contenido de agua), permanece activa varias horas a 100°C, y más aún, exhibe una mayor pero diferente actividad catalítica a esa temperatura. En contraste a la enzima “húmeda” que tiene una amplia especificidad de sustrato, la enzima “seca” no acepta como sustratos nucleofílicos a alcoholes terciarios.



**ESQUEMA II.1. Transesterificación de tributirina (2) y alcoholes primarios y secundarios (3), catalizada po PPL en un disolvente orgánico.**

Más tarde Klivanov mostró que las lipasas CCL y PPL, catalizan varias reacciones en disolventes orgánicos casi anhidros, como esterificación y transesterificación, las cuales tienen ventajas sobre los procesos de resolución hidrolíticos.<sup>15</sup> Como resultado se tiene que se pueden producir alcoholes, ácidos y ésteres ópticamente activos, con las siguientes ventajas: primero, no hay la necesidad de convertir un alcohol ó un ácido en el éster previo a la resolución enzimática, eliminando este paso sintético; segundo, la estabilidad de las enzimas es mayor en

disolventes orgánicos que en agua; y finalmente, no hay necesidad de inmovilizar a las enzimas para su reuso, porque son insolubles en ellos.

En resumen, cuando enzimas como las antes mencionadas se colocan en disolventes orgánicos adquieren nuevas propiedades, tales como mayor estabilidad, alteración de su especificidad por el sustrato y capacidad para catalizar nuevas reacciones, que en agua son imposibles por razones cinéticas o termodinámicas.<sup>16</sup> Estos aspectos han sido estudiados de manera importante, porque además de su utilidad biotecnológica, pueden arrojar luz sobre aspectos poco comprendidos de las enzimas, como son la importancia de la dinámica proteica y la flexibilidad conformacional en la catálisis, el reconocimiento molecular o el papel del agua en la estabilidad y actividad enzimáticas.

La mayor parte de los estudios se han hecho con enzimas liofilizadas, lo cual afecta tanto a la estructura de la enzima como a su dinámica. Los datos de FT-IR<sup>17</sup> y RMN en estado sólido<sup>18</sup> indican que la proteína sufre una desnaturalización parcial, con los cambios en su estructura secundaria y terciaria, si bien el cambio estructural no es demasiado grande. Resonancia Magnética Paraelectrónica<sup>19</sup> (EPR) y RMN en estado sólido,<sup>20</sup> han mostrado que el entorno del sitio activo es similar al de la proteína nativa. La suspensión de los liofilizados en disolventes orgánicos parece no provocar cambios adicionales en su estructura. En cuanto a la dinámica proteica, se ha comprobado en numerosas ocasiones que las proteínas cristalinas o liofilizadas, son menos flexibles en disolventes orgánicos que disueltas en agua.<sup>19, 16, 21</sup>

## **2.1. Papel del agua en la estructura y actividad de las enzimas en disolventes orgánicos**

Se ha comprobado que para que la enzima sea activa en un medio anhidro, es necesario que retenga cierta cantidad mínima de agua, llamada agua esencial, la cual mantiene la conformación de la enzima mediante numerosas interacciones no covalentes en las que las moléculas de agua participan activamente. Esta agua esencial es menos de una monocapa, de

modo que parte de la superficie de la enzima está en contacto directo con el disolvente.<sup>22</sup> Además actúa como un lubricante molecular, de modo que cuando hay muy pocas moléculas de agua la enzima se encuentra muy rígida, y se hace más flexible a medida que hay más agua disponible.

La estabilidad de las enzimas en disolventes orgánicos también está relacionada con la cantidad de agua unida a ellas. Así, la  $\alpha$ -quimiotripsina retiene toda su actividad tras seis meses en octano a 20°C, y la PPL es activa a 100°C, siempre que la cantidad de agua sea menor a 0.3%. Esto se debe a que en medio anhidro la enzima se encuentra muy rígida y carece de la movilidad conformacional necesaria para sufrir la desnaturalización.<sup>23</sup>

## 2.2. Papel del disolvente en la catálisis enzimática.

Se han llevado a cabo estudios cinéticos de reacciones enzimáticas en disolventes orgánicos, observándose cambios notables en  $V_{m\acute{a}x}$ ,  $K_{cat}$ ,  $K_M$ , ( $V_{cat}/K_M$ ) y en su selectividad al comparar la actividad enzimática en diferentes disolventes. Normalmente se buscan correlaciones con propiedades del disolvente, como el coeficiente de reparto (expresado como el  $\log P$ ), la polarizabilidad o la viscosidad. Lo que no está claro es si dichos cambios se producen por una modificación de las propiedades de la enzima en sí, ó si se deben a procesos fisico-químicos simples.

Los posibles efectos del disolvente orgánico son tres: la interacción de moléculas individuales con la enzima, la interacción por contacto entre la enzima y la fase orgánica o la competencia con la enzima por el agua. Se ha comprobado que la principal influencia del disolvente orgánico no es por su interacción directa con la enzima, sino por su capacidad de competir con ella por las moléculas de agua disponibles en el medio. Así, para la  $\alpha$ -quimiotripsina en distintos disolventes orgánicos anhidros, la actividad es mayor cuanto más hidrofóbico es el disolvente.<sup>24</sup> Además, cuando se añade agua, siempre por debajo del límite

de solubilidad, la actividad de algunas enzimas aumenta. Para alcanzar la actividad catalítica óptima se requiere más agua en disolventes hidrofílicos que en hidrofóbicos.<sup>19</sup> Esto se interpreta como que los disolventes hidrofílicos tienen más capacidad para disolver agua, de modo que dejan a la enzima con una cantidad muy pequeña, sólo la que está más fuertemente unida.<sup>24</sup> Al tener poca agua, la enzima está más rígida y es más estable, pero menos activa. Para que la enzima alcance el mismo nivel de hidratación en disolventes hidrofílicos que en hidrofóbicos, el sistema debe contener mayor cantidad de agua. Lo importante es, pues, la cantidad de agua unida a la enzima, y no la cantidad total de agua en el medio. Expresando la cantidad de agua en términos de actividad termodinámica, las diferencias entre disolventes son menores.

Se ha comentado en el apartado anterior que la velocidad en medio orgánico es varios órdenes de magnitud menor que la misma en agua. Además, se ha comprobado que la relación  $V_{cat}/K_M$  decrece al aumentar la hidrofobicidad del sustrato ó del disolvente ( $\log P$ ).<sup>25,26</sup> El estudio detallado de este efecto indica que una vez que el sustrato se une a la enzima, la maquinaria catalítica en un disolvente orgánico es tan eficaz como en agua ( $10^3$  veces), es decir, que la desolvatación del sustrato para unirse a la enzima es más desfavorable. Es pues, una cuestión de distribución del sustrato entre la enzima y el disolvente.

El efecto de la diferente solvatación de los sustratos se corrige trabajando con sus actividades termodinámicas.<sup>27</sup> Cuando se hacen estas correcciones, todavía queda cierta diferencia de velocidad entre disolventes, que se puede atribuir a su auténtica influencia sobre la enzima ó sobre la reacción catalizada.<sup>28</sup>

Los dos fenómenos anteriores, competencia del disolvente por el agua esencial y diferente solvatación de los sustratos, son consecuencia de procesos fisicoquímicos relativamente fáciles de estudiar. Pero el resultado de la interacción directa entre enzima y disolventes es bastante más complejo de entender por la variedad de mecanismos posibles y porque no hay técnicas adecuadas para ver la interacción de moléculas pequeñas con enzimas

en estado sólido. Se han sugerido algunos posibles efectos directos del disolvente sobre la acción de la enzima:

- *Que el sustrato unido a la enzima no esté totalmente encerrado, sino parcialmente expuesto al disolvente, de modo que su solvatación afecte al estado de transición. Por ejemplo, en la acil-subtilisina un tercio del sustrato está expuesto.<sup>29</sup>*
- *Interacción directa del disolvente con la superficie de la enzima, afectando a su estructura, ó incluso la penetración de moléculas de disolvente en el interior de la proteína.*
- *Variación de la polaridad local en el sitio activo, que afecta a la estabilidad de las cargas en el estado de transición.*
- *Competencia de los disolventes con el sustrato para unirse al sitio activo o, dicho de otro modo, que el sustrato deba desplazar moléculas de disolvente antes de adherirse al sitio de unión.<sup>30,31</sup>*

### **3. VENTAJAS POTENCIALES DE EMPLEAR ENZIMAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS**

Aunque la influencia del disolvente orgánico en la estructura y actividad de las enzimas en medio anhidro aún no se entiende del todo, su capacidad de ser activas en estos medios aporta numerosas ventajas para su aplicación en síntesis, y de ahí su gran utilidad biotecnológica. Entre las ventajas de emplear medios orgánicos se pueden destacar que es posible emplear sustratos insolubles en medio acuoso y nucleófilos distintos del agua, al mismo tiempo que se simplifican considerablemente las tareas de recuperación del catalizador mediante filtración de los productos. También se minimiza la inhibición de la enzima al quedar el producto y el sustrato retenidos mayoritariamente en la fase orgánica. Asimismo, en un medio orgánico aumenta la estabilidad de las enzimas frente a la desnaturalización, de modo que es posible variar la temperatura dentro de un margen bastante amplio (desde temperaturas menores de 0°C hasta 100°C, en algunos casos). A continuación se resumen las ventajas ofrecidas por enzimas en medios no acuosos.

- *La gran mayoría de los compuestos orgánicos son poco polares, y su solubilidad en dichos disolventes, se ve incrementada con respecto a un medio acuoso.*
- *Se puede tener un desplazamiento del equilibrio termodinámico, a favor de las reacciones de síntesis sobre las de hidrólisis.*
- *La supresión de reacciones laterales indeseadas debidas al agua, al utilizar disolventes orgánicos anhidros.*
- *Las enzimas se pueden recuperar fácilmente por filtración, y los productos se pueden separar de los disolventes de bajo punto de ebullición, mediante una simple destilación.*
- *Se reporta un incremento de la estabilidad térmica de las enzimas en disolventes orgánicos.*
- *Es posible, regular e incluso invertir, la quimio-, regio- y estereoselectividad de una enzima, cuando se le coloca en disolventes orgánicos de diferente naturaleza (polaridad, hidrofobicidad).*
- *La posibilidad potencial de usar las enzimas, directamente en nuevos procesos químicos o en la optimización de los ya existentes.<sup>32</sup>*

Posteriormente a sus trabajos iniciales, Klivanov encontró, que además de las reacciones de transesterificación, la PPL cataliza reacciones de esterificación, aminólisis, tiotransesterificación, intercambio de acilo y oximólisis en disolventes, como hexano, acetona, THF, éter etílico, piridina y tolueno.<sup>33</sup>

### **3.1. Tipos de reacciones factibles en medios no acuosos**

En estos tipos de reacciones catalizadas por el grupo de las hidrolasas, se consideran las siguientes enzimas: las proteinasas  $\alpha$ -quimiotripsina, tripsina y subtilisina, esterasas como la PLE, lipasas como las microbianas PsL, CCL (CRL), PFL, GCL, de *Aspergillus sp*, ANL, RML y CAL, la cual cataliza todas las reacciones anteriores, y como las acilasas, por ejemplo la de hígado de cerdo.<sup>34, 35</sup>



Generalizando, tenemos el nuevo campo de la enzimología no acuosa, en el que lipasas y otras hidrolasas, actúan como catalizadores y, bajo estas condiciones catalizan procesos no factibles en agua, tales como las indicadas a continuación:

- *R-OH; Esterificación, Transesterificación, Lactonización*
- *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Peroxidación*
- *R-SH; Tiotransesterificación*
- *NH<sub>3</sub>; Amonólisis*
- *R-NH<sub>2</sub>; Aminólisis*
- *R-NH-NH<sub>2</sub>; Hidrazinólisis*
- *R (R')C=N-OH; Oximólisis*
- *R-CH(COOH)-NH<sub>2</sub>; Síntesis de péptidos*

#### **4. INVERSIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DEL SUSTRATO DE ENZIMAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS CON RESPECTO AL AGUA**

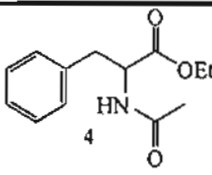
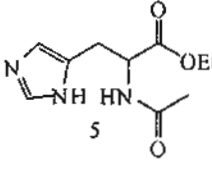
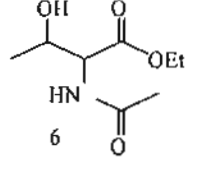
De los primeros hallazgos por Klibanov *et al.* (1986), respecto al uso de las enzimas en disolventes orgánicos, se encontró que la especificidad de la enzima se podía modificar, de acuerdo con los siguientes criterios:

- *Primero, la fuerza impulsora del enlace enzima-sustrato (para  $\alpha$ -quimiotripsina) son las interacciones hidrofóbicas entre la cadena lateral alifática del sustrato y el sitio activo de la enzima, y*
- *Si las interacciones hidrofóbicas deben su existencia al agua como medio de reacción, entonces la enantiopreferencia en disolventes orgánicos puede ser diferente al no existir dicho enlace hidrofóbico.*

Para validar esta hipótesis, se probó la especificidad de sustrato de  $\alpha$ -quimiotripsina y subtilisina en las reacciones de hidrólisis en agua y transesterificación en octano de los ésteres metílicos de fenilalanina (4), histidina (5) y serina (6) N-acetilados (Tabla II.1). En la reacción

natural de hidrólisis de ambas enzimas, de acuerdo con las premisas a) y b) arriba mencionadas, el efecto hidrofóbico es el factor por el cual los valores de  $k_{cat}/k_m$  decrecen en el orden (4) > (5) > (6), del más al menos hidrofóbico. Así por ejemplo, (4) el más hidrofóbico y el sustrato por excelencia para quimiotripsina; en la hidrólisis es mucho más reactivo que el sustrato (6) por una magnitud de  $5 \times 10^4$  (Tabla II.1, primera columna) y más reactivo que (5) por una magnitud de 2 (Tabla II.1, primera columna).

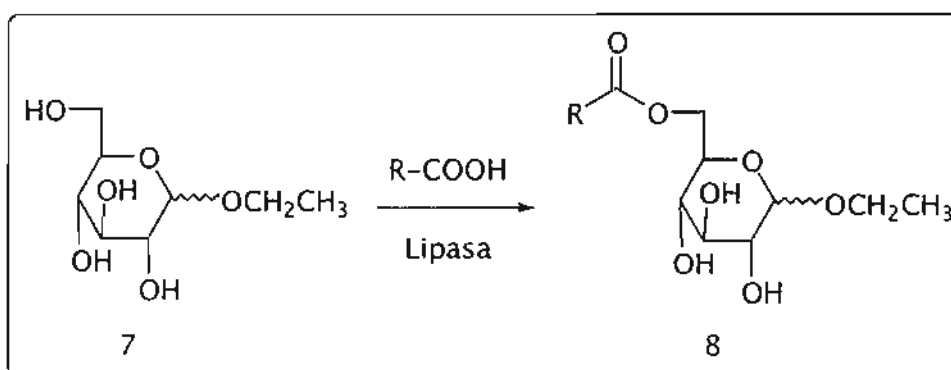
**TABLA II.1. Efecto de la modificación en la especificidad de sustrato de  $\alpha$ -quimiotripsina y subtilisina en las reacciones de hidrólisis en agua y transesterificación en octano de ésteres de  $\alpha$ -aminoácidos N-protégidos**

SUSTRATO	$k_{cat}/k_m, M^{-1}s^{-1}$			
	Quimiotripsina		Subtilisina	
	Hidrólisis	Transesterificación	Hidrólisis	Transesterificación
	$4 \times 10^4$	0.72	$1.3 \times 10^4$	1.7
	$2 \times 10^4$	15	$5.5 \times 10^2$	3.1
	0.87	2.5	$1.6 \times 10^2$	4.5

En la reacción de transesterificación en disolvente orgánico, se observó que no existe el enlace hidrofóbico, puesto que en este proceso (segunda columna de la tabla 2) el valor de  $k_{cat}/k_m$  es 3 veces mayor (más reactivo) para (6) (el sustrato menos hidrofóbico) y por consiguiente con menos demanda de este efecto en disolvente orgánico, que el más

hidrofóbico (4). Adicionalmente, el sustrato (5) cuya reactividad (y menor polaridad) es de 0.5% la de (4) en agua, en octano, es más reactivo por un factor de 20. Datos cualitativos similares se obtuvieron con subtilisina y la PLE.<sup>36</sup> Es decir, para las tres enzimas mencionadas arriba, ocurre una inversión de la especificidad de sustrato, al sustituir el agua por octano, como el medio de la reacción. Este fenómeno, parece ser general, en virtud de que el agua juega un papel importante y crítico en todos los tipos de interacciones enzima-sustrato, y por lo tanto, su reemplazo tiene un impacto determinante en la especificidad del sustrato por la enzima.

El advenimiento de la aplicación de la metodología enzimática en disolventes orgánicos, encontró sus primeras aplicaciones en la acilación regioselectiva de grupos hidroxilo catalizada por diferentes lipasas; primero, en azúcares como (7) (Esquema II.2) y más tarde en esteroides.<sup>37, 38, 39</sup>



**ESQUEMA II.2. Ejemplo de una reacción de esterificación de un azúcar y un ácido carboxílico, catalizada por lipasa en un disolvente orgánico.**

Posteriormente, Klibanov, estableció una extensión al nuevo “dogma”, en el sentido de que si las enzimas sólo requieren unas decenas de moléculas de agua “esencial” para ejercer su actividad, entonces sustituyendo el resto de la misma no requerida por la enzima, por un disolvente orgánico, llevaría a las proteínas a una rigidez estructural en él, resultando en una alta barrera cinética que impide el despliegue desnaturalizante de la conformación nativa de las enzimas.<sup>16</sup> De esta forma, Klibanov *et. al.*,<sup>36,40</sup> prueban que las proteinasas subtilisina y  $\alpha$ -

quimiotripsina, actúan como catalizadores en disolventes orgánicos anhidros, siguiendo una cinética de Michaelis-Menten (como las lipasas), y cuyos valores de  $V_{m\acute{a}x}/K_m$  correlacionan aproximadamente con la hidrofobicidad del disolvente. Asimismo, las diferentes actividades catalíticas de las enzimas en diferentes disolventes orgánicos, se deben en parte, al “retiro” de “agua esencial”, y su sustitución por los disolventes más hidrofílicos; y por otro lado a que cada disolvente debe afectar directamente (de un modo distinto) al proceso catalítico mismo.

Las proteinasas mencionadas, no están asociadas con membranas biológicas *in vivo*, y su función fisiológica es hidrolizar a proteínas solubles. De aquí que estas enzimas representan a aquellas que tienen como habitat natural al medio acuoso (opuesto a las enzimas lipolíticas ó de membrana, que trabajan en la interfase y están acostumbradas al medio no acuoso).

## **5. ESTRUCTURA, FUNCIÓN Y MECANISMO DE REACCIÓN DE LAS ENZIMAS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS: UN ANÁLISIS DE HAMMET**

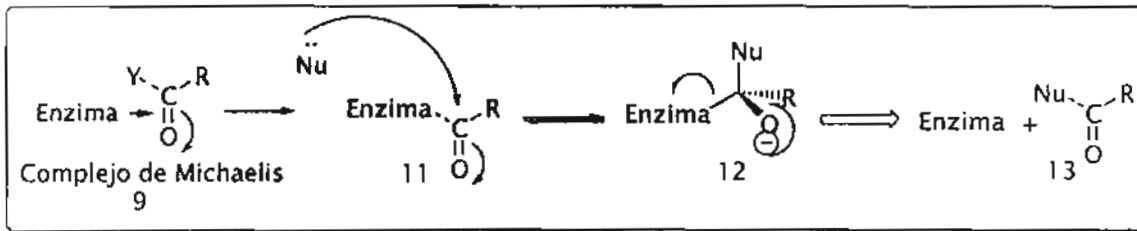
### **5.1. LAS LIPASAS**

Dentro del grupo de las hidrolasas, las lipasas son las más utilizadas para llevar a cabo transformaciones de compuestos orgánicos debido a la gran variedad disponible de ellas, a su costo relativamente bajo y a su flexibilidad para aceptar sustratos de muy diferentes estructuras.

Las lipasas son triacilglicerolhidrolasas (EC 3.1.1.3) y su función natural es la hidrólisis de triglicéridos. Se han caracterizado un gran número de ellas y se ha visto que presentan amplia variedad tanto en eficiencia como en especificidad.<sup>41</sup> Se ha obtenido la estructura primaria de varias lipasas mediante secuenciación de sus aminoácidos o de sus ácidos nucleicos. Su tamaño varía entre los 270 y los 641 aminoácidos. Todas las estudiadas hasta el momento comparten secuencias homólogas, incluyendo la serina en el entorno del

sitio activo (Gly-Y-Ser-Z-Gly, donde Z e Y denotan residuos de aminoácidos que pueden variar).

Se han determinado las estructuras de varias lipasas por rayos X. Sus estructuras tridimensionales son más parecidas entre sí de lo que podía esperarse por comparación de sus secuencias de aminoácidos. El patrón común de plegamiento hace que la disposición espacial de la maquinaria catalítica sea muy similar.<sup>42</sup> Así, desde 1990 se publicó que la estructura terciaria de lipasas microbianas, como la de *Rhizomocur miehei* (RML) refinada en alta resolución, revelándose que la tríada catalítica de dichas enzimas es: serina-histidina-asparagina, similar a la tríada de las denominadas serino-proteinasas como  $\alpha$ -quimiotripsina, tripsina y subtilisina. Esto implica que las proteinasas y las lipasas pueden compartir un mismo ancestro en el punto evolucionario, por lo cual las lipasas pueden ser prácticamente aplicables a sustratos característicos de las proteinasas, y realizar las reacciones típicas de éstas. Actualmente es bien conocido el mecanismo por el cual actúan las enzimas hidrolíticas del tipo de las serino-hidrolasas en medio acuoso,<sup>43,44,45</sup> (tales como, PLE, PPL y CCL,  $\alpha$ -quimiotripsina, tripsina y papaína que contiene a la cisteína homóloga de serina en la tríada catalítica), y que se describe como sigue: En dichas enzimas, el centro activo está conformado por serina, histidina, y ácido aspártico, y la serina es el portador del grupo hidroxilo nucleofílico, y los demás son los encargados de promover una catálisis ácido-base: En primer lugar, la enzima y el sustrato se asocian de manera no covalente para formar el complejo enzima-sustrato (9) (Esquema II.3, Figura II.3), seguido por el ataque del grupo hidroxilo de la serina sobre el carbonilo del sustrato, formándose un intermedio tetraédrico de alta energía (10), que se estabiliza por interacciones con el esqueleto proteico. Lo anterior lleva a la liberación del grupo saliente y a la formación del intermediario covalente acil-enzima (11). Este intermediario sufre el ataque del nucleófilo formando un nuevo intermediario tetraédrico (12), que elimina el grupo hidroxilo del aminoácido serina, para formar un complejo no covalente enzima-producto que finalmente se disocia en la enzima y el producto (13).



ESQUEMA II.3. Formación del complejo acil-enzima y su ataque por diversos nucleófilos diferentes al agua, en un medio orgánico

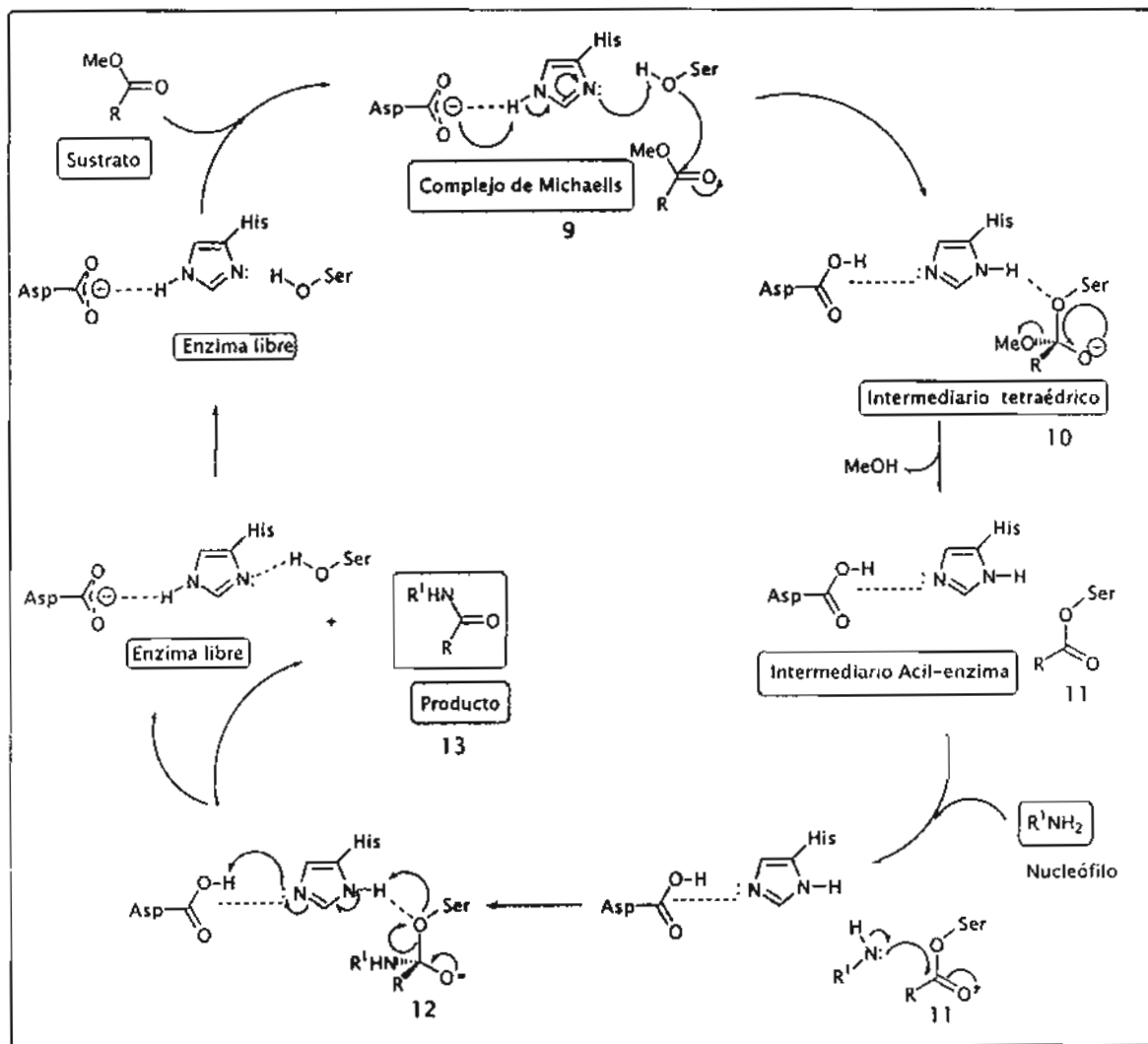


FIGURA II.3. Mecanismo de reacción de ácidos y derivados por el cual actúan las enzimas hidrolíticas del tipo de las serino-proteinasas en medio acuoso y orgánico

En medio orgánico se ha demostrado que el mecanismo catalítico de las lipasas es el mismo al descrito anteriormente, que es del tipo *ping-pong*, sin formación de complejos ternarios; este se ajusta a la cinética de Michaelis-Menten, indicando la formación del complejo acil-enzima previo a las formaciones de enlace covalentes. Con la utilización de inhibidores específicos se ha comprobado que interviene el mismo conjunto de aminoácidos del sitio catalítico mencionados en el medio acuoso.

Un análisis de *Hammett* reveló que las enzimas, no sólo pueden efectuar su función catalítica, sino que además, el mecanismo de reacción en un disolvente orgánico, transcurre esencialmente con la misma demanda estereoelectrónica respecto al conocido en medio acuoso, es decir, a través de la formación del complejo acil-enzima. En un excelente trabajo, Kanerva y Klibanov,<sup>46</sup> muestran que el mecanismo es general para las hidrolasas del tipo de las serino-proteinasas. La misma estructura del estado de transición se observa por un análisis de intercambio de deuterio.<sup>47</sup>

Las principales diferencias de una reacción en medio orgánico, con la reacción en un medio acuoso son las siguientes:

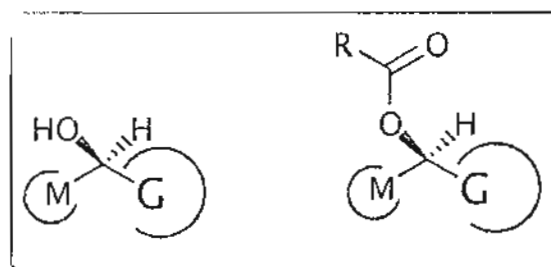
- *En medio orgánico se trata de catálisis heterogénea y puede haber limitaciones difusionales que no existen en el agua (esto es importante desde el punto de vista práctico). El problema de la difusión externa se elimina fácilmente con agitación vigorosa, mientras que la difusión interna depende del tamaño y de la estructura de las partículas de enzima.*
- *Las reacciones son varios órdenes de magnitud más lentas que en medio acuoso, aunque el número de moléculas activas de enzimas es del mismo orden que en agua.*<sup>40</sup>

La hipótesis de Klibanov de hace casi 15 años, respecto a la generalización de que “las enzimas pueden mostrar su actividad catalítica en disolventes orgánicos”, ha venido a ser soportada por la abrumadora cantidad de trabajos al respecto, hasta nuestros días.<sup>48-53</sup>

## 6. JUSTIFICACIÓN DE LA ESTEREOSELECTIVIDAD DE LAS LIPASAS. ESTRUCTURAS DE ALGUNOS MODELOS PROPUESTOS:

Normalmente se utilizan las enzimas sin tener una idea exacta de su estructura ni de sus interacciones con el sustrato. Para racionalizar y predecir los resultados de las reacciones se han propuesto diversas reglas o generalizaciones de su estereoselectividad. Se trata de reglas empíricas, deducidas a partir de los resultados obtenidos con un gran número de sustratos de diferentes estructuras. Estas reglas se basan en el tamaño de los sustituyentes del estereocentro del sustrato. También hay modelos más elaborados en los que se definen los huecos de determinado tamaño y polaridad en los que debe encajar el sustrato, según ciertos lineamientos.<sup>54-57</sup>

Una de las reglas que más se ha estudiado (“Regla de Kazlauskas”) es la que predice la estereoquímica del enantiómero que reacciona más rápidamente en la acilación de alcoholes secundarios ó en la hidrólisis de sus ésteres; y se basa en que la enantioselectividad para estos alcoholes es baja cuando los sustituyentes del estereocentro son de tamaño similar y suele mejorar cuando aumenta la diferencia en su tamaño. La estereoquímica del enantiómero favorecido se representa en la Figura II.4, donde **M** representa un sustituyente mediano y **G** uno grande.<sup>42</sup>



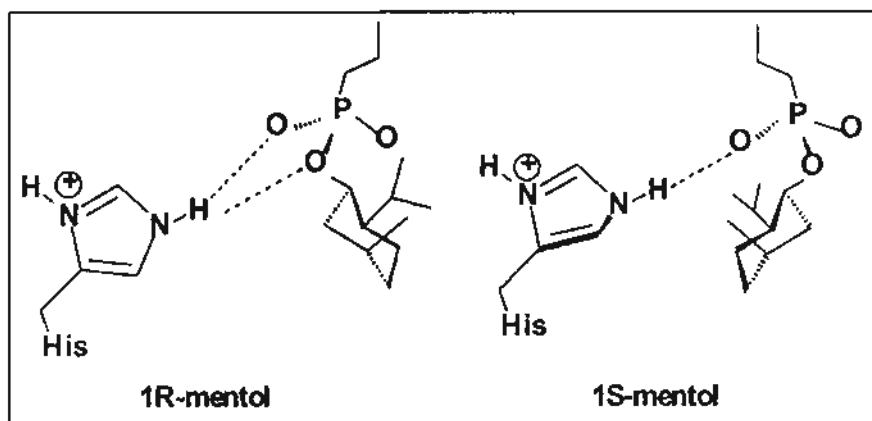
**FIGURA II.4. Predicción estereoquímica (regla de Kazlauskas) del enantiómero favorecido en la acilación enzimática de alcoholes primarios y secundarios**

Aunque la selectividad varía de unas enzimas a otras, un gran número de lipasas y esterases se ajustan a la misma regla (por ejemplo CRL, CAL-B, PSL, PCL, PFL, PPL, RML,



lipasa de *Arthrobacter sp.*, esterasa pancreática del colesterol, esterasa de *Mucor*; cultivos de *Rhizopus nigricans* y de *Bacillus Subtilus*, variedad *Níger*). La idea generalmente aceptada es que es consecuencia del patrón estructural común que comparten las lipasas. Sin embargo, esta similitud no hay que llevarla demasiado lejos porque no se ha podido desarrollar un modelo general equivalente para la selectividad de las lipasas hacia acilos quirales.

Recientemente se ha determinado el mecanismo por el que las lipasas distinguen los enantiómeros del alcohol.<sup>42</sup> Puesto que la enantioselectividad viene determinada por la diferente estabilización de los estados de transición producida por interacciones con la enzima, se analizó por difracción de rayos X el complejo de la CRL con el hexilfosfonato de mentilo. Este es un inhibidor quiral con un fósforo tetraédrico, que se supone análogo al estado de transición de la acilación (Figura II.5).



**FIGURA II.5.** Análisis del complejo de la CRL con el hexilfosfonato de mentilo, un inhibidor quiral análogo del estado de transición de la acilación

La CRL posee tres zonas para la unión del sustrato:

- *Un túnel largo e hidrofóbico para alojar la cadena del acilo que se está hidrolizando.*
- *Un pequeño hueco para alojar al oxianión, que se estabiliza por dos o tres enlaces de hidrógeno con un NH del esqueleto protéico.*

- *Una cavidad de forma ovalada en la superficie hidrofóbica, en la que se sitúa el fragmento del alcohol. Esta zona es relativamente flexible y se puede ajustar para acomodar diferentes sustratos.*

La principal diferencia entre los enantiómeros de este inhibidor es su interacción con la "His" de la tríada catalítica (Figura II.5). Los anillos de ciclohexano de los dos enantiómeros del mentol (Figura II.6), se colocan de manera similar en el hueco hidrofóbico correspondiente (Tal como está dibujado en la Figura II.5, el hueco G está por encima del plano del papel y el hueco M está por debajo), lo que determina que sus sustituyentes *O*-fosfonatos e isopropilo apunten en direcciones diferentes.

En el enantiómero favorecido (1R), el Nitrógeno de la "His" forma un enlace de hidrógeno bifurcado con el oxígeno de la "Ser" catalítica y el oxígeno del mentol, de manera que aumenta la nucleofilia de la "Ser" y simultáneamente estabiliza el oxígeno del alcóxido saliente.

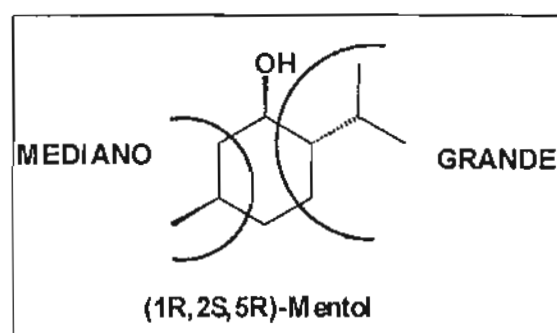
En el enantiómero desfavorecido (1S), la "His" no forma enlace de hidrógeno con el oxígeno del mentol. La ausencia de este enlace de hidrógeno es por dos razones:

- *El pequeño cambio conformacional de la enzima necesario para que encaje el isopropilo del mentol hace que el anillo de imidazol de la "His" se gire unos 60°, quedando el oxígeno del mentol alejado de la histidina.*
- *Debido a la configuración opuesta del estereocentro, el ángulo de torsión Ser-O-P-O-Cy cambia, y el oxígeno del mentol (1S) se coloca más alejado de la "His" que el del estereocentro (1R).*

Los autores proponen que la estabilización debida al puente de hidrógeno adicional entre el enantiómero (1R) y la enzima justifica la enantioselectividad. Este trabajo confirma que la enantioselección no tiene lugar porque uno de los enantiómeros no se "acomoda" en el

hueco de unión, ya que se ve que ambos se unen a la enzima en la misma posición, sino que uno de los enantiómeros puede tener más interacciones estabilizantes en el estado de transición que el otro.

Lo que nos dice la regla de Kazlauskas a la luz de estos resultados es que la unión del alcohol en el hueco hidrofóbico de la enzima viene determinada por la colocación de los sustituyentes M y G (Figura II.6) del estereocentro.



**FIGURA II.6. Preferencia estereoquímica en el sitio activo de la enzima CRL para uno de los enantiómeros del mentol**

## 7. LA LIPASA B DE *Candida antarctica*

La lipasa que mejores resultados ha dado en la reacción de aminólisis es la de *Candida antarctica*. La compañía Novo Nordisk comercializa diferentes lipasas inmovilizadas de dicho microorganismo, que se diferencian tanto en su estructura como en el soporte empleado. El presente trabajo se ha realizado con la variedad SP-435, que es la lipasa B inmovilizada en propileno y que se suele denominar CAL-B ó simplemente CAL.<sup>58</sup>

La inmovilización consiste en el atrapamiento de las moléculas de enzima en una fase permanente que permite el intercambio de materia con la fase homogénea. Es un método muy utilizado por las ventajas que presenta, pues aumenta la estabilidad de la enzima, facilita su

recuperación mediante filtración, y se evita la presencia de los aditivos que siempre contienen los crudos liofilizados de enzimas. El hecho de que la CAL-B esté inmovilizada le confiere una destacada termoestabilidad, de modo que a temperaturas relativamente altas, no sólo no se desnaturaliza sino que es más activa. Así, su actividad catalítica se conserva a 80°C para la reacción de aminólisis de ésteres en disolvente orgánico.<sup>59</sup>

La CAL-B es una proteína de 30 *KDa*, muy selectiva con alcoholes secundarios. La estructura de rayos X de esta enzima presenta en su sitio activo dos canales casi paralelos que se extienden desde la "Ser" del sitio activo hacia la superficie. Están parcialmente separados por dos cadenas hidrofóbicas de "Ile" y en ellos se alojan los fragmentos del alcohol y del acilo de sus sustratos.<sup>60</sup> También se ha identificado un fragmento de hélice  $\alpha$  que posee cierta movilidad pero que no impide el acceso del disolvente al sitio activo, como sucede con otras lipasas. Esto, unido al hecho de que no se ha detectado activación interfacial mediante pruebas de tipo bioquímico, indica que esta lipasa es algo diferente de la mayoría de las conocidas. Lo que sí tiene en común con las demás lipasas es que en las estructuras de complejos enzima-inhibidor hay una superficie hidrofóbica totalmente accesible al disolvente en el entorno del sitio activo.<sup>61,62</sup>

Su enantioselectividad con alcoholes secundarios se justifica de manera análoga a la explicada para la CRL (página 25). También la CAL-B posee un hueco hidrofóbico grande y otro mediano donde encajan los sustituyentes del estereocentro del alcohol. La simulación del estado de transición por dinámica molecular indica que el enantiómero favorecido "R" forma con la enzima un enlace de hidrógeno más que el enantiómero "S".

En un estudio realizado acerca de los tipos de procesos catalizados por la CAL-B, se encuentra que proceden, siguiendo el mismo mecanismo cinético similar al descrito para otras hidrolasas serínicas, a través del intermediario acil-enzima. Por otro lado, en cuanto al efecto del disolvente orgánico en la catálisis, la enzima sigue los mismos patrones que la mayoría de las enzimas estudiadas: Aumento de la actividad en disolventes hidrofóbicos.<sup>61,62</sup>

## 8. REGLAS, CRITERIOS Y SUGERENCIAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE PROCESOS BIOCATALÍTICOS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS

Como resultado de los estudios iniciales por Klibanov *et al.*, y otros investigadores, no cabe duda de que las enzimas pueden funcionar como catalizadores efectivos en solventes orgánicos, siguiendo algunas **reglas básicas**, por ejemplo:<sup>36</sup>

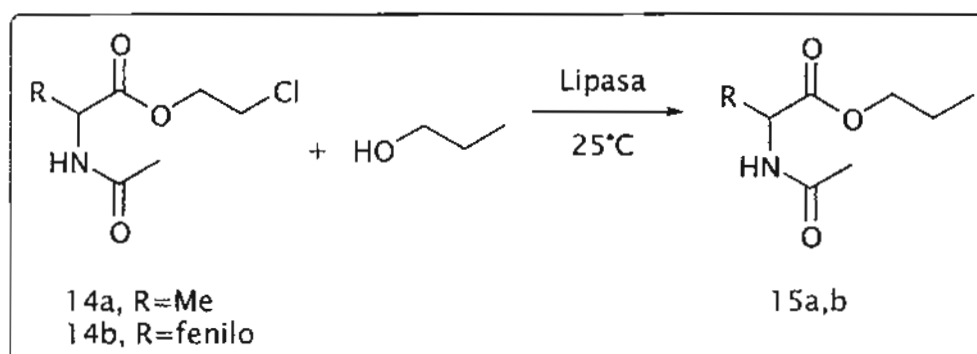
- ❑ *Selección del disolvente apropiado: es mejor un solvente hidrofóbico, que uno polar, el cual puede retirar la capa esencial de agua de la enzima (no obstante, más recientemente, se han venido usando disolventes polares, incluso DMF y DMSO como codisolventes que activan la actividad enzimática).*<sup>63</sup>
- ❑ *Es más eficiente una enzima liofilizada, recuperada de una solución acuosa de pH igual al pH donde la enzima muestra su máxima actividad enzimática.*
- ❑ *La eliminación de limitaciones difusionales (las enzimas son insolubles en disolventes orgánicos), se logra mediante una agitación vigorosa y una fina dispersión del polvo enzimático en el disolvente orgánico.*

## 9. INGENIERÍA DEL DISOLVENTE: CONTROL DE LA ENANTIOSELECTIVIDAD DE LA ENZIMA POR EL MEDIO DE LA REACCIÓN

La generalidad del fenómeno de variación de la enantioselectividad para varias enzimas,<sup>64-68</sup> al cambiar de agua a un disolvente orgánico, permite un control racional de la enantioselectividad, al sustituir el medio de reacción y no la enzima, como por ejemplo, la utilización de D-aminoácidos y derivados en procesos imposibles de realizar en agua.<sup>69</sup>

Para observar la enantioselectividad de diferentes enzimas en varios disolventes, se estudiaron las reacciones, **a)** de hidrólisis, en agua, y **b)** transesterificación, en propanol, utilizando como sustratos los 2-cloroetil ésteres de L- y D-Aminoácidos N-acetilados (14a,b)(Esquema II.4). Ambos procesos siguieron la cinética de Michaelis-Menten y del análisis cinético correspondiente, se determinaron las constantes de especificidad,

$(k_{cat}/(k_m)_L)/(k_{cat}/(k_m)_D$ , que reflejan la enantioselectividad de la enzima. La hidrólisis de N-Ac-Ala-Oet (14a) en agua, catalizada por subtilisina Carlsberg produjo  $(k_{cat}/(k_m)_L)/(k_{cat}/(k_m)_D = 1,800$  (1ª línea de la Tabla II.2). Para todos los disolventes probados, el factor de enantioselectividad fue de 1 a 2 ordenes de magnitud mas bajo. Como puede verse en la tabla 2, la elastasa, proteasa  $\alpha$ -litica, subtilisina BPN',  $\alpha$ -quimiotripsina, y tripsina, exhiben selectividad enantiomérica en agua, pero no en un disolvente orgánico. Así, mientras que en medio acuoso  $(k_{cat}/(k_m)_L)/(k_{cat}/(k_m)_D$  es del orden de  $10^3$ - $10^4$ , en éter *t*-butílico no sobrepasa de un orden de magnitud. Asimismo, también hay una correlación entre la diferencia de energía libre de activación ( $\Delta\Delta G^\ddagger = -RT \ln [(k_{cat}/(k_m)_L)/(k_{cat}/(k_m)_D]$ ), para la transesterificación catalizada por subtilisina de L- y D- enantiómeros de N-Ac-Ala-OEt-Cl (14a) en 13 diferentes disolventes orgánicos y el logaritmo del coeficiente de partición del disolvente en octanol/agua.<sup>70</sup>



**ESQUEMA II.4. Reacción de transesterificación de ésteres 2-cloroetilicos de L- y D-aminoésteres N-acetilados con propanol**

Para la interpretación de este fenómeno, se supone que si el enantiómero-D se enlaza al centro activo de la proteinasa, del mismo modo como lo hace el sustrato natural L-aminoácido-N-acilado, entonces el enlace que se rompe en la reacción no podría “encarar” al OH- de la “Ser” nucleofílica de la enzima, de modo que la ruptura nunca podría ocurrir de esta manera. Así, para que el isómero “D” sea reactivo con la enzima, debe enlazarse a ella “incorrectamente”, y esta interacción enlazante liberará menos moléculas de agua del sitio activo hidrofóbico que su contraparte, el enantiómero L. Por lo tanto, la reactividad del

enantiómero L debería reducirse en cierta extensión, y en consecuencia la enantioselectividad de la enzima deberá disminuir, conforme se incrementa la hidrofobicidad del disolvente. El modelo teórico de Klibanov supone que la diferencia de enantioselectividad de la enzima entre agua y un disolvente orgánico debería ser mayor para un sustrato con una cadena lateral voluminosa, lo cual se observa para subtilisina Carlsberg en éter butílico anhidro, al comparar  $(k_{cat}/(k_m)_L)/(k_{cat}/(k_m)_D$  en la reacción hidrolítica, comparada a la transesterificación para los 2-cloroetilésteres-N-acetilados de "Ala" (14a) y "Phe" (14b) (primeras dos líneas de la Tabla II.2). Se observa selectividad enantiomérica en agua, por varios órdenes de magnitud, pero no así en el disolvente orgánico, a pesar de la naturaleza del sustrato. Otras cinco serin-proteinasas, que aparecen en la Tabla II.2, prueban la generalidad de estas observaciones.

**TABLA II.2. Relación de enantioselectividades de diferentes enzimas para las reacciones de: a) hidrólisis en agua, y b) transesterificación en propanol, utilizando como sustratos 2-cloroetil ésteres de L- y D-aminoésteres N-acetilados**

ENZIMA	SUSTRATO	$(k_{cat}/(k_m)_L)/(k_{cat}/(k_m)_D$	
		Agua	Éter butílico
Subtilisina Carlsberg	N-Ac-Ala-OEt-Cl (14a)	1800	4.4
Subtilisina Carlsberg	N-Ac-Phe-OEt-Cl (14b)	15000	5.4
Elastasa	N-Ac-Ala-OEt-Cl (14a)	>1000	4.5
Proteasa $\alpha$ -lítica	N-Ac-Ala-OEt-Cl (14a)	>10000	8.3
Subtilisina BPN'	N-Ac-Phe-OEt-Cl (14b)	>16000	7.3
$\alpha$ -quimiotripsina	N-Ac-Ala-OEt-Cl (14a)	710	3.2
Tripsina	N-Ac-Phe-OEt-Cl (14b)	>4000	3.2

En conclusión, una alternativa para encontrar una modificación de la enantioselectividad de la enzima, sin modificarla, consiste en cambiar el medio de la reacción, esto es lo que se conoce como **Ingeniería del disolvente**.

### ***III. ANTECEDENTES***

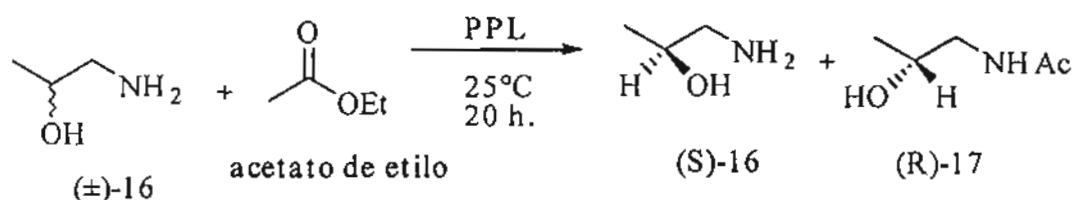


## 1. ESTUDIOS INICIALES EN LA AMINÓLISIS ENZIMÁTICA DE ÉSTERES Y DERIVADOS EN DISOLVENTES ORGÁNICOS

Aunque la conversión química directa de ésteres en amidas es una operación sintética útil, se requieren condiciones drásticas de reacción, tales como altas temperaturas, tiempos de reacción prolongados, o álcalis como catalizadores, las cuales no son compatibles con la funcionalidad de algunos de los productos de interés.

Cada vez es mayor el interés de los químicos orgánicos en el uso de las enzimas en la preparación de compuestos ópticamente activos de máxima importancia para la síntesis de fármacos, agroquímicos ó productos químicos finos, todos ellos en forma enantioméricamente pura. Es conocido el hecho de que las enzimas pueden “trabajar” no sólo en su ambiente natural sino también en disolventes orgánicos, donde pueden realizar reacciones difíciles ó incluso imposibles de efectuar en agua, y así se ofrecen nuevas posibilidades al químico orgánico sintético. En esta metodología, “enzimología en medios no acuosos”, han venido surgiendo nuevas reacciones orgánicas catalizadas por las enzimas hidrolíticas, tales como lactonización, oximólisis, amidación y transamidación. Asimismo, con dichas enzimas se pueden efectuar resoluciones cinéticas de ácidos, aminas y derivados de ambos. El desarrollo de esta metodología es aplicable a la síntesis de amidas y compuestos relacionados, mediante las reacciones de condensación correspondientes, a partir de ésteres racémicos y aminas racémicas, lo cual resulta ser una alternativa interesante a los métodos convencionales, dada la importancia del enlace amido que se encuentra presente en un gran número de compuestos de interés biológico. A la fecha existe un buen número de trabajos publicados al respecto, aunque el número de revisiones es mínimo. Fue el mismo Klibanov quien predijo la posibilidad de que las lipasas pudieran catalizar la formación de un enlace amido, y quién primero reportó la aplicación de esta reacción de amidación entre *n*-butirato de metilo y *n*-butilamina,<sup>33</sup> y en la síntesis de péptidos;<sup>71,72</sup> pero la utilidad de éstas enzimas en la preparación de amidas quirales, y la resolución de aminas y ésteres quirales fue primeramente demostrada por Gotor y su grupo.<sup>73,74</sup>

En un trabajo pionero en el campo de las reacciones de aminólisis, Gotor *et al.*<sup>75</sup> reportaron la acilación enantioselectiva de ( $\pm$ )-1-amino-2-propanol (16) con PPL y acetato de etilo (como agente acilante), para dar la amida (R)-17, en más del 95% de *e.e.* (Esquema III.1). Con CCL, los rendimientos fueron más bajos.



