

Tesis Doctoral

**“Desarrollo de Estrategias Quimioenzimáticas
Estereoselectivas en Síntesis Orgánica”**



Martín Guillermo López Vidal

2021

Instituto de Investigaciones en Fisicoquímica de Córdoba

Departamento de Química Orgánica

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

Universidad Nacional de Córdoba

2021

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS QUÍMICAS**



Director

Dr. Fabricio R. Bisogno

Co-Director

Dr. José Luis Barra

Comisión Evaluadora de Tesis

Dr. Mario Leandro Aimar Dra. Sandra E. Martín

Dra. María Elena Carrizo

Evaluador Externo

Dr. Ignacio Carrera Garese

A las personas que estuvieron y están siempre

A mi familia

A mis amigos y amigas

Agradecimientos

Primero quiero agradecer formalmente a las instituciones que hicieron posible el desarrollo de la presente Tesis Doctoral: a la Universidad Nacional de Córdoba, a la Facultad de Ciencias Químicas, al CONICET, al Instituto de Investigaciones en Fisicoquímica de Córdoba (INFIQC) y al Departamento de Química Orgánica.

Cuando pienso en estos cinco, seis años del Doctorado, sumados a los años anteriores como ayudante en el Departamento de Química Orgánica, hay una única imagen que se me viene a la cabeza: las risas de mis amigos y de mis amigas. Más allá de los inconvenientes y frustraciones inevitables en tantos años, cuando pienso en ese tiempo pasado, lo primero que veo es eso. Risas.

Hoy mi agradecimiento más grande es a todas esas personas que hicieron que este camino sea mucho más fácil de caminar. A esa gente que, ya sea en la Facultad, afuera, en otro país, o en donde sea, han estado para dar una mano, compartir, pasar un buen rato o acompañar en otros momentos. No creo que esto hubiera sido posible si no fuera por todas estas personas.

Índice de contenidos

Abreviaturas	1
Objetivos Generales	5
Resumen.....	6
Introducción	8
La importancia de los procesos catalíticos asimétricos.....	9
La química sustentable en la síntesis orgánica asimétrica.....	10
Reacciones multicomponente.....	11
Alcohol deshidrogenasas	21
Reacciones multicomponente asimétricas.....	13
Importancia de la catálisis enzimática.....	14
Hidrolasas	16
Reciclaje de cofactores rédox.....	24
Otros métodos.....	26
Químicos	26
Electroquímicos	27
Fotoquímicos	28
Transaminasas	29
Procesos concurrentes	32
Procesos en cascada que involucran enzimas	33
Procesos en dinámicos que involucran enzimas	35
CAPÍTULO 1. Biocatálisis rédox como estrategia para el desarrollo de reacciones multicomponente asimétricas. Síntesis de β - <i>O</i> -acil sulfuros enantioenriquecidos	39
Antecedentes	41
Objetivos particulares.....	44
Reacción multicomponente con halohidrinas racémicas para la obtención de β -hidroxisulfuros	45
Resultados y Discusión.....	45

Estudio y síntesis de halohidrinas enantioenriquecidas. Reacción multicomponente con halohidrinas obtenidas mediante bioreducción con ADHs.....	55
Resultados y Discusión.....	55
Conclusiones Parciales.....	61
Materiales y métodos.....	63
CAPÍTULO 2. Cascada bienzimática empleando lipasas y ADHs. Síntesis de β -hidroxisulfuros cíclicos enantioenriquecidos.....	83
Antecedentes.....	85
Objetivos particulares.....	86
Sección 1. Cascada bienzimática para la síntesis de β -hidroxisulfuros quirales con un centro estereogénico.....	88
Resultados y Discusión.....	88
Conclusiones Parciales.....	93
Sección 2. Cascada bienzimática para la síntesis de β -hidroxisulfuros quirales con dos centros estereogénicos partiendo de enol ésteres cíclicos.....	94
Resultados y Discusión.....	94
Conclusiones Parciales.....	105
Materiales y métodos.....	107
CAPÍTULO 3. Cascada bienzimática para la síntesis asimétrica de β -sulfanil aminas a partir de enol ésteres no quirales.....	125
Antecedentes.....	127
Objetivos particulares.....	134
Resultados y Discusión.....	135
Conclusiones parciales.....	141
Materiales y métodos.....	143
CAPÍTULO 4. Modulación de la estereoselectividad en la síntesis quimioenzimática de β -hidroxisulfuros quirales cíclicos: estudio de la expresión heteróloga de ADHs en <i>E. coli</i>	187
Antecedentes.....	189
Objetivos particulares.....	195
Resultados y Discusión.....	196
Conclusiones parciales.....	207
Materiales y métodos.....	209
Apéndice.....	217