**ESQUEMA III.1. Acilación enantioselectiva de 1-amino-2-propanol con PPL y acetato de etilo como agente acilante y disolvente**

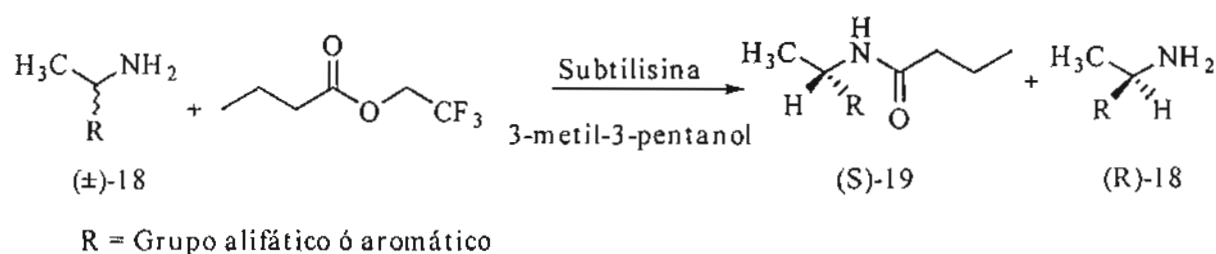
## 2. RESOLUCION DE AMINAS

Las aminas quirales constituyen una clase importante de compuestos orgánicos debido a su utilidad como materias primas para la preparación de compuestos farmacéuticos importantes y de interés para la industria en general.<sup>76</sup>

Se han utilizado enzimas proteolíticas para la resolución cinética de aminas. Sin embargo, las lipasas presentan varias ventajas, por ejemplo; poseen muy baja actividad amidasa. Así, Klivanov *et al.* habían probado lipasas en la aminólisis de ésteres activados, en disolventes orgánicos, tales como: CRL, PPL, PsL, la lipasa de *Candida sp* 382), así como la lipasa obtenida del polvo acetónico de hígado de caballo. Esta última fue la más eficiente en la condensación de butirato de etilo y *n*-hexilamina, usando como disolvente un exceso del éster (con heptano como disolvente, la reacción fue más lenta).<sup>77</sup>

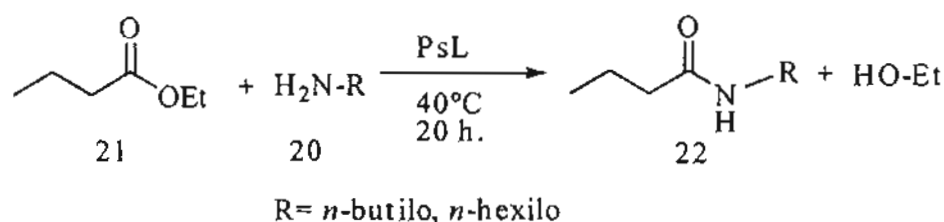
Por otro lado en un intento de encontrar un biocatalizador eficiente para la resolución de aminas racémicas, Klivanov *et al.*, investigaron la proteinasa subtilisina Carlsberg y las

lipasas CCL, PsL PPL, de *Mucor sp.* y CVL en la reacción de butirato de 2,2,2-trifluoroetilo como el reactivo acilante y los enantiómeros de  $\alpha$ -metil bencilamina (( $\pm$ )-18, R=fenilo), y *n*-octano como disolvente, que sin embargo no dió los resultados esperados. Con base en los estudios iniciales realizados por el mismo grupo,<sup>77</sup> en relación a la influencia del disolvente orgánico como un factor importante que afecta la enantioselectividad de estos procesos, se probaron varios disolventes para la reacción anterior, utilizando subtilisina como catalizador y observándose la marcada preferente enantioselectividad de esta enzima. De los diferentes disolventes probados, los mejores resultados se obtuvieron con 3-metil-3-pentanol (Esquema III.2). La enzima exhibió una gran selectividad hacia el isómero "S" de la amina (18), obteniéndose las amidas (S)-19 y las aminas (R)-18, con altos *e.e.*'s.



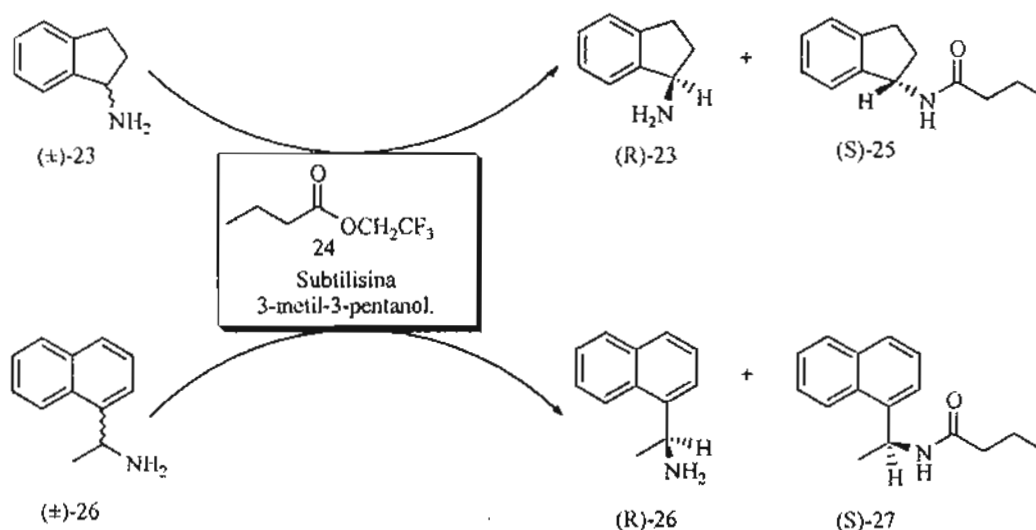
### ESQUEMA III.2. Enantioselectividad de la enzima subtilisina hacia el isómero "S" de la amina, en la obtención de amidas "S"

Es muy importante tener presente el agente acilante para la resolución de las aminas, porque con respecto a los alcoholes, son más reactivas que estos con algunos agentes acilantes como los ésteres de enol, con los cuales reaccionan exotérmicamente aún en ausencia de la enzima. En estos casos es conveniente usar condiciones controladas cuidadosamente, como se muestra en la resolución de Gutman *et al.*,<sup>79</sup> ó bien utilizando ésteres no activados, incluso como disolvente de la reacción como se describe en el Esquema III.3. En este ejemplo las aminas (20) (ejemplo *n*-butilamina y *n*-hexilamina) reaccionaron cuantitativamente en 1 hora con butirato de etilo (21) con la lipasa de *Candida sp* 382. a 40°C, para producir las amidas correspondientes (22).<sup>78</sup> Sin embargo, en ambos casos, se pueden tener reacciones más lentas si se utiliza un disolvente orgánico.



**ESQUEMA III.3. Aminólisis de ésteres no activados con aminas catalizada por PsL**

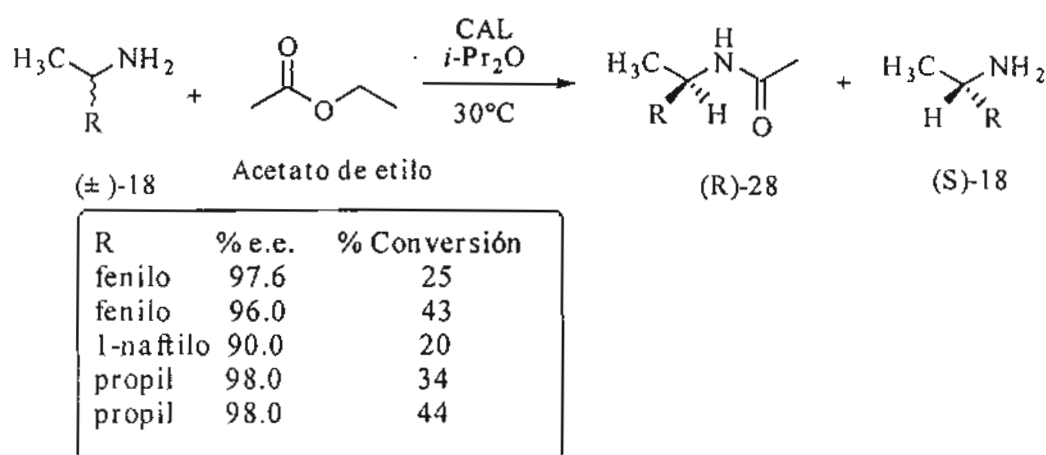
Gutman *et al.*,<sup>79</sup> desarrollaron un proceso enzimático para la resolución continua de 1-(R)-aminoindano (23), un intermediario importante en la síntesis de fármacos y 1-(R)-(1-naftil) etilamina (26), un agente de resolución en química fina. El proceso consiste en la aminólisis estereoselectiva catalizada por subtilisina de las aminas primarias mencionadas, utilizando un agente acilante activado (butirato de 2,2,2-trifluoroetilo (24)), y como disolvente, 3-metil-3-pentanol, que resultó ser el más adecuado para la supresión del proceso no enzimático (Esquema III.4).



**ESQUEMA III.4. Resolución enzimática de aminas catalizada por subtilisina soportada en un biorreactor de columna, en un medio orgánico**

En este caso, la reacción no enzimática entre las aminas y el éster activado se minimizó mediante la selección apropiada de la concentración de los sustratos, del disolvente y minimizando el tiempo de contacto entre los sustratos, para lo cual se utilizó una columna de soporte de vidrio para la enzima, en un biorreactor de columna requerido para el flujo continuo.

Reetz *et al.*, han reportado que la CAL es un catalizador muy efectivo en la acetilación enantioselectiva de aminas quirales ( $\pm$ )-18, utilizando acetato de etilo (un éster no activado) como el agente acilante (Esquema III.5), con lo cual la resolución cinética procede con enantioselectividades del orden del 90 al 98% de *e.e.*<sup>80</sup>

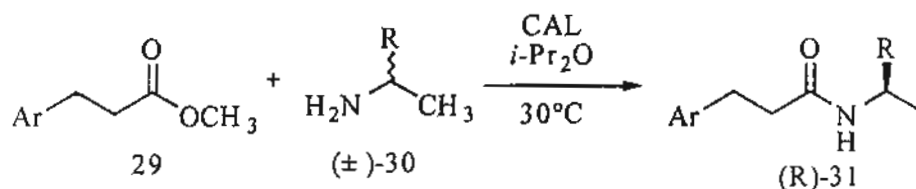


### ESQUEMA III.5. Resolución cinética altamente enantioselectiva de aminas con acetato de etilo y CAL en disolvente orgánico

En este trabajo, la configuración absoluta de la amida (28) obtenida es "R", y otras enzimas como CCL, PsL, de *Rhizomucor sp.*, PPL y CVL son menos eficientes (no más del 20% de *e.e.*). Más tarde el mismo grupo reporta la resolución cinética dinámica, mediante la racemización de la (S)-amina (18) catalizada con paladio, que no afecta al proceso enzimático, aumentando sustancialmente el rendimiento químico hasta un 64% y conservando un alto exceso enantiomérico (99% de *e.e.*).<sup>81</sup> Este grupo también ha descrito la resolución cinética de 2-pentil amina con PaL vía la N-acetilación, y el proceso ha sido extendido a otras aminas. En

esta reacción las aminas que poseen un grupo voluminoso como el ciclohexilo ó fenilo, se acilan muy eficientemente con alto *e.e.*

Otras enzimas además de CAL, han sido investigadas en la resolución de aminas con ésteres no activados, como por ejemplo, CCL, PCL y Subtilisina, pero CAL, es la que cataliza estos procesos más eficientemente. Por ejemplo, los  $\beta$ -arilpropionatos de metilo (29), se condensan con aminas racémicas ( $\pm$ )-30, en éter diisopropílico, con buen porcentaje de conversión y alto *e.e.* (por ejemplo para Ar= R= fenilo, el rendimiento es 84% y un *e.e.* >95%, en 10 horas) (Esquema III.6), con una alta enantioselectividad hacia la amida (R)-31; y en contraste a la selectividad mostrada por subtilisina para la reacción de aminas racémicas con butirato de 2,2,2-trifluoroetilo.<sup>82</sup>

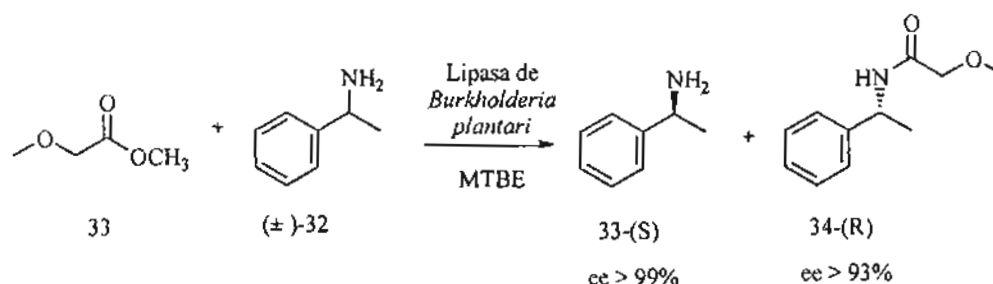


Ar= Fenilo, R= Fenilo: 84% Rendimiento, 95% *e.e.*; 10 h.  
Ar= 2-furilo, R= Fenilo: 83% Rendimiento, 95% *e.e.*; 8 h.

### ESQUEMA III.6. Resolución de aminas con ésteres no activados y CAL como catalizador en disolvente orgánico

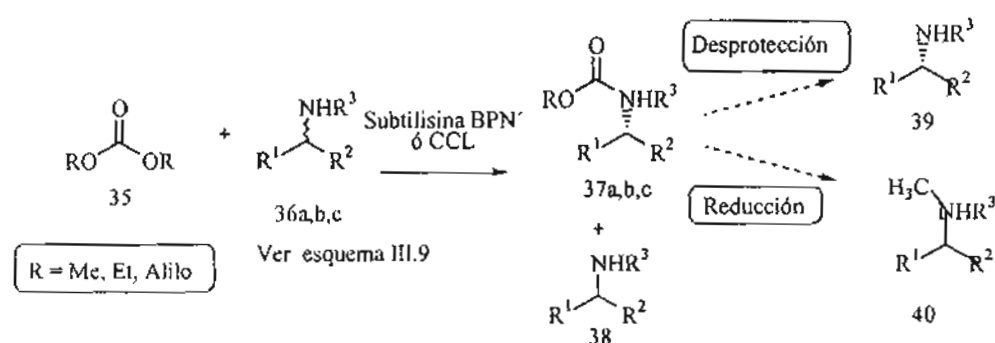
Similarmente, se reporta la resolución de aminas racémicas como ( $\pm$ )-32 utilizando metoxiacetato de etilo (33) como agente acilante, en presencia de una lipasa de *Burkholderia plantarii* como biocatalizador.<sup>83</sup> Lo interesante de esta reacción de acilación son los excelentes rendimientos y la alta selectividad mostrada en las (R)-amidas como (34) (representadas en el Esquema III.7 por  $\alpha$ -feniletilamina), aún con pequeñas cantidades de enzima (como un preparado enzimático crudo). El grupo  $\alpha$ -metoxilo favorece la reacción, pero el sustituyente en la posición  $\alpha$ , el cloro, conduce a reacciones laterales de sustitución. Por otro lado, la purificación de la enzima disminuye sustancialmente la velocidad de la reacción. Finalmente,

se concluye en este estudio que la reacción de aminólisis es más rápida y selectiva con  $\alpha$ -metoxiésteres que con otros ésteres.



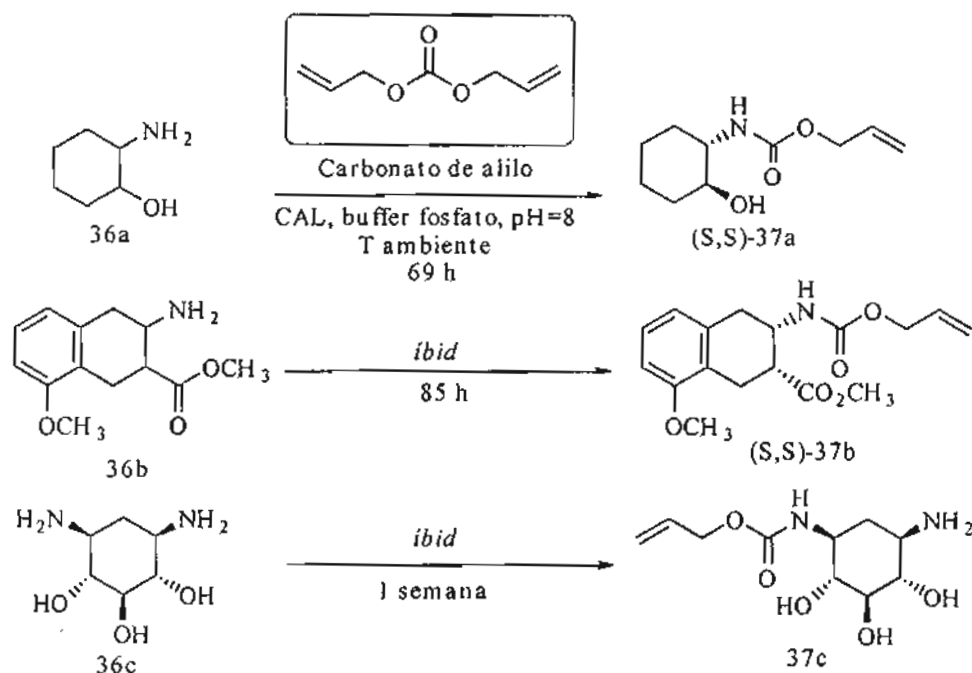
**ESQUEMA III.7. Resolución de aminas con un extracto enzimático de *Burkholderia plantarii***

Aunque como se dijo anteriormente, los éteres de enol no se pueden utilizar como agentes acilantes en la resolución de aminas, existen otras alternativas además del uso de ésteres no activados; por ejemplo el uso de carbonatos de alquilo (35), para la protección selectiva de aminas (36), empleando las enzimas subtilisina BPN' ó CCL.<sup>84</sup> Asimismo, los productos de la reacción enzimática de aquellos con las aminas (36), los carbamatos (37), se pueden obtener fácilmente a partir de carbonatos de alquilo baratos, y pueden removerse con relativa facilidad (lo cual les convierte en un buen grupo protector) y así convertirlos en las (R)-aminas (39). Los carbamatos (37) pueden transformarse mediante reducción, en los N-Metil-derivados (40), lo cual conduce a un método químico-enzimático alternativo, para la metilación de aminas (Esquema III.8).



**ESQUEMA III.8. Resolución enzimática de aminas con carbonatos de alquilo y su conversión en N-metilaminas**

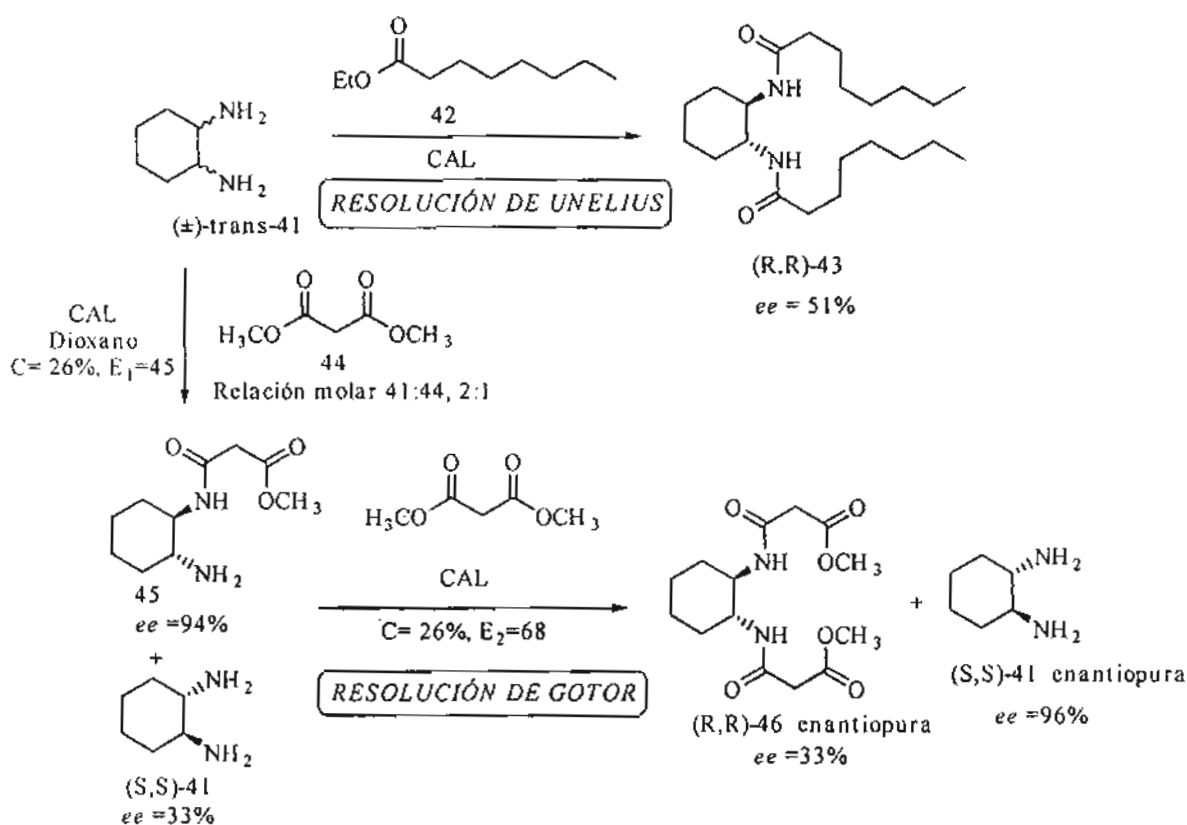
Similarmente, algunos sustratos (36a, 36b, 36c) que fueron tratados frente al reactivo carbonato de alilo se indican en el Esquema III.9. Es notable observar con el sustrato (36c), las elevadas quimio- y enantioselectividad del proceso a pesar de los cinco posibles sitios de reacción.<sup>84</sup>



### ESQUEMA III.9. Resolución enzimática de aminas con carbonato de alilo

Recientemente se ha reportado la resolución diastereoselectiva de la ( $\pm$ )-trans-1,2-ciclohexanodiamina (41) con un eje de simetría  $C_2$ , mediante la acilación con octanoato de etilo (42) a 39°C, presión reducida y sin disolvente. La conversión fue de 75%, y aunque el *e.d.* fue bajo (8%), el *e.e.* obtenido de (43) fue regular (51%) (Esquema III.10).<sup>85</sup> Esta amina, importante en química medicinal y síntesis asimétrica, fue convertida en el producto diacilado (R,R)-46 o el sustrato (S,S)-41, en forma enantiopura, a través de una resolución cinética secuencial, mediante su reacción con malonato de dimetilo (44) en presencia de CAL en dioxano.<sup>86</sup> En este caso, un cuidadoso control de las condiciones de reacción para la aminólisis doble, permite obtener la (S,S)-diamina 41 ó el producto (R,R)-(46), en forma enantiopura, en virtud de que el sustrato tiene que “visitar” dos veces el sitio activo de la enzima (Esquema III.10).

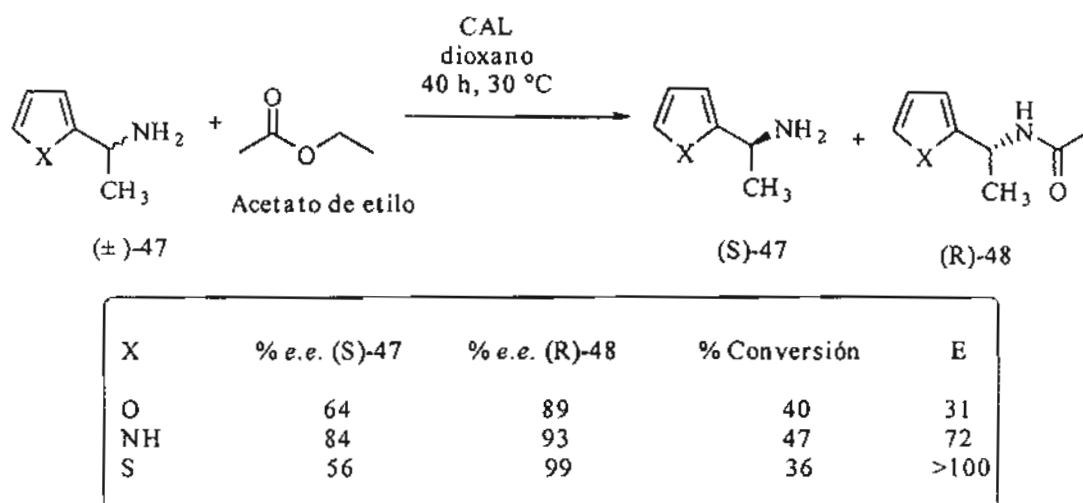




**ESQUEMA III.10. Resolución cinética secuencial de *trans*-ciclohexanodiamina con malonato de dimetilo en presencia de CAL**

Más recientemente se han resuelto 1-(heteroaril)etilaminas ( $\pm$ )-47, mediante la acetilación enzimática, usando acetato de etilo como disolvente y donador de acilo. Nuevamente, CAL cataliza la reacción muy eficientemente.

El uso de dioxano como disolvente, condujo a reacciones más lentas que con acetato de etilo, pero las enantioselectividades fueron diferentes para cada heteroarilamina, aunque la configuración absoluta de todas las amidas obtenidas fue "S" (Esquema III.11).<sup>87</sup>



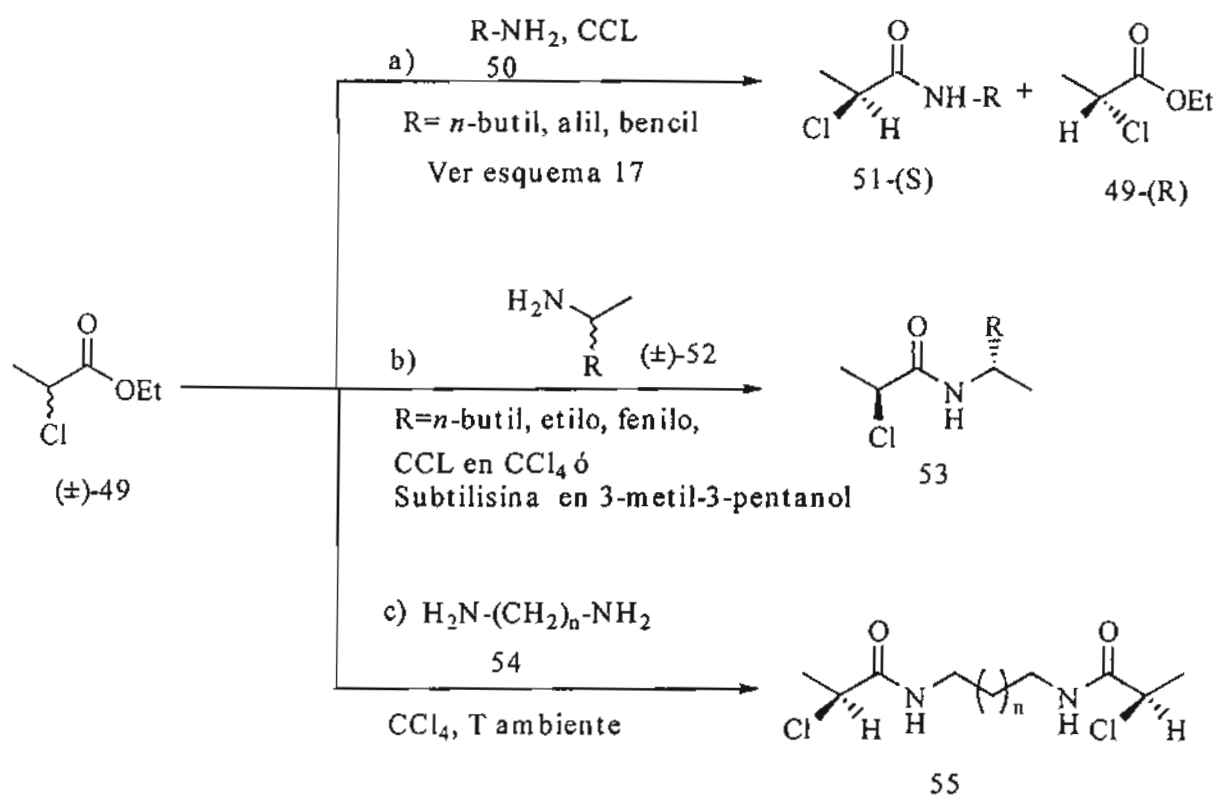
ESQUEMA III.11. Resolución de heteroariletilaminas catalizada por CAL

### 3. AMINÓLISIS Y RESOLUCIÓN DE ÉSTERES SIMPLES

En un trabajo también pionero en el campo de las reacciones de aminólisis, Gotor *et al.*,<sup>88</sup> reportaron que CCL catalizó la reacción (Esquema III.12, inciso a)) entre 2-cloropropionato de etilo (±)-49, y varias aminas alifáticas y aromáticas (50). Las (S)-amidas (51) se obtuvieron con rendimientos químicos moderados y altos *e.e.*'s. Con las aminas aromáticas, la reacción se efectuó a 60°C, pero con ésteres más reactivos que (49), como el 2-cloropropionato de 2,2,2-tricloroetilo racémico, la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente. El disolvente jugó un papel importante; con aminas alifáticas, el hexano dió los mejores rendimientos, pero con las aminas aromáticas el mejor disolvente fue el CCl<sub>4</sub> (probablemente debido a la mayor solubilidad de estas últimas). En todos los casos CCL mostró una alta actividad catalítica hacia el isómero "S" del éster, en contraste a la esterificación, en la cual la lipasa mostró preferencia hacia el enantiómero "R" del ácido.

Por otro lado, a partir de la reacción del 2-cloropropionato de etilo racémico (±)-49 y aminas racémicas (±)-52 (Esquema III.12, inciso b), se pudieron preparar amidas enantioselectivamente con dos centros quirales (53).<sup>89</sup> Se seleccionaron las enzimas CCL

(CRL) y subtilisina, debido a su alta enantioselectividad para el éster, y las aminas respectivamente (Tabla III.1).



Enzima/disolvente	n	Configuración(55)	ee
CCL/CCl <sub>4</sub>	2	SS	88
Subtilisina/3-metil-3-pentanol	2	RR	69
CCL/CCl <sub>4</sub>	3	SS	88
Subtilisina/3-metil-3-pentanol	3	RR	30
CCL/CCl <sub>4</sub>	8	SS	32
Subtilisina/3-metil-3-pentanol	8	RR	21

**ESQUEMA III.12. Reacciones entre (±)-2-cloropropionato de etilo y varias aminas. a) Resolución del éster con aminas alifáticas y aromáticas, b) Resolución del éster con aminas racémicas y, c) Resolución del éster con diaminas.**

La configuración de las amidas aisladas depende de la enzima utilizada. En general, se obtiene una mezcla de diastereoisómeros, con altos *ee*'s en la mayoría de los casos. En

algunos casos, la relación de los diastereoisómeros fue satisfactoria, pero en ninguno la enzima mostró una selectividad absoluta hacia el éster y la amina simultáneamente. Sin embargo, se corroboró en esta reacción, que CCL prefiere el enantiómero "S" del éster, y subtilisina muestra una alta selectividad hacia el isómero "S" de la amina.

**TABLA III.1. Obtención enantioselectiva de amidas con 2 centros quirales a partir de 2-cloropropionato de etilo y aminas racémicas catalizada por enzimas**

Enzima	Amina	Tiempo de reacción (h)	Disolvente	Configuración	Rendimiento (%)	e.e. (%)
CCL	<i>i</i> -butil	120	CCl <sub>4</sub>	S,S	30	95
subtilisina	<i>i</i> -butil	24	3-metil-3-pentanol	R,R	45	90
CCL	2-heptil	120	CCl <sub>4</sub>	S,S	40	48
subtilisina	2-heptil	24	3-metil-3-pentanol	R,R	29	45
CCL	$\alpha$ -metilbencil	120	CCl <sub>4</sub>	S,S	15	46
subtilisina	$\alpha$ -metilbencil	24	3-metil-3-pentanol	R,R	60	77

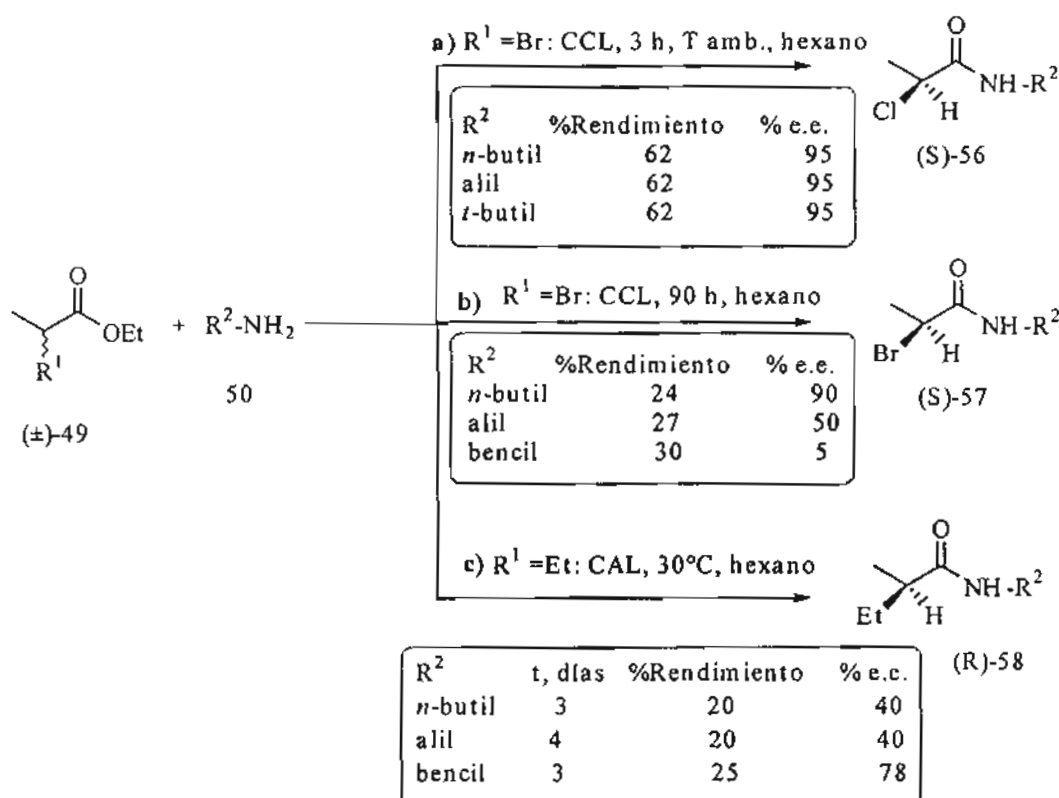
De manera similar, el 2-cloropropionato de etilo ( $\pm$ )-49, sufrió una doble aminólisis con diaminas (54) en presencia de CCL y subtilisina (Esquema III.12, inciso c)). La primera catalizó la formación de la (S,S)-amida (55) correspondiente, con diastereoselectividad completa y alto *e.e.*, mientras que la proteinasa y PsL, exhibieron una enantioselectividad más baja, pero opuesta, produciendo una mezcla de los estereoisómeros "R,R" y "R,S".<sup>90</sup> Otras enzimas como PPL, RAL, ANL, mostraron una baja actividad catalítica. De los varios disolventes utilizados, el CCl<sub>4</sub> fue el más adecuado.

Como se dijo antes, las lipasas también catalizan la formación de amidas a partir de ésteres no activados. Así, la preparación de *N-n*-octil alquilamidas se puede llevar a cabo en hexano anhidro. Las enzimas probadas fueron CCL, RAL, y la lipasa de *Penicillium cyclopium*, obteniéndose los mejores resultados con la segunda lipasa.<sup>91</sup> Kobata *et al.*, han investigado la síntesis enzimática de análogos de capsaicina, en la cuál varios derivados de

ácidos grasos, saturados e insaturados, reaccionan con vainillilamina en presencia de varias lipasas, en un sistema de dos fases, con lo que se obtienen derivados de vainillina en rendimientos moderados; PsL dió los mas altos rendimientos.<sup>92,93</sup>

Los ésteres con un grupo electroatrayente en la posición 2 dan mejores resultados en procesos catalizados por lipasas, sin embargo Gotor *et al.*,<sup>94</sup> probaron la influencia del grupo metilo en la posición  $\alpha$  del éster para la aminólisis enzimática, para lo cual, se realizó la reacción entre ( $\pm$ )-2-metilbutirato de etilo (49c) con aminas alifáticas (butilamina y alilamina), utilizando las enzimas CCL y PsL, obteniéndose enantioselectividad opuesta, en la amida producida entre estas dos enzimas, es decir: la amida con la configuración "R" con CCL, y la de configuración "S" con PsL. En resumen, se requieren condiciones más drásticas para ésta reacción, que con respecto al 2-cloropropionato arriba mencionado, y para el caso de las aminas aromáticas, no hubo reacción. Se puede concluir que, es importante la naturaleza del éster durante la aminólisis. Así por ejemplo, no se puede preparar la amida quiral correspondiente, a partir de  $\alpha$ -cloro- $\alpha$ -fenilacetato de alquilo con aminas y lipasas. Sin embargo, el  $\alpha$ -cloro- $\alpha$ -fenilacetato- $\alpha$ -fenilacetato de 2,2,2-trifluoroetilo racémico se hidrolizó satisfactoriamente en medio orgánico en presencia de anilina.<sup>95</sup>

La misma enantioselectividad que se observa con CCL (CRL), se encuentra para CAL, la cual presenta una amplia versatilidad y mayor eficiencia para esta reacción, como se ilustra con los ésteres  $\alpha$ -sustituidos del Esquema III.13, y como se mostrará más adelante.<sup>94</sup> Para el caso de ésteres no activados (en referencia a la porción de acilo), por ejemplo, la aminólisis de 2-metilbutirato de etilo racémico (49c) con *n*-butilamina (50,  $R^2=n$ -butilo), con CCL ó PsL como biocatalizadores, produjo modestos resultados. Para CCL en hexano, se requirió de un tiempo de reacción largo (5 días) y temperatura de 50°C. Aún así, el porcentaje de conversión fue bajo (solo 18%), con la formación de la amida (R)-58 (*e.e.*=84%), y de enantioselectividad opuesta a la del producto de la esterificación del ácido 2-metilbutírico (49c). Con la enzima PsL, se formó la misma amida "S" (*e.e.*=40%), pero el rendimiento fue sólo del 20% después de 5 días, en dioxano como disolvente. Con otras enzimas los resultados fueron aún mas pobres.



**ESQUEMA III.13. Reacciones de aminólisis de ésteres  $\alpha$ -sustituídos con aminas, en presencia de CAL como catalizador**

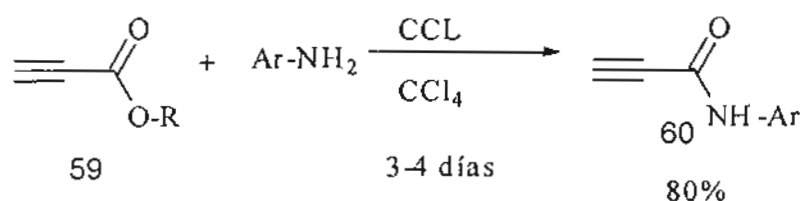
Debido a la dificultad de obtener amidas a partir de ésteres "no activados", se probó la CAL, debido a su mayor potencial y actividad catalítica probada, observando que la enzima catalizó la aminólisis de 2-metilésteres racémicos, prefiriendo siempre el isómero "R", aunque los *e.e.*'s fueron solamente moderados (Esquema III.13).<sup>96</sup> Existen pocos reportes, que consideran la reacción de amidación catalizada por enzimas, con  $\alpha$ -alquil-ésteres no activados, quizá porque los resultados no son muy satisfactorios. Por ejemplo, varias enzimas comerciales (CRL, PsL denominada Novozym SP 526 y CAL) mostraron actividad significativa en la aminólisis de 2-metil octanoato de metilo con (R)-1-fenil etilamina, en éter diisopropílico como disolvente; nuevamente fue CAL la que produjo los mejores resultados. En este caso, la amida diastereomérica predominante tenía la configuración "R" en el carbono

$\alpha$  al carbonilo (independientemente de la configuración de la amina utilizada). Es notable mencionar que la enzima toleró temperaturas en el rango de 23-70°C. Los mejores resultados fueron una conversión del 99%, con la (1R)-1-feniletilamina y un *e.d.* del 45%, en 115 horas a 70°C, sin disolvente.<sup>97</sup>

## 4. AMINÓLISIS Y RESOLUCIÓN DE COMPUESTOS BIFUNCIONALES

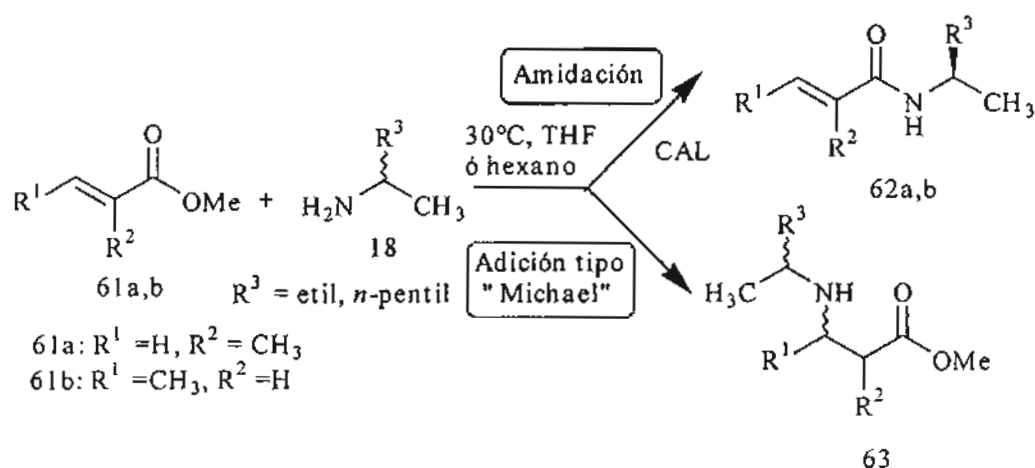
### 4.1. QUIMIOSELECTIVIDAD EN ÉSTERES $\alpha,\beta$ -INSATURADOS

Un primer trabajo en este campo, se refiere a la síntesis enzimática de propargilamidas (60). La enzima CCL catalizó la aminólisis de propiolato (propinoato) de etilo (59), con aminas aromáticas, para obtener las N-aril-propionilamidas (60) correspondientes (Esquema III.14).<sup>98</sup> En ausencia de la enzima, dicho éster reacciona con las aminas para dar los productos de la adición tipo Michael. La reacción se efectuó en 3 a 4 días y las amidas aromáticas (60) se obtuvieron en aproximadamente un 80%. No obstante, cuando se usaron aminas alifáticas, sólo se obtuvieron los productos tipo Michael, aún cuando la reacción se efectuó a más bajas temperaturas. La enzima PPL mostró una actividad catalítica mas baja y con la proteinasa papaína, solo se obtuvo el aducto de tipo Michael. La relevancia de este trabajo es por la facilidad de realizar el experimento biocatalítico. Incluso su progreso se pudo seguir muy fácilmente, por espectroscopía infrarroja.



**ESQUEMA III.14. Aminólisis quimioselectiva de ésteres propargílicos catalizada por CAL**

Con ésteres acrílicos (61a,b) como sustratos, CCL no catalizó la reacción de aminólisis, y similares resultados se obtuvieron con PsL; otras enzimas, como PPL mostró una muy baja actividad catalítica para la reacción, y con papaína sólo se obtuvo el producto de la adición tipo Michael (63) (Esquema III.15). Por su parte, la lipasa CAL mostró una mayor especificidad de sustrato, permitiendo la reacción de los acrilatos de metilo, con varias aminas racémicas, produciendo el enantiómero "R" de la amida (62a,b), con *e.e.*'s de moderados a buenos. Las aminas, *n*-butilamina y bencilamina, dieron los mejores resultados. Los disolventes probados, hexano, THF e isopropil éter, dieron rendimientos de las amidas (62) de moderados a buenos.<sup>99</sup>



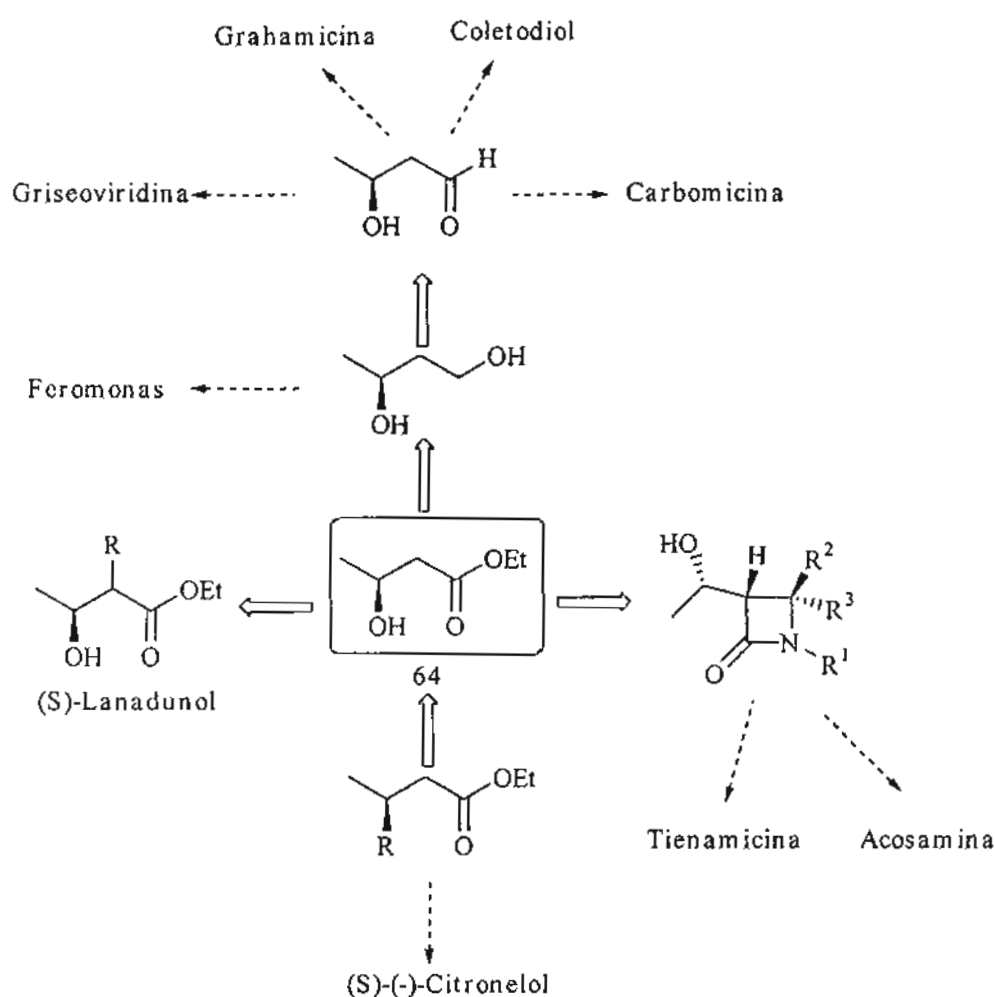
### ESQUEMA III.15. Aminólisis quimioselectiva de ésteres acrílicos catalizada por CAL

A diferencia de que con ésteres  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados ó con propiolato (propargilato) de etilo, que no efectúan la reacción de aminólisis con lipasas (como CAL), el amoniaco, en solución al 1.5% en dioxano, produjo las amidas primarias en muy altos rendimientos, en presencia de CAL (SP 435). La reacción se efectuó a 60°C, y no se observaron trazas de los aductos tipo Michael, por lo que las amidas no requirieron de purificación, excepto cuando se usó propiolato de etilo. En este último caso la reacción se efectuó a 30°C y la propargilamida se produjo en un rendimiento del 75%. En ningún caso, se forman las amidas en ausencia de la lipasa.<sup>100</sup>



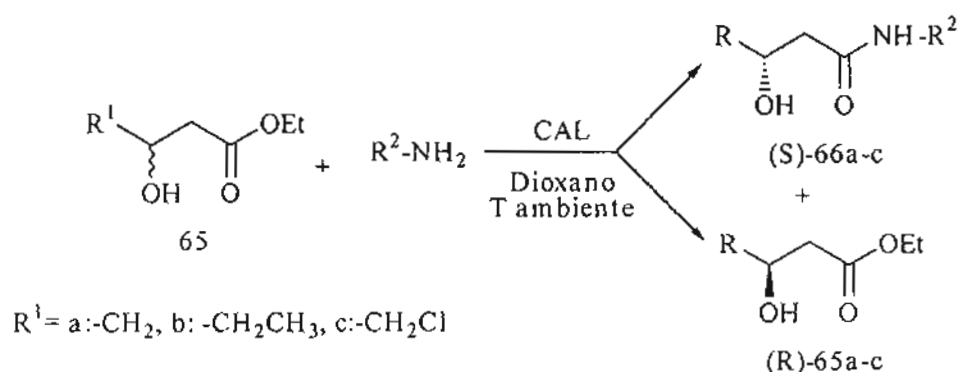
## 4.2. AMINÓLISIS ENANTIOSELECTIVA DE HIDROXIÉSTERES Y AMINOÉSTERES

Uno de los objetivos de la aminólisis de ésteres catalizada por enzimas es la síntesis enantioselectiva de hidroxiésteres y sus amidas, que son importantes bloques constructores quirales para la síntesis de productos naturales biocativos. Así, el 3-(S)-hidroxibutirato de etilo (64) se utiliza en la síntesis asimétrica de una gran variedad de productos naturales debido a su fácil transformación en distintos sintones quirales, como se puede ver en el esquema III.16.



ESQUEMA III.16. Usos del 3-(S)-hidroxibutirato de etilo en la síntesis asimétrica de productos naturales diversos

Además de ésteres simples, activados, no activados y diésteres, se ha encontrado, que ésteres funcionalizados pueden sufrir reacciones de amonólisis y aminólisis, mediante catálisis enzimática, en condiciones suaves. Así por ejemplo, a partir de 3-hidroxiésteres (65) etílicos racémicos y aminas alifáticas, se pueden obtener las correspondientes 3-hidroxiámidas quirales (66)(Esquema III.17). Con 3-hidroxi butirato de etilo racémico CCL (CRL) mostró actividad catalítica (aunque baja, porque la conversión procedió solamente en un 10%, en 10 h (sin efecto del disolvente), catalizando la formación de la amida racémica. Se obtuvieron mejores resultados con PsL y CAL, las cuales funcionaron en varios disolventes, como THF, diisopropil éter, hexano, tolueno y dioxano; pero fué este último el que dió los mejores resultados. Con PsL, se obtuvo la (S)-N-n-butil-3-hidroxi butiramida con un 56% de *e.e.*. CAL mostró una mayor, pero opuesta, enantioselectividad, obteniéndose la amida "R" en un 79% de *e.e.*. Con bencilamina, la misma enzima dió lugar a la amida "R" en un 99% de *e.e.*, con un rendimiento del 45%. Por su parte las aminas aromáticas no reaccionaron.<sup>101</sup>

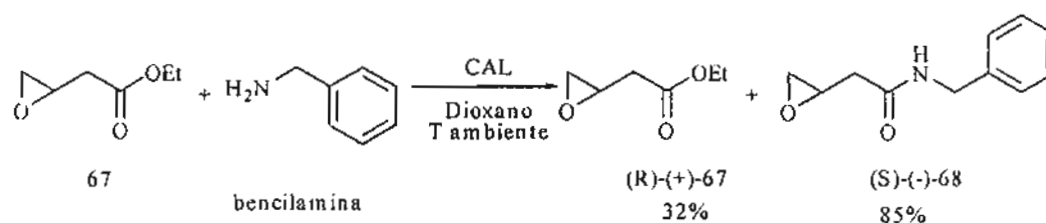


**ESQUEMA III.17. Resolución altamente enantioselectiva de 3-hidroxiésteres, catalizada por CAL en dioxano**

Variando el grupo alquilo, se observó que un grupo electroatrayente (como un cloro en el éster (sustrato 65c, Esquema III.17), ó un grupo más hidrofóbico en la amina, incrementaron la velocidad de la reacción. Los *e.e.*'s de las amidas "R" (66) de los ésteres probados (65a-c) fueron muy buenos, sin embargo con el 3-fenil-3-hidroxi propanoato de etilo racémico, la reacción con bencilamina procede con un rendimiento modesto (conversión del 11%) después de 264 h, y con un *e.e.* moderado del 66% (E=15) de la amida "S". A temperatura más alta

(60°C) la conversión mejora (20%, en 96 h), pero la enantioselectividad exhibida por la enzima es más baja ( $E=1$ ). La enzima no muestra pérdida aparente de su actividad catalítica, después de 20 ciclos catalíticos.<sup>102</sup>

Un resultado interesante de quimioselectividad, resultó la aminólisis de ( $\pm$ )-3,4-epoxibutirato de etilo (67) con bencilamina. CAL catalizó la formación de la N-bencil epoxiamida (68), consiguiéndose una conversión del 27% después de 3 h de reacción. No se observó la apertura del epoxiéster por la amina, ni la formación del éster  $\alpha,\beta$ -insaturado  $\gamma$ -hidroxilado (Esquema III.18). CAL volvió a mostrar la misma preferencia estereoquímica que con los 3-hidroxiésteres, catalizando la formación de la epoxiamida mencionada de configuración "S" con una enantioselectividad moderada ( $E=15$ ).

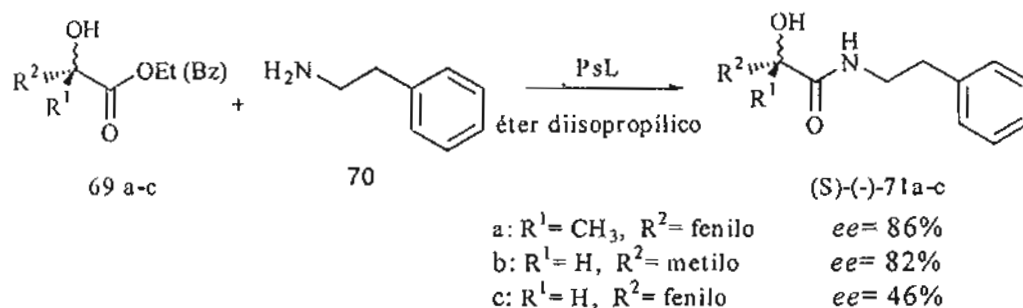


### ESQUEMA III.18. Resolución quimioselectiva y estereoselectiva de epoxiésteres catalizada por CAL en dioxano

A partir de estos resultados, se puede concluir que la aminólisis es un proceso alternativo a las reacciones de hidrólisis y esterificación enzimáticas para la resolución de ésteres.<sup>103</sup>

Al igual que las  $\beta$ -hidroxiamidas, las 2-hidroxiamidas se encuentran frecuentemente en moléculas biológicamente activas, y además son importantes intermediarios sintéticos. Por lo tanto, su obtención química y mediante métodos enzimáticos es muy importante en síntesis asimétrica. Respecto a la síntesis quimicoenzimática de las 2-hidroxiamidas, la lipasa PsL cataliza la aminólisis de 2-hidroxiésteres (69) con una variedad de aminas (por ejemplo 70), en

éter diisopropílico como el disolvente, produciendo las amidas correspondientes en altos rendimientos (Esquema III.19).<sup>104,105</sup>



### ESQUEMA III.19. Aminólisis de 2-hidroxiésteres con aminas catalizada por PSL

Los sustratos seleccionados fueron ésteres de los ácidos láctico, fenil láctico, y mandélico. Los resultados de la aminólisis se muestran en la Tabla III.2.

**TABLA III.2. Aminólisis de 2-hidroxiésteres con aminas catalizada por PsL**

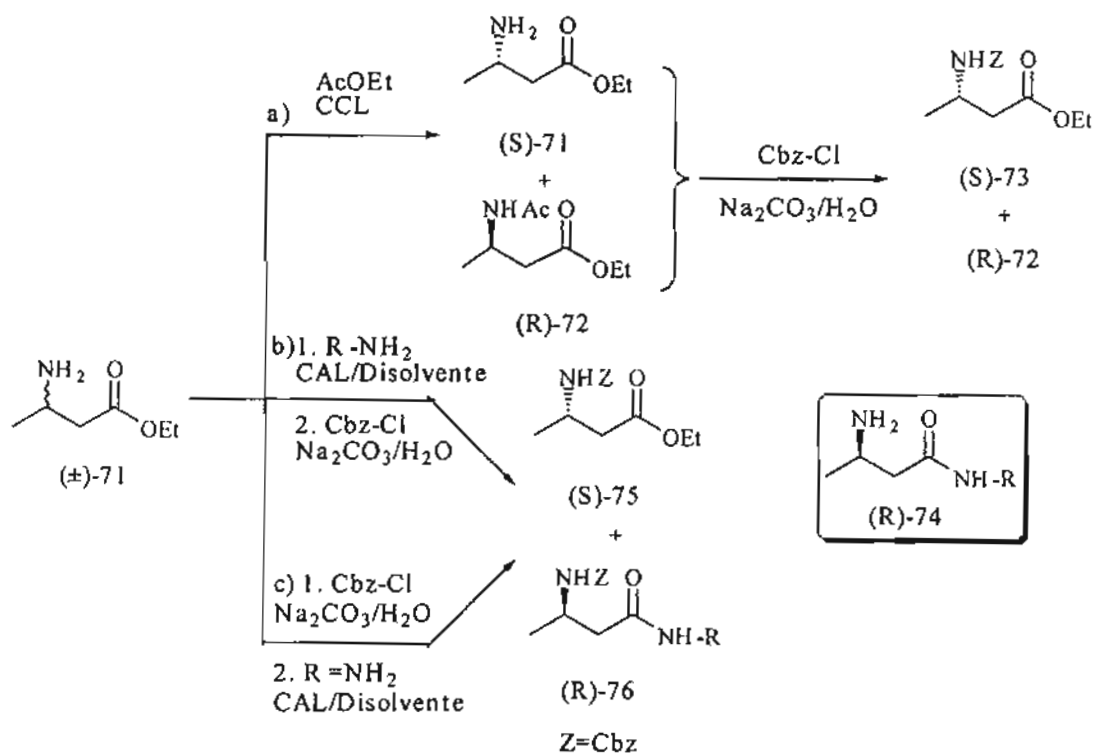
$\alpha$ -HIDROXIESTER	AMINA	Conversión (%)		
		24 h	72 h	144 h
(R)-lactato de bencilo (69b)	bencilamina	66	89	98
(S)-lactato de bencilo (69b)	bencilamina	79	95	>99
(R)-lactato de bencilo (69b)	2-feniletilamina	56	84	89
(S)-lactato de bencilo (69b)	2-feniletilamina	65	91	93
(R)-fenillactato de metilo (69a)	2-feniletilamina	12	41	58
(S)-fenillactato de metilo (69a)	2-feniletilamina	55	60	75
(R)-fenillactato de bencilo (69a)	2-feniletilamina	36	54	67
(S)-fenillactato de bencilo (69a)	2-feniletilamina	86	96	>99
(R)-mandelato de etilo (69c)	BOC-etilendiamina	5	18	56
(S)-mandelato de etilo (69c)	BOC-etilendiamina	5	19	58
(R)-mandelato de bencilo (69c)	BOC-etilendiamina	29	70	97
(S)-mandelato de bencilo (69c)	BOC-etilendiamina	38	82	>99

Como puede verse, en general las conversiones de los ésteres (69a-c) a las amidas (71a-c) son buenas. Asimismo, se observa que los ésteres bencílicos son más reactivos que los metílicos ó etílicos para cada uno de los ésteres. De acuerdo con los autores, esto es acorde a la mayor lipofobicidad del grupo bencilo respecto a los grupos metilo ó etilo de la porción alcoxilo del éster. La reactividad de los estereoisómeros "S" es ligeramente mayor que la de los enantiómeros correspondientes en cada caso. Para los ésteres del ácido feniláctico (69a), el isómero "S" presenta una reactividad doble a la del isómero "R", pero en los otros ésteres (69b y 69c), la diferencia en reactividad no es tan marcada. Otros ésteres, como el perhidromandelato de bencilo ó el 2-hidroxiisobutirato de bencilo, no producen la reacción de aminólisis con PsL. Aparentemente, el carbono quiral (portador del hidroxilo) terciario, y su vecino, un carbono secundario ejercen suficiente impedimento estérico en el sustrato para la lipasa mencionada.

Adicionalmente, la enantioselectividad de la aminólisis con 2-fenetilamina (70) de los mismos hidroxieésteres racémicos, medida a conversiones menores del 50%, indicó una aceptable estereoselectividad en fenillactato de bencilo (69a), menor en el lactato de bencilo (69b) y mínima en el caso del mandelato de bencilo (69c). (Esquema III.19).

Otros sustratos, los  $\beta$ -aminoácidos se encuentran presentes en productos como alcaloides y antibióticos, y son precursores sintéticos de  $\beta$ -lactamas y péptidos con actividad terapéutica incrementada, y han llamado fuertemente la atención de los químicos orgánicos, debido a su potencial como bloques de construcción quiral.<sup>106</sup> Sin embargo, pocas son las rutas enzimáticas que consideran la resolución de estos compuestos. Debido a su naturaleza ambidentada, como nucleófilos (en el grupo  $-\text{NH}_2$ ) y aceptores de acilo (en el grupo  $-\text{COOR}$ ), son sustratos versátiles y atractivos mediante procesos de aminólisis enzimática. Conocida la amplitud de la especificidad de sustrato de CAL en procesos de aminólisis, se seleccionó esta enzima para efectuar transformaciones enzimáticas de  $\beta$ -aminobutirato de etilo (71), mediante acetilación del grupo amino con acetato de etilo. Para un mejor aislamiento y análisis por HPLC quiral, el éster no convertido (S)-71 se convirtió en el Cbz-derivado (73). En este

primer caso (Esquema III.20a), se alcanzó un 53 % de conversión en 12 horas, con *e.e.*'s del 99% y del 88% del aminoéster (S)-71 y el producto (R)-72, (E=82) respectivamente, mostrando la eficiencia catalítica de CAL. En dioxano se obtuvieron resultados similares, pero en hexano decayó la conversión hasta un 15% aún después de 4 días. Es notable que no ocurrió reacción de dimerización en ninguno de los casos.<sup>107</sup>

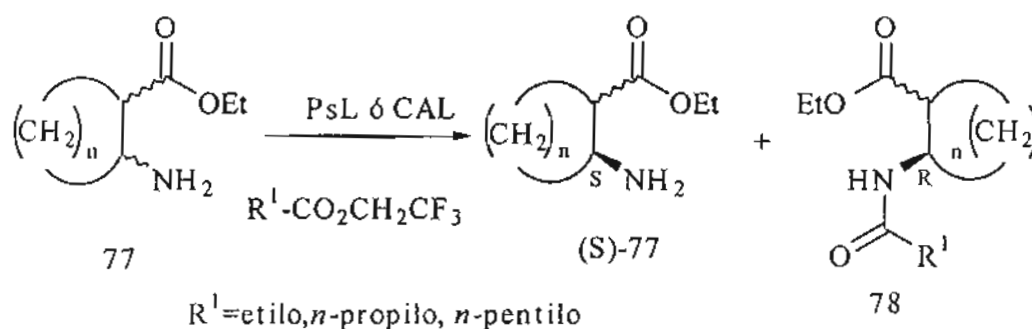


### ESQUEMA III.20. Reacciones de resolución de aminólisis enzimática de β-aminoésteres y derivados

Posteriormente, se observó la aminólisis del β-aminobutirato de etilo (±)-71 como donador de acilo frente a bencilamina (Esquema III.20b), utilizándose como catalizador CAL, en dioxano o tolueno como disolventes. El (S)-β-aminobutirato de etilo (71) y la (R)-β-aminobutiramida (74) resultantes, se convirtieron en los N-Cbz-derivados (75 y 76) respectivamente. Para una conversión del 53% el *e.e.* del Cbz-(S)-β-aminobutirato de etilo (75) fue del 93%, pero para la amida resultante (76) la enantioselectividad fue moderada (*e.e.*=66%, E=16). Finalmente la aminólisis (y la amonólisis) del (±)-N-Cbz-β-aminobutirato

de etilo, en tolueno y en presencia de CAL, sólo produjo la (R)- $\beta$ -Cbz-aminobutiramida (76) (Esquema III.20c). En este último caso, la hidrólisis del sustrato fue una reacción competitiva importante. En conclusión, siempre se observa la misma preferencia estereoquímica de CAL, por el enantiómero (R) del éster en cualquiera de los casos estudiados, sea como donador de acilo ó como nucleófilo. El grupo Cbz- no modifica la enantioselectividad de CAL.

Kanerva *et al.*, resolvieron diferentes  $\beta$ -aminoésteres (77) mediante la acilación del grupo amino con ésteres de 2,2,2-trifluoroetilo en varios disolventes, y en presencia de las enzimas PsL y CAL (SP-526) (Esquema III.21).<sup>108</sup> Las enzimas exhibieron un comportamiento de enantioselectividad complementaria, mientras PsL tuvo preferencia por los sustratos con los grupos amino y carboxilo en disposición *trans*, CAL tuvo la enantioselectividad por los isómeros *cis*. En todos los casos probados, las 2 enzimas mostraron mayor selectividad por el centro 2-(R) (portador del grupo amino).

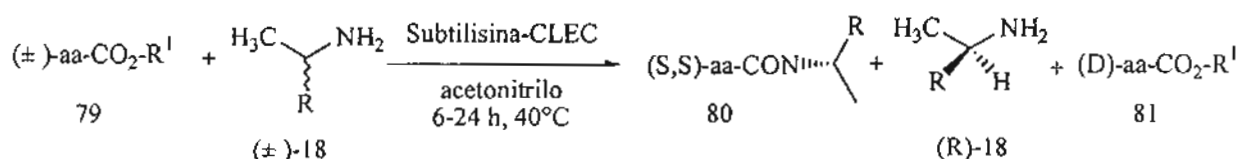


**ESQUEMA III.21. Resolución de  $\beta$ -aminoésteres mediante la acilación del grupo amino con ésteres de 2,2,2-trifluoroetilo en éter, en presencia de PsL y CAL**

De las variables experimentales probadas en este trabajo es de notar que no hubo una correlación entre la enantioselectividad de las enzimas en función del disolvente. En cuanto a los sustratos acílicos probados, los carboxilatos de 2,2,2-trifluoroetilo, se probaron desde el acetato de 2,2,2-trifluoroetilo, a hexanoato de 2,2,2-trifluoroetilo, con ambas enzimas en éter dietílico como disolvente. Para PsL la reactividad y la enantioselectividad tienden a disminuir

con el incremento de la cadena carbonada del donador de acilo; sin embargo, para CAL las mismas propiedades tienden a incrementarse con el aumento de la cadena carbonada de los ésteres de trifluoroetilo. Interesante resulta el hecho de que el sustrato más polar ( $\text{ClCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$ ), mejora la enantioselectividad (E) de la acilación de los aminoésteres para PsL, pero disminuye para CAL. La enzima de *Pseudomonas* (lipasa AK) de Amano muestra menor enantioselectividad que las enzimas anteriores.

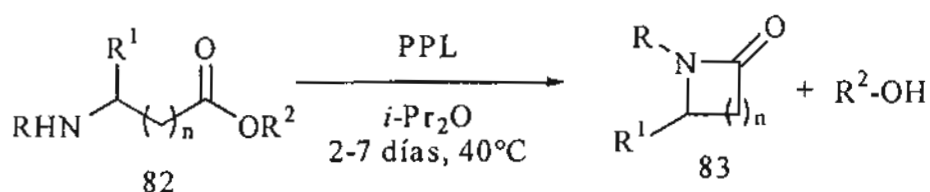
La compañía **Altus Biologicals** ha logrado una combinación única de una alta actividad catalítica con estabilidad química y mecánica de proteínas, y ha desarrollado la tecnología de la producción de Enzimas Cristalinas Entrecruzadas (CLEC, Cross-Linked Enzyme Crystals), que produce biocatalizadores que poseen una mayor estabilidad contra la desnaturalización por la temperatura, disolventes orgánicos y la autoproteólisis, lo cual les hace extremadamente útiles. Así, la enzima subtilisina-CLEC se ha usado en la síntesis eficiente de N-alquilamidas de aminoácidos y péptidos. Los resultados indican excelentes enantio- y diastereoselectividades en el acoplamiento de ésteres de aminoácidos naturales y no naturales N-protegidos (79), con aminas racémicas ( $\pm$ )-18. En esta reacción se probaron diferentes aminoésteres con diferentes grupos protectores (N-Ac, N-Cbz y N-Boc) y varios disolventes, acetato de etilo, THF, piridina, etanol, acetona, isopropanol, alcoholes terciarios y acetonitrilo, siendo éste el que dió los mejores resultados (Esquema III.22). El biocatalizador mostró una alta enantioselectividad hacia los (S)-aminoésteres y las (S)-aminas, para producir las (S,S)-alquilamidas (80), vía resolución *in situ* de los sustratos racémicos y la obtención de los D-aminoésteres (81).<sup>109</sup>



**ESQUEMA III.22. Resolución *in situ* de aminoésteres y aminas racémicos con diferentes grupos protectores (N-Ac, N-Cbz y N-Boc) mediante subtilisina-CLEC**



También se ha estudiado la aminólisis intramolecular de diferentes aminoésteres (82). Así, diferentes aminoésteres produjeron las correspondientes lactamas de 5-7 miembros a una velocidad de reacción similar, mediante ciclización de los sustratos correspondientes, catalizada por lipasas (Esquema III.23, Tabla III.3). Las enzimas probadas fueron: las lipasas de *Pseudomonas*, la de hígado de caballo y PPL, estas últimas obtenidas como polvos de acetona, y las proteinasas: subtilisina y de *Streptomyces griseus*. La formación del anillo de 7 miembros resultó muy lenta y la lactama de 4 miembros aún no ha sido descrita. El uso de los aminoésteres isopropílicos (82), suprimió la ciclización no biocatalizada.

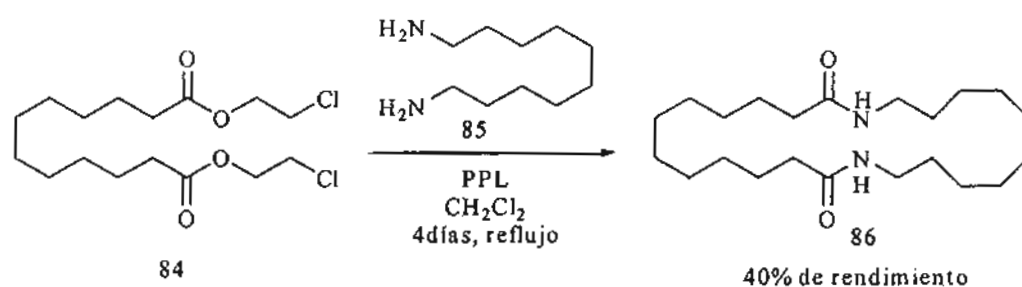


ESQUEMA III.23. Ciclización enzimática intramolecular de  $\beta$ -aminoésteres

TABLA III.3. Aminólisis intramolecular de aminoésteres catalizada por PPL no purificada

AMINO ÉSTER	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	n	Tiempo (días)	Conversión Enzimática (%)
82a	H	H	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	1	7	0
82b	H	CO <sub>2</sub> Et	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	2	2	50
82c	H	H	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2	3	45
82d	H	CH <sub>3</sub>	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2	6	40
82e	H	H	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2	6	30
82f	H	H	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3	4	80
82g	H	H	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3	5	40
82h	H	H	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4	7	10

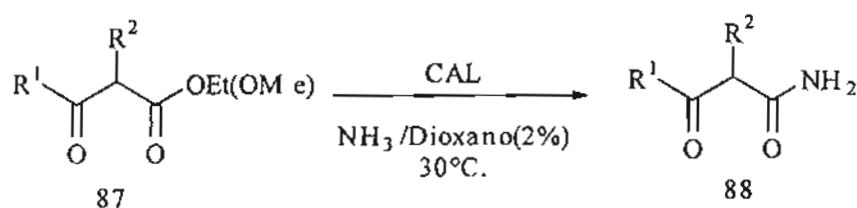
La enantioselectividad de este proceso es muy baja y la ciclización intramolecular es más rápida con aminas primarias, que con aminas secundarias.<sup>110</sup> Similarmente, se reportan las bislactamas (86), a partir de los diésteres de  $\beta$ -cloroetilo como (84), como puede observarse en el Esquema III.24.



**ESQUEMA III.24. Condensación y ciclización enzimática intramolecular de  $\beta$ -aminoésteres**

#### 4.3. REACCIONES DE AMONÓLISIS ENZIMÁTICA

En 1993 Gotor y colaboradores publican la primera reacción de amonólisis enzimática (Esquema III.25).

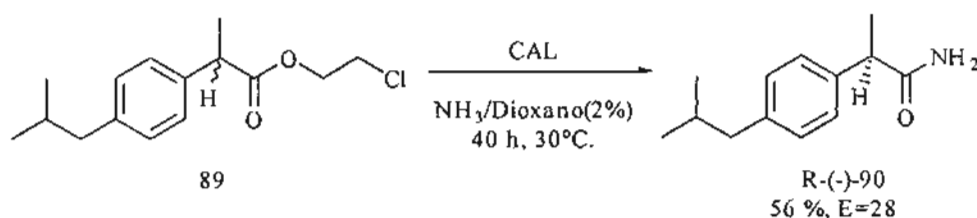


$\beta$ -cetoésteres		$\beta$ -cetoamidas
$\text{R}^1$	$\text{R}^2$	Rendimiento (%)
$\text{CH}_3$	H	59
Ph	H	88
$-(\text{CH}_2)_3-$		90

**ESQUEMA III.25. Reacción de amonólisis enzimática quimioselectiva de  $\beta$ -cetoésteres**

En este trabajo,<sup>111</sup> se probaron los  $\beta$ -cetoésteres (87) con una disolución de amoníaco en dioxano al 2%, y CAL como catalizador. Los resultados mostraron la eficiencia catalítica de la enzima, obteniéndose las correspondientes  $\beta$ -cetoamidas primarias (88), con altos rendimientos (Esquema III.25).

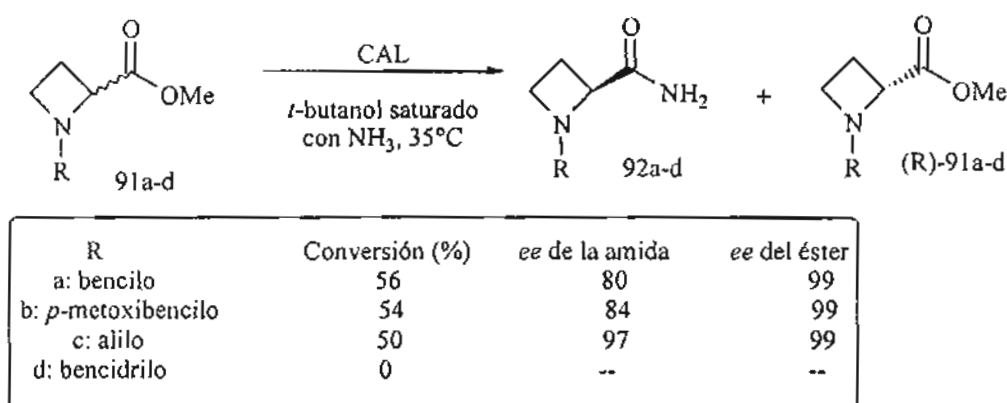
No obstante Sheldon proclama ser el autor de la primera reacción de amonólisis enzimática, publicó la amonólisis de ésteres, catalizada por lipasas a temperatura ambiente, pero después del trabajo precedente de Gotor *et. al.*<sup>112</sup> La amonólisis de octanoato de metilo con  $\text{NH}_3$  gaseoso en *t*-butanol seco produjo la amida correspondiente, en 24 horas con la fracción enzimática de CAL denominada SP-435. Aunque también mostraron la misma actividad catalítica, las muestras de las fracciones SP-398 y SP-523 de la misma bacteria, otras enzimas: lipasas, proteinasas y esterases (no reportadas) no catalizaron la reacción de amonólisis. Asimismo se comparó la enantioselectividad de la reacción de amonólisis contra la de la hidrólisis, utilizando como sustrato un derivado (éster 2-cloroetílico) de Ibuprofen (89). La reacción de amonólisis catalizada por la lipasa fue un orden de magnitud más enantioselectiva que la de hidrólisis (Esquema III.26).



**ESQUEMA III.26. Amonólisis enzimática enantioselectiva de un derivado de ibuprofen**

Como se aprecia del ejemplo anterior, y del siguiente, la resolución mediante amonólisis ó aminólisis puede ser una buena alternativa ó la única, respecto de la hidrólisis ó la transesterificación de sustratos racémicos. En el caso de los sustratos *N*-bencilazetidín-2-carboxilato de metilo ( $\pm$ )-91a y *N*-bencilazetidín-2-carboxamida ( $\pm$ )-92d, la resolución mediante hidrólisis con varias lipasas fue infructuosa.<sup>113</sup> Sin embargo, cuando *N*-alquil

azetidinésteres se sometieron a la amonólisis catalizada por CAL se obtuvieron los (R)-N-alquil-2-azetidinésteres (91a-d) y las (S)-N-alquil-2-azetidincarboxamidas (92a-d) con una alta enantioselectividad (Esquema III.27).



**ESQUEMA III.27. Resolución altamente enantioselectiva de N-alquil azetid ésteres mediante amonólisis catalizada por CAL**

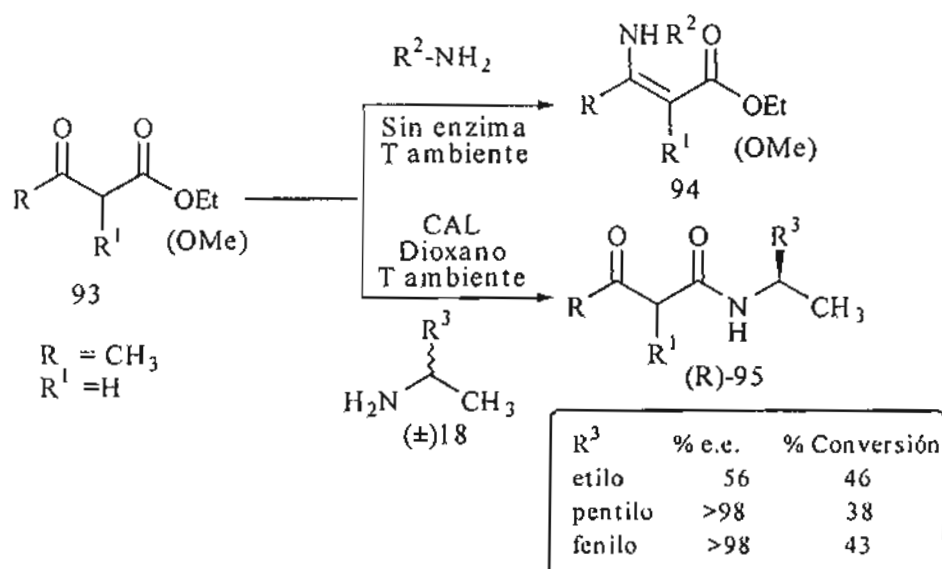
Como puede verse en el Esquema III.27, cuando el grupo alquilo fue el bencidrilo (91d), no fue aceptado por CAL, quizá por impedimento estérico.

Sheldon *et al.*, publicaron recientemente la resolución cinética dinámica de los ésteres de fenilglicina racémica, mediante una amonólisis catalizada por CAL, en *t*-butanol saturado con amoníaco. Cuando el proceso incluyó la racemización *in situ*, la mejor conversión fue del 85% y el *e.e.* de 73% en la amida de D-fenilglicina (importante en la síntesis de penicilinas y cefalosporinas semi-sintéticas).<sup>114</sup>

#### 4.4 AMINÓLISIS QUIMIOSELECTIVA DE CETO-ÉSTERES

La transformación quimioselectiva de compuestos difuncionales es un problema crucial en síntesis orgánica. Por ejemplo los  $\beta$ -cetoésteres (93) reaccionan con aminas primarias, a temperatura ambiente para dar los enaminoésteres (94) (Esquema III.28), y en

pocos casos se obtienen las amidas correspondientes. Por otro lado, los  $\beta$ -cetoésteres han sido los más estudiados en reacciones de amonólisis y aminólisis catalizadas por enzimas, y sus productos, las  $\beta$ -cetoamidas (95) son, como otros compuestos difuncionales mencionados antes, intermediarios muy versátiles e importantes en síntesis orgánica.<sup>111,115</sup> Por ejemplo, algunos son precursores de ácidos 3-aciltetrámicos, de gran interés médico y farmacológico, como los antibióticos tirandamicina y estreptolidigina, ó en la síntesis de lactamas y alcaloides, ó como precursores fotoquímicos de isocianatos.



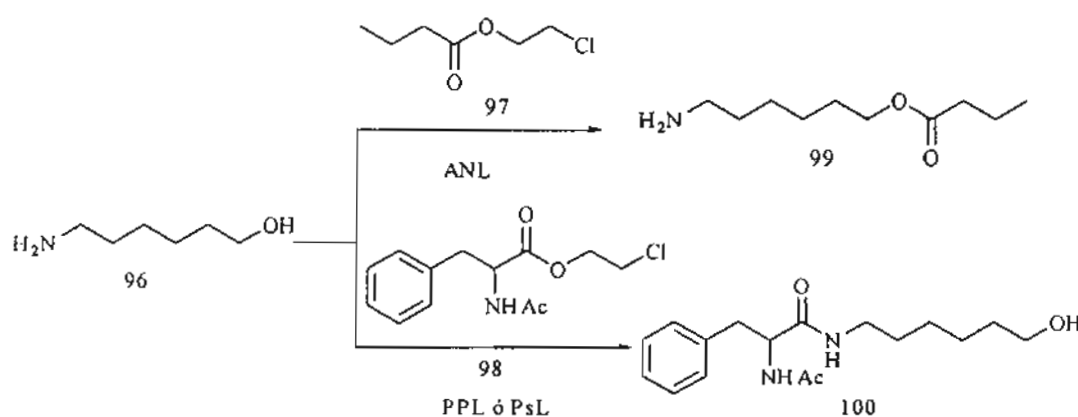
### ESQUEMA III.28. Reacciones de aminólisis quimioselectiva y enantioselectiva de $\beta$ -cetoésteres, catalizada por CAL en dioxano como disolvente

De manera análoga a la reacción de amonólisis previamente mencionada, los  $\beta$ -cetoésteres (93) sufren las reacciones de aminólisis con aminas (tales como: alilamina, bencilamina y *n*-butilamina) sin centros quirales de una manera quimioselectiva (no reaccionan con el grupo carbonilo, en presencia de la enzima) para dar las amidas en buen rendimiento, y con aminas racémicas (18) reaccionan de manera estereoselectiva para dar las amidas (R)-95.<sup>115</sup> Con las aminas, 2-heptilamina y  $\alpha$ -metilbencilamina, a temperatura ambiente, CAL como catalizador tiene una alta preferencia por la amina de configuración "R"

(con otras aminas como 2-butilamina no se obtienen buenos resultados). La relación de los sustratos fue de 1:1, y el *e.e.* fue muy bueno, en la mayoría de los casos probados (Esquemas III.25 y III.28). La reacción no catalizada condujo a los enaminoésteres (94), que a su vez no fueron sustratos para la aminólisis enzimática. En general, éste constituye un procedimiento sencillo y práctico para la preparación de  $\beta$ -cetoamidas mediante aminólisis directa de los  $\beta$ -cetoésteres, con rendimientos buenos y *e.e.*'s de moderados a buenos.

#### 4.5. QUIMIO- Y REGIOSELECTIVIDAD EN LA AMINÓLISIS DE AMINO ALCOHOLES

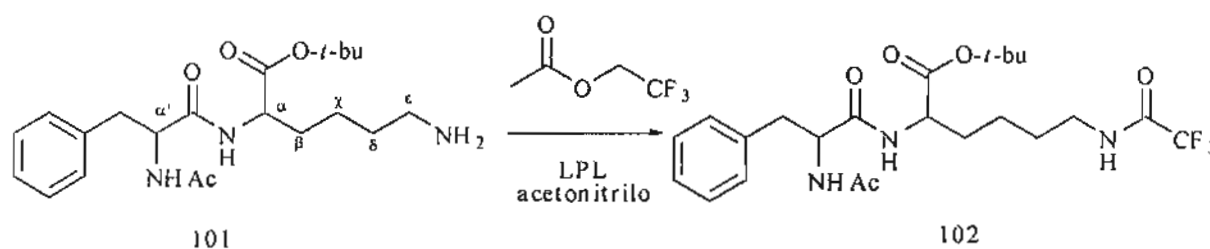
La monoacilación enzimática de aminoalcoholes fue inicialmente llevada a cabo por Klibanov *et. al.*, quienes observaron que compuestos difuncionales como los aminoalcoholes, pueden sufrir una acilación enzimática, de acuerdo con una elección apropiada del componente acílico. Utilizando 6-aminohexanol (96), ocurrió acilación quimioselectiva en el grupo amino o hidroxilo, dependiendo del grupo acilante y de la enzima. La ANL catalizó la O-acilación con ésteres de ácidos carboxílicos (con butirato de 2-cloroetilo (97), en alcohol *t*-amilico a 45°), pero la N-acilación con ésteres de aminoácidos (con *N*-Ac-L-Phe-O<sub>2</sub>Ci (98), en alcohol *t*-amilico a 45°). Un cambio similar en la quimioselectividad se observó con las enzimas de PsL y PPL (Esquema III.29).<sup>116</sup>



**ESQUEMA III.29. Reacciones de aminólisis quimio- y regioselectivas de amino alcoholes, catalizadas por lipasas en disolvente orgánico**

La acilación bioquímica de péptidos es una función muy importante. Dentro de estos procesos tenemos la acetilación, miristoilación y palmitoilación. Asimismo, los péptidos acilados con ácidos grasos, son “anclados” a liposomas, para ser translocados a través de membranas lipídicas, penetrando células intactas, así como a barreras hemato-encefálicas. Por lo anterior, sería de gran utilidad, realizar la síntesis *in vitro* de péptidos selectivamente acilados, con la posibilidad de variar los sitios de modificación.<sup>117</sup>

De esta manera, en procesos quimio- y regioselectivos similares a los ya mencionados anteriormente, el dipéptido, L-Phe- $\alpha$ -L-Lys-O-*t*-Bu (101), Esquema III.30, que contiene dos grupos amino, uno en la posición  $\alpha$  del residuo de “Phe” y otro en la posición  $\epsilon$  del residuo de “Lys”, de los cuales el grupo NH<sub>2</sub> en la posición  $\epsilon$  fue acetilado selectivamente con acetato de trifluoroetilo en acetonitrilo a 45°C con 3 lipasas: ANL, PsL y CVL.

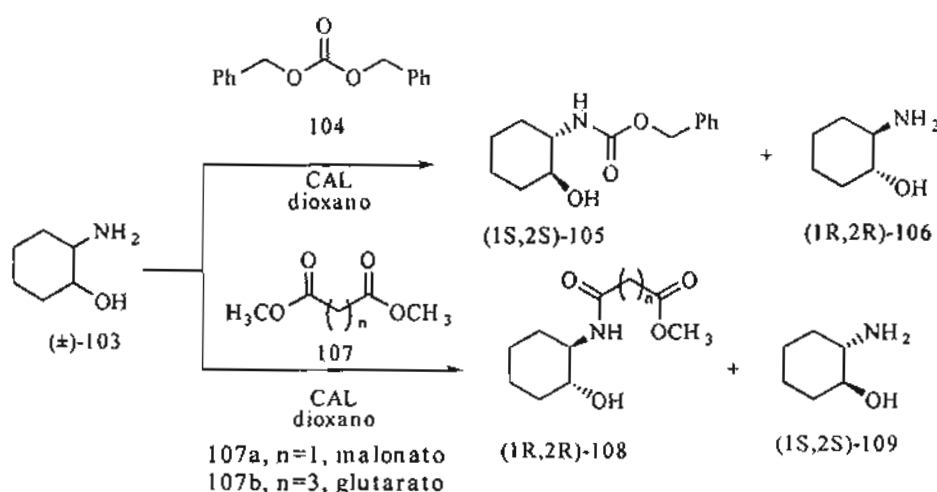


### ESQUEMA III.30. Quimio- y regioselectividad en la aminólisis del dipéptido L-Phe-L-Ser-NH- $\beta$ -naftilo, catalizada por lipasa en disolvente orgánico

La regioselectividad en la posición  $\epsilon$  de las lipasa es notable, considerando que no se detectó (por HPLC) la acetilación enzimática en la posición  $\alpha$ , aún con exceso del acetato de trifluoroetilo, y a pesar de que la acetilación química con anhídrido acético produjo la mezcla de productos (diacetilados en ambas posiciones,  $\epsilon$  y  $\alpha$ ). Otros disolventes mostraron la misma regioselectividad (alcohol *t*-butílico, THF y diclorometano). Asimismo, el mismo dipéptido fue acilado con los ésteres de trifluoroetilo de los ácidos mas largos: octanoico, mirístico y palmitico), y aromáticos (ácidos fenilacéticos). En todos los casos se observó el producto monoacilado (102) en la posición  $\epsilon$  regioselectivamente.

En el dipéptido (L)-Phe-(L)-Ser-NH- $\beta$ -naftilo, el grupo preferentemente acilado con LPL (lipasa lipoproteica), fue el grupo hidroxilo de "Ser" en preferencia al grupo amino de "Phe".

La resolución enzimática de aminoalcoholes no es fácil debido a que, en algunos casos se observa migración de acilo. En la resolución de 2-amino-1-alcoholes quirales con PPL y AcOEt a través de aminólisis, la enantioselectividad depende dramáticamente de la naturaleza del sustrato. Como ya se ha mencionado, en general se obtienen mejores resultados mediante reacciones de hidrólisis ó transesterificación del alcohol N-prottegido.<sup>118-121</sup> En un ejemplo de resolución mediante aminólisis, se intentó resolver el ( $\pm$ )-trans-2-aminociclohexanol (103) mediante alcoxycarbonilación usando los reactivos: carbonato de dibencilo (104) y carbonato de dialilo (reacción superior del Esquema III.31). Con la enzima CAL, sólo se observó el producto (1S,2S)-N acilado de la aminólisis (105), sin detectarse el producto de la O-alcoxycarbonilación.<sup>106</sup> Se obtuvieron los (1S,2S)-carbamatos (105) en bajo rendimiento (con carbonato de bencilo, 18% y 88% de *e.e.* después de 6 días, y con carbonato de alilo 24% y 82% de *e.e.* después de 58 horas), y los (1R, 2R)-*trans*-2-aminociclohexanoles (106), sin reaccionar en bajo rendimiento y *e.e.* aún mas bajo que en el caso de los productos carbamatos.



**ESQUEMA III.31. Resolución de ( $\pm$ )-trans-2-aminociclohexanol mediante reacciones de alcoxycarbonilación y acilación, catalizadas por CAL en dioxano**

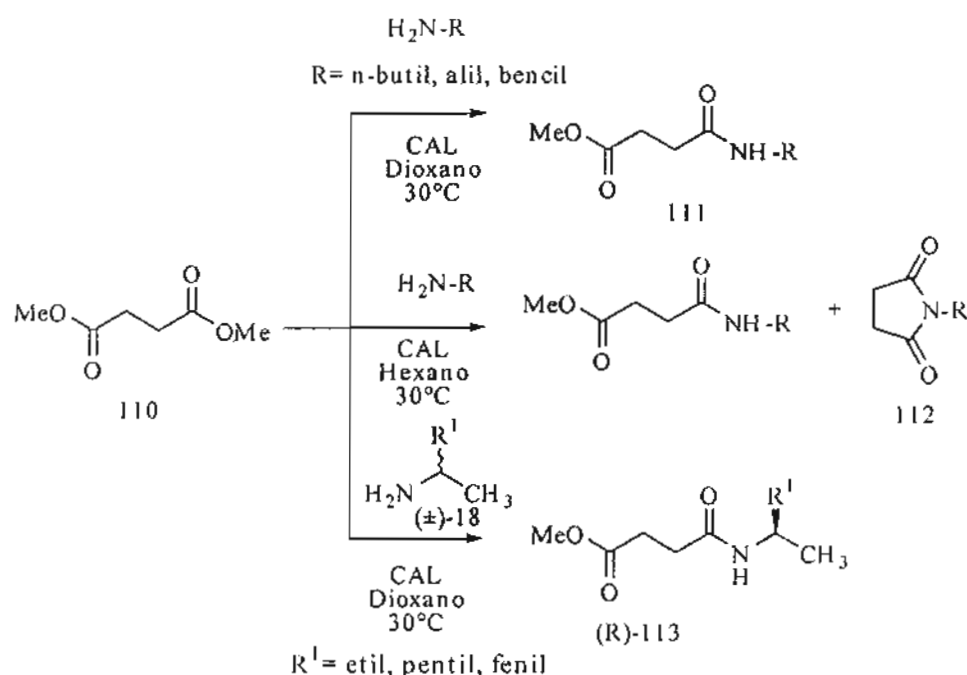


Ante estos resultados se realizó la acilación con diésteres (malonato de dimetilo (107a) y glutarato de dimetilo (107b) (Esquema III.31), con los cuales los aminoalcoholes (*trans*-2-aminociclohexanol (103) y *trans*-2-aminociclopentanol) mostraron una excelente quimio selectividad en presencia de CAL, con dioxano como disolvente, aunque mostró una estereoselectividad opuesta, sólo ligeramente superior con respecto a los carbonatos como agentes acilantes. Asimismo, el uso de otros disolventes, no mejoró los resultados de estereoselectividad obtenidos en dioxano.

#### 4.6. REGIO- Y ESTEREOSELECTIVIDAD EN LA AMINÓLISIS DE DIÉSTERES

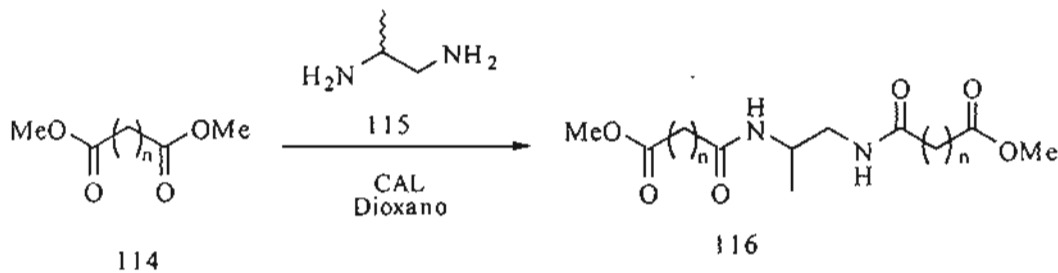
Antes se ha mencionado ya el uso de malonato de dimetilo como donador de acilo para la resolución enzimática de 2-aminoalcoholes cíclicos, así como de 1,2-ciclohexanodiamina (página 40, Esquema III.10). Para este último caso, estos procesos son de gran interés, debido a la importancia de los productos intermediarios dimaloilados como materiales de partida para la síntesis de compuestos de importancia biológica, como poliaminas y aza-macrociclos (página 74, Esquema III.43). Aparte del empleo de malonato de dietilo como donador de acilo, CAL es el mejor y más eficiente biocatalizador utilizado en procesos de amonólisis y aminólisis de otros diésteres. Esta lipasa cataliza la amonólisis y aminólisis de succinato de dimetilo (110) con varias aminas (*n*-butil-, alil- y bencilamina) (Esquema III.32). El disolvente juega un papel muy importante en esta reacción, y los mejores resultados se obtuvieron en dioxano (conversiones mayores a 95%).<sup>122</sup> Con hexano, los tiempos de reacción requeridos para las conversiones fueron similares, pero con la formación de *N*-alquilsuccinimida (30-40% de rendimiento) como subproducto. Cuando se utilizan aminas racémicas ( $\pm$ )-18:  $\alpha$ -metilpropil,  $\alpha$ -metilhexil y  $\alpha$ -metilbencilamina, se obtienen los amidoésteres quirales correspondientes (113) y CAL es selectiva hacia el isómero "R" de la amina, en dioxano como disolvente. Pero a diferencia de las aminas primarias no racémicas, no se obtuvieron las *N*-alquilsuccinimidias en hexano como disolvente.<sup>123</sup>

La aminólisis de  $\alpha$ -metilsuccinato de dimetilo conduce a los amidoésteres regioisoméricos aunque predomina aquél, en el que la aminólisis se efectúa sobre el grupo carboxilo menos impedido, y en este caso la amida que se obtiene es de configuración "R". La aminólisis de succinato de dimetilo se llevó a cabo a 30°C, usando una solución al 2% de amoníaco en dioxano, para dar el correspondiente amido-éster como único producto, en alto rendimiento.