1-bromooctan-2-ol (2a)	219
2-bromo-1-feniletan-1-ol (2b)	219
3-bromo-2-hidroxiopropanoato de etilo (2e)	220
4-cloro-3-hidroxibutanoato de etilo (2f)	221
1-((2-iodobencil)tio)octan-2-il acetato (3aa)	221
2-((2-acetoxioctil)tio)acetato de etilo (3ab)	223
2-(aliltio)-1-feniletil acetato (3ba)	224
2-(metiltio)-1-feniletil acetato (3bb)	225
2-(butiltio)-1-feniletil acetato (3bc)	226
2-(benciltio)-1-feniletil acetato (3bd)	227
2-((2-acetoxi-2-feniletil)tio)acetato de etilo (3be)	228
1-fenil-2-(prop-2-in-1-iltio)etilacetato (3bf)	229
2-(aliltio)-1-(4-metoxifenil)etil acetato (3ca)	230
2-(aliltio)-1-(4-nitrofenil)etil acetato (3da)	231
2-acetoxi-3-(aliltio)propanoato de etilo (3ea)	232
2-acetoxi-3-(benciltio)propanoato de etilo (3eb)	233
2-acetoxi-3-((2-etoxi-2-oxoetil)tio)propanoato de etilo (3ec)	234
2-acetoxi-3-((3-butoxi-3-oxopropil)tio)propanoato de etilo (3ed)	235
(Z)-1-(benciltio)prop-1-en-2-il acetato (4a)	237
(Z)-1-(aliltio)prop-1-en-2-il acetato (4b)	238
(Z)-1-(but-3-en-1-iltio)prop-1-en-2-il acetato (4c)	239
(Z)-2-((2-acetoxiprop-1-en-1-il)tio)acetato de etilo (4d)	240
2-(aliltio)ciclohex-1-en-1-il acetato (4f)	240
2-(benciltio)ciclohex-1-en-1-il acetato (4g)	241
2-(((trimetilsilil)metil)tio)ciclohex-1-en-1-il acetato (4h)	242
2-((2-acetoxiciclohex-1-en-1-il)tio)acetato de etilo (4i)	243
2-(prop-2-in-1-iltio)ciclohex-1-en-1-il acetato (4j)	244
2-((2-hidroxietil)tio)ciclohex-1-en-1-il acetato (4k)	245
2-(benciltio)ciclopent-1-en-1-il acetato (4m)	246
2-(prop-2-in-1-iltio)ciclopent-1-en-1-il acetato (4n)	247
2-(butiltio)ciclohex-1-en-1-il acetato (4o)	248
2-((2-cianoetil)tio)ciclohex-1-en-1-il acetato (4p)	249
1-(benciltio)propan-2-ona (5a)	250
1-(aliltio)propan-2-ona (5b)	251
1-(but-3-en-1-iltio)propan-2-ona (5c)	252
2-(aliltio)ciclohexan-1-ona (5f)	253

2-(benciltio)ciclohexan-1-ona (5g).....	254
2-(prop-2-in-1-iltio)ciclohexan-1-ona (5j).....	255
2-((2-hidroxietyl)tio)ciclohexan-1-ona (5k).....	256
2-(aliltio)ciclopentan-1-ona (5l).....	258
2-(benciltio)ciclopentan-1-ona (5m).....	259
2-(prop-2-in-1-iltio)ciclopentan-1-ona (5n).....	260
2-(butiltio)ciclohexan-1-ona (5o).....	261
3-((2-oxociclohexil)tio)propanonitrilo (5p).....	262
<i>N</i> -(<i>cis</i> -2-(aliltio)ciclohexil)acetamida (7f).....	263
<i>N</i> -(<i>trans</i> -2-(aliltio)ciclohexil)acetamida (7f').....	264
<i>N</i> -(<i>cis</i> -2-(prop-2-in-1-iltio)ciclohexil)acetamida (7j').....	265
<i>N</i> -(<i>trans</i> -2-(prop-2-in-1-iltio)ciclohexil)acetamida (7j').....	266
<i>N</i> -(<i>cis</i> -2-(benciltio)ciclohexil)acetamida (7g').....	267
<i>N</i> -(<i>trans</i> -2-(benciltio)ciclohexil)acetamida (mezcla) (7g').....	268
<i>N</i> -((<i>cis</i>)-2-(butiltio)ciclohexil)acetamida (7o').....	269
<i>N</i> -((<i>cis</i>)-2-(butiltio)ciclohexil)acetamida (7o').....	269
<i>N</i> -(2-((2-cianoetyl)tio)ciclohexil)acetamida(7q').....	270
<i>N</i> -(<i>cis</i> -2-(prop-2-in-1-iltio)ciclopentil)acetamida(7n').....	270
<i>N</i> -(<i>trans</i> -2-(prop-2-in-1-iltio)ciclopentil)acetamida (7n').....	271
<i>N</i> -(2-(butiltio)ciclopentil)acetamida (7q').....	272