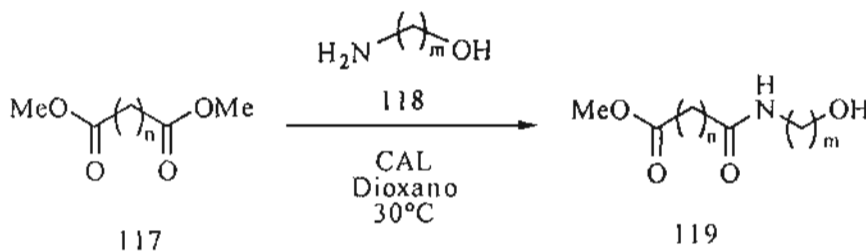
**ESQUEMA III.32. Reacciones de aminólisis de succinato de dimetilo con formación de amidoésteres simples y quirales, con CAL como catalizador**

Por otro lado, CAL mostró muy buena selectividad en la aminólisis de diésteres (114) no activados y diaminas como los nucleófilos, para obtener los amidoésteres como (116), como único producto, con muy buenos rendimientos y utilizando dioxano como disolvente, a temperatura ambiente. CCL y PsL mostraron muy baja actividad catalítica para el mismo proceso. Además, con ( $\pm$ )-1,2-propanodiamina (115), CAL mostró muy buena enantioselectividad ( $e.e.$ =90%), (Esquema III.33).<sup>124</sup>



**ESQUEMA III.33. Selectividad en la aminólisis de diésteres no activados y diaminas para la obtención de amidoésteres, catalizada por CAL en dioxano**

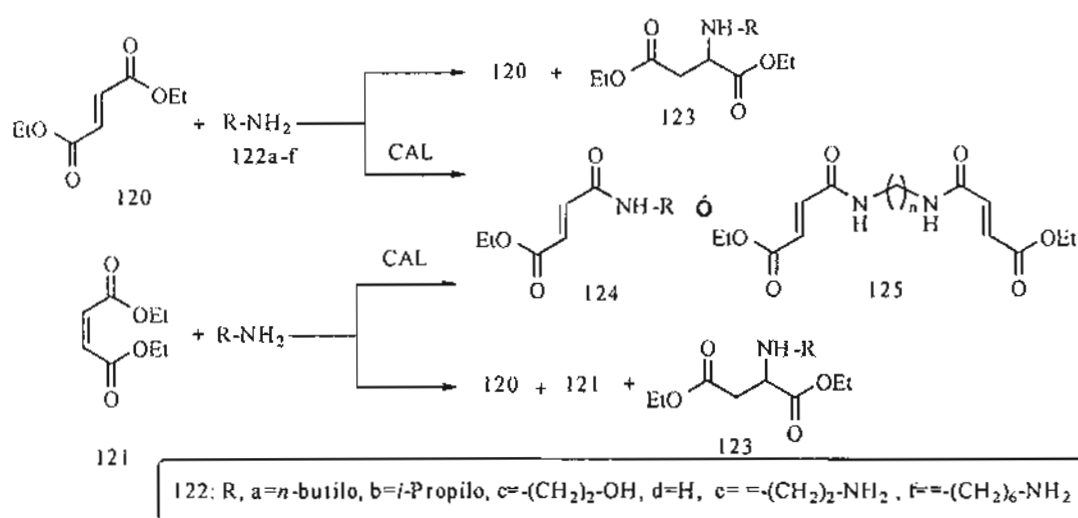
Variando el componente nucleofílico, se probaron varias enzimas (CCL, PsL y CAL), con diésteres no activados y aminoalcoholes, por ejemplo el succinato de dimetilo (110) y 3-amino-1-propanol (118,  $m=1$ ), pero sólo CAL mostró eficiencia catalítica, a temperatura ambiente, en dioxano. El producto principal fue el amidoéster (119  $n=2$ ,  $m=1$ ), resultante de la monoaminólisis (Esquema III.34).<sup>125</sup>



**ESQUEMA III.34. Quimioselectividad en la aminólisis de diésteres no activados y aminoalcoholes para la obtención de amidoésteres, catalizada por CAL en dioxano**

En aras de estudiar el efecto de la geometría de un doble enlace sobre la actividad catalítica, y en virtud de que la síntesis de las monoamidas de diésteres  $\alpha,\beta$ -insaturados requiere de varios pasos para su preparación, Gotor *et. al.*, efectuaron la aminólisis de fumarato (120) y maleato de dietilo (121) con butilamina y otras aminas (122a-f) (Esquema III.35) en dioxano y, nuevamente, CAL como catalizador. Con fumarato de dietilo, en

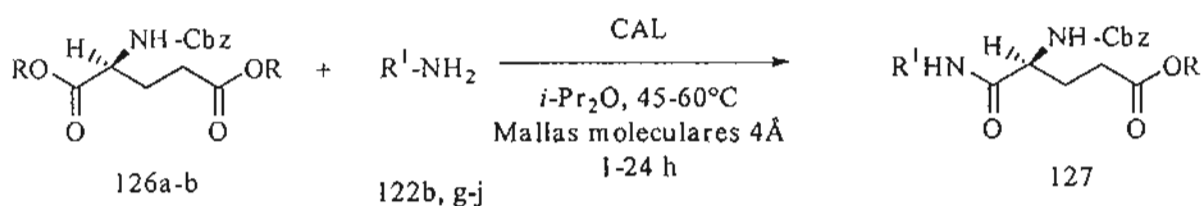
presencia de la enzima se obtuvo la monoamida (124) como único producto, pero sin la enzima se obtuvo un alto porcentaje del aducto de Michael (123) y algo de materia prima (120). Con maleato de dietilo (121), se obtuvo como producto de la aminólisis, la misma monoamida (124) obtenida con fumarato, es decir con la geometría *trans*. La formación de este producto debe transcurrir por isomerización de maleato a fumarato *via* una secuencia Michael-*retro*-Michael, seguido de la aminólisis del fumarato más estable.<sup>126</sup>



### ESQUEMA III.35. Estudio de las reacciones de aminólisis de los isómeros fumarato y maleato de dietilo, catalizadas por CAL en dioxano

En este mismo trabajo, entre otras aminas probadas la aminólisis de ambos sustratos con isopropilamina (122b), y amoníaco, también conduce a los *trans*-monoamidoésteres como únicos productos. Con aminoetanol (122c), sólo se obtiene el producto de la aminólisis, y con diaminas (122e,f), se obtienen las diamidas correspondientes (125). Los rendimientos son mejores para fumarato que para maleato. En ningún caso se obtienen monoamidas del maleato, por lo que se concluye en este trabajo, que es un mal sustrato para CAL, pero el fumarato permite obtener amidas de manera quimiosselectiva.

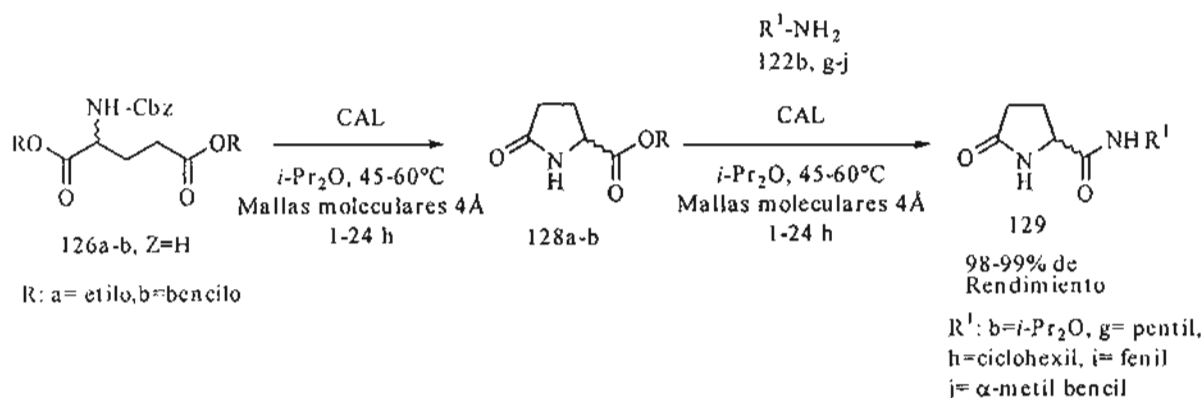
Conde *et. al.*,<sup>127</sup> han estudiado la aminólisis de diésteres del ácido glutámico protegidos como Cbz (126a-b), utilizando diferentes aminas primarias y CAL en éter diisopropílico como disolvente. La reacción toma lugar de manera regio- y enantioselectiva para producir las correspondientes monoamidas (127). Cuando la amina de partida es  $\alpha$ -metilbencilamina racémica, sólo reacciona el enantiómero "R" de la amina. En todos los casos, sólo se obtienen las monoamidas, pero el rendimiento es dependiente de la influencia estérica del grupo protector (Esquema III.36).



R: a= etilo, b= bencilo      R<sup>1</sup>: b= *i*-propilo, g= *n*-pentilo, h= ciclohexilo, i= fenilo, j=  $\alpha$ -metil bencil

### ESQUEMA III.36. Estudio de la aminólisis de diésteres del ácido glutámico N-protegidos, con aminas primarias y CAL en éter diisopropílico como disolvente

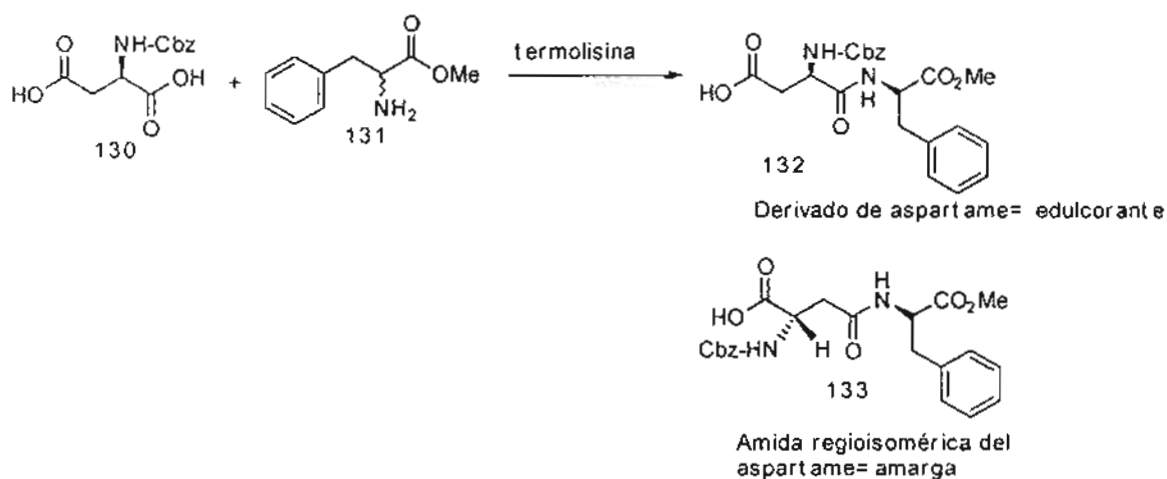
Los ésteres etílico y bencílico no protegidos en el nitrógeno del ácido (R)- y (S)- glutámico (126a,b, Cbz=H)), producen mediante ciclización catalizada por CAL, a los ácidos piroglutámicos correspondientes (128a,b).



### ESQUEMA III.37. Ciclización de ésteres del ácido glutámico N-protegidos para producir ésteres piroglutámicos y las reacciones de éstos con aminas en presencia de CAL

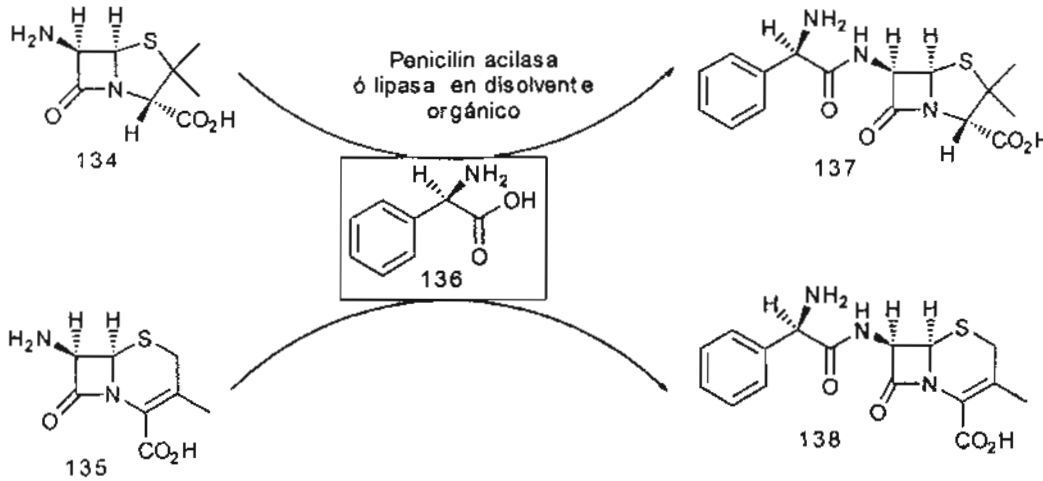
Estos ésteres piroglutámicos son sustratos altamente reactivos en la aminólisis catalizada por CAL para dar las amidas (129), y aunque la reacción exhibe algo de preferencia por el sustrato "S" del donador de acilo, la enantioselectividad es muy pobre. La enantioselectividad es alta, hacia el isómero "R", con las aminas quirales, como la  $\alpha$ -metilbencilamina (Esquema III.37).<sup>128</sup>

En la producción del edulcorante aspartame, por la compañía. DSM Toyo-Soda, la proteinasa termolisina, exhibe alta regio y estereoselectividad, de tal manera que no se requiere protección del grupo carboxilo en posición  $\beta$ , ni activación del carboxilo requerido en la formación del enlace amido (carboxilo  $\alpha$ ). No ocurre racemización, por lo que se parte de la unidad del ácido aspártico quiral protegido con el grupo Cbz (130). La alta estereoselectividad por la enzima, permite utilizar el éster metílico de la fenilalanina racémica (131), porque se incorpora únicamente el D-aminoácido para dar el derivado (132), precursor de aspartame (Esquema III.38). La regioselectividad mostrada, permite obviar la formación del producto regioisomérico, la amida- $\beta$  (133), en la síntesis química estequiométrica, el cual se forma en una alta proporción. Además de reducir el rendimiento en la producción del edulcorante, la amida- $\beta$  es amarga, y debe ser removida en una etapa posterior de recristalización.<sup>129</sup>



**ESQUEMA III.38. Regio- y estereoselectividad en la reacción de aminólisis del N-Cbz del ácido aspártico y el metiléster de fenilalanina, catalizada por termolisina**

Otro tipo de sustratos, en los que hidrolasas como proteinasas y lipasas tienen una gran oportunidad de exhibir su mayor especificidad de sustrato es en la producción de antibióticos como ampicilina (137) y amoxicilina (138), mediante la formación del enlace amido clave de 6-APA (134) y 7-ADCA (135) con D-fenilglicina (136), en medio bifásico o a través de los intermediarios convenientes en disolvente orgánico (Esquema III.39).



**ESQUEMA III.39. Reacción de aminólisis de ácidos penicilámicos y fenilglicina, catalizada por hidrolasas en disolvente orgánico**

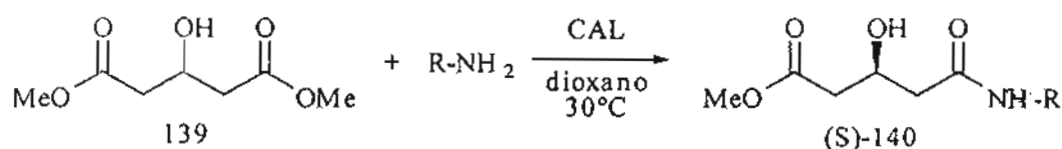
Actualmente, los antibióticos que se mencionan, se producen vía química tradicional, pero tienen los inconvenientes de utilizar grandes cantidades de DMF como disolvente, generar grandes cantidades de sales, requerir de pasos de protección-desprotección y de activación de los intermediarios correspondientes, y usar bajas temperaturas ( $-50^{\circ}\text{C}$ ).<sup>130</sup>

En la actualidad se está investigando para extender el uso de enzimas como penicilina-cilasa, para la condensación del núcleo de  $\beta$ -lactama con D-aminoácidos. Los primeros estudios indican que la enzima es regioselectiva y permite la formación del enlace amido, sin ocurrir la apertura del anillo de  $\beta$ -lactama. No obstante, un problema a resolver es la reacción de hidrólisis enzimática en el medio acuoso. El siguiente paso de la investigación en esta línea, es la síntesis enzimática, utilizando lipasas en disolventes orgánicos.<sup>131-135</sup>

## 5. AMINÓLISIS CON SELECTIVIDAD PROQUIRAL

En el mismo orden de ideas, Gotor *et. al.*<sup>136</sup> reportaron la primera aminólisis de un diéster proquiral, el 3-hidroxiglutarato de dimetilo (139), con CAL como catalizador y dioxano como disolvente a 30°C, con varias aminas (*n*-butil-, alil- y bencilamina), y a 25°C con amoníaco en solución. Los rendimientos son muy buenos y el producto de la monoamidación, enantioméricamente puro, tiene configuración "S" (140). Otros disolventes fueron menos adecuados (por ejemplo, la reacción fue más lenta con hexano), pero el cambio del mismo no influyó en la enantioselectividad. En cualquier caso, CAL solo transformó el grupo éster *pro-R*, produciendo la monoamida con configuración "S", independientemente de la amina utilizada.

Otras enzimas como PsL y CCL, no produjeron la aminólisis ó amonólisis, aún después de tres días de reacción (Esquema III.40).<sup>136</sup> La pureza enantiomérica de las (S)-monoamidas (140) se determinó derivatizando con el reactivo de Mosher (MTPA-Cl), cuyo espectro de RMN-F<sup>19</sup> mostró sólo una señal, en contraste a los MTPA-ésteres derivados del 3-hidroxiglutarato racémico, el cual mostró dos señales bien resueltas.<sup>136</sup>



R	t, h	%Rendimiento	% e.e.
n-butil	9	96	>99
alil	8	95	>99
bencil	9	98	>99

**ESQUEMA III.40. Reacción de aminólisis de un diéster proquiral, con CAL como catalizador y dioxano como disolvente con varias aminas**

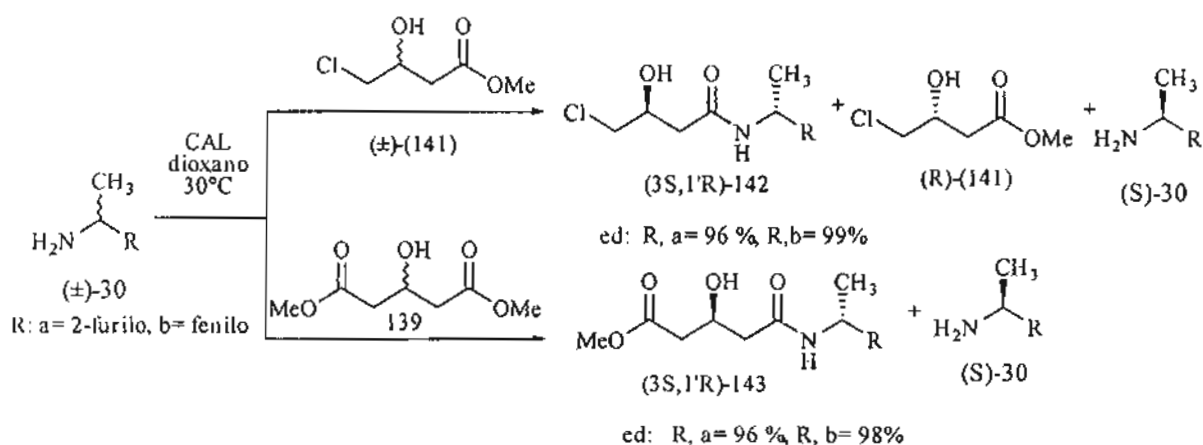


## 6. PROCESOS DE DOBLE RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA

El autoreconocimiento quiral del nucleófilo y del donador de acilo, ocurre en sitios diferentes de la enzima. Si ambos reconocimientos se llevan a cabo simultáneamente, se efectúa un proceso “doblemente enantioselectivo”. Algunos de estos procesos de reacciones doblemente enantioselectivas, ya se han mostrado y proceden con diastereoselectividades modestas.<sup>90, 137,138</sup>

En la mayoría de los casos la enantioselectividad de la enzima hacia un sustrato dado, por ejemplo el donador de acilo, es afectado por la estructura del aceptor de acilo y viceversa. Esto implica que aunque se obtengan altas enantioselectividades en la resolución cinética simple de los dos sustratos, no hay forma de predecir el resultado del proceso de la doble resolución cinética. Sin embargo, un buen criterio de selección de los sustratos para un proceso doblemente enantioselectivo es que las resoluciones simples de los sustratos sean muy altas.

En el siguiente ejemplo a continuación (Esquema III.41),<sup>137</sup> se llevó a cabo la reacción de aminólisis catalizada por CAL de (±)-4-cloro-3-hidroxi-butanoato de etilo (141) con aminas racémicas (±)-30 (2-furiletilamina y 2-feniletilamina), en dioxano a 30°C.



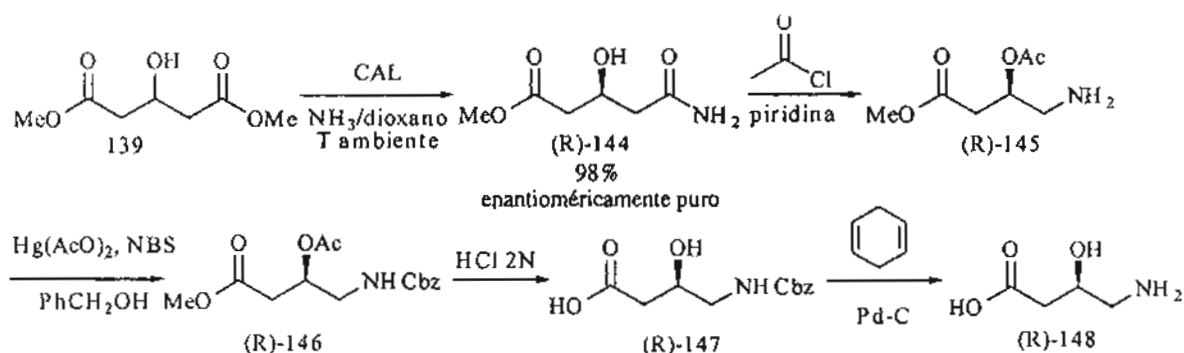
**ESQUEMA III.41. Procesos de doble resolución enzimática altamente diastereoselectivos, catalizados por CAL**

La enzima solo catalizó la aminólisis, obteniéndose las amidas (142) de configuración (3*S*,1'*R*) en alto *e.d.* (96-99%), dependiendo de la conversión y de la amina. En las mismas condiciones, se llevó a cabo la asimetrización-resolución de 3-hidroxi-glutarato de dimetilo (139) con la 2-feniletilamina y 2-furilamina anteriores, en las condiciones descritas arriba. Los *e.d.*'s en este caso fueron muy altos (96 y 98% respectivamente), para producir las amidas (143) de configuración (3*S*,1'*R*), similar a las del proceso anterior.

## 7. SÍNTESIS ASIMÉTRICA MEDIANTE PROCESOS DE AMINÓLISIS

### 7.1. Síntesis de (R)-GABOB

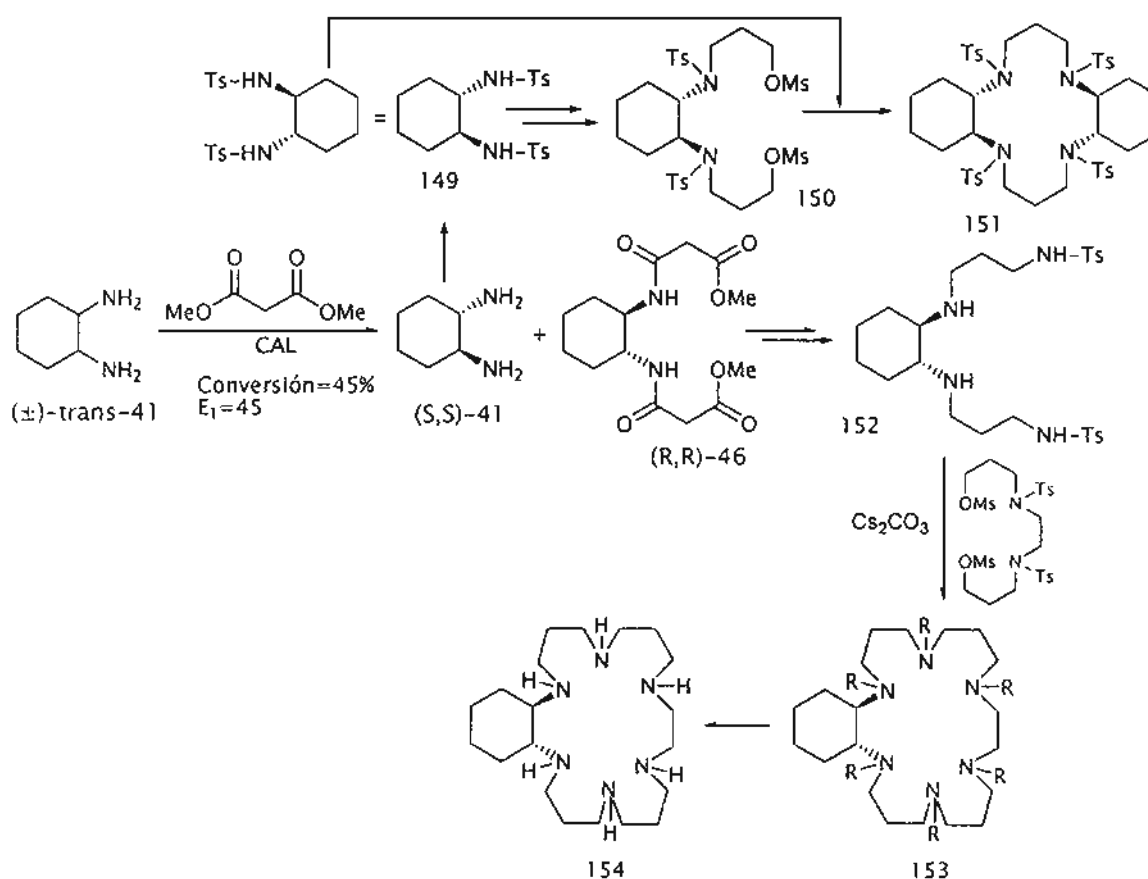
Son contados los ejemplos que se pueden encontrar en la literatura con relación a la síntesis quimicoenzimática, en el que se involucre un paso de amonólisis ó aminólisis enzimática como un evento crucial de la secuencia sintética. Los ejemplos encontrados corresponden a quien sin duda, es el "padre" de esta línea de investigación, el Dr. Vicente Gotor y su grupo en la Universidad de Oviedo, en España.<sup>136</sup> A continuación, se muestra la secuencia para la síntesis de (R)-GABOB (148), en la que el paso clave es asimetrización enzimática mediante una reacción de amonólisis del 3-hidroxi-glutarato de dimetilo (139), para dar la amida (R)-144 enantioméricamente pura, (Esquema III.42).



**ESQUEMA III.42. Síntesis de (R)-GABOB, mediante un paso clave altamente enantioselectivo de asimetrización enzimática de amonólisis del 3-hidroxi glutarato de dimetilo**

## 7.2. Síntesis de Azamacrociclos ópticamente activos

El diseño y síntesis de moléculas receptores orgánicos capaces de enlazar especies aniónicas es de un gran interés a los campos de la química y la biología. Estos compuestos exhiben sitios enlazantes cargados positivamente a pH's neutros, y se han investigado ampliamente sus propiedades de complejación de aniones. Además de las interacciones carga-carga, factores estructurales como el tamaño de la cavidad del macrociclo ó el número de nitrógenos juegan un papel importante en su función enlazante. A continuación se describe el proceso de síntesis de 2 poliaminas macrocíclicas con anillos de 22 miembros ópticamente activas, realizadas también por el grupo del profesor Gotor.<sup>139, 140</sup>

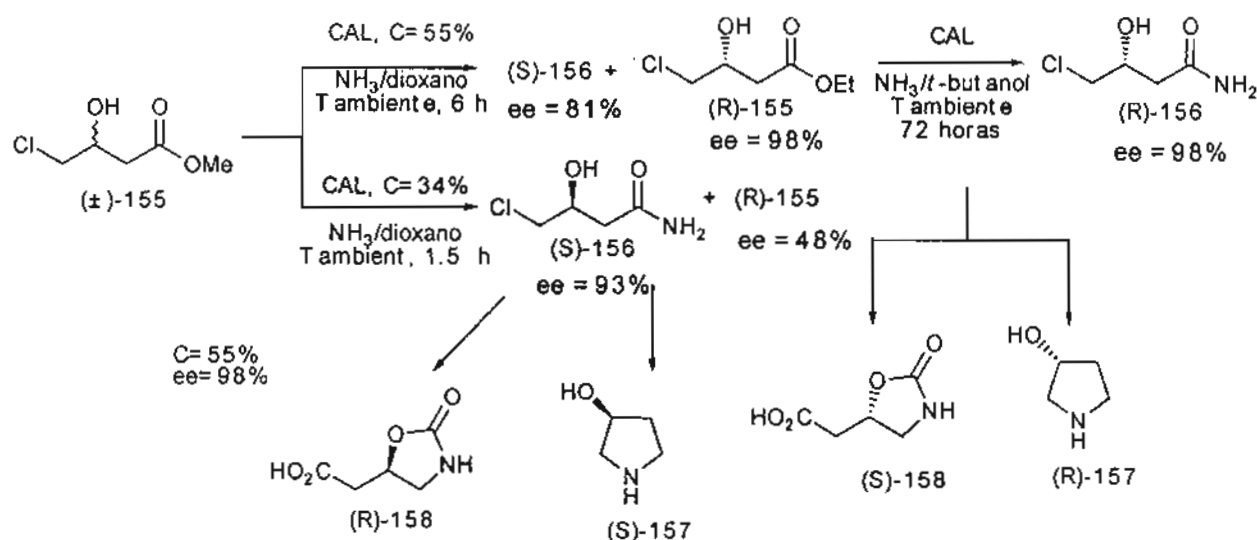


**ESQUEMA III.43. Síntesis de poliazamacrociclos quirales, a través de un paso clave de doble resolución enzimática de ciclohexano-1,2-diamina, con malonato de dimetil como agente acilante y CAL como catalizador**

Nuevamente, aquí el paso clave, lo constituye la doble resolución enzimática de la ciclohexano-1,2-diamina ( $\pm$ )-41, con 2 moléculas de malonato de dimetilo como el agente acilante. El producto de la doble resolución (R,R)-46, conlleva los centros quirales que habrá de portar el macrociclo final (154), obtenido mediante la secuencia sintética a través de los intermediarios (152) y (153) (Esquema III.43). Alternativamente, a partir de la diamina enantiomérica obtenida en la doble resolución enzimática, la (S,S)-ciclohexano-1,2-diamina (41), mediante la secuencia química indicada en el Esquema III.43, produce el macrociclo (151), a través de los intermediarios (149) y (150). Todos los intermediarios y productos de ésta síntesis son enantioméricamente puros en virtud de la alta enantioselectividad obtenida en la doble resolución enzimática de partida.

### 7.3 Síntesis de un sintón heterocíclico quiral

El siguiente trabajo se inició con la resolución, mediante amonólisis catalizada por CAL, del ( $\pm$ )-4-cloro-3-hidroxi-butanoato de etilo (155), para obtener los dos enantiómeros de la 4-cloro-3-hidroxi-butiramida (156) con alta pureza enantiomérica, lo cuál está determinado por las cuidadosas condiciones de la reacción de resolución catalizada por CAL (Esquema III.44). El enantiómero (S)-156 que se requiere para la síntesis de los enantiómeros de (S)-pirrolidin-3-ol (157) y (R)-5-(clorometil)-1,3-oxazolidin-2-ona (158), se obtuvo con un exceso enantiomérico del 93% en 1.5 horas, mediante la amonólisis catalizada por CAL en dioxano. Si la reacción de amonólisis con CAL como biocatalizador se realiza en 6 horas, en el mismo disolvente, la pureza enantiomérica de (S)-156 es menor, *e.e.*=81, pero la pureza enantiomérica del éster recuperado R-(155) es de 98%. A partir de este sustrato, se obtuvo la (R)-amida (156) mediante la amonólisis catalizada por CAL, efectuada en *t*-butanol a temperatura ambiente durante 72 h. La conversión para esta reacción fue completa, con un rendimiento del 90% en el producto. El compuesto (S)-157 se ha utilizado como precursor de productos de interés medicinal (precursor de alcaloides y derivados de  $\beta$ -prolina), mientras que el compuesto (R)-158 es un precursor de bloques constructores de isómeros hidroxietilénicos.<sup>141</sup>



**ESQUEMA III.44. Resolución altamente enantioselectiva mediante aminólisis catalizada por CAL de (±)-4-cloro-3-hidroxi-butanoato de etilo en un paso clave para la síntesis de los heterociclos pirrolidin-3-ol y 5-(clorometil)-1,3-oxazolidin-2-ona**

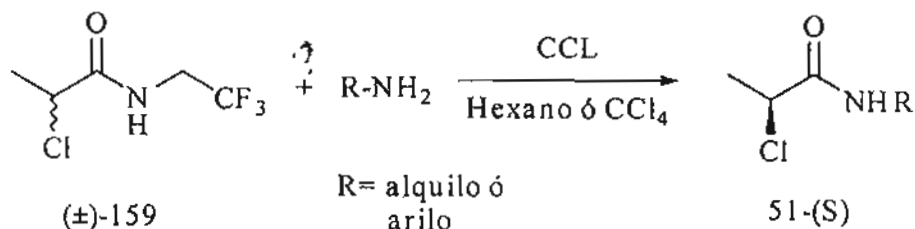
Finalmente, en otro tipo de aplicaciones biocatalíticas, se ha reportado la acilación enzimática de aminoácidos<sup>142</sup> y de aminoazúcares<sup>143</sup> con lipasas (por ejemplo las RML y CAL), con ácidos carboxílicos para la síntesis de surfactantes biodegradables.

## 8. OTROS PROCESOS RELACIONADOS A LA AMINÓLISIS ENZIMÁTICA

### 8.1 TRANSAMIDACIÓN

Como complemento de la aminólisis enzimática de ésteres, se tiene la reacción de transamidación, la cual se sabe que es un proceso difícil y se requieren condiciones especiales para que se lleve a cabo (Esquema III.45). Cuando se parte de la amida (±)-N-trifluoroetil-2-cloropropanamida (159), CCL cataliza la reacción de transamidación con aminas alifáticas y aromáticas, obteniéndose la correspondiente amida quiral, y aunque tanto el rendimiento químico como el óptico de las amidas obtenidas de esta reacción son mas bajas que los de la

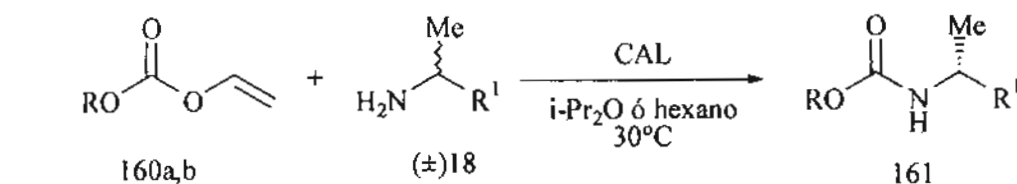
reacción de aminólisis de los ésteres, constituye el único ejemplo conocido de transamidación catalizada por una lipasa.<sup>94</sup>



**ESQUEMA III.45. Reacción de transamidación catalizada por CCL**

## 8.2. ALCOXICARBONILACION ENZIMÁTICA

La reacción de alcoxycarbonilación enzimática, ha sido poco investigada, pese al hecho de que este es un proceso de gran utilidad, en virtud de que permite la posibilidad de introducir grupos activantes ó protectores en alcoholes y aminas. Por ejemplo, la aplicación se ha utilizado en la alcoxycarbonilación regioselectiva de carbohidratos<sup>144</sup> y nucleósidos.<sup>145-147</sup> Los carbamatos son productos de gran interés en química medicinal, y aunque existen métodos químicos descritos para diferentes clases de carbamatos, la alcoxycarbonilación enzimática de aminas es una metodología de valor para la preparación de estos compuestos importantes. Para efectuar este proceso, se han estudiado varios agentes de alcoxycarbonilación; ya se han mencionado los carbonatos de alquilo, que son menos reactivos que los ésteres correspondientes en procesos enzimáticos, pero en este caso los carbonatos de alquil vinilo son útiles para alcoholes y aminas. En esta reacción de alcoxycarbonilación de aminas racémicas (18) con carbonatos de *n*-butil y *n*-octil vinilo (160a,b), se obtienen los carbamatos quirales correspondientes (161a-c) en rendimientos moderados, en presencia de CAL como biocatalizador (Esquema III.46). La enantioselectividad del proceso depende de la naturaleza del sustrato y del disolvente. En todos los casos, la amina de configuración "R" reacciona más rápido.<sup>148,149</sup>



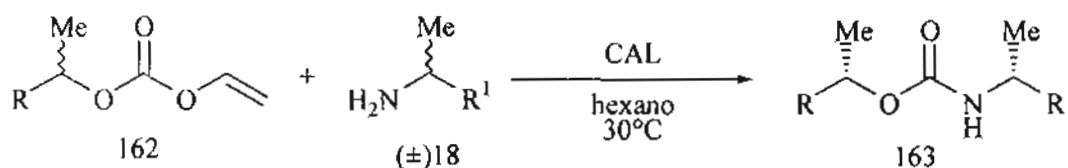
R:a= n-octil, b= n-butil

R <sup>1</sup>	% e.e.	% Conversión
etilo	62	45
pentilo	42	40
fenilo	98	39

**ESQUEMA III.46. Síntesis de carbamatos quirales mediante la alcoxycarbonilación de aminas racémicas con carbonatos de alquil vinilo usando CAL como biocatalizador**

Con la combinación de aminas primarias de cadenas alquílicas medianas y carbonatos de vinilo racémicos se obtienen los (S)-carbamatos correspondientes con alta enantioselectividad.<sup>150</sup>

La doble alcoxycarbonilación enzimática enantioselectiva de aminas (±)-18 con carbonatos de vinilo racémicos (162) produce los carbamatos (163) con dos centros estereogénicos. Este proceso muestra que el uso de enzimas con el par apropiado de amina-carbonato de vinilo da lugar a los uretanos con dos centros estereogénicos en un paso y con un alto exceso enantiomérico (Esquema III.47).<sup>151</sup>



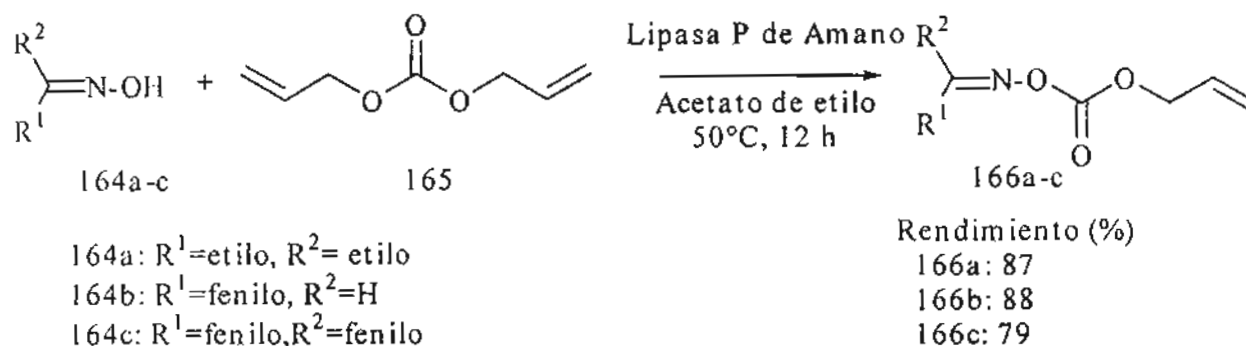
R	R <sup>1</sup>	tiempo (h)	% Conversión	% e.e. (SR/RS)	% e.d.
fenilo	fenilo	8	53	69	68
fenilo	n-pentilo	24	42	76	88
n-hexilo	fenilo	30	44	81	65

**ESQUEMA III.47. Síntesis de uretanos con dos centros quirales con altos e.e.'s, mediante una doble alcoxycarbonilación enzimática de aminas racémicas con carbonatos de alquil vinilo racémicos**

Recientemente se ha mostrado que carbonatos de dialquilo y de dibencilo simétricos, producen los carbamatos correspondientes, mediante catálisis con CAL en disolventes orgánicos. No obstante, las velocidades de reacción son menores en comparación con las de los ésteres, y entre diferentes carbonatos varía en el orden: carbonato de dibencilo  $\approx$  carbonato de dibutilo > carbonato de dietilo > carbonato de dimetilo. Asimismo la aminólisis de carbonato de dibencilo con bencilaminas quirales, produjo las correspondientes benciloxicarbonilaminas enantioméricamente puras.<sup>152</sup>

### 8.3. PROCESOS DE HIDRAZINÓLISIS Y OXIMÓLISIS ENZIMÁTICA

Las lipasas son capaces de aceptar otros nucleófilos nitrogenados además de amoníaco y aminas, tales como oximas (164a-c), hidrazinas (167a,b), hidroxilamina y carbonatos mixtos de las mismas. PPL y CCL muestran actividad catalítica similar en el proceso ilustrado en el Esquema III.48, y con las lipasas ANL y HLL, los oximinésteres (166a-c) se obtuvieron en rendimientos bajos, con carbonato de alilo (165) como agente acilante (Esquema III.48).<sup>153</sup>

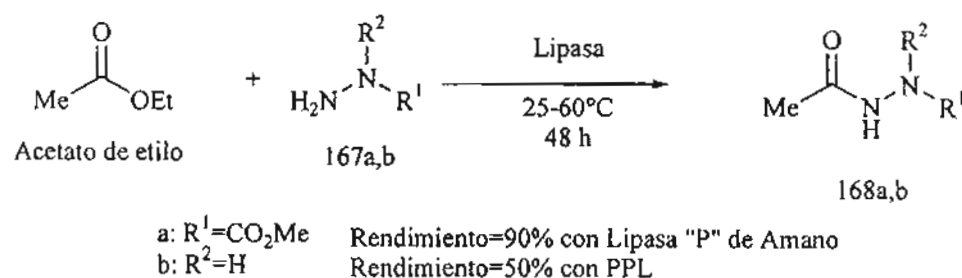


#### ESQUEMA III.48. Procesos general de oximólisis catalizada por enzimas en disolvente orgánico

Por su parte, se obtuvieron buenos resultados en la reacción de hidrazinólisis de hidrazinas (167a,b) con acetato de etilo, con la lipasa “P” de Amano, y sólo moderados con las

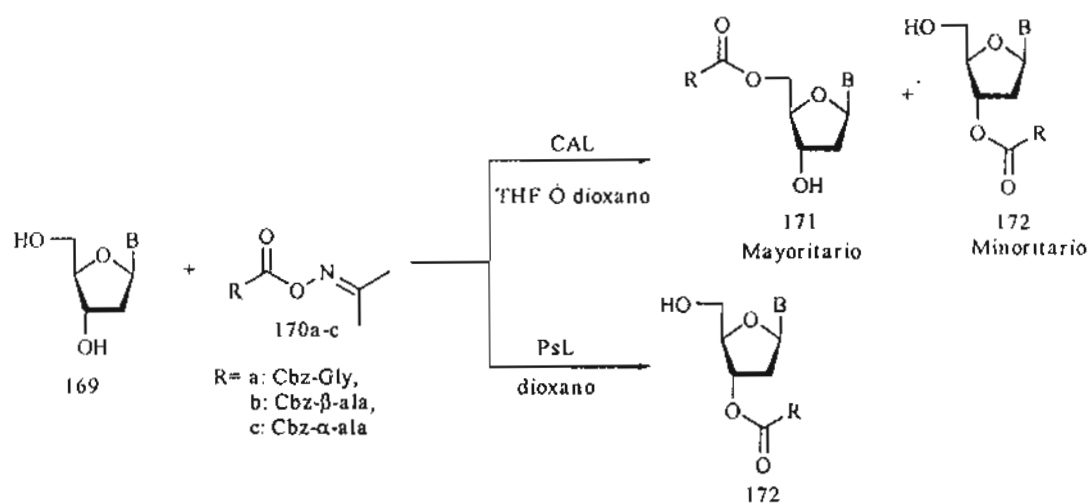


lipasas: CCL, RAL, ANL, CCL, y las proteinasas subtilisina Carlsberg y papaina (Esquema III.49).<sup>154</sup>



### ESQUEMA III.49. Procesos generales de hidrazinólisis catalizada por CAL en disolvente orgánico

Reacciones relacionadas son la alcoxicarbonilación regioselectiva de nucleósidos (169) con alcoxicarbonil-O-acetoximas (170a-c), con la participación de PsL y CAL. Esta última mostró mayor amplitud de sustrato, pero diferente regioselectividad (Esquema III.50).<sup>155</sup>

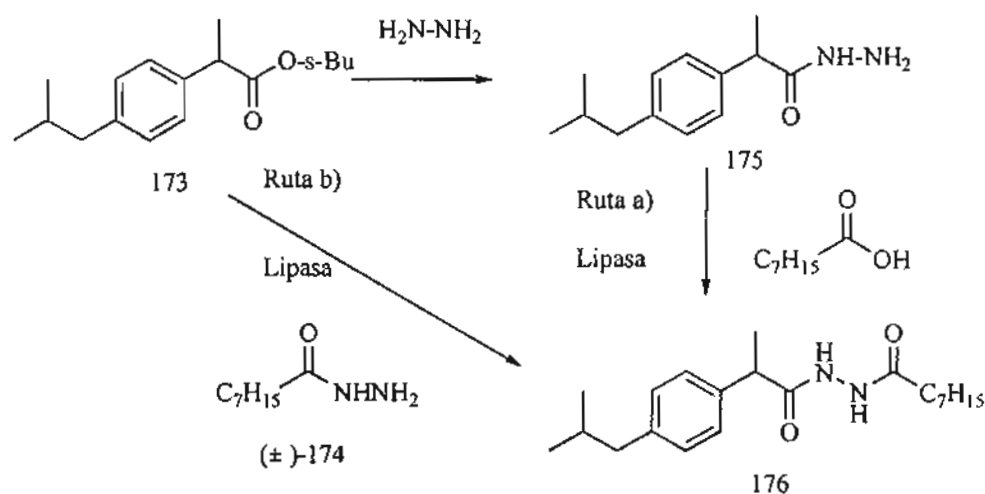


### ESQUEMA III.50. Reacciones de alcoxicarbonilación regioselectiva de nucleósidos con alcoxicarbonil-O-acetoximas con la participación de PsL y CAL

Algunos homólogos derivados de carbonatos se utilizan en la preparación de carbazoil-derivados de nucleósidos y alquilidencarbazoil-derivados de nucleósidos que han surgido como objetivos moleculares, debido a que combinan características estructurales análogas a las encontradas en nucleósidos terapéuticos y nucleósidos con actividad fungicida/herbicida.<sup>156</sup> Un estudio de la regioselectividad de la reacción de alcoxicarbonilación catalizada por CAL en diferentes disolventes, muestra la utilidad de modificar las condiciones experimentales, así como la influencia de la estructura del sustrato en la obtención de sintones del anillo A de la vitamina D<sub>3</sub> y análogos de la misma.<sup>157</sup>

Recientemente, Sheldon *et. al.*, han publicado la formación de diacilhidrazinas mediante la acilación enzimática de acilhidrazinas, como una técnica alternativa para la resolución indirecta de ácidos carboxílicos. Esta metodología eventualmente se probaría para resolver ácidos carboxílicos, que son por ejemplo, por razones estéricas, poco reactivos para la resolución cinética enzimática convencional. En este trabajo, se probaron enzimas y disolventes en la acilación de una hidrazida racémica de ibuprofeno (175), obtenida en un paso previo a partir del éster (173) (Esquema III.51, ruta a).<sup>158</sup> La enzima más eficiente fue CAL, y el disolvente que dió mejores resultados fue *t*-butanol. En este caso, la resolución cinética del compuesto acílico (173) se realizó indirectamente a través de su conversión en un compuesto nucleofílico como la hidrazida del mismo (175). De acuerdo con su reacción natural, las lipasas necesitan más espacio en el subsitio enlazante al nucleófilo (diacilglicerol), que en el subsitio enlazante al ácido graso. De aquí que las lipasas generalmente acomodan nucleófilos voluminosos en el subsitio aceptor. Mientras que la porción de acilo está sujeta a restricciones estéricas más severas.<sup>159</sup> De esta manera, la acilhidrazida de ibuprofeno (175) es aceptada como nucleófilo por varias enzimas (lipasas CAL-B (SP525), CAL-A (SP526), PAL, LPL, RML, CRL (CCL) y PSL); aunque las velocidades iniciales para cada lipasa fueron diferentes, en general, las reacciones fueron relativamente rápidas. En el caso de las lipasas, LPL y CAL se alcanzó una conversión del 100% en la diacilhidrazida correspondiente (176), en 24 horas. Esto contrasta con los modestos resultados obtenidos cuando el éster de ibuprofeno (173) se utiliza como componente acílico, y octanoilhidrazida (174) como el nucleófilo (Esquema III.51, ruta b). En este caso, los procesos transcurrieron más lentamente y la

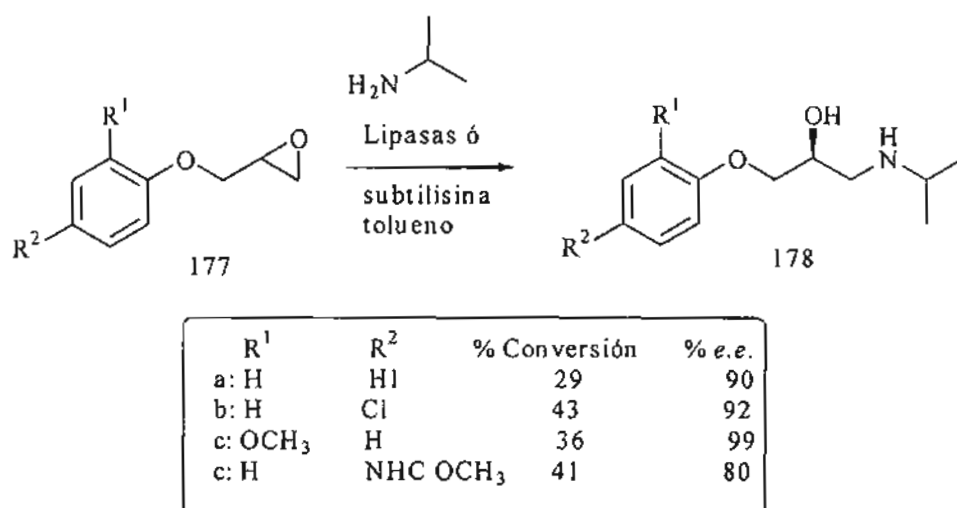
enantioselectividad fue más baja que en el proceso alternativo anterior, aún disminuyendo la temperatura.<sup>158</sup>



### ESQUEMA III.51. Resoluciones alternativas de ácidos carboxílicos mediante hidrazinólisis enzimática con CAL

## 9. SUSTRATOS "NO ACILÍCOS" DE LA LIPASA DE *Candida antarctica* EN PROCESOS DE AMINÓLISIS

Finalmente, en nuestro conocimiento, poco se ha publicado respecto de sustratos "no acilicos", es decir, compuestos que no sean derivados de ácidos carboxílicos. Kamal y Rao describen a algunos epóxidos como (177a-d), como sustratos "donadores" para enzimas como PPL, CCL, RML (ésta inmovilizada a un soporte microporoso), reaccionando con aminas como 2-propilamina (no se mencionan más aminas en el presente trabajo), en varios disolventes orgánicos (hexano, THF, tolueno y acetato de etilo). Las enantioselectividades del proceso son altas, produciéndose las (S)-propanolaminas (178a-d) con *e. e.*'s altos, del 80 al 99% (Esquema III.52).<sup>160</sup>



**ESQUEMA III.52. Epóxidos como sustratos “donadores” para lipasas y subtilisina en una reacción de aminólisis en disolvente orgánico**

Como puede verse de esta reseña, en los últimos años, las lipasas pueden catalizar muy eficientemente procesos de aminólisis y (otros relacionados a ésta) de ácidos y sus derivados en disolventes orgánicos, con control de la quimio-, regio- y estereoselectividad, mediante una variedad de reacciones que incluyen diversos aceptores de acilo (ésteres de vinilo, fenilo, oximinoésteres, ésteres simples y activados, carbonatos, pirocarbonatos, anhídridos mixtos, y hasta epóxidos) y variados nucleófilos (alcoholes, peróxido de hidrógeno, y en particular nitrogenados como: amoníaco, hidroxilamina, hidrazina, hidrazidas, aminas y oximas) no naturales, para producir compuestos de gran diversidad estructural e interés. Finalmente, no queda duda que la principal aportación de las enzimas sea su capacidad para ejercer diversos niveles de selectividad (quimio-, regio- y estereo-) y especificidad a las reacciones orgánicas, con su contribución a la determinación de configuraciones relativas, y a la síntesis orgánica asimétrica de productos naturales, farmacéuticos y de la química fina, así como saborizantes y fragancias industriales. Actualmente, es cada vez más interesante el conocimiento de que las enzimas pueden trabajar en condiciones extremas (además del uso de disolventes orgánicos), tal es el caso de subtilisina que puede actuar bajo alta presión (150-400 MPa), acelerando tanto procesos de hidrólisis como de síntesis. Desde un punto de vista práctico, un aumento en

la presión y una disminución del ataque por el agua favorecerá la síntesis de péptidos. Esto puede lograrse introduciendo un disolvente orgánico acoplado a un reactor presurizado.<sup>161, 162</sup>

En el mismo orden de ideas, la combinación única de una alta actividad catalítica con estabilidad química y mecánica, ha conducido al desarrollo de la reciente Tecnología de las Enzimas Cristalinas Entrecruzadas (**CLEC** de Cross-Linked Enzyme Crystals), que produce biocatalizadores que poseen una mayor estabilidad contra la desnaturalización por el calor, disolventes orgánicos y la autoproteólisis, lo cual les hace extremadamente útiles. Esta tecnología es de amplia aplicación a una variedad de proteínas, y existen aplicaciones interesantes en el campo de la biocatálisis preparativa o sintética y ha atraído la atención del no “enzimólogo”.<sup>163, 164</sup>

## ***IV. JUSTIFICACIÓN***

La aminólisis, como una reacción general para ésteres y lactonas, se ha reportado en condiciones muy variadas, sin embargo, sólo permite obtener amidas ó hidroxiamidas relativamente simples, debido a las condiciones de reacción. Por ejemplo, las dialquilamidas de aluminio, permiten convertir ésteres en amidas en rendimientos moderados, aunque con lactonas se obtienen hidroxialquilamidas. Por otro lado, el uso de alquilaminoestranos permite obtener 2-hidroxialquilamidas a partir de las lactonas respectivas y el aminoestrano apropiado, pero el proceso se realiza en dos pasos y los rendimientos son moderados. De forma similar, se ha descrito el uso de tricloruro de aluminio para promover la amidación, y aunque los rendimientos son de moderados a buenos, el método no es aplicable a 2-hidroxiésteres, para obtener las 2-hidroxiamidas correspondientes.<sup>165-170</sup>

Como ya se ha descrito en los Antecedentes, en los últimos años se ha venido estudiando la reacción de aminólisis enantioselectiva de ésteres racémicos con amins, utilizando diferentes hidrolasas (lipasas como: CAL, PsL, CCL ó proteasas como la quimiotripsina, la tripsina, papaína, subtilisina, entre otras), pero existen muy pocos reportes acerca de la aminólisis enantioselectiva de hidroxiésteres (sólo para 3-hidroxiésteres, y sólo un estudio parcial aparecido durante el desarrollo de este trabajo, respecto a la misma reacción con 2-hidroxiésteres).<sup>101,102, 104, 116</sup>

Adicionalmente a lo anterior, y en virtud de que los productos y sus derivados, así como los productos de la reducción química, es decir los 2-amino alcoholes, son importantes bloques constructores ó productos bioactivos interesantes,<sup>171-172</sup> que están presentes en numerosos productos naturales y son útiles precursores de heterociclos como aziridinas, oxazoles y derivados,<sup>173</sup> es de máximo interés abordar la ruta *enzimática* equivalente, para la síntesis de 2-hidroxiamidas, para la cual no se tienen muchas alternativas excepto los pocos trabajos encontrados a la fecha.

## ***V. HIPÓTESIS***



La especificidad de algunas hidrolasas puede ampliarse a sustratos no naturales para las mismas, a 2-hidroxiésteres y 2-cetoésteres no reportados al presente en la literatura especializada, para la reacción biocatalizada de aminólisis en disolventes orgánicos. Así, las hidrolasas seleccionadas pueden exhibir un buen grado de control estereoquímico en los sustratos, de enantioselectividad y regioselectividad en los 2-hidroxiésteres y quimioselectividad en los 2-cetoésteres, por la influencia del grupo funcional en la posición 2.

## ***VI. OBJETIVOS***

## OBJETIVO GENERAL

Ampliar la utilidad de las enzimas del tipo de las hidrolasas (lipasas y proteinasas), para la síntesis de un rango de 2-hidroxiamidas y 2-cetoamidas, mediante el estudio de los requerimientos estructurales de los sustratos (ésteres y aminas), de una variedad de enzimas.

## OBJETIVOS PARTICULARES

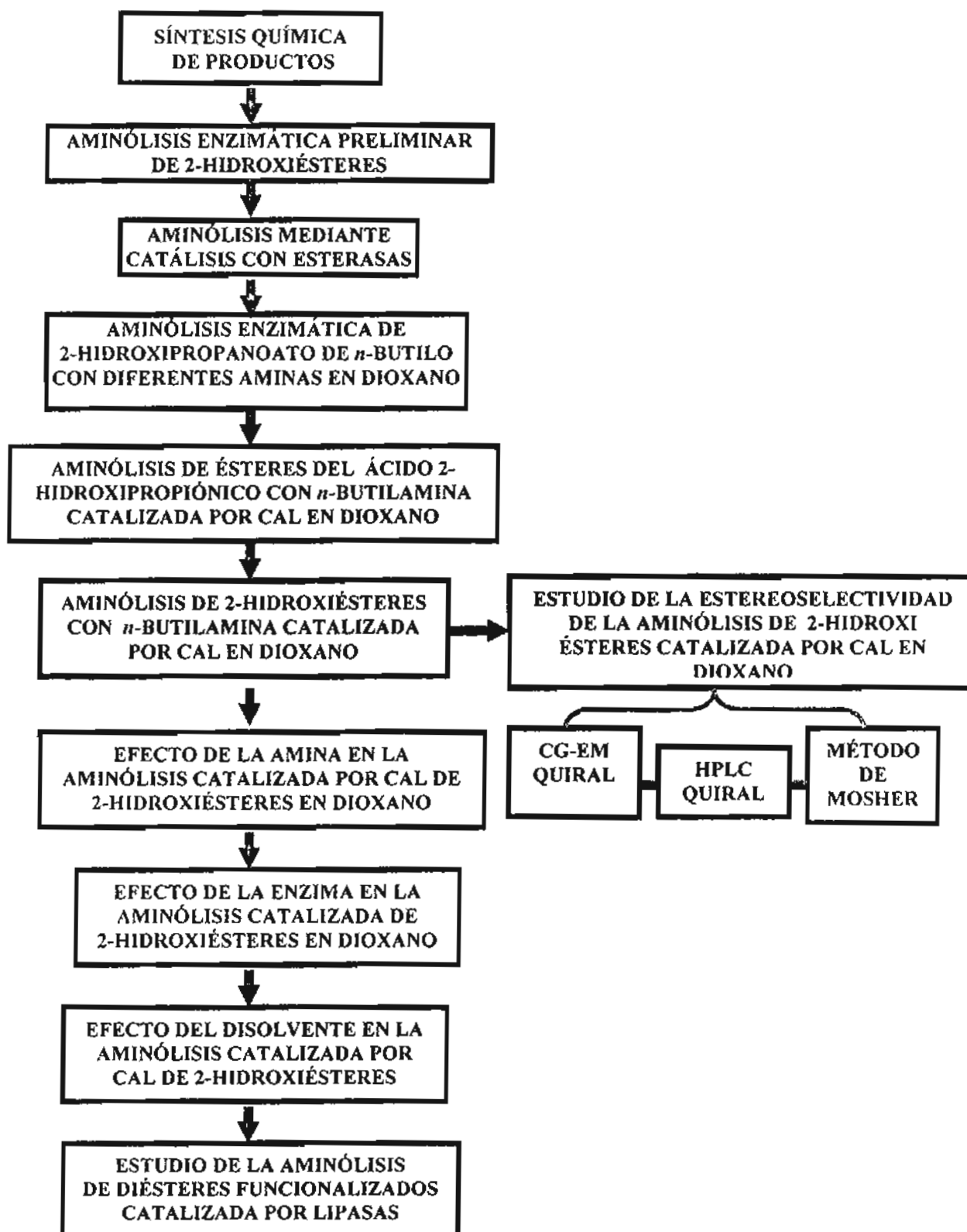
1. Efectuar la síntesis química de los productos involucrados: 2-cetoésteres, 2-cetoamidas, 2-hidroésteres y 2-hidroxiamidas.
2. Probar la síntesis enzimática para los productos del punto anterior, utilizando las materias primas correspondientes (2-hidroxiácidos, 2-hidroxiésteres y 2-cetoésteres y aminas), y varias enzimas del tipo de las hidrolasas: (lipasas, proteinasas y esterasas), en disolventes orgánicos anhidros.
3. Analizar el efecto de la estructura de los sustratos, considerando el rendimiento químico, el exceso enantiomérico ó valor E, la quimio- y estereoselectividad de la aminólisis ó amonólisis.
4. Optimizar las condiciones de la biocatálisis para los sustratos y enzimas que produzcan los mejores resultados en el disolvente más adecuado y probar la metodología en la síntesis de un producto de interés biológico. Este último objetivo será opcional, dependiendo de los resultados obtenidos.

## ***VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS***

## 1.- PROTOCOLO GENERAL PARA LA OBTENCION DE SUSTRATOS Y PRODUCTOS MEDIANTE SINTESIS QUIMICA, O CON EL USO DE ENZIMAS:

De acuerdo con los antecedentes descritos, hasta el año de 1996 cuando se planteó el desarrollo de este trabajo, no había reportes de la aminólisis enzimática de 2-hidroxiésteres. Sin embargo, durante el transcurso del presente trabajo, en 1997 apareció un reporte,<sup>104</sup> de la aminólisis de dos de los 2-hidroxiésteres propuestos en el presente trabajo (el ácido láctico y el ácido mandélico), aún así nos pareció apropiado seleccionar a los mismos 2-hidroxiésteres y otros no probados hasta esa fecha. No obstante lo poco que se ha hecho con estos sustratos, existen reportes de otros métodos de resolución enzimática de 2-hidroxiésteres.<sup>174-179</sup>

La estrategia experimental general realizada se ilustra en el Esquema VII.1. Asimismo, la metodología general, esquematizada en la Figura VII.1, se llevó a cabo para la aminólisis tanto química como enzimática de los 2-hidroxiésteres con aminas, de acuerdo con la siguiente secuencia experimental: reacción química y/o enzimática de los sustratos en el disolvente orgánico, el seguimiento de la reacción mediante técnicas cromatográficas (CCF, CG-EM), purificación mediante las técnicas cromatográficas comunes (CC, CCF preparativa), recristalización ó destilación, así como la caracterización de productos de partida, productos intermediarios y finales, mediante los métodos instrumentales clásicos (IR, RMN-<sup>1</sup>H, EM); así como la determinación de la pureza óptica, *e.e.*, y el rendimiento químico ó % de conversión de la reacción.



ESQUEMA VII. 1. Estrategia experimental

## Metodología general

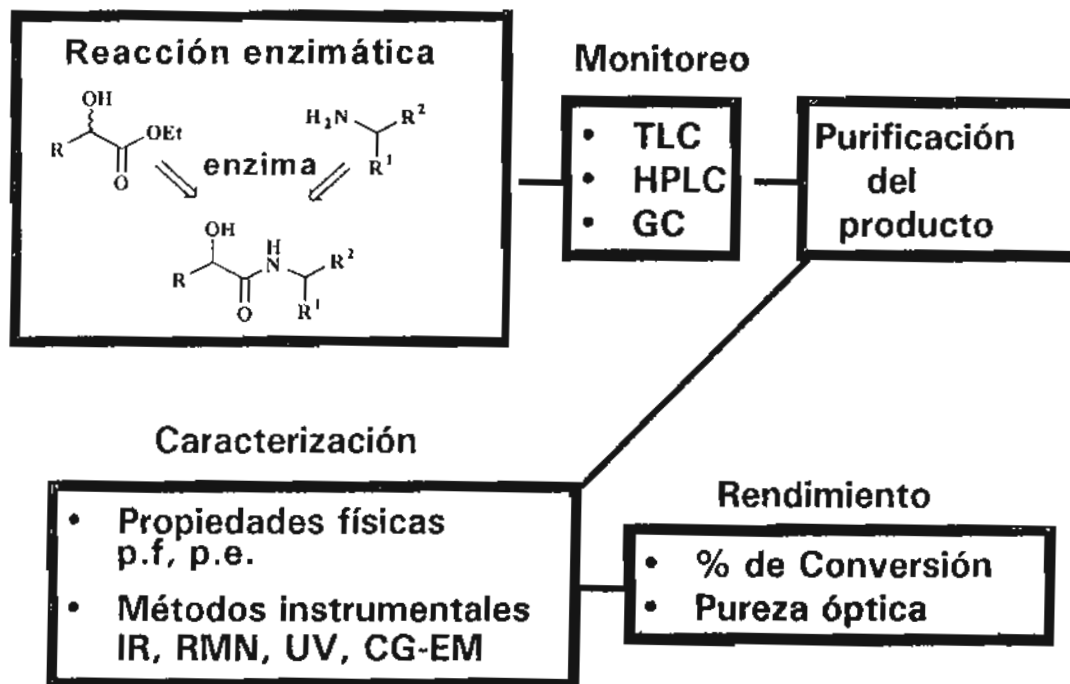


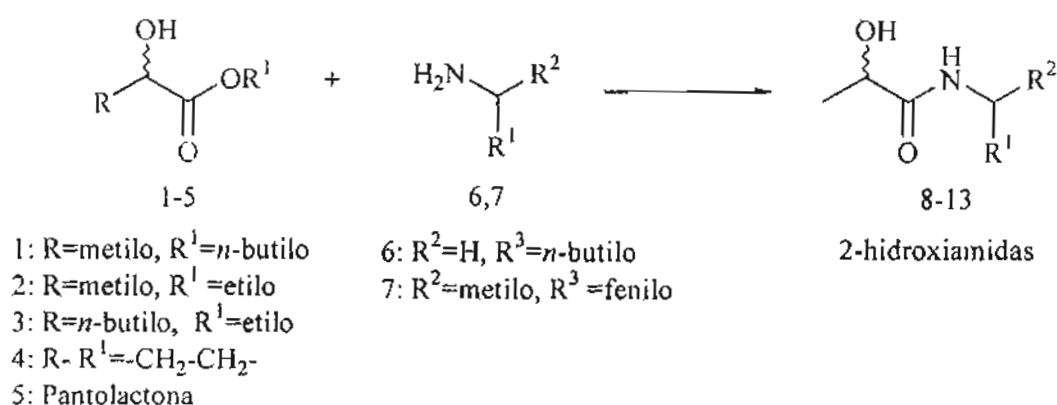
FIGURA VII.1.

## 2. AMINÓLISIS QUÍMICA: PREPARACIÓN DE SUSTRATOS Y PRODUCTOS (NO ASEQUIBLES) MEDIANTE SÍNTESIS QUÍMICA

En este punto se discute la preparación química de algunos de los productos propuestos en los objetivos del trabajo, requeridos para la validación estructural de los productos objetivo de las reacciones enzimáticas: 2-hidroxiésteres y 2-hidroxiamidas.

Dos de los 2-hidroxiésteres: 2-hidroxi octanoato de etilo (36) y 2-hidroxiisovalerato de etilo (37), se prepararon mediante la técnica de activación del ácido carboxílico con DCC y condensación con etanol absoluto, debido a que el método es más eficiente que la técnica de Fisher tradicional y se disponía de los mismos en poca cantidad. Los rendimientos en cada uno de los 2-hidroxiésteres mencionados fueron del 90% en el producto puro.<sup>180-182</sup>

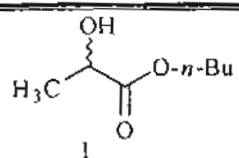
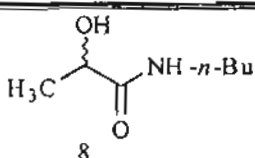
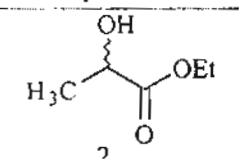
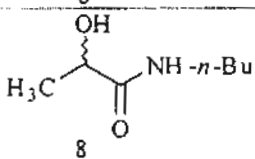
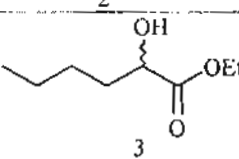
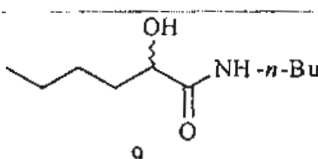
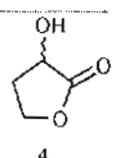
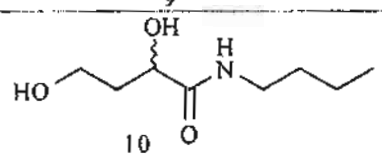
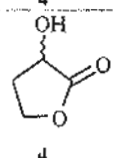
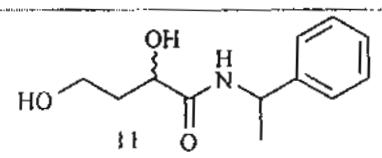
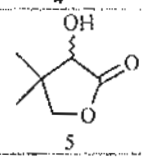
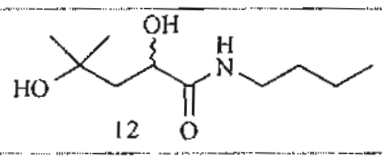
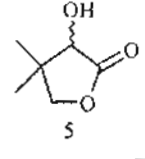
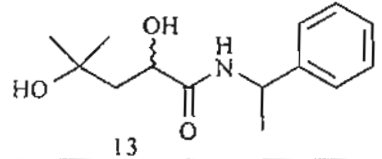
En cuanto a las 2-hidroxiamidas (8-13), se prepararon de acuerdo con el Esquema de reacción general VII.2, (Tabla VII.1), mediante la reacción de aminólisis química llevada a cabo por calentamiento a reflujo de los 2-hidroxiésteres correspondientes: lactato de *n*-butilo (1), lactato de etilo (2) y 2-hidroxiproato de etilo (3), con *n*-butilamina (6); y bajo las mismas condiciones, la aminólisis de las lactonas, 2-hidroxi- $\gamma$ -butirolactona (4) y 3,3-dimetil-2-hidroxi- $\gamma$ -butirolactona (5), con *n*-butilamina y con ( $\pm$ )- $\alpha$ -metilbencilamina (7). Las reacciones de lactato de *n*-butilo y las 2-hidroxi lactonas con *n*-butilamina, son aparentemente muy rápidas y con la formación de un solo producto (por CCF) en el primer caso, pero más de uno con las lactonas, y los rendimientos químicos fueron de moderados a buenos, según se aprecia en la Tabla VII.1. En ambos casos, 2-hidroxiésteres y 2-hidroxi lactonas, el grupo hidroxilo electroatrayente, en la posición 2, incrementa el carácter electrofílico del grupo carbonilo, lo cual permite reacciones más rápidas respecto a ésteres y lactonas no sustituidas con dicho grupo en la posición 2.<sup>171</sup> En el caso de las 2-hidroxi lactonas, no se requirió la activación que generalmente se requiere para la aminólisis de ésteres y lactonas sin sustituir (y que debe ser promovida por bases como 2-hidroxipiridina, 4-dimetilaminopiridina, o por ácidos como tricloruro de aluminio).<sup>170</sup> Las estructuras químicas de los sustratos y de los productos obtenidos de la aminólisis química, así como el tiempo de reacción y los rendimientos químicos de los productos aislados se reportan en la Tabla VII.1.



**ESQUEMA VII. 2. Reacción general de aminólisis química para la obtención de 2-hidroxiamidas**



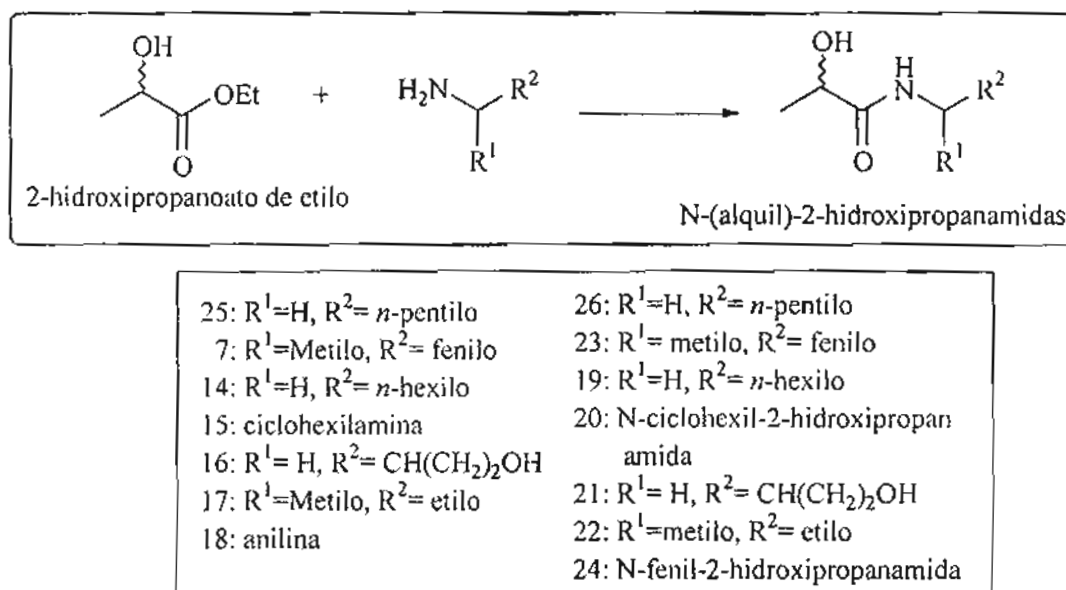
Tabla VII. 1. Resultados experimentales de las reacciones químicas de aminólisis

2-hidroxiéster	Producto <sup>4</sup>	Tiempo de reacción (h) <sup>3</sup>	Rendimiento (%)
		24 <sup>1</sup>	58.0
		24 <sup>1</sup>	45.0
		4 <sup>1</sup>	91.0
		4 <sup>1</sup>	61.0
		5 <sup>2</sup>	52.0
		5 <sup>2</sup>	98.0
		19 <sup>2</sup>	31.0

1= Reacción con *n*-butilamina. 2= reacción con  $\alpha$ -metilbencilamina. 3. En todos los casos se siguió la reacción mediante CCF, usando mezclas de hexano-acetato de etilo como eluyente. Al término de la reacción, la mezcla se concentró en evaporador rotatorio y el residuo se purificó por CC. 4. El producto, se caracterizó mediante espectroscopía.

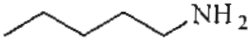
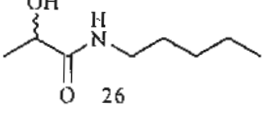
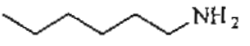
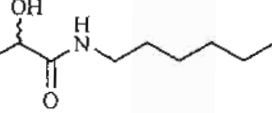
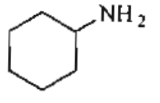
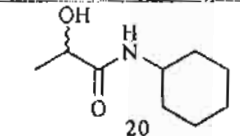
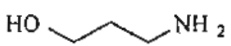
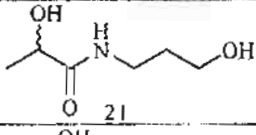
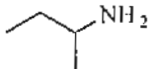
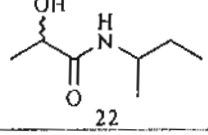
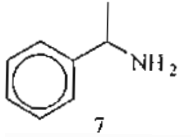
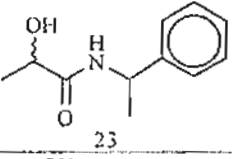
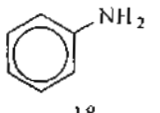
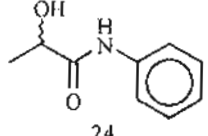
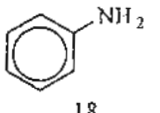
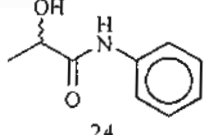
Similarmente, se procedió a realizar la aminólisis de lactato de etilo (2-hidroxipropanoato de etilo) (2), el 2-hidroxiéster más simple, con diversas aminas (6, 7, 14,

15, 16, 17, 18, 25, Esquema VII.3). De acuerdo con los resultados de la Tabla VII.2, se observa que las reacciones proceden rápidamente con las aminas alifáticas: *n*-amilamina (25), *n*-hexilamina (14), y con rendimientos de moderados a buenos, de manera similar a los resultados obtenidos previamente con *n*-butilamina. Sin embargo, en la reacción con la anilina (18), no tiene efecto el utilizar o no el disolvente, ó incluso el uso de atmósfera de nitrógeno, puesto que en todos los casos la reacción es lenta y produce la anilida en bajos rendimientos, lo cual es esperado por la notable menor nucleofilia de dicha amina. Con el 3-amino-1-propanol (16), la reacción fue rápida y eficiente, pero con las aminas ramificadas: ciclohexilamina (15), *sec*-butilamina (17) y  $\alpha$ -metilbencilamina (7), la reacción es más lenta que con las aminas alifáticas lineales y los rendimientos son más bajos, lo cual es atribuido a que las aminas están más impedidas estéricamente para la reacción de acilación.



**ESQUEMA VII. 3. Reacción general de aminólisis química de 2-hidroxipropanoato de etilo (2) con aminas**

Tabla VII. 2. Resultados de las reacciones químicas de 2-hidroxiopropanoato de etilo (2) y aminas

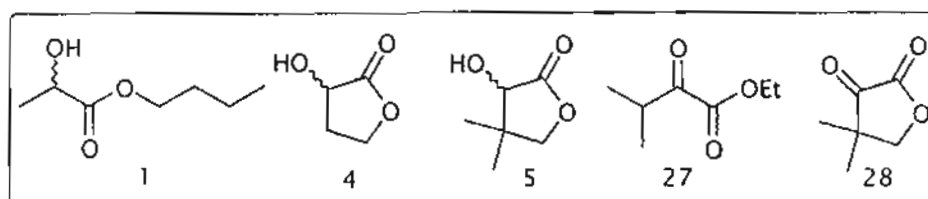
Amina	Producto	Tiempo de reacción (h)	Rendimiento (%)
 25	 26	22	65.0
 14	 19	22	83.0
 15	 20	22	72.0
 16	 21	22	89.0
 17	 22	68	77.0
 7	 23	68	60.0
 18	 24	22 <sup>1</sup>	11.0
 18	 24	50 <sup>2</sup>	5.0

Todas la reacciones se efectuaron en condiciones de reflujo. 1. Con disolvente, 2. Sin disolvente.

Una vez obtenidos algunos productos, como referencia para las reacciones enzimáticas, se procedió a efectuar un ensayo preliminar de la aminólisis enzimática de los 2-hidroxiésteres y 2-hidroxilactonas seleccionados.

### 3. AMINÓLISIS ENZIMÁTICA PRELIMINAR

De acuerdo con los objetivos, y a través de la estrategia experimental indicada en el esquema VII.1, se iniciaron los experimentos preliminares de aminólisis enzimática con los sustratos disponibles. Para ello se utilizaron los siguientes sustratos: lactato de *n*-butilo (1), 2-hidroxi- $\gamma$ -butirolactona (4), pantolactona (5), 3-metil-2-oxobutirato de etilo (27) y ceto-pantolactona (28) (Esquema VII.4), utilizándose a la *n*-butilamina (6) como nucleófilo.



**ESQUEMA VII. 4. 2-Hidroxiésteres y 2-cetoésteres considerados para la aminólisis enzimática preliminar**

Para la elección de la enzima y los detalles del procedimiento experimental, se tuvo en cuenta las analogías descritas en la literatura hasta ese momento. Básicamente los trabajos de Gotor y colaboradores, cuyo grupo de investigación ya había llevado a cabo, desde 1988 hasta fines de 1996, diversas reacciones de amonólisis y de aminólisis con sustratos similares. De acuerdo con estos reportes, la lipasa CAL es la enzima hidrolítica que mejores propiedades catalíticas ha presentado, y con una amplia especificidad de sustrato tanto para donadores de acilo (ésteres y otros derivados de ácido), como para sustratos nucleofílicos nitrogenados (amoníaco, aminas y derivados). Asimismo, se utilizó la proteinasa papaína, para este mismo propósito. Por otro lado, la elección del disolvente de reacción está basada en los mejores resultados obtenidos de acuerdo con esas mismas analogías. De esta manera, se decidió

utilizar al 1,4-dioxano. En esta aminólisis preliminar siguiendo el procedimiento descrito para cada ensayo de la aminólisis enzimática, los resultados indican que sólo el 2-hidroxiopropanoato de *n*-butilo (1) es sustrato para CAL. Cabe mencionar que en ese momento el seguimiento se hizo mediante CCF exclusivamente. Las principales observaciones derivadas de estos experimentos son las siguientes: En la **aminólisis enzimática de 2-hidroxiopropanoato de *n*-butilo (1)**, se obtiene el producto esperado desde la primera hora, en la que la amida ya se había detectado, lo cual no se observó con papaína. En la reacción química del testigo, la aparición del mismo producto se observa a partir de las 92 h, y continúa hasta las 240 h sin que la cantidad de producto llegue a ser importante. El producto (8), del proceso enzimático se identificó y caracterizó mediante espectroscopía. En la **aminólisis enzimática de 2-hidroxi- $\gamma$ -butirolactona (4)**, se observa la transformación química de la materia prima desde el inicio del seguimiento hasta las 240 horas. Tanto en la reacción química como en la enzimática, se detectó un producto diferente del obtenido por síntesis química  $R_f = 0.96$  (AcOEt-EtOH, 9:1). Sin embargo, por la aparición de otros compuestos no se trabajó más la reacción. En la **aminólisis enzimática de 3,3-dimetil-2-hidroxi- $\gamma$ -butirolactona (5)**, a diferencia de la 2-hidroxi- $\gamma$ -butirolactona, ocurre una reacción de aminólisis mas lenta en las reacciones enzimática y del testigo. En este caso, se observó la formación lenta y gradual de productos más polares cuya separación y purificación no se intentó. Por su parte, la **aminólisis enzimática de 3-metil-2-oxobutirato de etilo (27)**, mostró la formación de una mezcla de productos por lo que no se trabajó más la reacción. Finalmente, la **aminólisis enzimática de 3,3-dimetil-2-oxo- $\gamma$ -butirolactona (28)**, similarmente al caso anterior, mostró la formación de una mezcla de productos.

Resumiendo los resultados de estos experimentos preliminares, sólo se pudo observar el producto esperado de la aminólisis enzimática de 2-hidroxiopropanoato de *n*-butilo con CAL, pero no se observa con papaína. La reacción química a temperatura ambiente es significativa después de 92 h. La estructura de la N-(*n*-butil)-2-hidroxiopropanamida producida (8), se confirmó por espectroscopías de IR, RMN- $^1\text{H}$  (Figura VII.2), y posteriormente por espectrometría de masas. En la Figura VII.2 se aprecia una señal triple en 0.92 ppm

correspondiente al  $-\text{CH}_3$  terminal del butilo; a 1.4 ppm una señal doble correspondiente al  $-\text{CH}_3$  del lactato, acoplado al protón base del alcohol. En 1.3-1.6 ppm, una señal múltiple, que integra para 4 hidrógenos correspondientes a los dos  $-\text{CH}_2$  del radical butilo. En 3.25 ppm una señal triple-dobleteada superpuesta que integra para 2 hidrógenos del  $-\text{CH}_2$  base del nitrógeno, acoplado al otro  $-\text{CH}_2$  y al protón  $-\text{NH}$  amídico. En 4.2 ppm una señal cuadruple para el hidrógeno enlazado al carbono base del  $-\text{OH}$  acoplado con el  $-\text{CH}_3$  del lactato. En 4.4 ppm se observa al hidrógeno del grupo  $-\text{OH}$  como una señal simple ancha, confirmado por su desaparición por intercambio con  $\text{D}_2\text{O}$ . Finalmente, en 6.9 se presenta el protón del grupo  $-\text{NH}$ , como una señal simple ancha, que no intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , lo cual es típico de grupos  $\text{NH}$  amídicos. De esta manera se corrobora la estructura de la amida (8). Una ampliación de 4 regiones del espectro de  $\text{RMN-}^1\text{H}$ , se indican en la Figura VII.3.

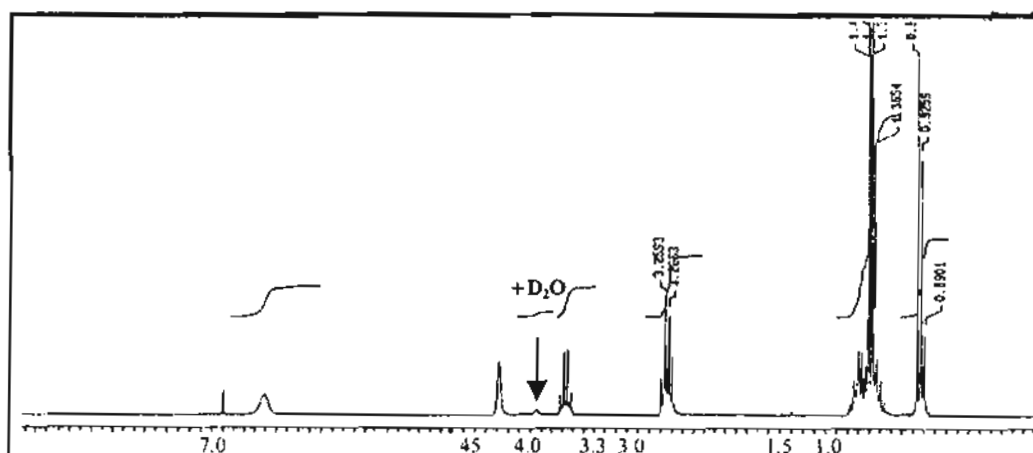
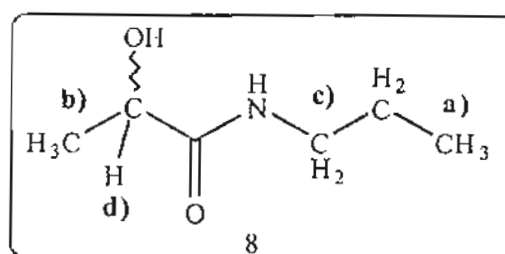


Figura VII. 2.  $\text{RMN-}^1\text{H}$ . Espectro de  $\text{RMN-}^1\text{H}$  de  $N$ -( $n$ -butil)-2-hidroxiopropanamida (8)



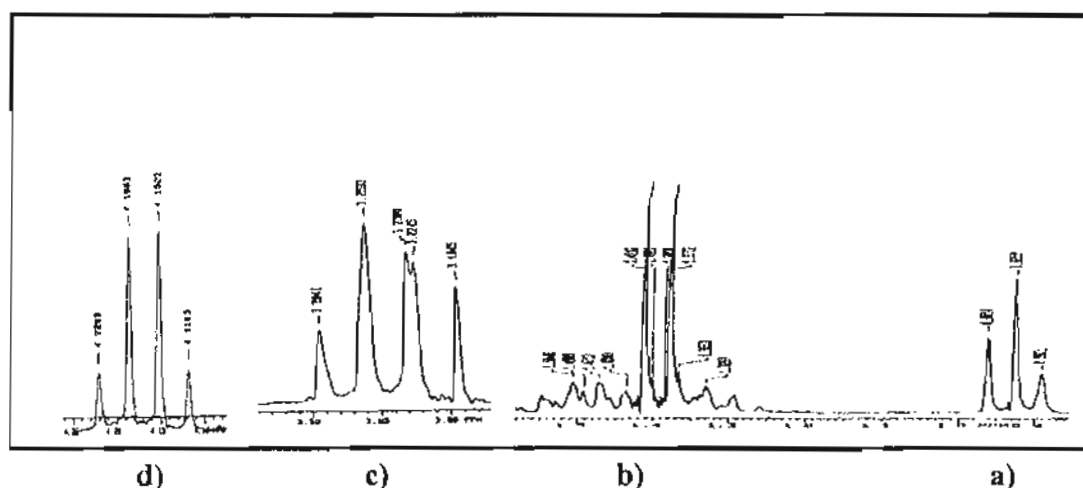
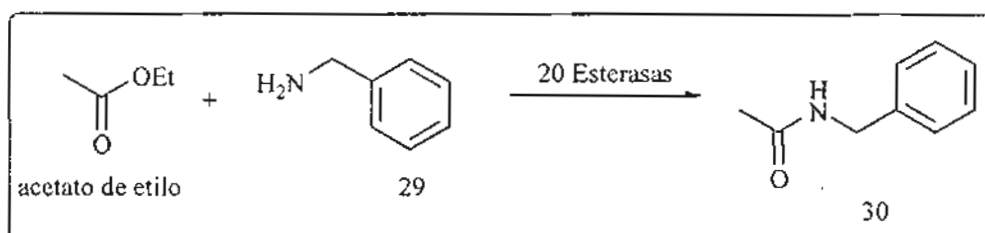


Figura VII. 3. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H amplificado de N-(*n*-butil)-2-hidroxiopropanamida (8)

#### 4.- AMINÓLISIS MEDIANTE CATÁLISIS CON ESTERASAS

En otro orden de ideas, bajo la dirección del profesor Gotor de la Universidad de Oviedo, se realizó en sus laboratorios la reacción de aminólisis de ésteres con esterasas, que no había sido descrita hasta ese momento. Por ello, se intentó la aminólisis de AcOEt como agente acilante y como disolvente, y bencilamina como el sustrato nucleofílico. Como catalizador, se usaron 20 enzimas esterolíticas (no especificadas comercialmente) de reciente introducción en el mercado por la compañía *Thermogen* (Esquema VII.5).



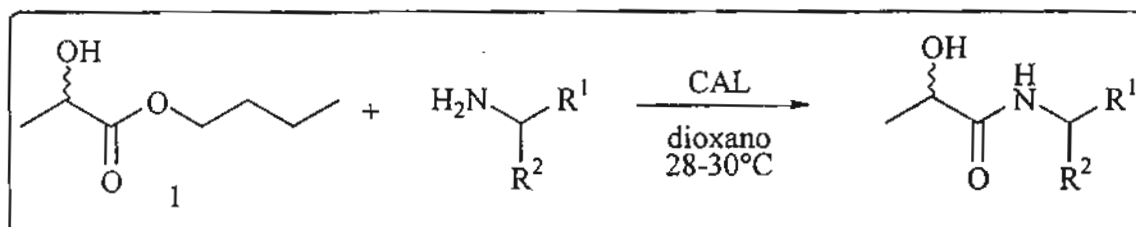
ESQUEMA VII. 5. Intento de la aminólisis de acetato de etilo utilizando esterasas

Se probaron las enzimas distintas a diferentes temperaturas: 20°, 30°, 40°C, siguiendo la posible reacción enzimática a los 30 y 60 min, 2, 4, 8, 16, 24, 48 h, 3, 4, 5, 6, y 7 días. Al comparar con el testigo, reacción química, se observó la formación de la amida (30), pero no se notó progreso en ninguna de las reacciones enzimáticas, durante el intervalo de tiempo considerado.

Por otro lado, nuevamente con respecto a las lipasas, una vez conocidas las condiciones de reacción adecuadas de los experimentos preliminares, se procedió a la generalización del proceso enzimático, extendiendo la reacción a otros 2-hidroxiésteres y aminas. El transcurso de la reacción fue controlado por CCF. En todos los casos ensayados, el producto mayoritario fue el correspondiente a la reacción de monoaminólisis selectiva. Los resultados obtenidos se discuten a continuación.

### 5. AMINÓLISIS ENZIMÁTICA DE 2-HIDROXIPROPANOATO DE *n*-BUTILO CON DIFERENTES AMINAS EN DIOXANO

En este apartado se considera el efecto de la estructura del sustrato nucleofílico, es decir de las diferentes aminas sobre la especificidad de la enzima seleccionada, y utilizando como sustrato acilante, al lactato de *n*-butilo (1) (que exhibió los mejores resultados preliminares de la reacción de aminólisis) y CAL como biocatalizador (Esquema VII.6, Tabla VII.3). Se observó que esta enzima acepta un amplio rango de aminas, incluyendo lineales, ramificadas, aromáticas y aminoalcoholes.



ESQUEMA VII.6. Aminólisis enzimática de 2-hidroxiopropanoato de *n*-butilo con diferentes aminas



**Tabla VII.3. Aminólisis de 2-hidroxiopropanoato de *n*-butilo y aminas catalizada por CAL en dioxano**

Amina	Producto	Signo de la rotación Óptica	Conversión por CG (%)	Rendimiento (%)
<i>n</i> -butilamina (6)	N-( <i>n</i> -butil)-2-hidroxiopropan amida (8)	+	64.0	58.0
<i>n</i> -amilamina (25)	N-( <i>n</i> -pentil)-2-hidroxiopropan amida (26)	+	84.0	66.3
<i>n</i> -hexilamina (14)	N-( <i>n</i> -hexil)-2-hidroxiopropan amida (19)	+	85.0	63.2
3-amino propanol (16)	N-(3-hidroxi propil)-2-hidroxi propanamida (21)	+	49.0	49.0
Ciclo hexilamina (15)	N-(ciclohexil)-2-hidroxiopropan amida (20)	+	N. D.	18.8
Anilina (18)	N-(fenil)-2-hidroxi propanamida (24)	+	N. D.	8.0
2-aminoetanol (28)	N-(2-hidroxi etil)-2-hidroxiopropan amida (31)	+	N. D.	23.0
$\alpha$ -metilbencil amina (7)	N-(1-feniletíl)-2-hidroxiopropan amida (23)	+	N. D.	17.2
<i>Sec</i> -butil Amina (17)	N-( <i>sec</i> -butil)-2-hidroxiopropan amida (22)	+	N. D.	17.4

1. Tiempo de reacción 6h, excepto para los sustratos (18) (259 h), y (28) (5 h). 2. N. D.= No determinado.

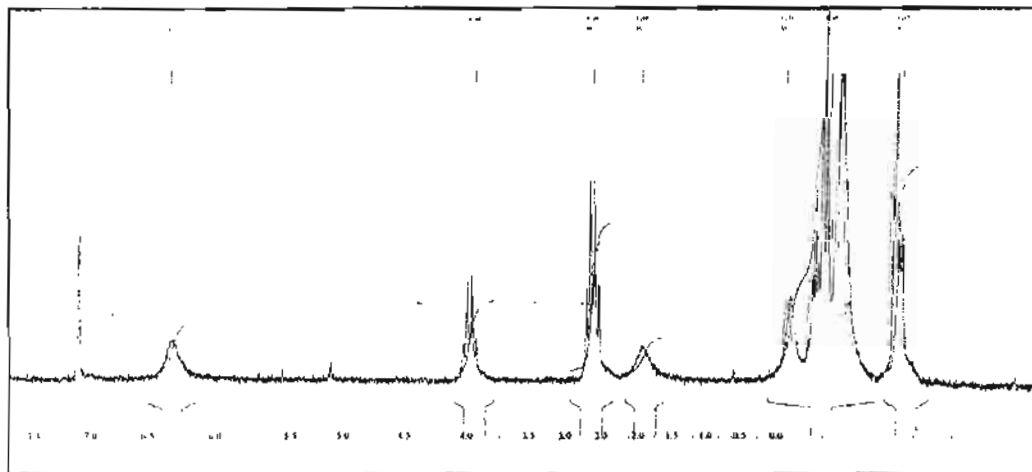
Las reacciones enzimáticas, proceden rápidamente en el caso de *n*-amil (25) y *n*-hexilamina (14), como se observa para *n*-butilamina en el apartado anterior, pero menos rápidamente con ciclohexilamina (15), lo cual es de esperarse por razones de tipo estérico en esta última.

Con los aminoalcoholes, también la aminólisis enzimática es más lenta, como puede apreciarse para los sustratos (16) y (28). En este caso explicable por razones de tipo electrónico, de acuerdo con la naturaleza electroatrayente del grupo hidroxilo que disminuye la basicidad y por lo tanto, la nucleofilia del grupo amino. Asimismo, se observó la quimioselectividad esperada en estos compuestos; es decir, el producto de la aminólisis (el proceso “preferido” por la CAL) y no el de la transesterificación, ya observada y reportada previamente por Gotor *et.al.*<sup>106-109</sup>

La CAL cataliza la acilación del grupo amino pero no se descarta la reacción competitiva de transesterificación del grupo hidroxilo primario del aminoalcohol. No obstante, cabe decir que no se detectó el hidroxiéster producto de la transesterificación mediante CG (posteriormente corroborado por CG-EM, pág. 115), durante el intervalo de tiempo del análisis (aunque no se realizó un análisis antes de 30 minutos). En el caso de la amina aromática utilizada, la anilina (18), cabía esperar una reacción más lenta respecto de todas las reacciones comentadas anteriormente, y efectivamente el rendimiento fue muy bajo, del 8% de la anilida correspondiente. Con las aminas ciclohexilamina (15) y *sec*butilamina (17), ambas ramificadas, las reacciones y en consecuencia los rendimientos, son ostensiblemente más bajos como es de esperar, debido a impedimento estérico alrededor del grupo amino reactivo en las mismas.

Sin embargo, se puede concluir que las reacciones enzimáticas, proceden apreciablemente en 5-6 h en todos los casos, tiempo en el cual se observa un balance adecuado de conversión/tiempo, debido a que en monitoreos de hasta 24 horas la conversión no varía más del 2 al 3 % en la mayoría de los mismos. En este experimento, se recuperó el sustrato sin reaccionar, con la finalidad de determinar su rotación óptica y la posible estereoselectividad del proceso. Aunque baja, se observó actividad óptica dextrógira en los productos, y levógira en dos de los reactantes recuperados. Por otro lado, las reacciones químicas del “testigo” no enzimáticas, son muy lentas en todos los casos, en comparación a las enzimáticas, y empieza a apreciarse la formación de los productos con las aminas correspondientes, hasta después de 4 días.

Los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de la Figura VII.4, corresponden a dos hidroxiamidas típicas: N-(*n*-hexil)-2-hidroxiopropanamida (19) (a) y N-(*sec*-butil)-2-hidroxiopropanamida (22) (b) respectivamente. En éstos espectros el número de señales, desplazamiento químico, así como la multiplicidad de las señales, se explica claramente en virtud de la estructura simple de los productos, y por comparación con las señales explicadas para el espectro de la *n*-butil-hidroxiopropanamida (Figura VII.2). Particularmente se aprecia a 1.4 ppm la señal doble correspondiente al -CH<sub>3</sub> del lactato, acoplado al protón base del alcohol. En 2.6 ppm para (19) y 3.8 ppm para (22) se observa una señal triple-dobleteada superpuesta que integra para 2 hidrógenos del -CH<sub>2</sub> base del nitrógeno, acoplado al otro -CH<sub>2</sub> y al protón -NH amídico. En 4.2 ppm una señal cuadruple para el hidrógeno enlazado al carbono base del -OH acoplado con el -CH<sub>3</sub> del lactato. En 4.0 y 4.4 ppm respectivamente, se observa al hidrógeno del grupo -OH como una señal simple ancha, confirmado por su desaparición por intercambio con D<sub>2</sub>O. Asimismo en 6.3 y 5 ppm, aparece la señal del protón del grupo -NH, como una señal simple ancha, que no intercambia con D<sub>2</sub>O, lo cual es típico de grupos NH amídicos.



a)

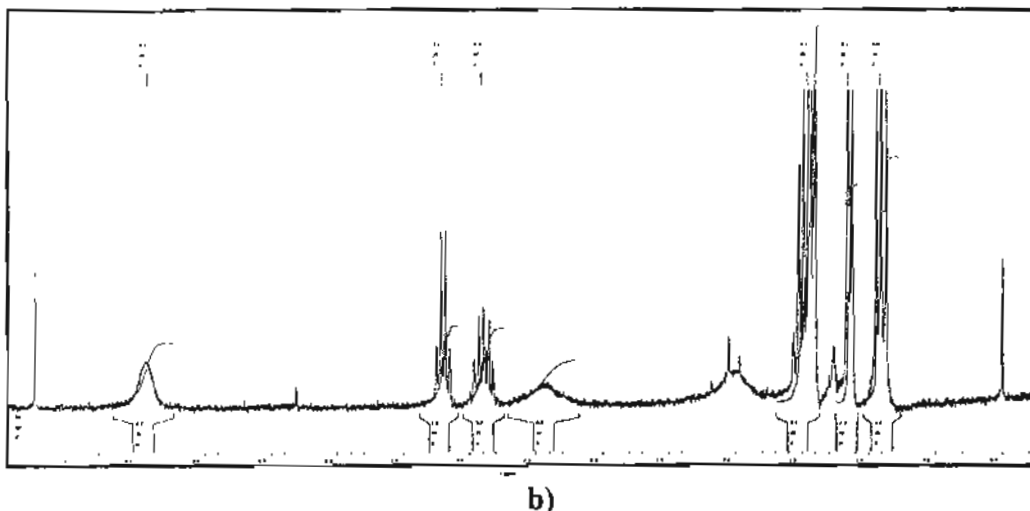
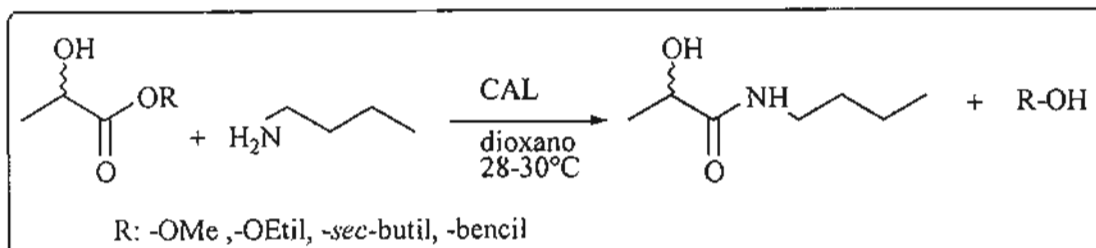


Figura VII.4. Espectros de RMN-<sup>1</sup>H a) N-(*n*-hexil)lactamida b) N-(*sec*-butil)lactamida

#### 6. AMINÓLISIS DE ÉSTERES DEL ÁCIDO 2-HIDROXIPROPIÓNICO CON *n*-BUTILAMINA CATALIZADA POR CAL EN DIOXANO

Posteriormente, realizamos la aminólisis de varios lactatos (ésteres del ácido 2-hidroxiopropanoico) variando la porción de alcoxilo (Esquema VII.7). Se incluyeron varios lactatos estereoisoméricos, variando la configuración del centro quiral de la porción acilo, para observar el efecto de estas características estructurales y estereoquímicas sobre la actividad y especificidad catalítica de CAL. Como se puede observar en la Tabla VII.4, los resultados indican que la reacción biocatalizada fue rápida en todos los casos (conversiones mayores al 80%, en 6 h), independientemente del grupo alcoxilo (R: -OMe, -OEt, -O-*isobutil*, -O-*bencil*), y de la configuración absoluta del 2-hidroxiéster.

A la vista de los resultados obtenidos en la Tabla VII.4, no se observa una influencia apreciable de la porción alcoxilo en la estructura del éster sobre la actividad catalítica de la enzima, ya que en la mayoría de los casos los rendimientos obtenidos son aproximadamente del mismo orden. Lo mismo puede concluirse con respecto a la estereoquímica del centro quiral de la porción de acilo, indicando una reacción no estereoselectiva para cada uno de los ésteres del ácido láctico probados.



ESQUEMA VII.7. Aminólisis de ésteres del ácido 2-hidroxiopropanoico con *n*-butilamina catalizada por CAL

Tabla VII.4. Aminólisis de ésteres del ácido láctico en la reacción catalizada por CAL con *n*-butilamina en dioxano

2-hidroxiéster	(Configuración) (alcoxilo)	%C <sup>1</sup>
	(32): ( <i>R</i> )-metilo	88.0
	(2): ( <i>S</i> )-etilo	87.0
	(2): ( <i>R,S</i> )-etilo	86.0
	(33): ( <i>R,S</i> )- <i>sec</i> butilo	87.0
	(1): ( <i>S</i> )- <i>n</i> -butilo	70.0
	(34): ( <i>S</i> )-bencilo	80.0

1. Valores promedio de experimentos efectuados por duplicado durante 6 h, en dioxano a 30° C.

## 7.- AMINÓLISIS DE 2-HIDROXIÉSTERES CON *n*-BUTILAMINA CATALIZADA POR CAL EN DISOLVENTES ORGÁNICOS.

De acuerdo con los resultados obtenidos con lactato de *n*-butilo, para la aminólisis catalizada por CAL, que ya había mostrado buenos resultados en la aminólisis enzimática, y habiéndose probado la influencia y los requerimientos estructurales de la porción de alcoxilo y la no enantioselectividad en alguno de los enantiómeros del lactato, se procedió a probar la modificación de la porción de acilo, por lo que se utilizaron otros 2-hidroxiésteres, homólogos superiores de los ésteres del ácido láctico. Es un hecho bien conocido de que una lipasa en general tiende a incrementar la velocidad de la reacción que cataliza en sustratos homólogos, conforme aumenta la hidrofobicidad del sustrato.<sup>183</sup> De esta manera, se comparó la velocidad de la reacción enzimática del lactato de *n*-butilo (1), con un éster más corto, el lactato de etilo (2) y otro más largo, el 2-hidroxihexanoato de etilo (2-hidroxihexanoato de etilo) (3). Adicionalmente, se probó un éster cíclico estrechamente relacionado, la 2-hidroxi- $\gamma$ -butirolactona (4). Se utilizó *n*-butilamina como componente nucleofílico de la reacción, y se probaron dos disolventes, dioxano e isooctano, (de diferente hidrofobicidad ó Log P), para observar el efecto de esto sobre la velocidad de la reacción enzimática en estos sustratos. La temperatura de las reacciones de aminólisis fue la usual (28-30°C) y CAL como la enzima. Se usó una relación de 1:0.55 éster-amina a una concentración 1 mmol/mL, para cada disolvente. El seguimiento fue realizado por CCF, de manera cualitativa. Los resultados se discuten en los dos apartados siguientes:

### a) Estudio preliminar del efecto de la estructura del sustrato acilante y del disolvente en la velocidad de la aminólisis catalizada por CAL

Para este caso, se probó la reacción enzimática de los hidroxiésteres: 2-hidroxiopropanoato de etilo (2) y de *n*-butilo (1) y de 2-hidroxihexanoato de etilo (3). Para los dos primeros sustratos, la aminólisis enzimática procede con una velocidad inicial similar en isooctano y en dioxano (en 0.5 h), y aunque es ligeramente más lenta para el sustrato más largo, el 2-hidroxihexanoato de etilo de acuerdo con la apreciación sugestiva de la mancha en

la cromatoplaça, la reacción catalizada también se inicia a las 0.5 h. Por lo anterior puede concluirse que la reacción catalizada es rápida para los tres sustratos en ambos disolventes (Tabla VII.5). La reacción química en isooctano, procede con gran rapidez inicial en todos los sustratos; sin embargo, en dioxano no se observa por un espacio de tiempo menor de 3 días para los lactatos. Lo anterior es posiblemente debido a que el dioxano solvata a la amina y disminuye su nucleofilia en términos entrópicos, retardando la reacción química comparada con la que se observa en isooctano, en el cual no ocurre dicha solvatación. En el caso de la 2-hidroxi-butirilactona (4), desde los 30 minutos del seguimiento de la reacción se observaron dos manchas por CCF (la del producto de la apertura de la lactona  $R_f=0.34$ , la hidroxiamida polar, y la de la materia prima  $R_f=0.6$ , usando acetato de etilo como eluyente).

**Tabla VII.5. Monitoreo de la aminólisis mediante CCF**

Éster	Tiempo de inicio de la reacción <sup>1</sup> (h)			
	Química		Enzimática	
	Isooctano	Dioxano	Isooctano	Dioxano
2-hidroxi-propanoato de etilo (2)	2	92	0.5	0.5
2-hidroxi-propanoato de <i>n</i> -butilo (1)	2	92	0.5	0.5
2-hidroxi-hexanoato de etilo (3)	4	N.R.	0.5	0.5
2-hidroxi-butirilactona (4)	0.5	0.5	0.5	0.5

Nota: 1. Observable por cromatografía en capa fina.

De manera alternativa, se realizó el mismo proceso, con los sustratos (1), (2) y (3) y las mismas condiciones de reacción, sólo que tomando como base un tiempo de reacción de 6 h. En cuanto a la aminólisis enzimática en ambos disolventes se obtuvieron resultados similares, aunque el porcentaje de conversión (del producto obtenido determinado mediante CG) es

mayor para los sustratos (1) y (2) en dioxano (en el que son más solubles), que en isooctano. De otra manera, el sustrato (3) es menos soluble en dioxano que (1) y (2) y es posible que por ello muestre una menor conversión en ese disolvente que en isooctano, en el cual se disuelve más fácilmente. La reacción no catalizada nuevamente procedió más rápidamente en isooctano que en dioxano, como se muestra en la Tabla VII.6. El sustrato (4) ya no se utilizó en el siguiente ensayo, en virtud de la rapidez de la reacción del testigo.

**Tabla VII.6. Efecto del disolvente sobre la conversión en la aminólisis catalizada por CAL**

Éster	% Conversión <sup>1</sup>			
	No enzimática		Enzimática	
	Isooctano	Dioxano	Isooctano	Dioxano
2-hidroxiopropanoato de etilo (2)	10.0	N.R	45.6	64.0
2-hidroxiopropanoato de <i>n</i> -butilo (1)	9.5	N.R	45.0	64.0
2-hidroxihexanoato de etilo (3)	N.R	N.R	70.0	60.0

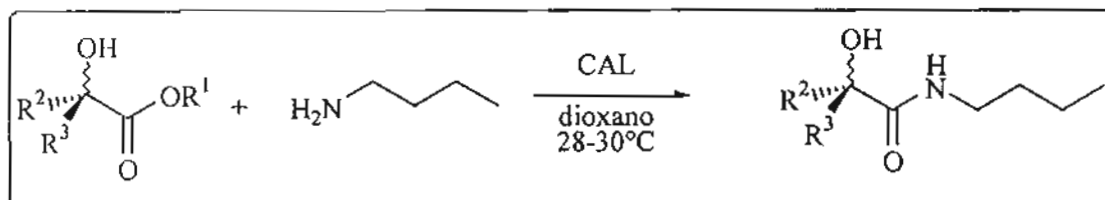
1. Determinado mediante CG. Reacciones realizadas a 28-30°C, en 6 h, N.R: no se observó reacción

#### b) La reacción general de aminólisis de 2-hidroxiésteres catalizada por CAL

Posteriormente probamos la generalidad de la aminólisis de 2-hidroxiésteres ampliando el rango posible de especificidad para CAL, y la posible enantioselectividad de esta enzima al modificar la porción de acilo, al utilizar un mayor número de sustratos (Esquema VII.8). Se seleccionaron 2-hidroxiésteres lineales además de los ya probados (lactato de butilo (1) y de etilo (2), 2-hidroxiacetato de etilo (35), 2-hidroxihexanoato de etilo (3), y 2-hidroxiacetato de etilo (36), ramificados como el 2-hidroxiisobutirato de etilo (37), y el 2-hidroxiisopentanoato de etilo (38), así como el sustrato aromático, mandelato de metilo (39), en las condiciones anteriormente mencionadas, es decir: CAL como biocatalizador, dioxano



como disolvente, a 28-30°C de temperatura, y el seguimiento fue realizado mediante CG-EM (Tabla VII.7).

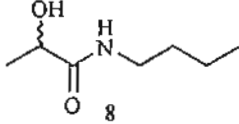
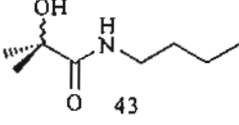
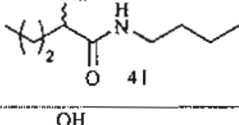
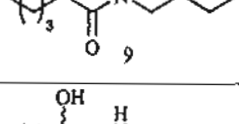
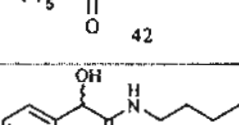
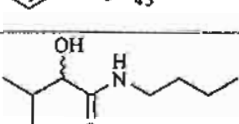
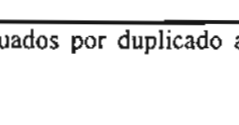


- |       |                                    |  |                    |
|-------|------------------------------------|--|--------------------|
| (1):  | R <sup>1</sup> = <i>n</i> -butilo, | R <sup>2</sup> = Metilo,                 | R <sup>3</sup> = H |
| (37): | R <sup>1</sup> = Etilo,            | R <sup>2</sup> = R <sup>3</sup> = Metilo |                    |
| (35): | R <sup>1</sup> = Etilo,            | R <sup>2</sup> = <i>n</i> -propilo,      | R <sup>3</sup> = H |
| (3):  | R <sup>1</sup> = Etilo,            | R <sup>2</sup> = <i>n</i> -butilo,       | R <sup>3</sup> = H |
| (36): | R <sup>1</sup> = Etilo,            | R <sup>2</sup> = <i>n</i> -hexilo,       | R <sup>3</sup> = H |
| (39): | R <sup>1</sup> = Metilo,           | R <sup>2</sup> = Fenilo,                 | R <sup>3</sup> = H |
| (38): | R <sup>1</sup> = Etilo,            | R <sup>2</sup> = <i>i</i> -propilo,      | R <sup>3</sup> = H |

#### ESQUEMA VII.8. Aminólisis de 2-hidroxiésteres catalizada por CAL en dioxano

De acuerdo con los resultados observados, la aminólisis de 2-hidroxiésteres es un proceso de tipo general catalizado por CAL, que ocurre en buen rendimiento con los sustratos alifáticos, pero no así con el sustrato aromático mandelato de metilo (38), para el cual el proceso fue más lento. Asimismo, se puede observar que la reacción es más lenta con los sustratos más largos, pero los sustratos ramificados, son igualmente reactivos a sus homólogos lineales. El sustrato aromático, es menos reactivo, y es posible que con éste pueda ocurrir el proceso con cierta enantioselectividad (ver página 135).

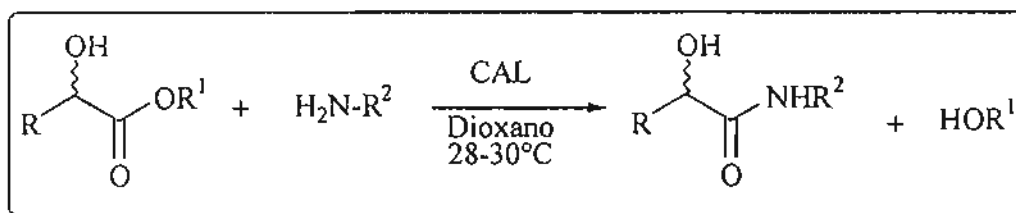
Tabla VII.7. Efecto del sustrato acilante en la aminólisis de 2-hidroxiésteres catalizada por CAL, con *n*-butilamina.<sup>1</sup>

Experimento	2-hidroxiéster	2-Hidroxiamida	Conversion(%)
1	(1): R <sup>1</sup> = <i>n</i> -bu, R <sup>2</sup> =Me, R <sup>3</sup> =H		81.0
2	(37): R <sup>1</sup> =Et, R <sup>2</sup> =R <sup>3</sup> =Me		87.0
3	(35): R <sup>1</sup> =Et, R <sup>2</sup> = <i>n</i> - Pr, R <sup>3</sup> =H		88.0
4	(3): R <sup>1</sup> =Et, R <sup>2</sup> = <i>n</i> - Bu, R <sup>3</sup> =H		78.0
5	(36): R <sup>1</sup> =Et, R <sup>2</sup> = <i>n</i> - Hex, R <sup>3</sup> =H		69.0
6 <sup>2</sup>	(39): R <sup>1</sup> =Me, R <sup>2</sup> =fenilo, R <sup>3</sup> =H		45.0
7	(38): R <sup>1</sup> =Et, R <sup>2</sup> = <i>i</i> - Propil, R <sup>3</sup> =H		81.0

1. Valores promedio de experimentos efectuados por duplicado a 30° C, durante 6 h., en dioxano. 2. Tiempo de reacción: 20 h.

## 8.- EFECTO DE LA AMINA EN LA AMINÓLISIS DE 2-HIDROXIÉSTERES CATALIZADA POR CAL EN DIOXANO

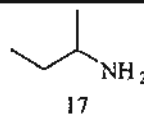
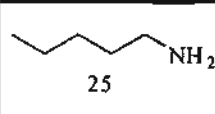
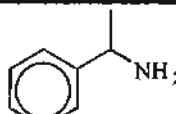
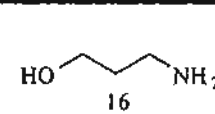
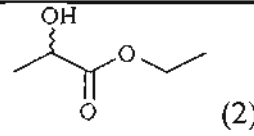
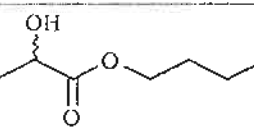
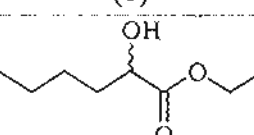
Para probar la selectividad de la enzima respecto al nucleófilo, se probaron 4 aminas: *sec*-butilamina (17), *n*-amilamina (25),  $\alpha$ -metilbencilamina (7) y 3-amino-1-propanol (16), con tres 2-hidroxiésteres: los lactatos de *n*-butilo (1), de etilo (2), y el 2-hidroxicaproato de etilo (3), (Esquema VII.9, Tabla VII.8).



2: R= metilo, R<sup>1</sup>= etilo R<sup>2</sup>= *sec*-butilo, *n*-pentilo,  
 1: R= metilo, R<sup>1</sup>=butilo 1-feniletilo, 3-hidroxipropilo  
 3: R= *n*-butilo, R<sup>1</sup>= etilo

ESQUEMA VII.9. Efecto de la amina en la aminólisis de 2-hidroxiésteres catalizada por la CAL

Tabla VII.8. Efecto de la amina en la aminólisis de 2-hidroxiésteres catalizada por CAL (% de Conversión)

Amina				
2-Hidroxi éster	17	25	7	16
 (2)	55.0	81.0	60.0	55.0
 (1)	58.0	85.0	65.0	49.0
 (3)	50.0	64.0	N.R.	45.0

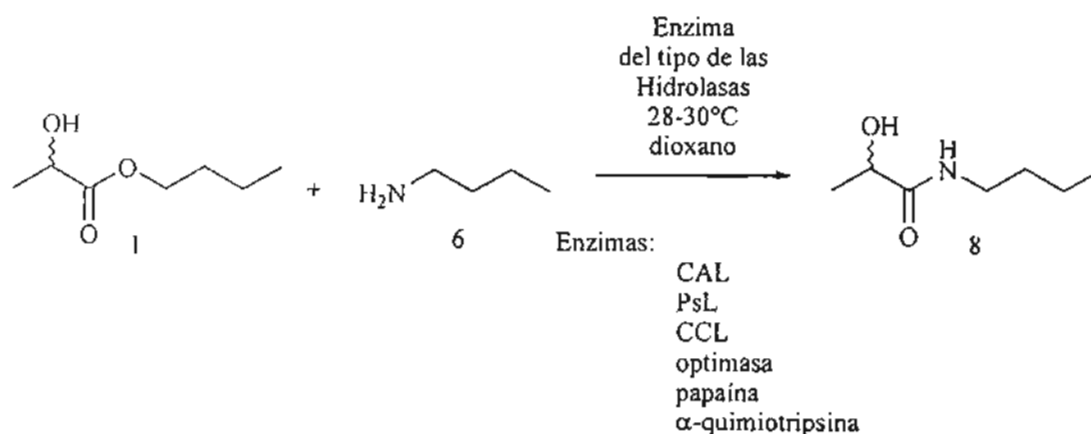
Valores promedio de experimentos efectuados por duplicado a 30° C, durante 6 h., en dioxano.

En general la CAL acepta a una variedad de aminas. Sin embargo, con  $\alpha$ -metil bencilamina racémica (7), (4ª columna de la Tabla VII.8), y *sec*-butilamina (17), (2ª columna),

la reacción fue más lenta que con las aminas lineales (experimentos 1-5 y 7 de la Tabla VII.7, y 3ª columna de la Tabla VII.8). Nuevamente, la enzima cataliza la aminólisis, aceptando diversos sustratos nucleofílicos y la diferencia en reactividad, medida como porcentaje de conversión, indica cierta sensibilidad de la enzima a factores de tipo estérico. Con el 3-amino-1-propanol (16) (5ª columna de la Tabla VII.8), el proceso biocatalítico fue quimioselectivo hacia el grupo amino, pero reaccionó más lentamente que las aminas alifáticas lineales. Es notable el hecho de que no se observa el producto de la transesterificación (de acuerdo con lo observado en el seguimiento por CG-EM, y que también se menciona en la pág. 105).

### 9.- EFECTO DE LA ENZIMA EN LA AMINÓLISIS CATALIZADA DE 2-HIDROXI ÉSTERES EN DIOXANO

De los resultados anteriores se procedió a realizar una evaluación de la actividad catalítica de varias enzimas hidrolasas, tomando como sustrato acilante al 2-hidroxiopropanoato de *n*-butilo (1), y la *n*-butilamina (6) como nucleófilo en dioxano como disolvente orgánico (Esquema VII.10).



ESQUEMA VII.10. Efecto de la enzima en la aminólisis catalizada de 2-hidroxiésteres

Se seleccionaron las enzimas hidrolasas comerciales asequibles, tales como: las lipasas CAL, PsL, CCL ( ó CRL), y las proteinasas optimasa M-440, papaina y  $\alpha$ -quimiotripsina. Las bioconversiones fueron seguidas por cromatografía de gases (Tabla VII.9). Las condiciones del seguimiento para probar la actividad catalítica de las diferentes hidrolasas probadas no fueron las óptimas en cuanto al tipo de columna usada, y por lo tanto el tiempo de duración del análisis (en virtud de usarse una columna polar para sustratos muy polares), pero dan una clara idea de los resultados. La enzima más activa fue CAL, seguida por optimasa-440.

**Tabla VII.9. Aminólisis preliminar de 2-hidroxipropanoato de *n*-butilo catalizada por hidrolasas**

Enzima	Tiempo de reacción (h)	Conversión (%)	Enzima	Tiempo de reacción (h)	Conversión (%)
CAL	1	25.0	PsL	227	28.0
CAL	6	64.0	CCL	27	N.R.
Optimasa	2.5	3.0	CCL	228	11.0
Optimasa	25	23.0	$\alpha$ -QTP	28	N.R.
Optimasa	36	41.0	$\alpha$ -QTP	239	13.0
PsL	10	N.R.	R.Q. <sup>3</sup>	72	N.R.
PsL	26	3.0	R.Q. <sup>3</sup>	244	15.0

1. *n*-Butilamina como nucleófilo, 2. Valores promedio de experimentos efectuados por duplicado en Dioxano a 28-30° C. 3. Reacción química no biocatalizada

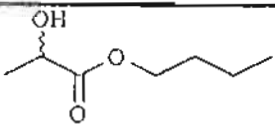
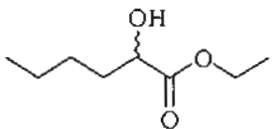
De los resultados (Tabla VII.9), puede verse que la reacción química no se detecta durante 72 h. El seguimiento fue realizado hasta el décimo día (244 h) donde se observa sólo un 15 % de conversión de la aminólisis química del testigo. Con la enzima CAL, se observa una reacción enzimática inmediata (25% de conversión en 1 hora), alcanzando una conversión del 64% en 6 h. Las otras lipasas mostraron una actividad catalítica muy baja en el proceso, lo que concuerda con los resultados de la literatura comentados en los antecedentes.

Con la enzima optimasa-440, se aprecia un 3% de conversión a las 2.5 h y posteriormente en 36 h se alcanza el 41% de conversión, lo cual resultó conveniente para

efectos de observar enantioselectividad; aunque la reacción se continuó hasta el décimo día, alcanzando un 82 % de conversión. Con la enzima Lipasa PsL, se observó una conversión máxima de 3% en 26 h, la aminólisis se dejó seguir hasta el décimo día alcanzando solamente 28% de conversión. Con la lipasa CCL (CRL), los resultados no fueron satisfactorios y apenas se detectan valores cercanos al 11% de conversión, casi equivalente a lo obtenido para la transformación química. Lo mismo se puede concluir respecto a la  $\alpha$ -quimiotripsina, pues se aprecia un máximo de conversión de 13%, al décimo día de reacción.

Posteriormente, se continuó con un análisis comparativo de la actividad catalítica de las enzimas asequibles con la capacidad catalítica exhibida por CAL, tomando como referencia un tiempo de 6 h (Tabla VII.10); por lo que se probó la aminólisis enzimática de dos 2-hidroxiésteres, 2-hidroxiopropanoato de *n*-butilo (1) y 2-hidroxihexanoato de etilo (3) con las enzimas: las lipasas PsL, CRL y las proteinasas: Optimasa-440 y Opticlean. La CAL nuevamente dió los mejores resultados en la conversión de ambos 2-hidroxiésteres en las 2-hidroxiámidas correspondientes.

Tabla VII.10. Comparación de la actividad catalítica de enzimas hidrolíticas en la aminólisis de 2-hidroxiopropanoato de etilo y 2-hidroxihexanoato de *n*-butilo con respecto a CAL

2-Hidroxiéster	Enzima <sup>1</sup>									
	CAL		CRL		Optimasa		Opticlean		PsL	
	E <sup>2</sup>	T <sup>2</sup>	E	T	E	T	E	T	E	T
 <p>(1)</p>	85.0	N.R.	10.0	N.R.	27.0	N.R.	45.0	N.R.	N.R.	N.R.
 <p>(3)</p>	78.0	N.R.	N.R.	N.R.	27.0	N.R.	9.0	N.R.	N.R.	N.R.

1. Valores promedio de % de conversión, de experimentos efectuados por duplicado durante 6 h, en dioxano a 28-30° C. 2. E= Proceso enzimático, T= Testigo. 3. N.R= No hubo reacción.

Aparte de que puede observarse que la lipasa CAL, dió los mejores resultados en la aminólisis de los dos 2-hidroxiésteres, resulta interesante que las proteinasas producidas por bacterias del género *Bacillus* exhiben moderada bioconversión: del 27% (en los dos hidroxiésteres) para Optimasa-440, y del 45% (para el 2-hidroxiopropanoato de *n*-butilo) en el caso de Opticlean. Por su parte, las enzimas lipolíticas CRL y PsL no mostraron actividad catalítica en el tiempo considerado para esta reacción.

Resumiendo los resultados de este apartado, la lipasa CAL mostró nuevamente ser la enzima con mayor capacidad catalítica en la aminólisis de 2-hidroxiopropanoato de etilo y 2-hidroxihexanoato de *n*-butilo para convertirlos en las 2-hidroxiámidas correspondientes. A partir de los resultados moderados de bioconversión de los 2-hidroxiésteres mencionados con Optimasa-440 y Opticlean, las 2 enzimas pueden exhibir un buen grado de estereoselectividad.

#### **10. EFECTO DEL DISOLVENTE EN LA AMINÓLISIS DE 2-HIDROXIESTERES CATALIZADA POR CAL**

Adicionalmente se analizó el efecto del disolvente en el proceso enzimático de aminólisis, en función de su valor de Log P, para lo cual se seleccionaron: isooctano, THF, ACN, *t*-butanol, dioxano, DMF y agua. El dioxano (Log P= -1.1) es un mejor disolvente para el proceso biocatalítico con CAL (Tabla VII.11), que otros disolventes más hidrofóbicos, como el isooctano (log P= 4.5), e incluso mejor que DMF (Log P= -1.0), lo que es contrario a lo predicho, respecto a la sugerencia de utilizar disolventes con Log de  $P \geq 4$ .<sup>6</sup> Aún en agua ocurre la formación de la amida, lo cual subraya la mayor nucleofilia de la amina en presencia de exceso de agua.

Es notable observar un alto grado de aminólisis química en disolventes no solvantes de la amina, como el isooctano, pero en el caso de THF, que se supone debería solvatar en buena parte a la amina, sorprende el alto nivel de conversión en la aminólisis química. En el

caso del *t*-butanol, un disolvente solvatante mediante puentes de hidrógeno, se observa excelente conversión enzimática, pero inferior a la observada en dioxano. En otro disolvente, el acetonitrilo, de mediana polaridad, las conversiones son ligeramente inferiores a las obtenidas en *t*-butanol. A partir de los resultados obtenidos en estos dos disolventes, puede esperarse cierto nivel de estereoselectividad en la aminólisis enzimática de los 2-hidroxiésteres.

**Tabla VII.11. Efecto del disolvente en la aminólisis catalizada por CAL de 2-hidroxiésteres**

2-Hidroxiéster	Disolvente <sup>1</sup> E/T <sup>2</sup>						
	Isooctano	THF	ACN	<i>t</i> -BuOH	DMF	Dioxano	Agua
1	46/43	58/56	76/N.R.	79/ N.R.	13/N.R.	85/ N.R.	57/38
3	79/ N.R.	46/43	71/N.R.	84/N.R.	18/N.R.	78/ N.R.	55/14

1. Valores promedio de experimentos efectuados por duplicado durante 6 h, en el disolvente orgánico a 28-30° C. 2. (E/T= Enzimático/Testigo)

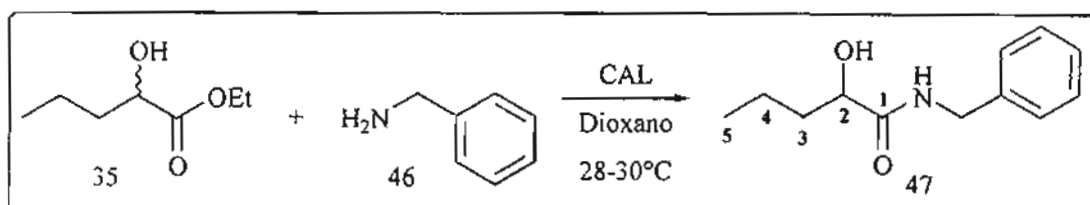
## 11. ESTUDIO DE LA ESTEREOSELECTIVIDAD DE LA AMINÓLISIS DE 2-HIDROXIÉSTERES CATALIZADA POR CAL EN DIOXANO

### a) Mediante derivatización química: método de Mosher

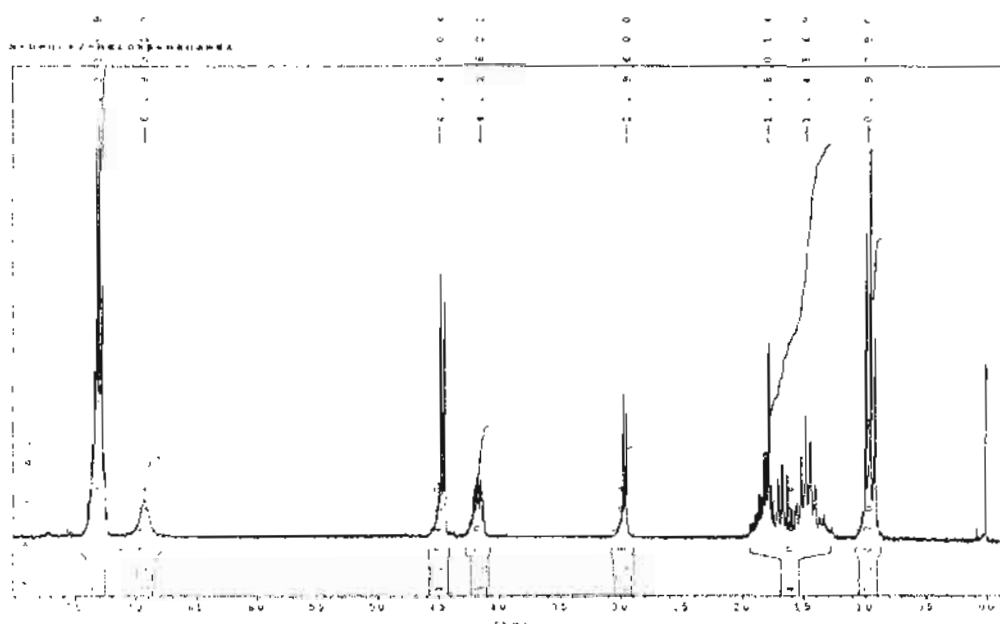
A continuación, se discute un estudio preliminar sobre la enantioselectividad del proceso de la aminólisis de 2-hidroxiésteres con aminas catalizado por CAL en dioxano como disolvente orgánico. Para esto, se llevó a cabo la aminólisis de 2-hidroxipentanoato de etilo (41) con bencilamina (46), en una proporción 2:1, en dioxano como disolvente, utilizando el biocatalizador más eficiente (CAL). En este caso, la reacción se condujo bajo atmósfera de



nitrógeno, para evitar la oxidación de la amina. La reacción se paró a las 5.5 h, y se aislaron el 2-hidroxipentanoato de etilo remanente y la 2-hidroxipentanamida producida (Esquema VII.11, Figura VII.5). En la reacción no biocatalizada, no se observa la amida (47) en 7 días.



**ESQUEMA VII.11.** Reacción de aminólisis de 2-hidroxipentanoato de etilo (41) con bencilamina en dioxano como disolvente y CAL como catalizador

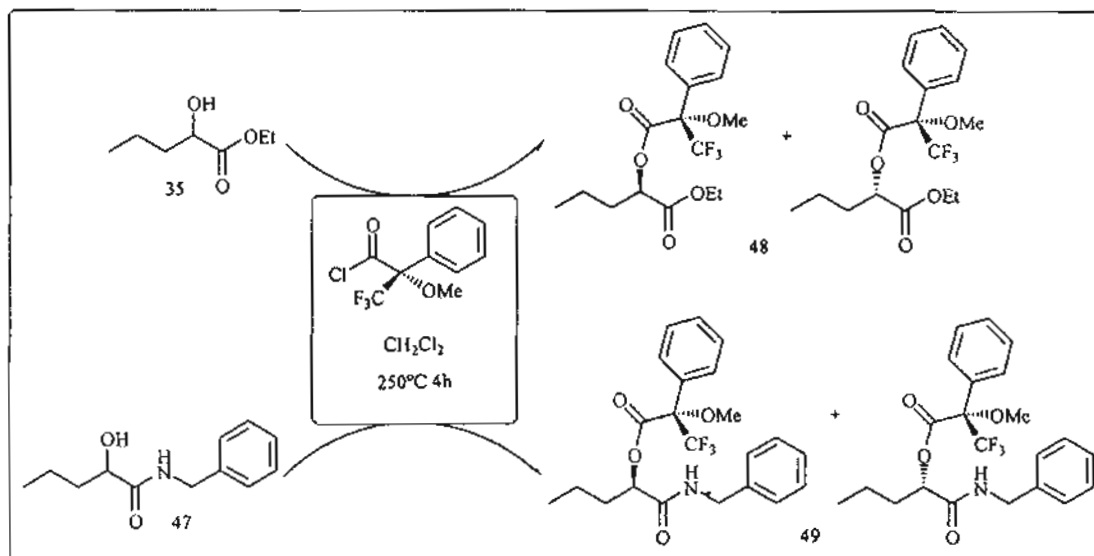


**Figura VII.5.** Espectros de RMN-<sup>1</sup>H de la N-(bencil)-2-hidroxipentanamida (47)

Del espectro de la Figura VII.5 de la amida (47), se aprecia una señal triple en 0.95 ppm correspondiente al -CH<sub>3</sub> terminal de la posición 5 (Esquema VII.11) acoplado al -CH<sub>2</sub>- de la posición 4, y que aparece como una señal múltiple centrada en 1.4 ppm. El -CH<sub>2</sub>- de la posición 3, aparece como una señal múltiple centrada en 1.8 ppm, que por estar más cerca de la influencia “desprotectora” de los grupos electrónatrayentes, muestra su señal a campos más

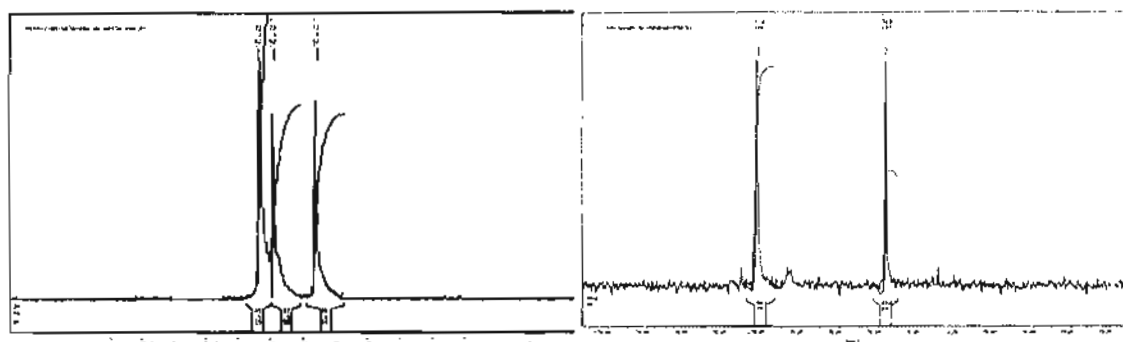
bajos que el  $-\text{CH}_2-$  de la posición 4. En 2.95 ppm se centra una señal doble que integra para un protón correspondiente al grupo  $-\text{OH}$ , que se acopla con el protón  $\beta$  del alcohol, y cuya señal múltiple se observa en 4.2 ppm. En 4.5 ppm se centra una señal doble que integra para los 2 hidrógenos diastereotópicos del metileno  $\beta$  del nitrógeno. Esta señal se encuentra desplazada más a campos bajos respecto de otras señales para estos hidrógenos diastereotópicos de amidas relacionadas (ver en la Figura VII. 2. los espectros de RMN- $^1\text{H}$  de N-(*n*-butil)-2-hidroxiopropanamida (8), y la Figura VII.4, que corresponde a los espectros de: N-(*n*-hexil)-2-hidroxiopropanamida (19) y N-(*sec*-butil)-2-hidroxiopropanamida (22)). La razón es la influencia “desprotectora” del fenilo en la amida (47). Finalmente, en 6.95 se presenta el protón del grupo  $-\text{NH}$ , como una señal simple ancha, que no intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ , lo cual es típico de otros grupos NH amídicos mostradas anteriormente.

La rotación óptica observada para ambos, el sustrato y el producto, fueron muy bajas. Sin embargo, para observar la posible enantioselectividad de la aminólisis, se prepararon los ésteres diastereoméricos de “Mosher” del 2-hidroxi-pentanoato de etilo (35) y la 2-hidroxiamida (47), aislados del proceso biocatalítico, junto con el sustrato y el producto (preparado por métodos químicos) racémicos. Para ello, sustratos y productos, se sometieron a la reacción con el cloruro del ácido-2-trifluorometil-2-metoxi-propiónico (48) (reactivo de Mosher) y se analizaron mediante RMN- $^1\text{H}$ . En el Esquema VII.12 se indican las reacciones de derivación correspondientes para la materia prima (35) y el producto (47).

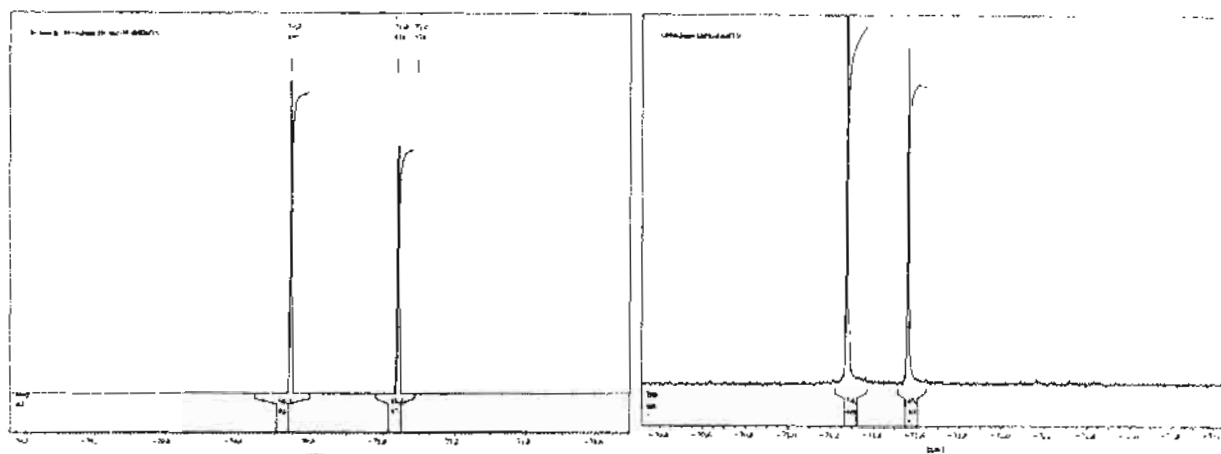


**ESQUEMA VII.12. Reacciones de derivación de Mosher del 2-hidroxipentanoato de etilo (35) remanente y la N-(bencil)-2-hidroxipentanoamida (47) obtenida del proceso catalizado con CAL**

No obstante, previamente se había observado baja actividad óptica en los sustratos y productos previamente aislados de procesos catalizados por CAL, el análisis de RMN- $\text{F}^{19}$  de los derivados de Mosher, tanto de los sustratos (Figura VII.6), como de los productos (Figura VII.7); la reacción es virtualmente no estereoselectiva, como se puede ver en los espectros correspondientes, en los que se observa una proporción de las señales diastereoméricas 1:1 del grupo trifluorometilo en cada derivado.



**Figura VII.6. Espectro de RMN- $\text{F}^{19}$  de los MTPA-derivados del 2-hidroxipentanoato de etilo racémico (35) (izquierda) y el mismo éster obtenido de la reacción de resolución de aminólisis catalizada con CAL (derecha)**



**Figura VII.7. Espectros de RMN- $^{19}\text{F}$  de los MTPA-derivados de la N-(bencil)-2-hidroxipentanamida racémica (47) (izquierda) y de la misma amida obtenida de la reacción de resolución de aminólisis enzimática con CAL (derecha)**

Para la misma reacción de aminólisis de 2-hidroxipentanoato de etilo (35) con bencilamina (46) (Esquema VII.11), se probaron dos disolventes más. En cloruro de metileno, durante el mismo tiempo y en las mismas condiciones se obtuvo el 50% de rendimiento del producto; en este caso, no se observó la reacción sin catalizar en 10 días.

De manera similar, el proceso llevado a cabo en hexano como disolvente, durante el mismo tiempo y en las mismas condiciones, produjo el 48% de rendimiento del producto. En este caso se observó la reacción sin catalizar en 50 h. El espectro de RMN- $\text{H}^1$  correspondiente a la amida obtenida (47) es similar al mostrado en la Figura VII.7. Del bajo valor de rotación óptica observado, se dedujo que un cambio en el disolvente, al variar el valor de  $\log P$ , no produjo ninguna influencia en la enantioselectividad para éste 2-hidroxieéster (35).

Por lo anterior, se realizaron las reacciones de aminólisis enzimática de 2-hidroxipentanoato de etilo (35) con bencilamina (46) en presencia de una de las siguientes enzimas: CAL, PsL y CCL en cloruro de metileno como disolvente. En este caso se pudo observar que hubo una enantioselectividad muy baja, cuando se observó el *e.e.* obtenido de los derivados de Mosher. Los resultados se indican en la Tabla VII.12 y los espectros de los derivados de Mosher de RMN- $\text{F}^{19}$  en la Figura VII.8: el espectro de la izquierda (a),

corresponde a la *N*-(bencil)-2-hidroxipentanamida (47) obtenida mediante resolución con CCL y el espectro de la derecha (b), para la misma amida obtenida de la resolución enzimática con CCL. La proporción enantiomérica fue de 71:29 para CCL y la proporción enantiomérica fue 44:56, ligeramente en favor del enantiómero opuesto (al observado con las enzimas CCL y CAL) para la enzima PsL, de acuerdo con la relación relativa de las señales diastereoméricas de  $F^{19}$ .

Tabla VII.12. Resultados de las reacciones enzimáticas de aminólisis 2-hidroxipentanoato de etilo (35) en  $CH_2Cl_2$

Enzima	Tiempo de reacción (h)	<i>e.e.</i> del éster <sup>1</sup>	<i>e.e.</i> de la amida <sup>1</sup>	Rendimiento experimental (%)
CAL <sup>3</sup>	5.25	6	26	33
PsL <sup>1</sup>	222	N.D.	12	Bajo
CCL	222	N.D.	42	Bajo

NOTAS: 1. En el caso de la Enzima PsL, el *e.e.* corresponde al del enantiómero contrario al producto mayor con CCL y CAL. 2. Obtenido de los derivados de Mosher correspondientes. 3. El valor de la relación enantiomérica *E*, para este proceso es de 4. 3. N.D.=No determinado.

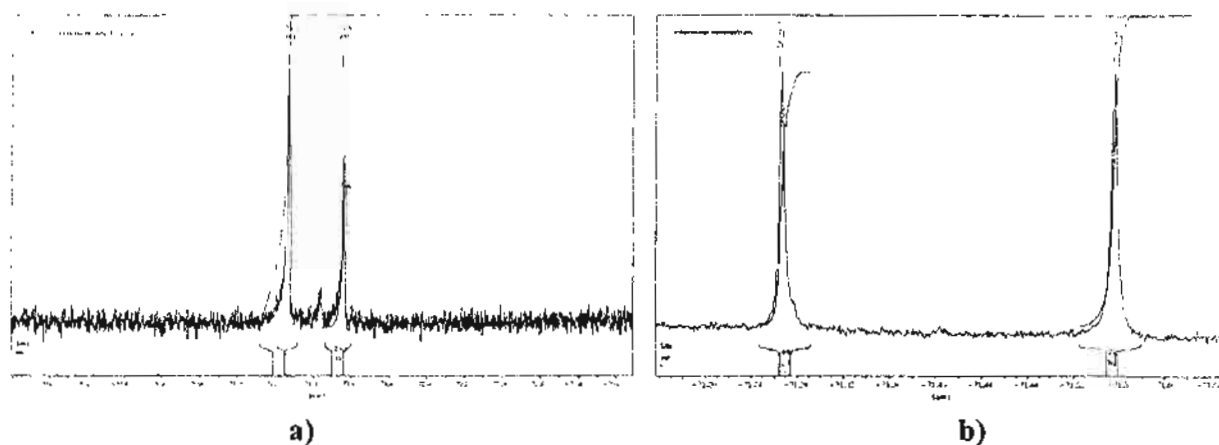


Figura VII.8. Espectros de RMN- $^{19}F$  de los MTPA derivados de la *N*-(bencil)-2-hidroxipentanamida (47) obtenida mediante aminólisis con: a) CCL y b) PsL

Similarmente, la aminólisis enzimática del 2-hidroxihexanoato de etilo racémico (3), con *n*-butilamina, en dioxano, y CAL como catalizador, durante 5.5 horas produjo N-(*n*-butil)-2-hidroxihexanamida (9) virtualmente racémica, como puede verse tanto en el espectro de RMN-<sup>19</sup>F (en el que la proporción de las señales de <sup>19</sup>F fue de 51.9:48), (Figura VII.9), como en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la derecha de la MTPA-amida obtenida, cuyas señales de metoxilo en 4.1 y 4.2 ppm, tienen prácticamente la misma proporción (Figura VII.10).

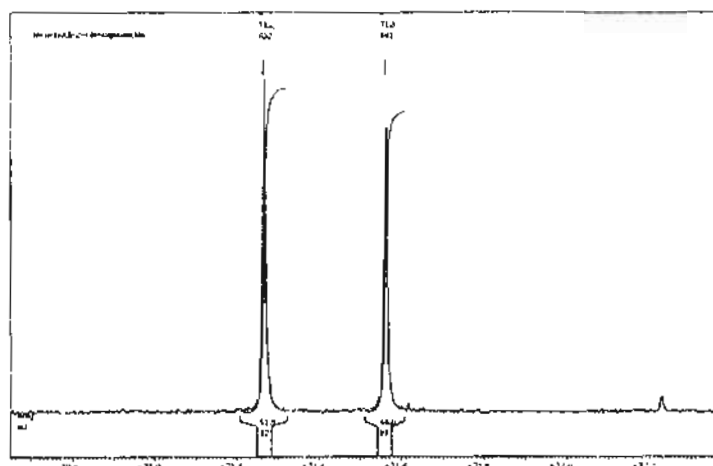


Figura VII.9. Espectro de RMN-<sup>19</sup>F del derivado MTPA-N-(*n*-butil)-2-hidroxihexanamida obtenida de la reacción de aminólisis de 2-hidroxiproato de etilo racémico (3) con CAL

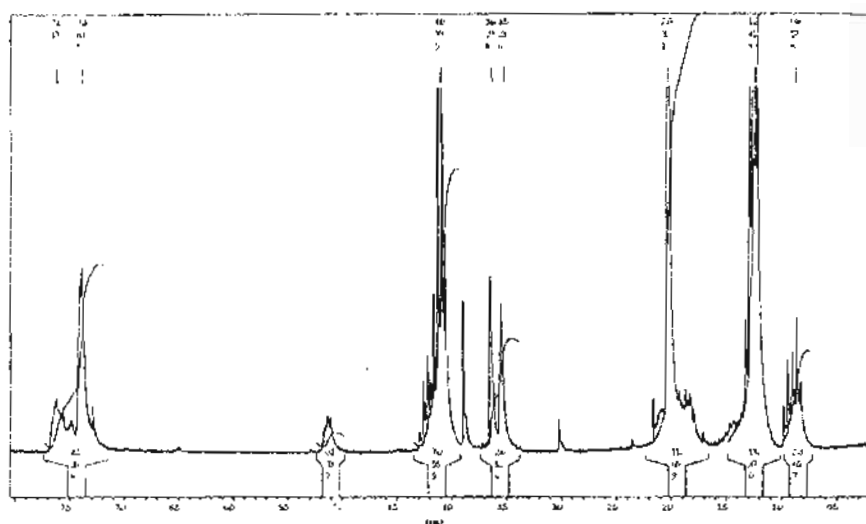
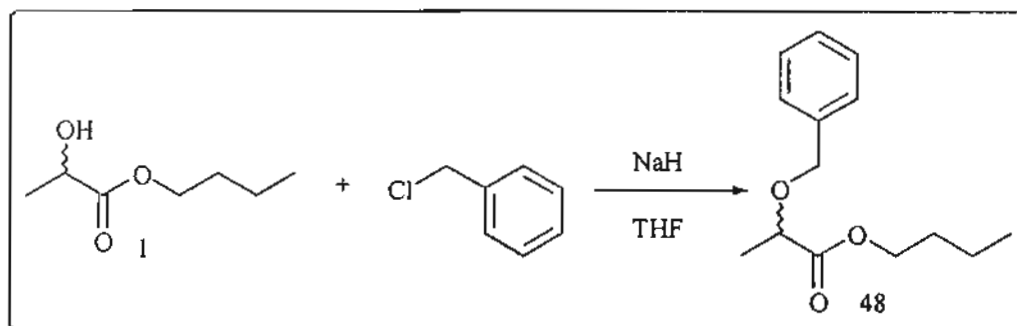


Figura VII.10. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del derivado MTPA-N-(*n*-butil)-2-hidroxihexanamida obtenida de la reacción de aminólisis de 2-hidroxiproato de etilo racémico con CAL

**b) Efecto de la modificación del sustituyente en la posición  $\alpha$  en la reacción de aminólisis de 2-hidroxiésteres con bencilamina y CAL: análisis mediante CLAR-quiral**

Con la finalidad de observar el efecto del sustituyente oxigenado en la posición  $\alpha$  al grupo carboxilo, se efectuó la O-alquilación del grupo hidroxilo (Esquema VII.13).



**ESQUEMA VII.13. Introducción de un sustituyente voluminoso en el grupo hidroxilo  $\alpha$  del hidroxíster mediante alquilación**

El espectro de RMN- $H^1$  y las asignaciones de los diferentes tipos de protones correspondiente al producto esperado se muestra en la Figura VII.11. En 0.95 ppm se aprecia una señal triple para el metilo (a) del butilo de la porción alcoxilo (Figura VII.11) acoplado con el metileno (c), que aparece como una señal múltiple centrada en 1.4 ppm. El metilo b, de la porción de acilo, es una señal doble en 1.45 ppm, acoplado con el metino (CH-) e, que aparece como una señal cuadruple, centrado en 4.1 ppm. El  $CH_2$ - d, es una señal múltiple en 1.65 ppm acoplado con el  $CH_2$ - c y el  $CH_2$ - f. Este último grupo f, es una señal triple centrada en 4.15 ppm. En la región de 4.4-4.8 ppm, aparece un sistema AB, correspondiente a los hidrógenos diastereotópicos g y g'. Finalmente la señal en 7.35 ppm, integra para los 5 protones aromáticos h.

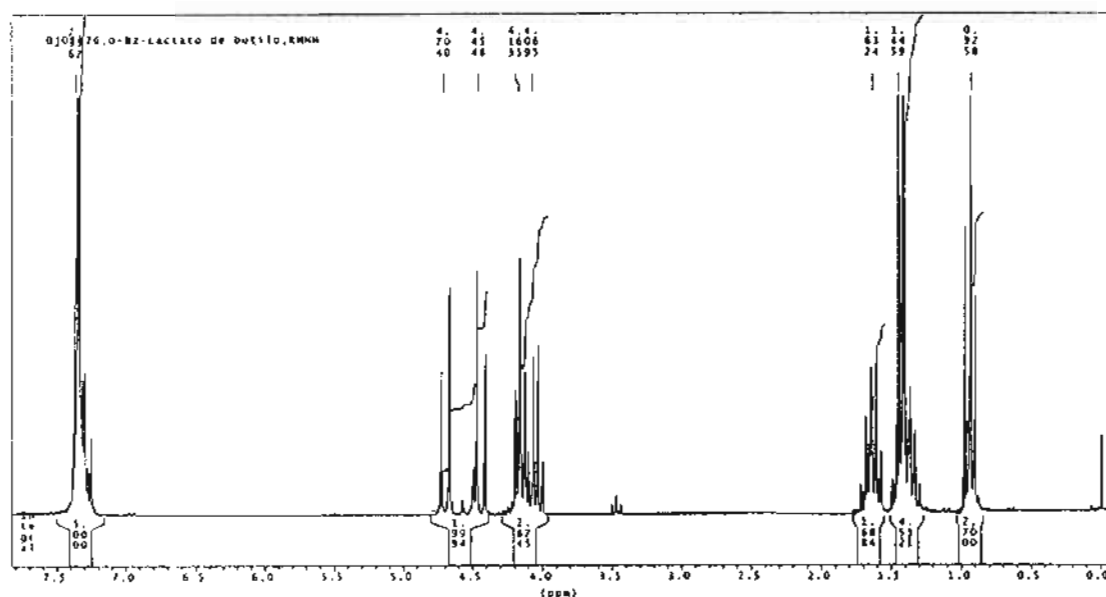
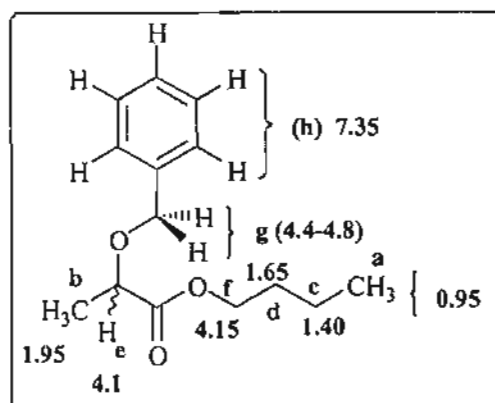
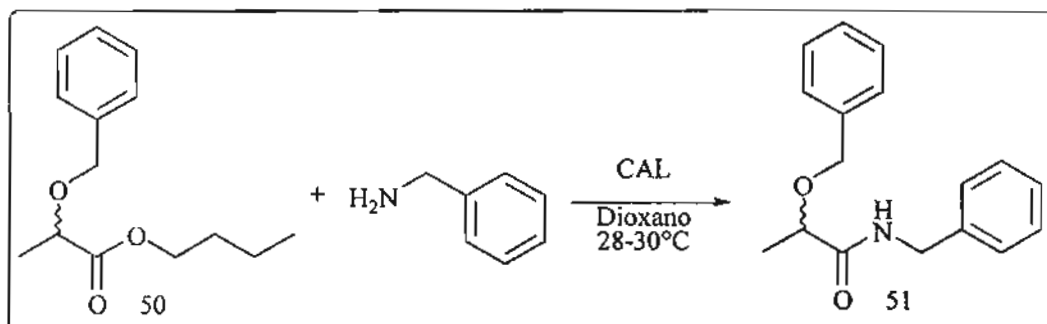


Figura VII.11. Estructura y espectro de  $H^1$ -RMN del 2-benciloxipropionato de *n*-butilo (50) y asignación de las señales observadas en el espectro

El éster O-benciloxi-derivado (50), sintetizado, se sometió entonces a la reacción de aminólisis (Esquema VII.14), en las condiciones usuales, con CAL como el biocatalizador en dioxano a 28-30°C. Sorprendentemente, la aminólisis enzimática procedió muy rápidamente, de manera análoga a los 2-hidroxiésteres probados antes; no obstante el grupo protector en la posición  $\alpha$ , que aparentemente dificultaría la aproximación del nuevo grupo éster al sitio activo de la enzima.





ESQUEMA VII.14. Reacción de aminólisis de 2-benciloxipropionato de *n*-butilo (50) racémico catalizada por CAL

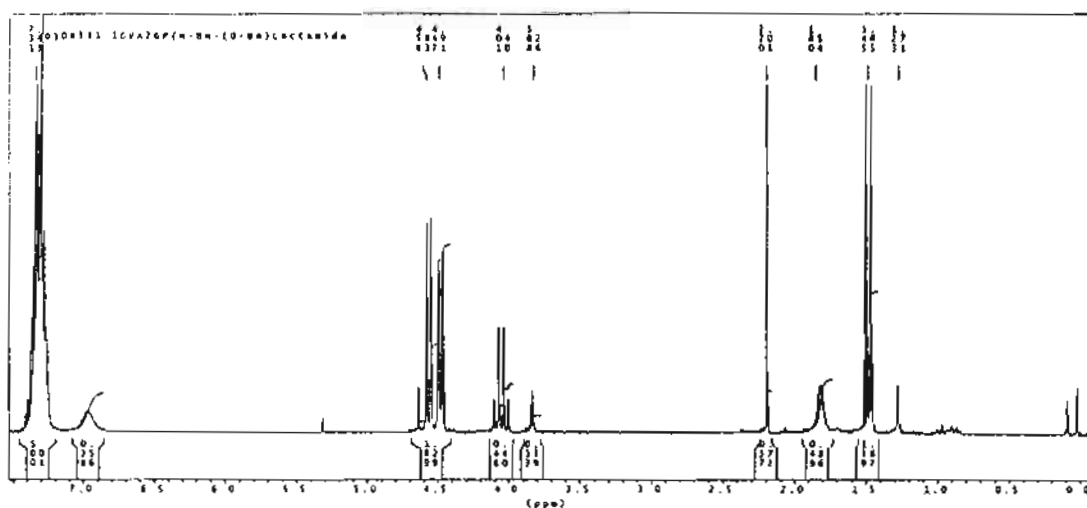
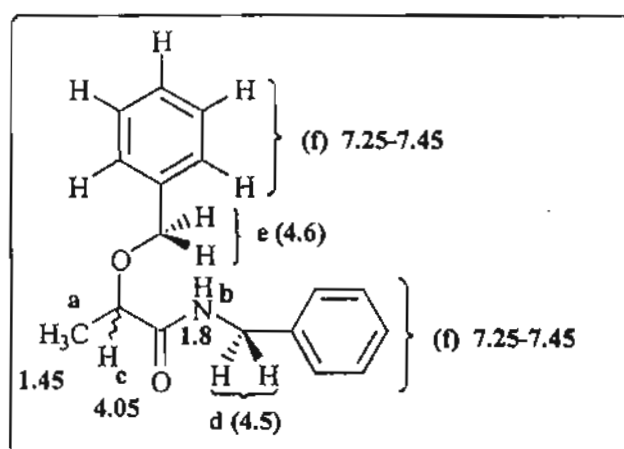


Figura VII.12. Estructura y espectro de H<sup>1</sup>-RMN de la N-(bencil)-2-benciloxipropionamida (51) y asignación de las señales observadas en el espectro

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H del producto (51) (Figura VII.12), se observan los cambios propios a la estructura de la amida producida. Persiste la señal doble para el metilo **a** en 1.45 ppm, acoplado con el metino (CH-) **c**, que aparece como una señal cuadruple, centrado en 4.05 ppm. El NH **b**, de la amida es una señal ancha en 1.8 ppm. En 4.5 ppm se observa una señal doble ligeramente ancha, debida al grupo metileno diasterotópico **d** adyacente al N. El otro metileno diasterotópico **e**, es una señal doble ligeramente ancha adyacente al oxígeno, centrado en 4.6 ppm. En la región de 7.25-7.45 ppm, se observa la señal múltiple que integra para los 10 protones aromáticos **f**.

El exceso enantiomérico del producto se determinó por CLAR usando una columna quiral. En el caso del sustrato no fue necesaria la derivatización del mismo para la determinación del exceso enantiomérico, puesto que el grupo fenilo del bencilo en  $\alpha$ , es un grupo adecuado para la columna utilizada.

La conversión y la enantioselectividad se calcularon a partir de los excesos enantioméricos de sustrato y producto mediante las fórmulas de Sih que se muestran a continuación.<sup>184</sup>

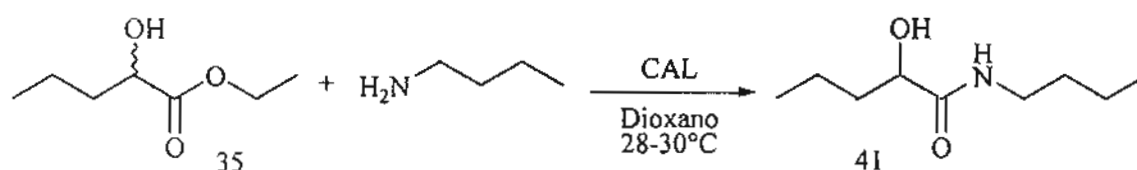
$$c = \frac{ee_{sust}}{ee_{sust} + ee_{prod}}; E = \frac{\ln[(1-c) \times (1-ee_{sust})]}{\ln[(1-c) \times (1+ee_{sust})]} = \frac{\ln[1-c \times (1+ee_{prod})]}{\ln[1-c \times (1-ee_{prod})]}$$

Como se puede ver de acuerdo con los resultados: para una relación molar amina:éster de 1.5, y un tiempo de bioconversión de 12 h, el *e.e.* del éster recuperado fue de 18%, mientras que el de la amida correspondiente fue de 9%. La conversión calculada con la ecuación anterior arrojó un 67% de conversión y un valor de E igual a 1.4. Se trata de una reacción no muy enantioselectiva, sólo ligeramente superior a la reacción producida por el 2-hidroxiéster correspondiente no derivatizado.

### c) Estudio de la estereoselectividad de la aminólisis de 2-hidroxiésteres catalizada por CAL mediante CG-EM

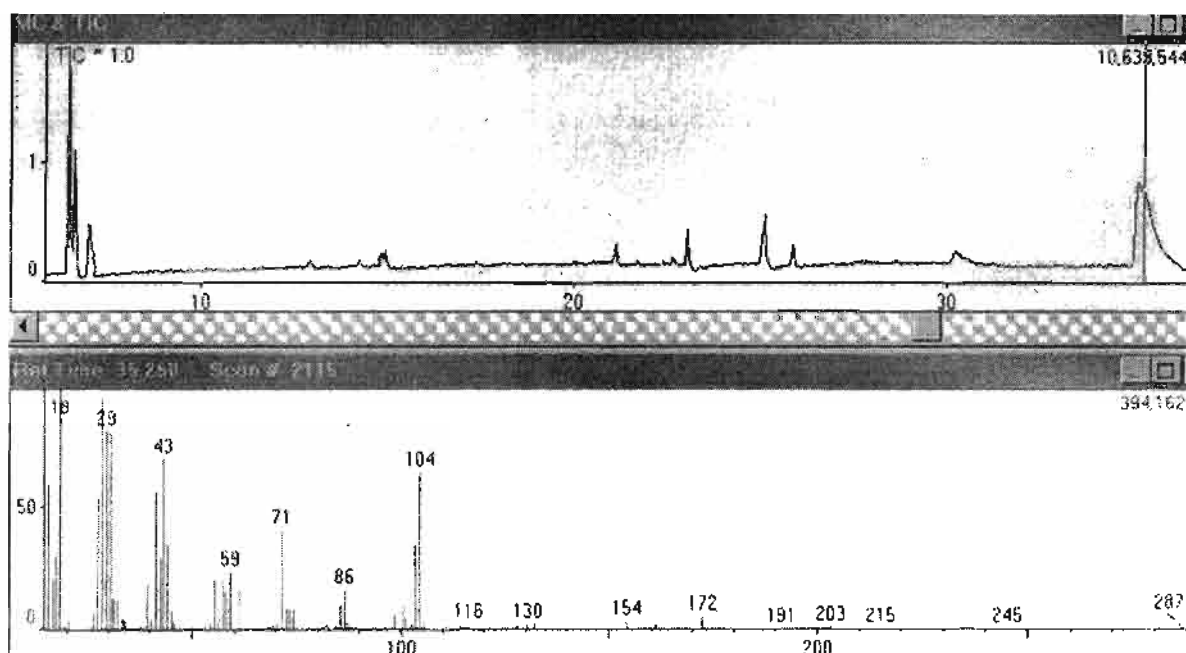
A continuación se discuten los resultados del análisis de la enantioselectividad de la reacción de aminólisis catalizada por CAL, para los 2-hidroxiésteres: 2-hidroxipentanoato de etilo (35), 2-hidroxipropanoato de etilo (3) y mandelato de metilo (39) racémicos, con *n*-butilamina en dioxano, usando CG con una columna de fase estacionaria quiral. No fue posible encontrar las condiciones para observar los picos resueltos de cada enantiómero del sustrato y del producto en un mismo cromatograma, por lo que de acuerdo con los resultados obtenidos no se pudieron incluir el valor de la enantioselectividad (*E*) esperado. Sin embargo, dichos resultados sí permiten corroborar la escasa selectividad de la enzima utilizada.

Primeramente, en el esquema VII.15., se muestra la reacción de aminólisis catalizada por CAL de 2-hidroxipentanoato de etilo (35) con *n*-butilamina, y el cromatograma-espectro de masas en la Figura VII.13.



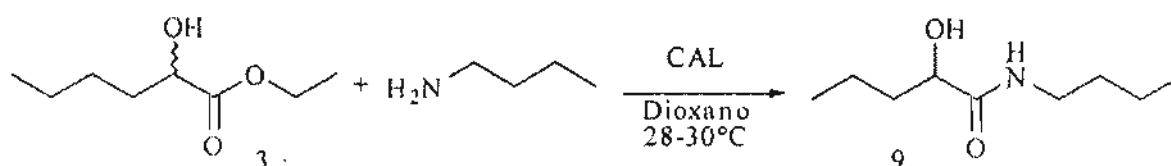
#### ESQUEMA VII.15. Estereoselectividad de la reacción de aminólisis de 2-hidroxipentanoato de etilo (35) racémico catalizada por CAL

El espectro de masas corresponde a la amida ya que concuerda con el ión molecular y el patrón de fragmentación esperados para la *N*-(*n*-butil)-2-hidroxipentanamida. La reacción fue llevada hasta una conversión del 40%. Los picos de las amidas enantioméricas no se observan resueltos, pero los correspondientes a los picos del sustrato racémico remanente se observan lo suficientemente separados ( $t_R=1.48$  y  $t_R= 1.92$  respectivamente), lo que permiten medir el modesto *e.e.* del 12%, lo que corrobora los resultados anteriores en relación con la escasa enantioselectividad exhibida por la enzima CAL.



**Figura VII.13. Cromatograma de la aminólisis de 2-hidroxipentanoato de etilo racémico y espectro de masas del producto, N-(*n*-butil)-2-hidroxipentanamida**

Posteriormente, se utilizó un segundo sustrato. En el esquema VII.16, se muestra la reacción de aminólisis de 2-hidroxihexanoato de etilo (3) con *n*-butilamina, catalizada por CAL. El cromatograma-espectro de masas de la Figura VII.14 corresponde a una mezcla equimolecular del sustrato (3) y el producto (9), ambos racémicos, por lo que se observan 4 picos en el cromatograma desarrollado en la columna quiral. Se observan los picos separados de los enantiómeros del sustrato ( $t_R=3.75$  y  $t_R= 4.6$  respectivamente), y los picos de los enantiómeros del producto parcialmente separados ( $t_R=26.45$  y  $t_R= 27.0$  respectivamente).



**ESQUEMA VII.15. Estereoselectividad de la reacción de aminólisis de 2-hidroxihexanoato de etilo (3) racémico catalizada por CAL**

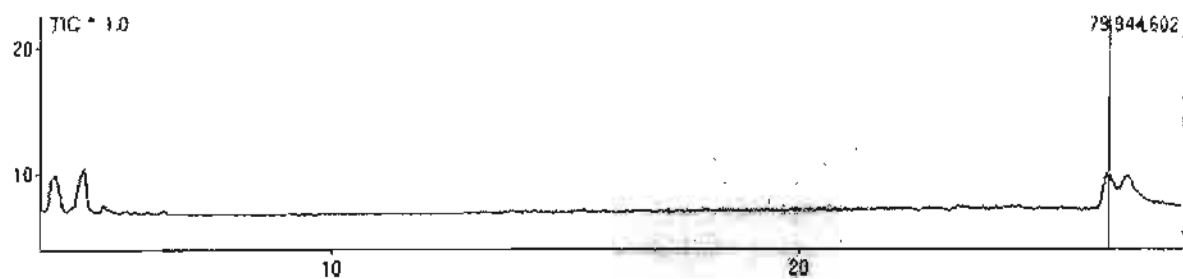


Figura VII.14. Cromatograma del sustrato 2-hidroxicaproato de etilo y producto N-(*n*-butil)-2-hidroxicaproamida racémicos de referencia

En la Figura VII.15, se muestra el cromatograma y el espectro de masas de la N-(*n*-butil)-2-hidroxihexanamida (9), obtenida del proceso de aminólisis catalizado por CAL. La reacción fue llevada hasta una conversión del 45%.

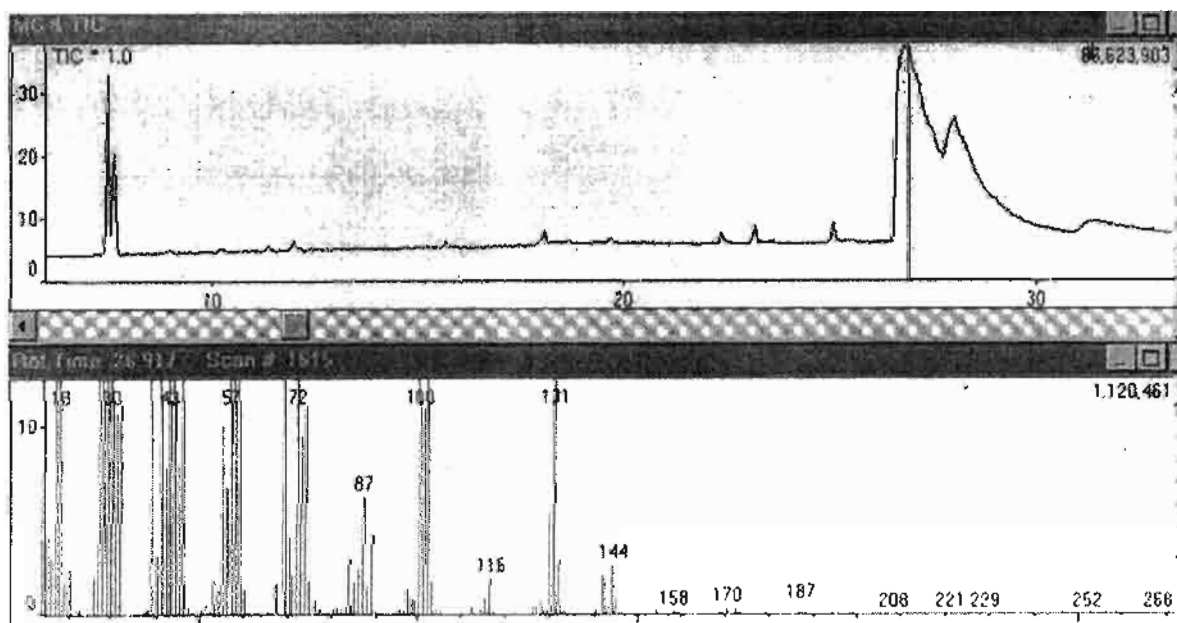
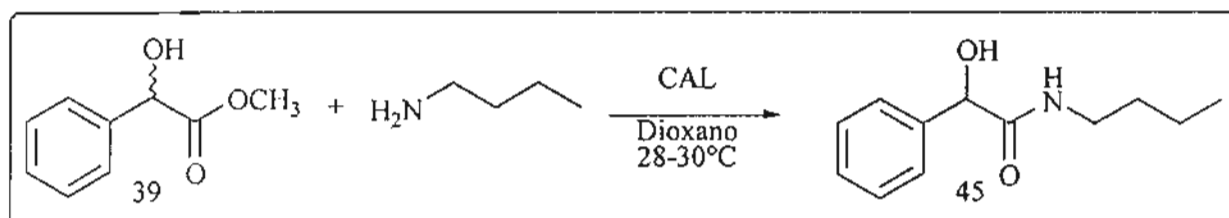


Figura VII.15. Cromatograma de la aminólisis del 2-hidroxihexanoato de etilo y producto N-(*n*-butil)-2-hidroxihexanamida y espectro de masas de la N-(*n*-butil)-2-hidroxihexanamida

De la figura VII.15, se observa que el ión molecular, así como con el patrón de fragmentación corresponden con el esperado para la amida producto (9). Los picos de las amidas enantioméricas no se observan totalmente resueltos, pero del mismo modo, como en el caso del sustrato anterior, los picos del sustrato racémico remanente se observan bien separados, con un *e.e.* del 19%. De esta manera y similarmente al caso precedente del 2-hidroxipentanoato de etilo, este valor de *e.e.*, muestra una baja enantioselectividad de la CAL hacia el sustrato racémico 2-hidroxihexanoato de etilo.

Finalmente, en busca de mejorar la enantioselectividad con CAL, se realizó la aminólisis del mandelato de metilo racémico (39) con *n*-butilamina y la enzima CAL en dioxano como disolvente. El cromatograma-espectro de masas de la Figura VII.16 corresponde a una mezcla equimolecular del sustrato (39) y el producto (45), ambos racémicos, aunque no se observan los 4 picos esperados en el cromatograma desarrollado en la columna quiral. Se observan los picos no separados para los enantiómeros del sustrato ( $t_R=3.95-7.9$ ), y los picos de los enantiómeros del producto parcialmente separados ( $t_R=26.45$  y  $t_R= 27.0$  respectivamente).



**ESQUEMA VII.15. Estereoselectividad de la reacción de aminólisis de mandelato de metilo (39) racémico catalizada por CAL**

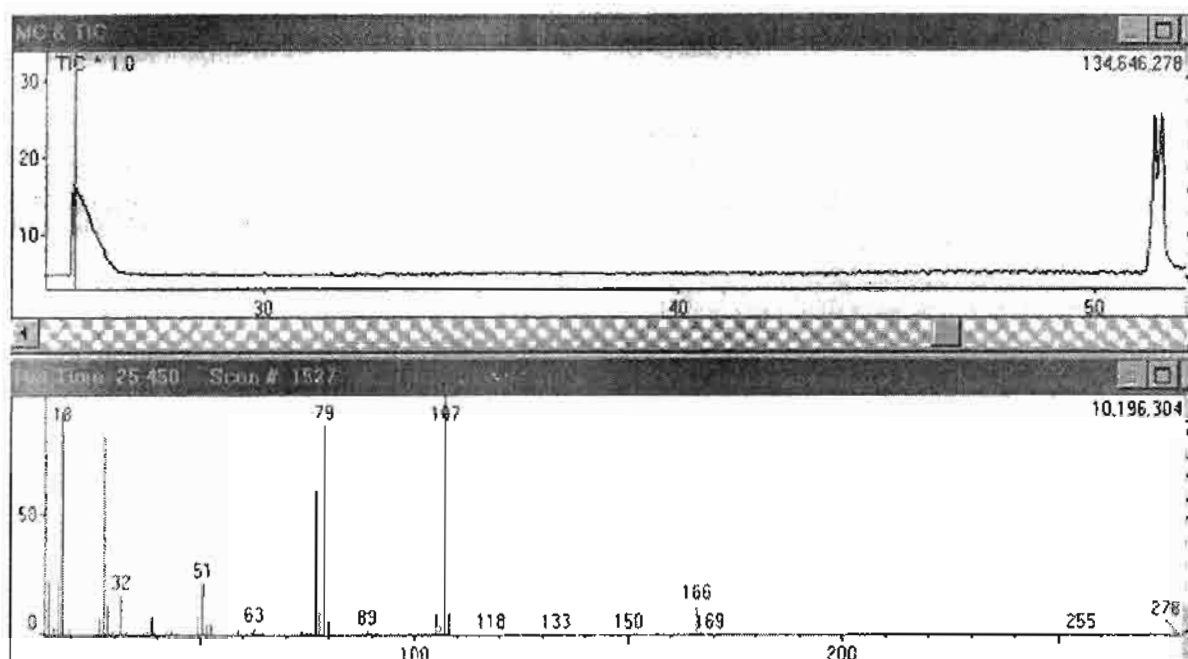


Figura VII.16. Cromatograma-espectro de masas del mandelato de metilo (39) racémico y cromatograma del producto *N*-(*n*-butil)mandelamida (45) de referencia

Se realizó la aminólisis enzimática del mandelato de metilo (39) con *n*-butilamina en presencia de CAL en dioxano a 30°C. El seguimiento a las 4, 6 y 21 h mostró las conversiones de: 36, 40 y 46% respectivamente, y en todos los casos sólo se observa un pico en los cromatogramas correspondientes. En la Figura VII.17 se muestra el cromatograma y espectro de masas de la muestra del seguimiento a las 21 h y sólo se aprecia un pico correspondiente al producto, por lo que se deduce que la aminólisis del mandelato de metilo con *n*-butilamina, empleando CAL como catalizador, procede con enantioselectividad. El valor de la rotación óptica del producto aislado y caracterizado corrobora lo observado mediante la cromatografía de gases quiral.

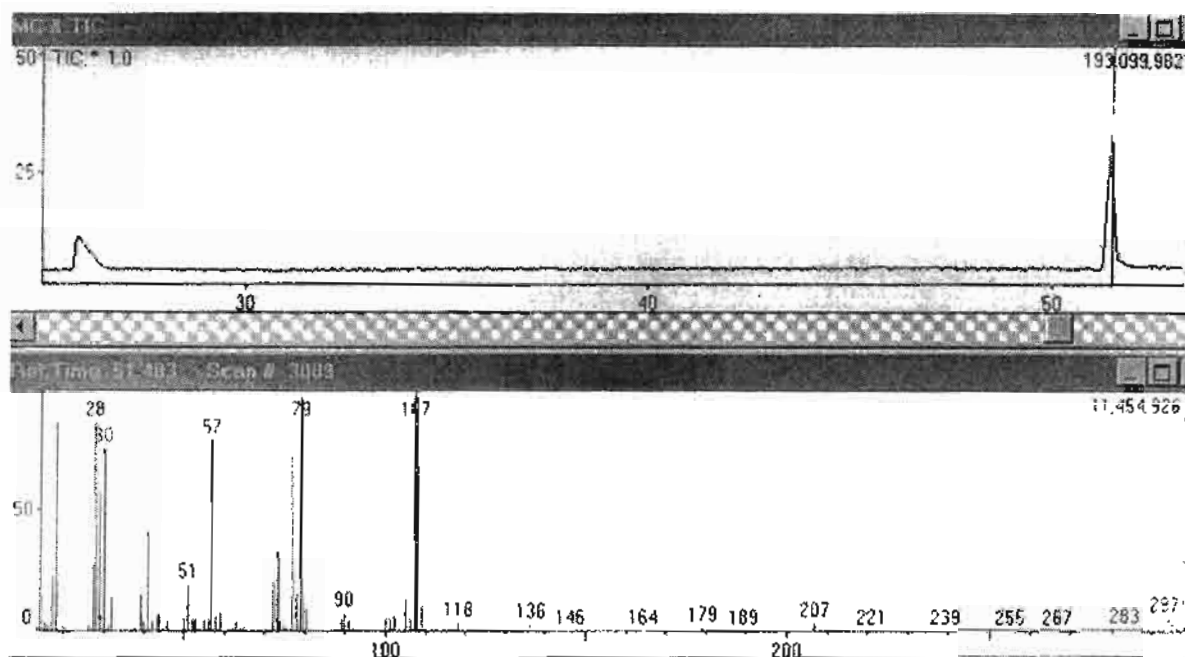


Figura VII.17. Cromatograma-espectro de masas del mandelato de metilo (39) racémico y del producto *N*-(*n*-butil)mandelamida (44), de la aminólisis con *n*-butilamina y CAL como catalizador a las 21 h

## 12. ESTEREO- Y REGIOSELECTIVIDAD DE LA AMINÓLISIS DE DIÉSTERES FUNCIONALIZADOS CATALIZADA POR LIPASAS

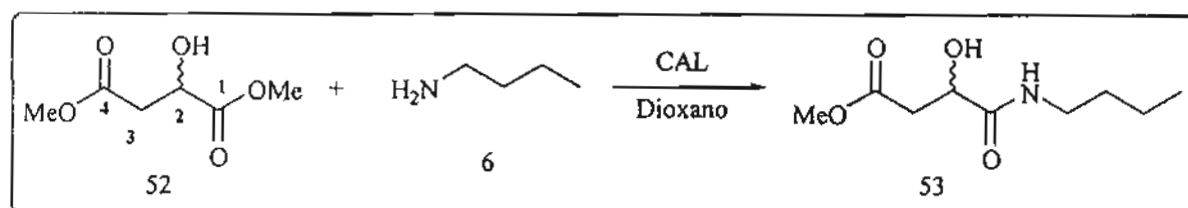
### a) Regioselectividad y estereoselectividad en la aminólisis enzimática del hidroxisuccinato de dimetilo (52):

La utilidad de ambos enantiómeros del ácido málico y sus derivados, ha sido mostrada ampliamente a través de su utilización como importante bloque constructor quiral.<sup>185-192</sup> En virtud de lo anterior, se desprende el interés en el estudio de la aminólisis de ésteres del ácido málico (ácido hidroxisuccínico) con el objetivo de investigar la regioselectividad del proceso, y su potencial aplicación de una ó ambas anidas regioisoméricas a la síntesis de compuestos heterocíclicos interesantes.<sup>193</sup>

Se procedió a probar la aminólisis enzimática de los dos enantiómeros del hidroxisuccinato de dimetilo (52), pues ambos se encuentran en forma disponible, pero no el compuesto racémico. De cualquier forma, midiendo el grado de conversión de la reacción



enzimática para cada enantiómero por separado, y comparando la conversión de cada uno, permite tener idea del grado de selectividad de la misma (aunque siempre es conveniente medir la enantioselectividad a partir de la reacción competitiva en que ambos enantiómeros se encuentren presentes y en la misma concentración). Era interesante observar la posible enantioselectividad en la aminólisis de este sustrato, que tiene un grupo hidroxilo en posición  $\alpha$  respecto a uno de los grupos carbometoxilo, que de acuerdo con nuestros resultados previos, no ejercía estereoselectividad en el proceso de aminólisis de 2-hidroxiésteres simples, y que también es  $\beta$  respecto al otro grupo carbometoxilo, y que de acuerdo con los resultados con  $\beta$ -hidroxiésteres por el profesor Gotor y su grupo,<sup>101,102,136,141</sup> debería ejercer una notable enantioselectividad. Al efectuar el experimento con cada enantiómero por separado, los malatos de dimetilo "R" y "S", la aminólisis enzimática procedió aceptablemente en ambos casos (Esquema VII.16, Tabla VII.14). Sin embargo, aunque se anticipó y se confirmó la formación de la amida regioisomérica (53) correspondiente al éster más reactivo ( $C_1$ ), el proceso mostró sólo un modesto grado de selectividad (expresada como **selectividad relativa S.r. (R/S)**) con las tres enzimas probadas: la lipasa CAL y las proteinasas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus alcalophyllus*. La reacción fue regioselectiva hacia el éster más reactivo, con cada una de las tres enzimas siendo la lipasa CAL la más eficiente en el grado de conversión del proceso, así como en el grado de selectividad, expresado en la relación de las conversiones y la selectividad relativa: **S.r. (R/S)**, Tabla VII.13.



**ESQUEMA VII.16. Reacción de aminólisis enzimática regioselectiva de los enantiómeros del hidroxisuccinato de dimetilo (52), con *n*-butilamina y CAL como catalizador**

No hay reacción en el testigo en este tiempo. Con Optimasa en 72 h, la conversión no varió mucho (82%), y con Opticlean no rebasó el 65% en 24 h. Como puede verse en la

Tabla VII.14, la selectividad relativa de la enzima CAL es mayor en las primeras horas (S.r. (R/S)= 1.8), pero disminuye con el transcurso del tiempo (S.r. (R/S)= 1.5 en 8.5 h.). Con la proteinasa Optimasa-440, la selectividad es baja (S.r. (R/S) = 1.1-1.3) y no muestra ninguna tendencia con el transcurso del tiempo. Con la proteinasa Opticlean, se observa una selectividad relativa ( S.r. (R/S) = 1.0, y como en el caso de Optimasa, es muy baja.

**Tabla VII.13. Aminólisis de los isómeros R/S del hidroxisuccinato de dimetilo (53) con varias enzimas**

TIEMPO DE REACCION	CAL		Optimasa		Opticlean	
	R/S (%)	S.r. (R/S)	R/S (%)	S.r. (R/S)	R/S (%)	S.r. (R/S)
0.5 h	34.0/18.5	1.8	32.5/30.5	1.1	28.5/24.1	1.2
2.5 h	68.5/38.0	1.8	57.0/42.4	1.3	49.0/48.0	1.0
4.5 h	77.5/48.0	1.6	63.5/57.5	1.1	54.9/54.0	1.0
8.5 h	85.0/57.0	1.5	77.0/60.3	1.3	64.5/61.7	1.0

R/S = Relación de conversión de los isómeros del malato de dimetilo, Selectividad relativa: S.r.(R/S). T=28-30°C, Disolvente: dioxano: Condiciones CG-EM: T<sub>c</sub>=150 °C, T<sub>iny.</sub>=T<sub>det.</sub>= 200°C.

A continuación, se realizó un ensayo comparativo del efecto del disolvente sobre la actividad catalítica de la enzima CAL para la aminólisis de los dos isómeros "R" y "S" hidroxisuccinato de dimetilo (52) con *n*-butilamina, en términos de magnitud de la conversión (Tabla VII.15).

Como puede verse en los resultados de la Tabla VII.15, no existe un apreciable efecto del disolvente sobre la enantiodiscriminación de la enzima en los estereoisómeros del sustrato (no ocurre aminólisis no enzimática en los éteres dioxano y MTB). Sin embargo, se aprecia que a) el dioxano permite una mayor conversión catalítica de CAL de la reacción del isómero

R que MTBE, pero es muy similar para el isómero S, por lo que se deduce que la selectividad, aunque es mayor en dioxano, no lo es notablemente, y b) el isooctano no es un disolvente para la aminólisis catalizada porque se notó un muy alto porcentaje de la aminólisis química en el testigo, durante el tiempo del seguimiento de este experimento.

**TABLA VII.15. Aminólisis de los isómeros R/S del hidroxisuccinato de dimetilo con *n*-butilamina en diferentes disolventes**

DISOLVENTE	CONVERSIÓN DEL ISOMERO R (%)		CONVERSIÓN DEL ISOMERO S (%)		S.r.(R/S) <sup>3</sup>
	E <sup>1</sup>	B <sup>2</sup>	E <sup>1</sup>	B <sup>2</sup>	
<b>Dioxano</b>	85.0	N.R.	57.4	N.R.	1.5
<b>MTBE</b>	70.5	N.R.	56.7	N.R.	1.2
<b>Isooctano</b>	49.5	45	49.0	45	!

Notas: 1. Tiempo de reacción: 8 h., 2. Enzima: CAL, 28-30°C. , 3. Selectividad relativa: S.r.(R/S).

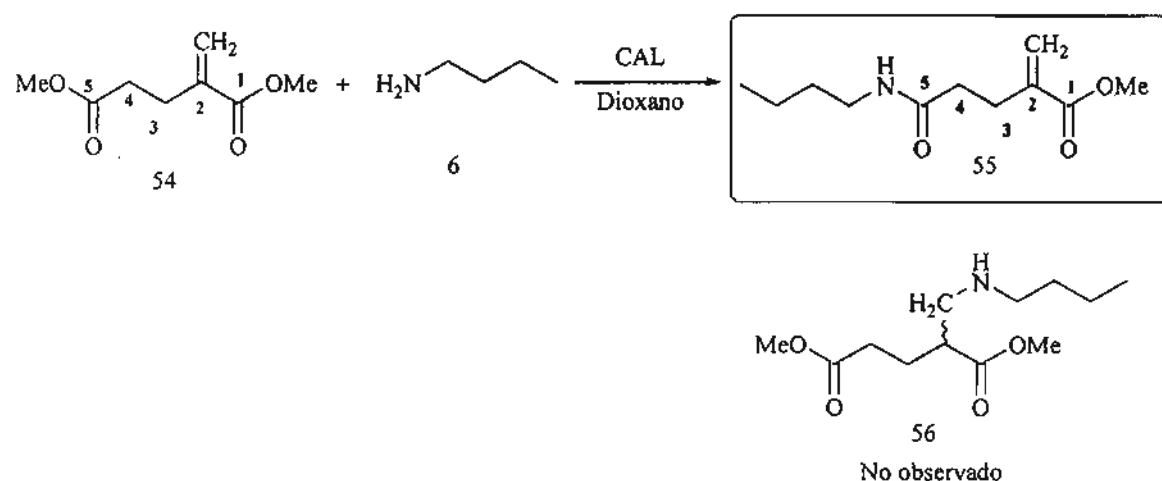
En conclusión, y a la vista de los resultados de las correspondientes reacciones enzimáticas, es evidente que las enzimas probadas no muestran una enantiodiferenciación apreciable en los estereoisómeros del malato de dimetilo (52). Esto probablemente sea debido a que la reacción es muy rápida al encontrarse activado el carboxilo con el hidroxilo en posición 2, tal que se suprime toda estereoselectividad, y que al no formarse el regioisómero menos reactivo, no se observa el efecto del grupo hidroxilo “en posición  $\beta$ ”, que de acuerdo con lo comentado en la página 49, sí debería ejercer la enantioselectividad esperada.

#### **b. Regioselectividad en la aminólisis enzimática del 2-metilidenglutarato de dimetilo**

Se seleccionó al 2-metilidenglutarato de dimetilo (itaconato de metilo) (54) como sustrato, para estudiar la influencia de la geometría del sistema  $\pi$  en la actividad catalítica de

esta lipasa. Existen numerosos ejemplos en la literatura que demuestran que la presencia de insaturaciones y la configuración del doble enlace, afectan drásticamente a la actividad de algunas lipasas.<sup>194-197</sup>

Se realizó este estudio con la reacción entre el itaconato de dimetilo (54), Esquema 16, con *n*-butilamina, bajo las condiciones de reacción empleadas anteriormente, es decir dioxano como disolvente y CAL como biocatalizador. En esta reacción se obtiene como único producto el amidoéster  $\alpha,\beta$ -insaturado (55), resultante de la monoaminólisis selectiva del diéster. La estructura de este amidoéster fue confirmada por CG-EM y mediante análisis espectroscópicos de IR, <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, así como por espectrometría de masas. Bajo las mismas condiciones de reacción, y en ausencia del catalizador, se obtiene, como cabría esperar, el correspondiente aducto de Michael (56).



ESQUEMA VII.17. Reacción de aminólisis enzimática regioselectiva del 2-metilidenglutarato de dimetilo, con *n*-butilamina y CAL como catalizador

## ***VIII. CONCLUSIONES***

1. La aminólisis química de 2-hidroxiésteres y 2-hidroxilactonas, con una variedad de aminas, es un método general para la obtención de las 2-hidroxiámidas correspondientes, aunque los rendimientos varían de regulares a buenos en función de la estructura de la amina, y en menor grado también de la estructura del 2-hidroxiéster. Los rendimientos, son mejores si la amina es alifática, disminuyen si está funcionalizada (por ejemplo un aminoalcohol) y son drásticamente más bajos si la amina es aromática. Dentro de las alifáticas, las aminas lineales son más reactivas que las ramificadas, lo cual era de esperarse.

2. Para la aminólisis biocatalizada por enzimas en disolvente orgánico: los 2-hidroxiésteres son sustratos para las lipasas de *Candida cylindracea*, *Pseudomonas cepacea*, y también lo son para las proteinasas de *Bacillus licheniformis* y de *Bacillus alcalophilus*. Sin embargo, la lipasa de *Candida antarctica* muestra una amplia especificidad de sustrato, porque permite cadenas alifáticas en la porción de acilo y en la de alcoxilo de los 2-hidroxiésteres, aunque menor selectividad que PsL para el 2-hidroxipentanoato de etilo. La CAL aceptó un amplio rango de 2-hidroxiésteres como sustratos acíclicos. En cuanto a las aminas: Las aminas alifáticas menos impedidas son las más reactivas y las que producen los mejores resultados en las reacciones biocatalizadas con CAL (lo mismo que las aminólisis no biocatalizadas). Las más voluminosas como ciclohexilamina y las aromáticas como anilina, dan rendimientos más pobres. Por su parte, con los aminoalcoholes el proceso biocatalítico con CAL fue quimioselectivo hacia el grupo amino, siendo notable el hecho de que no se observa el producto de la reacción de transesterificación en el rango de tiempo de duración del análisis.

3. La aminólisis de 2-hidroxiésteres racémicos con aminas catalizada por CAL procede con enantioselectividad muy pobre, aún variando el disolvente orgánico (dioxano, cloruro de metileno, hexano, isooctano). La modificación estructural del sustrato, como la sustitución del grupo hidroxilo en posición  $\alpha$ , por un grupo más hidrofóbico y voluminoso como el benciloxi, mejora los resultados de enantioselectividad, aunque no de manera notable. Por otro lado el reemplazo de la cadena alifática de la porción acilo del 2-hidroxiéster, por un anillo aromático, determina que el proceso biocatalítico de aminólisis ocurra con alta enantioselectividad.

4. El dioxano es un excelente disolvente para la aminólisis enzimática de 2-hidroxiésteres, suprimiendo la reacción química y favoreciendo el proceso catalizado por la enzima. Sin embargo, disolventes hidrofóbicos como isooctano no suprimen la reactividad de la amina, ocurriendo el proceso no catalizado más rápidamente en comparación con el dioxano.

5. Las 2-hidroxi-lactonas probadas (2-hidroxi-butirilactona y 3,3-dimetil-2-hidroxi-butirilactona) son muy reactivas a la temperatura de los ensayos (28-30°C) y no son sustratos para la CAL.

6. La aminólisis de 2-hidroxiésteres más funcionalizados, ocurre fácilmente con excelente regioselectividad con los dos sustratos probados: en el caso del malato de dimetilo, sin embargo, ocurre con una baja estereoselectividad. Con el itaconato de dimetilo el proceso también ocurre con una excelente regioselectividad.

**En resumen, en el presente trabajo, se estudió la aminólisis enzimática de 2-hidroxiésteres simples y funcionalizados en disolventes orgánicos con aminas, y los resultados indican que es posible obtener las amidas de compuestos simples y polifuncionales de manera más rápida, simple y con mejores rendimientos de los productos, que el procedimiento de aminólisis química de los ésteres mediante calentamiento, efectuado en este trabajo. La principal aportación de este trabajo es la de presentar una valiosa alternativa a los procedimientos descritos por las condiciones suaves de reacción, lo fácil de su manejo y los rendimientos de las amidas obtenidas.**

**Finalmente, aunque el proceso ocurre con un buen grado de regioselectividad, produce una baja estereoselectividad. La razón de este último aspecto es aún desconocida, por lo que en futuros trabajos, deberán realizarse estudios de modelamiento molecular. En aras de obtener la enantioselectividad deseada, deberán realizarse estudios a nivel de variaciones en las condiciones de reacción como son: el tipo de enzima, o bien el utilizar equivalentes sintéticos de los 2-hidroxiésteres.**

## ***IX. PARTE EXPERIMENTAL***



## IX.1 MATERIALES Y MÉTODOS:

### TÉCNICAS INSTRUMENTALES DE USO GENERAL

**Puntos de Fusión:** se determinaron en un aparato "Büchi" modelo 510 y no están corregidos.

**Espectros de Infrarrojo:** se determinaron en equipos Perkin-Elmer, modelos Paragón 500 y Paragón 1000 con transformada de Fourier, utilizando soluciones tanto de las muestras sólidas como de las líquidas en una concentración de 5-10 mg/ml en  $\text{CHCl}_3$  ó acetona como disolventes, utilizándose celdas de KBr ó mediante el dispositivo HATR.

**Espectros de RMN de Hidrógeno ( $\text{RMN-}^1\text{H}$ ):** se efectuaron en varios tipos de equipos; Varian de 250 y 300 Mhz, Bruker AC 200 de 200 Mhz y Bruker AC 300 de 300 Mhz. Los espectros de RMN de flúor ( $\text{RMN-}^{19}\text{F}$ ) se efectuaron en la frecuencia del núcleo de  $^{19}\text{F}$  de los equipos Bruker. Los valores de desplazamiento químico se expresan en ppm respecto al TMS, usado como la referencia interna y como disolvente  $\text{CDCl}_3$ .

**Espectros de masas:** se llevaron a cabo en un equipo acoplado de cromatografía de gases-espectrometría de masas de la marca Shimadzu modelo QP-5050, mediante la técnica de impacto electrónico (75 eV), utilizándose un analizador de tipo cuadrupolar.

**La medición de rotación óptica:** se realizó en 2 polarímetros, un Perkin-elmer modelo 241, y un modelo 341 en unidades de  $10^{-1}$  grado. $\text{cm}^2.\text{g}^{-1}$ , utilizando la línea D del sodio.

**Cromatografía de Gases:** las bioconversiones fueron seguidas por cromatografía de gases, bajo las siguientes condiciones: como fase estacionaria una columna de Supelcowax 10, 30 m de longitud, 0.32 mm de diámetro interno y 1.00  $\mu\text{m}$  de espesor de película, gas acarreador  $\text{N}_2$  y detector de ionización de flama.), temperaturas del inyector y del detector 250°C, con una rampa de temperatura de la columna: la inicial de 130°C, y la final de 210°C (20°C/min.) durante 15 min. Se utilizó un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5890 Series II.

Los excesos enantioméricos: se determinaron por RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>19</sup>F en el mismo equipo a partir de los ésteres de Mosher correspondientes. También se utilizó el sistema acoplado de CG-EM mencionado arriba, con la columna quiral Cydex (una β-ciclodextrina). Alternativamente el *e. e.* fue medido en un equipo de CLAR de la marca Shimadzu, modelo LC-10AD equipado con una columna quiral “Chiralcel-OD” de DAICEL INDUSTRIES y un detector de fotodiodos a 210 nm.

## ENZIMAS Y REACTIVOS DE USO GENERAL.

**Cromatografía en capa fina:** se utilizaron cromatofolios de Merck de gel de sílice 60 (espesor 0.25 mm) que incorporan revelador para luz ultravioleta.

Para el revelado de las placas se utilizó una solución acuosa de K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub> al 5 %, Yodo y luz U.V., o bien una solución de KMnO<sub>4</sub> al 1 % en solución acuosa-alcalina (2.5 g KMnO<sub>4</sub> 12.5 NaOH y 12.5 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 250 mL).

**Cromatografía en columna:** se utilizó gel de sílice 60 de Merck (230-240 mallas) y mezclas de Hexano-AcOEt, AcOEt-EtOH, como eluyentes.

### Enzimas:

Enzima	Compañía
Lipasa de <i>Candida antarctica</i>	Novo Nordisk.
Lipasa de <i>Candida cylindracea</i>	Sigma-Aldrich.
Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i>	Amano.
Proteinasa de <i>Bacillus licheniformis</i>	Solvay Enzimes.
Proteinasa de <i>Bacillus alcalophyllus</i>	Solvay Enzimes.
Proteasas α- Quimiotripsina y Papaína	Sigma-Aldrich.

**Sustratos y reactivos:** se adquirieron de Sigma-Aldrich, Fluka y Baker.

**Disolventes:** se adquirieron de Merck ó Baker de grado R. A.

## DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS EXPERIMENTALES GENERALES

### PURIFICACIÓN Y SECADO DE LOS DISOLVENTES ORGÁNICOS:

En base a lo reportado en la literatura, los disolventes requeridos para las reacciones químicas y catalizadas por enzimas, se purificaron vía el siguiente procedimiento: i) Los disolventes se sometieron a reflujo en presencia de sodio metálico: dioxano e isooctano, ii) Purificación mediante destilación fraccionada, iii) Almacenamiento en recipientes ámbar, utilizando mallas moleculares de 3Å, para mantenerlos anhidros.<sup>198, 199</sup>

El dioxano, THF, éter diisopropílico y metil *t*-butil éter se sometieron a reflujo durante 12 h con sodio metálico, se destilaron y se almacenaron sobre mallas moleculares de 3Å. La piridina se sometió a reflujo durante 12 h con lentejas de hidróxido de potasio, se destiló y se recibió sobre mallas moleculares de 3Å. El tolueno y el isooctano, se sometieron a reflujo durante 6 h sobre sodio metálico, se destilaron y se recibieron sobre mallas moleculares de 3Å. El *t*-Butanol y el acetonitrilo se destilaron dos veces con una columna de fraccionamiento al vacío y se preservaron sobre mallas moleculares de 3Å.

### Seguimiento de las reacciones químicas y enzimáticas:

El seguimiento se llevó a cabo retirando una muestra pequeña (de 5 µL) con una jeringa, disolviendo en unas gotas de diclorometano y aplicando una gota pequeña en una placa de 5 cm x 5 cm de silicagel soportada en placa de aluminio, y eluyendo con mezclas de hexano: acetato de etilo en diferentes proporciones. Los reveladores utilizados se mencionaron anteriormente, y se aplicó un calentamiento a 50 a 70°C. El avance de las transformaciones químicas (y posteriormente las enzimáticas), se realizó mediante la observación de la desaparición de las materias primas o aparición de los productos, en base a su  $R_f$  en placa fina, ó su  $t_R$  en cromatografía de gases.

### **Aislamiento y purificación de los productos:**

La purificación de las mezclas de las reacciones se realizó mediante cromatografía preparativa en placa fina, en columna flash convencional, mediante destilación con vacío, ó mediante recristalización.

### **Elucidación estructural:**

Mediante las técnicas espectrofotométricas comunes como: Espectroscopía infrarroja, Espectrometría de Masas y Resonancia magnética nuclear.

### **Aminólisis química: preparación de los productos, 2-hidroxiamidas mediante síntesis química.**

Se mezclaron cantidades equimoleculares del 2-hidroxiéster ó de la 2-hidroxilactona y de la amina. La mezcla se calentó a reflujo durante un cierto período de tiempo, hasta la desaparición de las materias primas, y la observación en forma importante de los productos correspondientes.

### **Preparación de 2-hidroxiésteres (36) y (38), comercialmente no disponibles mediante síntesis química.**

#### **Acoplamiento con DCC<sup>200-201</sup>**

Utilizando atmósfera de nitrógeno, se pesaron 2 meq. del ácido carboxílico (2-hidroxiisopentanoico ó del ácido 2-hidroxiocetanoico) y se adicionaron 10 mL de etanol absoluto. A la solución anterior, se adicionaron 1.05 meq. de DCC, y la mezcla resultante se agitó durante 12 h. Se filtró la solución resultante para remover la dicitohexilurea y la fase líquida se concentró y el éster etílico crudo se purificó por CC.

**Preparación de la 2-oxo-3,3-dimetil- $\gamma$ -butirolactona (28).**

A una solución 20 mmol de 2-hidroxi-3,3-dimetil- $\gamma$ -butirolactona (pantolactona (5)) en 25 mL de tetracloruro de carbono, se adicionó en 1.5 h, una solución de bromo (7.03 g, 43.45 mmoles) en 43 mL de tetracloruro de carbono a temperatura ambiente. Se calentó a reflujo 3.5 h y se dejó agitando toda la noche a temperatura ambiente. Se removió el disolvente mediante rotavapor. Se adicionaron a la mezcla anterior 20 mL de cloruro de metileno y se puso a reflujo, pero el producto sólo se disolvió parcialmente. Posteriormente se adicionaron 20 mL de cloroformo y se reflujo durante 1.5 h, disolviéndose mayor cantidad del producto. Se decantó la solución de color rojizo, se adicionó 1 g de carbón activado, se reflujo durante 0.5 h y se filtró sobre celita. La mezcla se concentró a la mitad de su volúmen, se enfrió y de la solución se obtuvieron unos cristales blancos, puros por cromatografía en capa fina,  $R_f=65-67^\circ\text{C}$ , con un rendimiento práctico del 90%.

**Aminólisis enzimática preliminar.**

Se prepararon soluciones de 1.5 mmol/mL de cada sustrato (lactato de *n*-butilo (1), 2-hidroxi- $\gamma$ -butirolactona (4) y pantolactona (5)) en 2 mL de dioxano y se les adicionaron 135 mg de la enzima CAL, ó 200 mg de la enzima papaína y finalmente se adicionaron 1.5 mmol (2 mL de la solución de la amina en dioxano) a cada uno de los sustratos. Se llevó a agitación orbital a una temperatura de 28-30°C. Conjuntamente, se llevaron a cabo las reacciones de los testigos, preparando los viales que contenían cada uno de los reactantes, pero sin la enzima.

La reacción se siguió a intervalos de tiempo: a las 1, 2, 4, 6, 24, 48 h, a los 3, 4, 5, 6, 7 días, e incluso a las 2, 3 y hasta 4 semanas en algunos casos. Al tiempo en que se detectó la aparición de un producto con la desaparición consecuente del sustrato, se filtró la suspensión de la enzima y se lavó con cloruro de metileno. La solución resultante se concentró en evaporador rotatorio. Se aislaron y purificaron los productos por cromatografía en columna y se prepararon muestras puras y secas de los productos para su determinación estructural mediante IR y RMN.

**Intento de aminólisis de acetato de etilo mediante catálisis con esterasas.**

Se pesó la cantidad de enzima equivalente a 7000 PLU de CAL, en viales de 5 mL y se adaptó un septum. Se secó al alto vacío durante 15 minutos y se despresurizó con nitrógeno. Se adicionaron 3 mL de acetato de etilo con jeringa hipodérmica y finalmente se adicionaron 109  $\mu\text{L}$  de bencilamina. La mezcla de reacción se llevó a agitación orbital, a la temperatura indicada y se muestreó y analizó periódicamente mediante CCF.

**Procedimiento I para la aminólisis enzimática.**

Se pesaron 1.5 mmoles del éster etílico ó *n*-butílico del ácido láctico racémico ó quiral en viales de 5 mL y se adicionaron 2 ml de dioxano. A la mezcla anterior, se adicionaron 135 mg de la enzima CAL y posteriormente 1.4 mmoles (en 2 mL de dioxano) de cada una de las aminas: (*n*-butilamina (6), *n*-amilamina (25) *n*-hexilamina (14), 3-aminopropanol (16), ciclohexilamina (15), anilina (18), 2-aminoetanol (28),  $\alpha$ -metilbencilamina (7) y *sec*-butilamina (17). Simultáneamente, se preparó un vial testigo, para cada una de las reacciones enzimáticas con cada amina donde no se incluyó la enzima. Los viales se llevaron a agitación orbital, siguiéndose a diferentes intervalos de tiempo: 0.5, 1, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6, 8, 24, 48, 72 h. Al cabo del tiempo de la biotransformación, se filtró la solución de la enzima y se lavó con cloruro de metileno, para posteriormente concentrar en un evaporador rotatorio. Los productos se aislaron y purificaron por CCF preparativa o cromatografía en columna, y finalmente los productos aislados se analizaron por IR y RMN- $^1\text{H}$ .

**Procedimiento II para la aminólisis enzimática.**

Se pesaron 400 mg de CAL en viales de 5 mL y se adaptó un septum. La mezcla de reacción se secó al alto vacío durante 15 min y entonces se despresurizó mediante la introducción de nitrógeno. Con una microjeringa se adicionó el sustrato acilante (2.0 mmoles), seguido de la adición de 4 mL de dioxano seco (con una jeringa hipodérmica), y finalmente se adicionaron 2.1 mmol de la amina (*n*-butilamina (6) y  $\alpha$ -metilbencilamina (7)). El vial con la

mezcla de reacción, se llevó a agitación orbital a 28-30°C. Simultáneamente, se prepararon los viales testigo que contienen cada uno de los reactantes sin la enzima.

La reacción se analizó a intervalos regulares de tiempo de: 15 min, 30 min, 1, 2, 4, 6, 20 y 24 h. En cada uno de estos intervalos, se toma una muestra de 2-5  $\mu\text{L}$ , se diluye con con cloruro de metileno y se analiza mediante las técnicas correspondientes (CCF ó CG). Al finalizar la reacción, la mezcla de reacción se filtró al vacío, y la enzima se lavó con 5 mL de cloruro de metileno y la solución filtrada se concentró en un evaporador rotatorio. Los productos se aislaron y purificaron por CC y se caracterizaron mediante IR y RMN- $^1\text{H}$ .

#### **Procedimiento para el estudio de la estereoselectividad de la aminólisis de 2-hidroxipentanoato de etilo (35) catalizada por CAL en dioxano.**

En uno de 2 viales de 5 mL se pesaron 300 mg de CAL y se adaptó un septum. Al otro vial (del testigo) no se adicionó la enzima. Ambos viales se secaron al alto vacío (aproximadamente 1-3 mm de Hg) durante 15 min y entonces se despresurizaron con nitrógeno gaseoso. Se adicionaron 12 mL de dioxano a cada uno de los viales y posteriormente se adicionaron 450  $\mu\text{L}$  de 2-hidroxipentanoato de etilo con una microjeringa, y finalmente 163  $\mu\text{L}$  de bencilamina. Se llevó a agitación orbital a 28-30°C. A las 6 h se detuvo la reacción, filtrándose la mezcla de reacción para separar la enzima, que se lavó con 5 mL de cloruro de metileno y la solución filtrada se concentró en un evaporador rotatorio. El residuo se sometió a purificación por CC flash, utilizando hexano:acetato de etilo (2:1) y seguido de los mismos disolventes en proporción 1:1, para obtener, después de concentración en el evaporador rotatorio seguido de secado a la N-(bencil)-2-hidroxipentanamida (47). Se determinó el espectro de RMN- $^1\text{H}$  que se muestra en la Figura (VII.5).

#### **Obtención del cloruro del ácido de Mosher.**<sup>202-203</sup>

Se depositaron 3.4 g del ácido de Mosher (ácido- $\alpha$ -metoxi- $\alpha$ -(trifluorometil) fenilacético) solidificado (almacenado a 4°C), en un bulbo bajo atmósfera de nitrógeno. Se adicionaron 40 mL (52 equivalentes) de cloruro de tionilo. La mezcla se tornó clara

homogénea, se le adaptó un bulbo bajo corriente de nitrógeno y se dejó a reflujo por toda la noche. Cuando la reacción estuvo completa, se ensambló un equipo de microdestilación al vacío y se destiló el cloruro de Mosher a 65-75°C, como un líquido claro incoloro.

**Obtención de los derivados de Mosher (48 y 49) de los 2-hidroxiésteres (35 y 3) y 2-hidroxiamidas (47 y 9).**<sup>204-205</sup>

A una cantidad determinada del 2-hidroxiéster o la 2-hidroxiamida (20-30 mg), pesada en un vial, se adicionó 1.6 equivalentes de 4-N, N-dimetilamino anilina, y se secó al alto vacío durante 15 min. a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, se despresurizó con nitrógeno, y entonces se adicionaron 1.5 mL de cloruro de metileno seco (recién destilado) y enseguida se adicionaron 1.5 equivalentes del cloruro de Mosher. A las 3 h, se paró la reacción, a través de neutralización con 1 mL de HCl 1N y enseguida con 1 mL de una solución saturada de bicarbonato de sodio. El derivado obtenido se secó con sulfato de sodio y luego al alto vacío, y se determinó el espectro de RMN-<sup>19</sup>F.

**Preparación de 2-benciloxi propionato de etilo (48).**

En un matraz bola de 25 mL seco, se pesaron 8.2 mmoles de NaH, y se adicionaron con jeringa (a través de septum de hule), 7 mL de THF seco. A la suspensión anterior, se le adicionaron 6.84 mmoles de bromuro de bencilo, y mientras se mantuvo enfriado con hielo, y con agitación, se adicionaron gota a gota 6.84 mmoles de lactato de *n*-butilo (1). La mezcla se tornó ligeramente amarillenta, hacia el final de la adición del éster. Se dejó en hielo durante 10 min. y posteriormente a temperatura ambiente durante 4 h. A la mezcla resultante, se adicionaron 2 mL de HCl 1N. Se separó la fase orgánica y se lavó con agua hasta un pH final de 6 (5x5 mL). Se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró en un evaporador rotatorio. El producto aceitoso de color ligeramente amarillento y olor pungente, se purificó por CC *flash* (hex:AcOEt, 9:1). El espectro de RMN-<sup>1</sup>H de (48) se muestra en la Figura (VII.11).

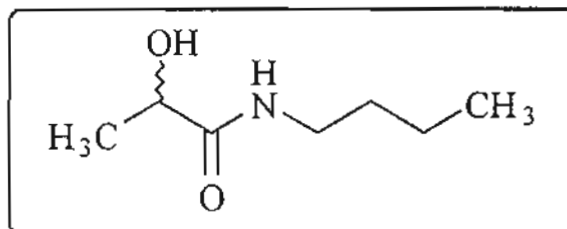


### Aminólisis catalizada por CAL de 2-benciloxi propionato de etilo (48).

En uno de 2 viales de 5 mL se pesaron 472 mg de CAL y se adaptó un septum. Al otro vial (del testigo) no se adicionó la enzima. Ambos viales, se secaron al alto vacío durante 15 minutos y entonces se despresurizaron con nitrógeno. A cada uno de los viales se adicionaron 5 mL de cloruro de metileno y posteriormente con una microjeringa, se adicionaron 472 mg (2 mmoles) del 2-benciloxipropionato de etilo (48), y finalmente, a cada uno de los viales se adicionaron 2 mmoles (109  $\mu$ L) de bencilamina. El vial con la mezcla de reacción se llevó a agitación orbital a 30°C. La reacción se detuvo a las 10.5 h, se filtró la enzima, se lavó con cloruro de metileno y se evaporaron los disolventes mediante rotavapor. El residuo se sometió a purificación por CC Flash, utilizando hexano:acetato (8:2), seguido de 1:1. Se obtuvo aproximadamente 20% del producto (51). El espectro de RMN-<sup>1</sup>H de (51) se muestra en la Figura (VII.12).

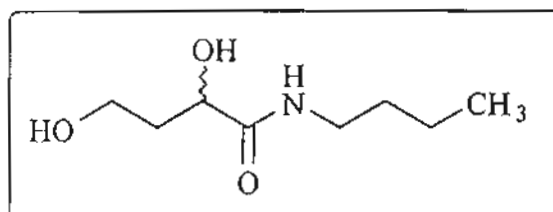
El exceso enantiomérico de reactantes y productos se determinó por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) usando una columna quiral, de acuerdo con el siguiente procedimiento: se procedió a preparar 8 viales de 9 mL. A 4 de ellos se adicionó 1 mg del éster y la amida racémicos y quirales. A cada uno de los viales anteriores, se adicionó 0.2 mL de isopropanol, seguido de 3.8 mL de hexano. Así, la concentración de cada compuesto fue de 0.25 mg/mL (en la mezcla de isopropanol al 5% en hexano). Se filtró cada una de las soluciones anteriores en los 4 viales limpios restantes, de los cuales se tomaron 20  $\mu$ L con microjeringa, para analizar la composición enantiomérica, mediante HPLC a un flujo de 0.8 mL/min, 3% de isopropanol (hexano) para los sustratos:  $t_R$  6.729 y 8.225 para cada enantiómero respectivamente; y un flujo de 0.8 mL/min, 5% de isopropanol (hexano) para los productos,  $t_R$  17.976 y 19.749 para cada enantiómero respectivamente.

## IX.2 DATOS ESPECTROSCÓPICOS DE ALGUNOS COMPUESTOS:

N-(*n*-butil)-2-hidroxiopropanamida

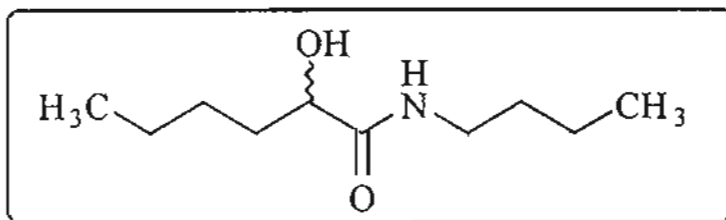
*IR* (película),  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3327 (OH, NH), 1654 (C=O, amida I), 1542 (O=C-NH, amida II).

*RMN*  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 0.92 (t, 3H,  $\underline{\text{CH}_3}$ - $\text{CH}_2$ ), 1.4 (d, 3H,  $\underline{\text{CH}_3}$ -CH), 1.3-1.6 (m, 4H,  $2\underline{\text{CH}_2}$ ), 3.25 (t d, 2H,  $\underline{\text{CH}_2}$ -N), 4.2 (q, 1H,  $\underline{\text{CH}}$ -OH), 4.4 (s ancho,  $\underline{\text{H}}$ -O-CH intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ), 6.9 (s ancho, N- $\underline{\text{H}}$ , no intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ).

N-(*n*-butil)-2,4-dihidroxiбутanamida

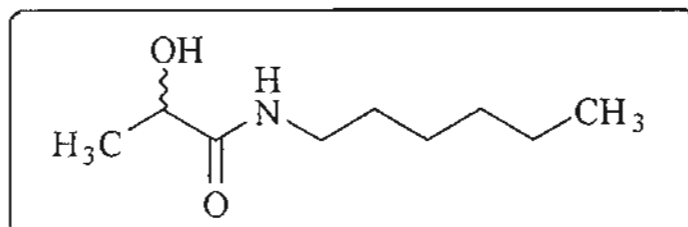
*IR* (película),  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3328 (OH, NH), 1653 (C=O, amida I), 1527 (O=C-NH, amida II).

*RMN*  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.15 (t, 3H,  $\underline{\text{CH}_3}$ ), 1.3-1.8 (m, 6H,  $3\underline{\text{CH}_2}$ ), 2.98 (s ancho,  $\underline{\text{H}}$ -O- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$  intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ), 3.27 (t d, 2H,  $\underline{\text{CH}_2}$ -N), 4.5 (s ancho,  $\underline{\text{H}}$ -O-CH intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ), 3.85 (m, 2H,  $\underline{\text{CH}_2}$ -OH), 4.25 (q, 1H,  $\underline{\text{CH}}$ -OH), 6.8 (s ancho, N- $\underline{\text{H}}$ , no intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ).

N-(*n*-butil)2-Hidroxihexanamida

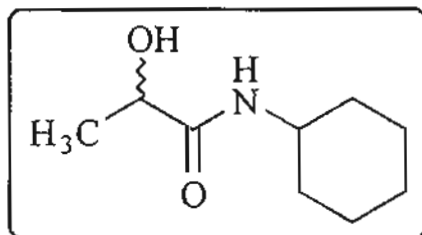
*IR* (película),  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3253 (OH, NH), 1613 (C=O, amida I), 1536 (O=C-NH, amida II).

*RMN*  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 0.93 (t, 6H,  $2\text{CH}_3$ ), 1.2-2.0 (m, 10H, 5  $\text{CH}_2$ ), 2.2 (s, 1H,  $\text{CH-OH}$ , intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ), 3.3 (t d, 2H,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 4.1 (q, 1H,  $\text{CH-OH}$ ), 6.5 (s ancho, N-H, no intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ).

N-(*n*-hexil)-2-hidroxiopropanamida

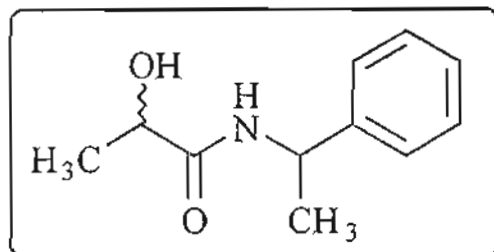
*IR* (película),  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3397 (OH, NH), 1652 (C=O, amida I), 1540 (O=C-NH, amida II).

*RMN*  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 0.92 (t, 3H,  $\text{CH-CH}_3$ ), 1.1-1.9 (m, 11H,  $\text{CH}_3$ , 4  $\text{CH}_2$ ), 2.87 (s ancho,  $\text{H-O-CH}$  intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ), 3.28 (t d, 2H,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ), 4.22 (q, 1H,  $\text{CH-OH}$ ), 6.56 (s ancho, N-H, no intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ).

**N-(ciclohexil)-2-hidroxiopropanamida**

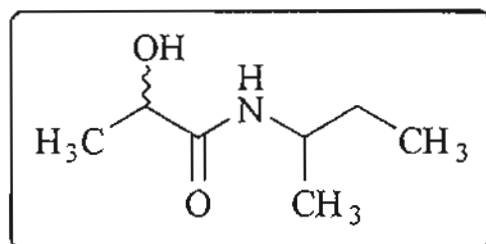
*IR* (película),  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3395 (OH, NH), 1648 (C=O, amida I), 1534 (O=C-NH, amida II).

*RMN*  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.1-1.9 (m, 10H, 5  $\text{CH}_2$ ), 1.35 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.61 (s ancho,  $\text{H-O-CH}$  intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ), 3.72-3.94 (m, 1H,  $\text{CH-NH}$ ), 4.2 (q, 1H,  $\text{CH-OH}$ ), 6.5 (s ancho, N-H, no intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ).

**N-( $\alpha$ -metilbencil)-2-hidroxiopropanamida**

*IR* (película),  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3395 (OH, NH), 1650 (C=O, amida I), 1537 (O=C-NH, amida II).

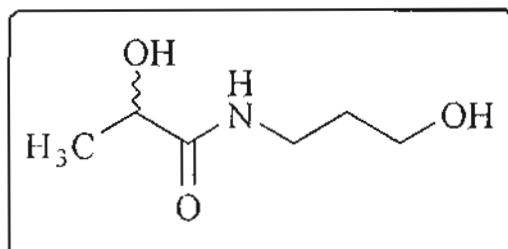
*RMN*  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.35 (d, 3H,  $\text{HOCHCH}_3$ ), 1.50 (d, 3H,  $\text{NH-CHCH}_3$ ), 4.0 (q, 1H,  $\text{CH-OH}$ ), 4.15 (s ancho,  $\text{H-O-CH}$  intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ), 5.0-5.15 (m, 1H,  $\text{HN-CH-Ph}$ ), 7.05 (s ancho, N-H, no intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ), 7.2-7.4 (m, 5H, Ph).

N-(*sec*-butil)-2-hidroxiopropanamida

*IR* (película),  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3320 (OH, NH), 1649 (C=O, amida I), 1541 (O=C-NH, amida II).

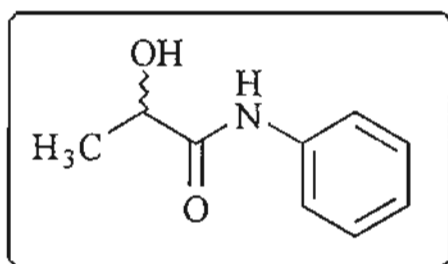
*RMN*<sup>1</sup>*H* (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.25 (t, 3H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ ), 1.3-1.45 (m, 6H, 2 $\text{CH}_3$ ), 1.6 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.89 (m, 1H,  $\text{CH-NH}$ ), 3.1 (s ancho,  $\text{H-O-CH}$  intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ), 5.0 (q, 1H,  $\text{CH-OH}$ ), 6.7 (s ancho,  $\text{N-H}$ , no intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ).

## N-(3-hidroxiopropil)-2-hidroxiopropanamida



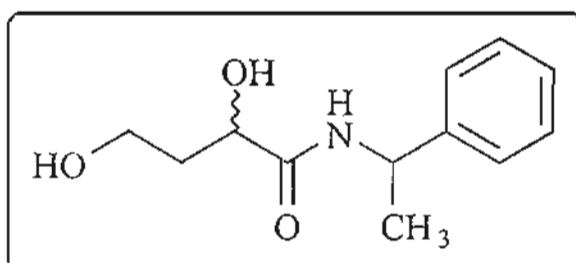
*IR* (película),  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3344 (OH, NH), 1650 (C=O, amida I), 1545 (O=C-NH, amida II).

*RMN*<sup>1</sup>*H* (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.35-1.45 (d, 3H,  $\text{HOCHCH}_3$ ), 1.6-1.8 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.9 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{-NH}$ ,  $\text{H-O-CH}$ ), 3.65 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-OH}$ ), 5.0 (q, 1H,  $\text{CH-OH}$ ), 6.9 (s ancho,  $\text{N-H}$ , no intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ).

**N-(fenil)-2-hidroxiopropanamida**

*IR* (película),  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3366 (OH, NH), 1654 (C=O, amida I), 1534 (O=C-NH, amida II).

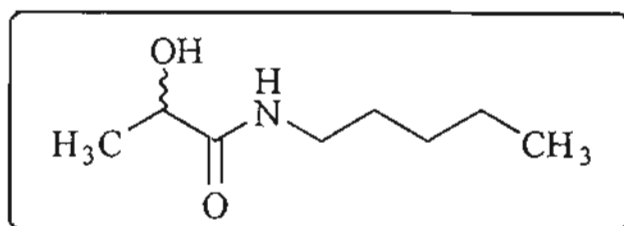
*RMN*  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.4 (d, 3H,  $\underline{\text{CH}_3}$ -CH), 1.7 (s ancho,  $\underline{\text{H}}$ -O-CH intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ), 5.0 (q, 1H,  $\underline{\text{CH}}$ -OH), 5.89 (s ancho, N- $\underline{\text{H}}$ , no intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ), 6.3-7.0 (m, 5H, Ph).

**N-(1-fenil-1-etil)-2,4-dihidroxiбутiramida**

*IR* (película),  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3386 (OH, NH), 1642 (C=O, amida I), 1522 (O=C-NH, amida II).

*RMN*  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.7 (m, 2H,  $\underline{\text{CH}_2}$ ), 1.89 (d, 3H,  $\underline{\text{CH}_3}$ ), 2.7 (s ancho,  $\underline{\text{H}}$ -O- $\text{CH}_2$  intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ), 3.68 (s, 1H,  $\underline{\text{H}}$ -O-CH intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ), 3.85 (m, 2H,  $\underline{\text{CH}_2}$ -OH), 4.0 (q, 1H,  $\underline{\text{CH}}$ -NH), 5.25 (m, 1H,  $\underline{\text{CH}}$ -OH), 6.6 (s ancho, N- $\underline{\text{H}}$ , no intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ), 7.29 (s, 5H, Ph).

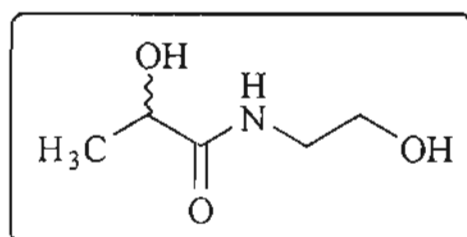
## N-(pentil)-2-hidroxiopropanamida



*IR* (película),  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3329 (OH, NH), 1652 (C=O, amida I), 1541 (O=C-NH, amida II).

*RMN*  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.15 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.35-1.45 (m, 7H, HO- $\text{CH}_3$ , 2  $\text{CH}_2$ ), 1.55-1.7 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -NH), 2.2 (s ancho,  $\text{H-O-CH}$  intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ), 2.6-2.72 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ -NH), 5.0 (m, 1H,  $\text{CH-OH}$ ), 6.25 (s ancho, N-H, no intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ).

## N-(2-hidroxiethyl)-2-hidroxiopropanamida



*IR* (película),  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3397 (OH, NH), 1652 (C=O, amida I), 1540 (O=C-NH, amida II).

*RMN*  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm): 1.4 (d, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.65 (s ancho, 1H,  $\text{H-O-CH}_2$  intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ), 2.6 (s ancho,  $\text{H-O-CH}$  intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ), 2.75 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ -NH), 3.85 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ -OH), 5.0 (m, 1H,  $\text{CH-OH}$ ), 5.95 (s ancho, N-H, no intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ ).

## ***X. BIBLIOGRAFÍA***



1. Poppe, L. & Novak, L., "Selective Biocatalysis: A synthetic approach", Weinheim, New York, Cambridge, Basel, VCH, 1992.
2. Santaniello, E., Ferraboschi, P., Grisenti, P. & Manzacchi, A., *Chem Rev.*, 1992, 92, 1071-1040.
3. Yamada, H. & Shimizu, S., *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 1988, 27, 622-642.
4. Davies, H. G., Green, R. H., Kelly, D. R. & Roberts, S. M., "Biotransformations in Preparative Organic Chemistry, Best Synthetic Methods", 1989, Academic Press, London, U. K.
5. Chen, C. -S. & Sih, C. J., *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.*, 1989, 28, 695-707.
6. a) Turner, N. J., *Nat. Prod. Reports*, 1992, 1-15.  
b) *ibid*, *Nat. Prod. Reports*, 1994, 1-15.
7. Parida, S., & Dordick, J. S., *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, 2253-2259.
8. Strauss, U. T., Felfer, U., & Faber, K., *Tetrahedron: Asymmetry*, 1999, 10, 107-117.
9. Dordick, J. S., "Principles and applications of non aqueous enzymology", 1-51. En *Applied Biocatalysis, Vol. I*, Blanch, C. H. W. & Clark, D. S. Eds. Marcel Dekker, Inc. New York, 1991.
10. Hang, J. Y. & Arnold, F. H., "Enzyme Design For Non Aqueous Solvents", 53-86. En *Applied Biocatalysis, Vol. I*, Blanch, C. H. W. & Clark, D. S. Eds. Marcel Dekker, Inc. New York, 1991.
11. Dastoli, F. R., Musto, N. A. & Price, S., *Arch. Biochem. Biophys.*, 1966, 115, 44-47; *ibid*, 1967, 122, 289-291.
12. Yamada, H., *CHIMIA*, 1993, 47, 69-74.
13. Cambou, B. & Klivanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, 244, 1249-1251.
14. Zaks, A. & Klivanov, A. M., *Science*, 1984, 224, 1249-1251.
15. Kitchner, G., Scollar, M. P. & Klivanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, 107, 7072-7076.
16. Zaks, A. & Klivanov, A. M., *J. Biol. Chem.*, 1988, 263, 3194-3201.
17. Griebenow, A. & Klivanov, A. M., *Biotechnol. Bioeng.*, 1997, 53, 351-362.
18. Desai, U. R. & Klivanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, 3940-3945.
19. Guim, R. M., Skerker, P., Kavanaugh, P. & Clark, D. S., *Biotechnol. Bioeng.*, 1991, 37, 303-308.

20. Burke, P. A., Bachovchin, W. W., Smith, S. O. & Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 8290-8291.
21. Burke, P. A., Griffin, R. G. & Klibanov, A. M., *Biotechnol. Bioeng.*, **1993**, *42*, 87-94.
22. Parker, M. C., Moore, B. D. & Blaker, A. J., *Biotechnol. Bioeng.*, **1995**, *46*, 452-458.
23. Klibanov, A. M., *Trends Biochem. Sci.*, **1989**, *14*, 141-144.
24. Gorman, L. & Dordick, J. S., *Biotechnol. Bioeng.*, **1992**, *39*, 392-397.
25. Ryu, K. & Dordick, J. S., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 8026-8027.
26. Chatterjee, S. & Russell, A. J., *Biotechnol. Bioeng.*, **1992**, *40*, 1069-1077.
27. Halling, P. J., *Enzyme Microb. Technol.*, **1994**, *16*, 178-206.
28. van Tol, J. B. A., Stevens, R. M. N, Veldhuizen, W. J., Jongejan, J. A. & Duine, J. A., *Biotechnol. Bioeng.*, **1995**, *47*, 71-81.
29. Wescott, C. R. & Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 10362-10363.
30. Nakamura, K., Takebe, Y., Kitayama, T. & Ohno, A., *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 4941-4944.
31. Ottolina, G., Gianinetti, F., Riva, S. & Carrea, G., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 535-536.
32. Klibanov, A. M., *CHEMTECH*, **1986**, 354-359.
33. Zaks, A. & Klibanov, A. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1985**, *82*, 3192-3196.
34. Sonnet, P. E., *CHEMTECH*, **1988**, 94-98.
35. Wong, C. -H., *Science*, **1989**, *244*, 1146-1152.
36. Zaks, A. & Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 2767-2768.
37. Therisod, M. & Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 5638-5640.
38. Therisod, M. & Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 3977-3981.
39. Riva, S. & Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 3291-3295.
40. Wescott, C. R. & Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 1629-1631.
41. Malcata, F.X., Reyes, H. R., García, H. S., Hill, C. G., & Admunson, C. H., *Enzyme Microb. Technol.*, **1992**, *14*, 426-446.
42. Cygler, M., Grochulski, P., Kazlauskas, R. J., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Rubin, B., Serrequi, A.N. & Gupta, A.K., *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 3180-3186.
43. Blackburn, S., "*Enzyme Structure and Function*", Marcel Dekker, Inc. New-York, **1976**.

44. Fersht, A., *"Enzyme Structure and Mechanism"*, 2nd Ed., Freeman Publications, San Francisco, 1985.
45. Walsh, C., *"Enzymatic Reaction Mechanisms"*, Freeman Publications, San Francisco, 1979.
46. Kanerva, L. T. & Klivanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 6864-6865.
47. Adams, K., Chung, S. H. & Klivanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 9418-9419.
48. Johnson, C. R., *Acc. Chem. Res.*, **1998**, *31*, 333-341.
49. Roberts, S. M., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1998**, 157-169.
50. Schmid, R. D. & Robert, V., *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.*, **1998**, *37*, 1608-1633.
51. Whitesides, G. M. & Wong, C.-H., *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.*, **1985**, *24*, 617-718.
52. Margolin, A. L., *Enzyme Microb. Tech.*, **1993**, *15*, 266-280.
53. Sellek, G. A., *Enzyme Microb. Technol.*, **1999**, *21*, 471-482
54. Oberhauser, T., Faber, K. & Griengl, H., *Tetrahedron*, **1989**, *45*, 1679-1682.
55. Burgess, K. & Jennings, L. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 6129-6139.
56. Toone, E. J., Werth, M. J. K. & Jones, J. B., *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 4946-4952.
57. Toone, E. J. & Jones, J. B., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1991**, *2*, 1041-1052.
58. Bjorkling, E., Godtfredsen, S. E. & Kirk, O., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, 934-935.
59. Vorde, C., Högberg, H-E & Hedenström, E., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, *7*, 1507-1413.
60. Uppenberg, J., Patkar, S., Bergfors, T. & Jones, T. A., *J. Mol. Biol.*, **1994**, *235*, 790-792.
61. Tesis de Doctorado: "Biocatálisis con Lipasas en medios orgánicos: Estudios Cinéticos y Aplicaciones en la Modificación Selectiva de Nucleósidos", Luis Fernando García Alles, Departamento de Química Orgánica e Inorgánica, Universidad de Oviedo, **1997**.
62. Uppenberg, J., Ohrner, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G. J., Patkar, S., Waagen, V., Anthonsen, T. & Jones, T. A., *Biochemistry USA*, **1995**, *34*, 16838-16851.
63. Almarson, Ô. & Klivanov, A. M., *Biotechnol. Bioeng.*, **1996**, *49*, 87-92.
64. Fitzpatrick, P. A. & Klivanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 3166-3171.
65. Terradas, F., Teston-Henry, M., Fitzpatrick, P. A. & Klivanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 390-396.

66. Wescott, C. R. & Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, *115*, 10362-10363.
67. Schmitke, J. L., Wescott, C. R. & Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 3360-3365.
68. Wescott, C. R. & Klibanov, A. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1994**, *206*, 1-9.
69. Sakurai, T., Margolin, A. L., Rusell, A. J. & Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 7236-7237.
70. Laane, C., Boeren, S., Vos, K. & Veeger, C. M., *Biotechnol. Bioeng.*, **1987**, *30*, 81-87.
71. Margolin, A. L. & Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 3802-3804.
72. Margolin, A. L., Dar-Fu, T. & Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1987**, *109*, 7885-7887.
73. Gotor, V., En "Microbial Reagents in Organic Synthesis", NATO ASI ser. C381, Servi S, Ed.; Kluwer Acad. Pub.: The Netherlands, **1992**, pp 199-208.
74. Gotor, V., *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, *7*, 2189-2197.
75. Gotor, V., Brieva, R. & Rebolledo, F., *J. Chem., Soc., Chem. Commun.*, **1988**, 957-958.
76. Kagan, H. B., In *Asymmetric Synthesis*; Morrison, J. D., ed., Academic: Orlando, **1985**, 1-39.
77. Kitaguchi, H., Fitzpatrick, P. A., Huber, J. E. & Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 3094-3095.
78. Djeghaba, Z., Deleuze, H., De Jeso, B., Messad, D. & Maillard, B., *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 761-762.
79. Gutman, A. L., Meyer, E., Kalerin, E., Polyak, F. & Sterling, J., *Biotechnol. Bioeng.*, **1992**, *40*, 760-767.
80. Reetz, M. T. & Dreisbach, C., *Chimia*, **1994**, *48*, 570.
81. Reetz, M. T. & Schimossek, K., *Chimia*, **1996**, *50*, 668-669.
82. Gotor, V., Menéndez, E., Moulongui, Z. & Gaset, A., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1993**, 2453-2456.
83. Balkenhohl, F., Ditrich, K., Hauer, B. & Ladner, W., *J. Prakt. Chem.*, **1997**, *339*, 381-384.
84. Orsat, B., Alper, P. B., Moree, W., Mak, C-P. & Wong, C.-H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 712-713.
85. Mattson, A., Orrenius, C., Öhrner, N., Unelius, R. C., Hult, K. & Norin, T., *Acta Chem. Scand.*, **1996**, *50*, 918-921.

86. Alfonso, I., Astorga, C., Rebolledo, F. & Gotor, V., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1996**, 2471.
87. Iglesias, L. E., Sánchez, V., Rebolledo, F. & Gotor, V., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, *8*, 2675-2677.
88. Gotor, V., Brieva, R. & Rebolledo, F., *Tetrahedron Lett.*, **1988**, *29*, 6973-6974.
89. Gotor, V., García, M. J. & Rebolledo, F., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1990**, *1*, 277-278.
90. Brieva, R., Rebolledo, F. & Gotor, V., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1990**, 1386-1387.
91. Tuccio, C., Ferré, E. & Comeau, L., *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 2763-2764.
92. Kobata, K., Yoshikawa, K., Kohashi, M. & Watanabe, T., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 2789-2790.
93. Kobata, K., Kawamura, M., Toyoshima, M., Tamura, Y., Ogawa, S. & Watanabe, T., *Biotech. Lett.*, **1998**, *20*, 451-454.
94. Gotor, V., Brieva, R., Gonzalez, C. & Rebolledo, F., *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 9207-9214.
95. García, M. J., Brieva, R., Rebolledo, F. & Gotor, V., *Biotechnol. Lett.*, **1991**, *13*, 867-870.
96. Quirós, M., Sánchez, V., Brieva, R., Rebolledo, F. & Gotor, V., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, *4*, 1105-1112.
97. Vorde, C., Högberg, H-E. & Hedenström, E., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, *7*, 1507-1513.
98. Rebolledo, F., Brieva, R. & Gotor, V., *Tetrahedron Lett.*, **1989**, *30*, 5345-5346.
99. Puertas, S., Brieva, R., Rebolledo, F. & Gotor, V., *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 4007-4014.
100. Sánchez, V., Rebolledo, F. & Gotor, V., *SYNLETT.*, **1994**, 529-530.
101. García, M. J., Rebolledo, F. & Gotor, V., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1992**, *3*, 1519-1522.
102. García, M. J., Rebolledo, F. & Gotor, V., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1993**, *4*, 2199-2210.
103. García, M. J., Rebolledo, F. & Gotor, V., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1994**, *3*, 1519-1522.
104. Adamczyk, M., & Grote, J., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, *8*, 2509-2512.
105. Sánchez, V. M., Rebolledo, F. & Gotor, V., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, *8*, 37-40.
106. Juaristi, E., Quintana, D. & Escalante, J., *Aldrichimica Acta*, **1994**, *27*, 3-27.
107. Kanerva, L. T., Csomós, P., Sundholm, O., Bernáth, G. & Fulöp, F., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, *7*, 1705-1716.

108. Wang, Y-F., Yakovlevsky, K. & Margolin, A. L., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 5317-5320.
109. Margolin, A. L., *TIBTECH*, **1996**, *14*, 223-230.
110. Gutman, A. L., Meyer, E., Yue, X. & Abell, C., *Tetrahedron Lett.*, **1992**, *33*, 3943-3946.
111. García, M. J., Rebolledo, F. & Gotor, V., *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*, 6141-6142.
112. De Zoete, M. C., Kock-van Dalen, A. C., Van Rantwijk, F. & Sheldon, R. A., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1993**, 1831-1832.
113. Starmans, W. A. J., Doppen, R. G., Thijs, L. & Zwanenburg, L., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, *9*, 429-435.
114. Hacking, M. A. P. J., Wegman, M. A., Rops, J., van Rantwijk, F. & Sheldon, R. A., *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **1998**, *5*, 155-157.
115. García, M. J., Rebolledo, F. & Gotor, V., *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 6935-6940.
116. Chinsky, N., Margolin, A. L. & Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 386-388.
117. Gardossi, L., Bianchi D. & Klibanov, A. M., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 6328-6329.
118. Francalanci, F., Cesti, P., Cabri, W., Bianchi, D., Martinengo, T. & Foá, M., *J. Org. Chem.*, **1987**, *52*, 5079-5082.
119. Luna, A., Astorga, C., Fülöp, F. & Gotor, V., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, *9*, 4483-4487.
120. Luna, A., Maestro, A., Astorga, C. & Gotor, V., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, *10*, 1969-1977.
121. Kanerva, L. T., Kosonen, M., Vántinen, E., Huhtanen, T. T. & Dahlqvist, V., *Acta. Chem. Scand.*, **1992**, *46*, 1101-1105.
122. Maestro, A., Astorga, C. & Gotor, V., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1997**, *8*, 3153-3159.
123. Puertas, S., Rebolledo, F. & Gotor, V., *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 1495-1502.
124. Astorga, C., Rebolledo, F. & Gotor, V., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1994**, 829-832.
125. Quirós, M., Rebolledo, F., & Gotor, V., *J. Chem. Res.*, **1994**, (M), 1917-1934.
126. Quirós, M., Covadonga, A., Rebolledo, F. & Gotor V., *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 7715-7720.
127. Chamorro, C., González-Muñiz, R. & Conde, S., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, *9*, 2343-2352.

128. Conde, S., López-Serrano, P. & Martínez, A., *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **1999**, *7*, 299-306.
129. Oyama, K., & Kihara, K., *CHEMTECH*, **1984**, 100-104.
130. Barber, M., *The Penicillins Business*, Surrey, U. K., **1996**.
131. St. Clair, N. L. & Navia, M. A., *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, *114*, 7314-7316.
132. Margolin, A. L., *Trends in Biotech.*, **1996**, *14*, 219-259.
133. Margolin, A. L., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 6507-6510.
134. Lalonde, J., *CHEMTECH*, **1997**, 38-45.
135. Johnson, C. R., *Tetrahedron*, **1996**, *52*, 3769-3826.
136. Puertas, S., Rebolledo, F. & Gotor, V., *J. Org. Chem.*, **1996**, *61*, 6024-6027.
137. Sánchez, V. M., Rebolledo, F., & Gotor, V., *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 1464-1470.
138. Pozo, M. & Gotor, V., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, *11*, 2797-2802.
139. Alfonso, I., Astorga, C., Rebolledo, F. & Gotor, V., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, *10*, 367-374.
140. Alfonso, I., Astorga, C., Rebolledo, F. & Gotor, V., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, *10*, 2515-2522.
141. García-Urdiales, E., Rebolledo, F. & Gotor, V., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1999**, *10*, 721-726.
142. Vulfson, E., "Novel Surfactants: Preparation, Applications, and Biodegradability", Chapter 9: Holmberg, K., ed., Marcel Dekker, Inc., New York, **1998**.
143. Vulfson, E. N., *Enzyme Microb. Tech.*, **1996**, *18*, 162-183.
144. Pulido, R. & Gotor, V., *Carbohydr. Res.*, **1994**, *252*, 55-68.
145. Morís, F. & Gotor, V., *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 2490-2492.
146. Morís, F. & Gotor, V., *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 9869-9876.
147. Morís, F. & Gotor, V., *J. Org. Chem.*, **1993**, *58*, 653-660.
148. Pozo, M., Pulido, R. & Gotor, V., *Tetrahedron*, **1992**, *48*, 6477-6484.
149. Pozo, M. & Gotor, V., *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 4321-4326.
150. Maugard, T., Remaud-Simeon, M., Petre, D. & Monsan, P., *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **1998**, *5*, 13-17.
151. Pozo, M. & Gotor, V., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, *11*, 2797-2802.

152. Hacking, M. A. P. J., van Rantwijk, F. & Sheldon, R. A., *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **2000**, *9*, 201-208.
153. Gotor, V., Astorga, C. & Rebolledo, F., *SYNLETT.*, **1990**, 387-388.
154. Gotor, V. & Menéndez, M., *SYNLETT.*, **1990**, 699-700.
155. Moris, F. & Gotor, V., *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 6927-6934.
156. Magdalena, J., Fernández, S., Ferrero, M. & Gotor, V., *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 8873-8879.
157. Gotor-Fernández, V., Ferrero, M., Fernández, S. & Gotor, V., *J. Org. Chem.*, **1999**, *64*, 7504-7510.
158. Hacking, M. A. P. J., Wegman, M. A., Rops, J., van Rantwijk, F. & Sheldon, R. A., *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, **2000**, *9*, 183-191.
159. De Zoete, M. C., van Rantwijk, F. & Sheldon, R. A., *Catal. Today*, **1994**, *22*, 563-590.
160. Kamal, A. & Rao, M. V., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1994**, *5*, 1881-1882.
161. Kunugi, S., Kobayashi, I., Takano, K., Kasuya, T. & Murakami, Y., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1996**, *69*, 3375-3380.
162. Kim, J. & Dordick, J. S., *Biotechnol. Bioeng.*, **1993**, *42*, 772-776.
163. Lalonde, J.J., & Others, Proceedings from Chiral USA'97 Symposium, Spring Innovations, Boston, MA.
164. Lalonde, J.J., *Chem. Eng.*, **1997**, 108-112.
165. Lesimple, P., Bigg, D. C. H., *Synthesis*, **1991**, 306-308.
166. Blay, G., Cardona, L., García, B., García, L. & Pedro, R. J., *Tetrahedron*, **1996**, *52*, 10507-10518.
167. Singh, B., *Tetrahedron. Lett.*, **1971**, *4*, 321-322.
168. Kim-Wenn, Y., Cannon, G. J. & John, R. G., *Tetrahedron Lett.*, **1970**, *21*, 1791-1794.
169. Shimizu, T., Osako, K. & Nakata, T., *Tetrahedron Lett.*, **1997**, *38*, 2685-2688.
170. Bon, E., Réau, R. & Bertrand, G., *Tetrahedron Lett.*, **1996**, *37*, 1217-1220.
171. Christian, F., *Helv. Chim. Acta*, **1986**, *69*, 404-409.
172. MacKeith, R. A., McCague, R., Olivo, H. F., Roberts, S. M., Taylor, S. J. C & Xiong, H., *Biorg. Med. Chem.*, **1994**, *2*, 387-394.



173. Gilchrist, T. L. "Heterocyclic Chemistry" 2nd. Ed. Longman Scientific & Technical, p. 338, 1992.
174. Adam, W., Lazarus, M., Saha-Möller, C. R. & Schreier, P., *Acc.Chem. Res.*, 1999, 32, 837-845.
175. Huerta, F. F., Santosh-Laxmi, Y. R. & Bäckvall, J.-E., *Organic Lett.*, 2000, 2, 1037-1040.
176. Miyasawa, T., Kurita, S., Ueji, S. & Yamada, T., *Biotechnology Lett.*, 1999, 21, 1023-1027.
177. Torres, C. & Otero, C., *Enzyme Microb. Tech.*, 1999, 25, 745-742.
178. Torres, C., Bernabé, M. & Otero, C., *Enzyme Microb. Tech.*, 1999, 25, 753-761.
179. Torres, C., Bernabé, M. & Otero, C., *Biotechnology Lett.*, 2000, 22, 331-334.
180. Oh, H. K., Shin, C. H. & Lee, I., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1995, 1169.
181. Castro, E. A., Cubillos, M. & Snatos, J. G., *J. Org. Chem.*, 1996, 61, 3501.
182. Levi, I., Blondal, H., Weed, J. W., Frosst, A. C., Reilly, H. C., Schmid, F. A., Sugiura, K., Tarnowski, G. S. & Stock, C. C., *J. Med. Chem.*, 1965, 8, 715.
183. Dordick, J. S., *Biotechnol. Prog.*, 1992, 8, 259-267.
184. Chen, C. -S. & Sih, C. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, 104, 7294-7296.
185. Michielsen, M. J. F., Meijer, E. A., Wijffels, R. H., Tramper, J. & Beeftink, H. H., *Enzyme & Microb. Technol.*, 1998, 22, 621-628.
186. Solladié, G., Arce, E., Bauder, C. & Carreño, C. M., *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 2332-2337.
187. Ueki, T., Ichinari, D., Yoshihara, K., Morimoto, Y. & Kinoshita, T., *Tetrahedron Lett.*, 1998, 39, 667-668.
188. Thiem, J. & Wieczorec, E., *SYNLETT*, 1998, 467-469.
189. Noda, T., Ishiwata, A., Uemura, S., Sakamoto, S. & Hirama, M., *SYNLETT*, 1998, 298.
190. Boukouvalas, J., Fortier, G. & Radu, I.-I., *J. Org. Chem.*, 1998, 63, 916-917.
191. Sauret-Cladière, S. & Jeminet, G., *Tetrahedron: Asymmetry*, 1997, 8, 417-423.
192. Smith III, A. B., Chen, S. S.-Y., Nelson, F. C., Reichert, J. M. & Salvatore, B. A., *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117, 12013-12014.
193. Danielmeier, K. & Steckhan, E. *Tetrahedron: Asymmetry*. 1995, 6, 1181

194. Guanti, G., Narisano, E., Podgorski, T., Thea, S. & Williams, A., *Tetrahedron*, **1990**, *46*, 7081-7083.
195. Guanti, G., Banfi, L. & Narisano, E., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1990**, *1*, 721-722.
196. Haraldsson, G.G., Gudmundsson, B.Ö., & Almarsson, Ö., *Tetrahedron Lett.*, **1993**, *34*, 5791-5792.
197. Geresh, S. & Gilboa, G.Y., *Biotech. Bioeng.*, **1990**, *36*, 270-271.
198. Pomilio, A. B. & Vitale, A. A., "Métodos experimentales de laboratorio en Química Orgánica" Sría. Gral. de La Org. de Los Estados Americanos, Washington D. C., **1988**.
199. Purification of Laboratory Chemicals, 3rd. Ed., Perrin D. & Armarego, W., Pergamon Press, Elmsford New York, **1988**.
200. Laurent, P., Hennig, L., Burger, K., Hiller, W. & Neumayer, M., *SYNTHESIS*, **1998**, 905-909.
201. Shengkui, H. & Neckers, D. C., *Tetrahedron*, **1997**, *53*, 7165-7180.
202. Dale, J. A., Dull, D. L. & Mosher, H. S., *J. Org. Chem.*, **1969**, *34*, 2543-2546.
203. Ward, D. E. & Chung, K. R., *Tetrahedron Lett.*, **1991**, *32*, 7165-7166.
204. Dutcher, J. S., Macmillan, J. G. & Heathcock, C. H., *J. Org. Chem.*, **1976**, *41*, 2663-2669.
205. Clayden, J., McCarthy, C. & Cumming, J. G., *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, *9*, 1427-1440.
206. Valerio-Alfaro, G., García, H.S., Luna, H. & Cruz-Almanza, R., *Biotech. Lett.*, **2000**, *22*, 575-578.