Abreviaturas

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico
Ac	Acetilo
AcOEt	Acetato de etilo
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADH-A	ADH de <i>Rhodococcus ruber</i>
ADH-T	ADH de <i>Thermoanaerobium brockii</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AZADO	2-azaadamantano N-óxido
BVMO	Baeyer-Villiger monooxigenasa
q	Cuatriplete
CAL-A	Lipasa A de <i>Candida antarctica</i>
CAL-B	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i>
CG	Cromatografía de gases
conv	Conversión
d	Doblete
DCM	Diclorometano
DKR	Resolución cinética dinámica (" <i>Dynamic Kinetic Resolution</i> ")
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DYKAT	Transformación cinética dinámica asimétrica
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
<i>ee</i>	Exceso enantiomérico
EI	Impacto electrónico
EM	Espectrometría de masas
equiv.	Equivalente químico
ESI	Ionización por electrospray
Et	Etilo
FAD	Flavínadenín dinucleótido
FDH	Formiato deshidrogenasa
FID	Detector de ionización de flama (" <i>Flame Ionization Detector</i> ")
FMN	Flavín mononucleótido

G6P	Glucosa-6-fosfato
GDH	Glucosa deshidrogenasa
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
h	Hora
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (<i>"High Performance Liquid Chromatography"</i>)
Hz	Hertz
<i>i</i> PA	Isopropilamina
<i>i</i> Pr	Isopropilo
kDa	Kilodalton
LB	Medio Luria-Bertani
LBADH	ADH de <i>Lactobacillus brevis</i>
LDH	Lactato deshidrogenasa
m	Multiplete
MAO	Monoamino oxidasa
Me	Metilo
MS	Tamices moleculares (<i>"Molecular sieves"</i>)
MV	Metil viológeno
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PDC	Piruvato descarboxilasa
Ph	Fenilo
PLE	Esterasa de hígado porcino (<i>"Pig Liver Esterase"</i>)
PLP	Fosfato de piridoxal
PMP	Fosfato de piridoxamina
PTDH	Fosfito deshidrogenasa
<i>Ras</i> ADH	ADH de <i>Ralstoniasp.</i>
RMC	Reacción multicomponente
RMCA	Reacción multicomponente asimétrica
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Singlete
<i>Sy</i> ADH	ADH de <i>Sphingobium yanoikuyae</i>
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
TA	Transaminasa
TB	<i>"Terrific Broth"</i>

TBME	Éter <i>tert</i> -butil metílico
<i>t</i> Bu	<i>tert</i> -Butilo
<i>Tes</i> ADH	ADH de <i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>
TLC	Cromatografía en capa fina (" <i>Thin Layer Chromatography</i> ")
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

Objetivos Generales

Desarrollar metodologías quimioenzimáticas tendientes a obtener selectivamente compuestos organocalcógenos de interés, especialmente aquellos que poseen azufre en su estructura.

Objetivos Específicos

- Sintetizar moléculas proquirales o quirales que contengan azufre usando en lo posible estrategias ambientalmente benignas.
- Optimizar procesos para lograr mayor quimio-, regio- y estereoselectividad.
- Combinar metodologías enzimáticas y no enzimáticas para el desarrollo de procesos secuenciales o en cascada.
- Alterar el desempeño catalítico de un biocatalizador, a través de modificaciones en la expresión de las enzimas.

Resumen

Esta Tesis hace referencia a procesos quimioenzimáticos secuenciales o en cascada, empleando oxidorreductasas, hidrolasas y transaminasas, aplicados a la obtención de compuestos enantioenriquecidos de gran relevancia.

Así, en el Capítulo 1 se desarrolla una reacción multicomponente asimétrica para la síntesis de β -O-acil sulfuros, empleando una halohidrina quiral, tioacetato de potasio y electrófilos de distinta naturaleza química. La obtención enantioselectiva de las halohidrininas empleadas se realiza mediante la bio-reducción con ADHs de halocetonas. Además, se pone en evidencia el control de la enantiopureza del producto final con el uso de halohidrininas enantioenriquecidas.

Luego, el Capítulo 2 se ha dividido en dos secciones. En la primera, se ha desarrollado una cascada bienzimática empleando hidrolasas y ADHs para la obtención de β -hidroxisulfuros con un centro estereogénico, a partir de Z-enol ésteres azufrados. En la segunda sección, se lleva a cabo la misma cascada bienzimática, esta vez sobre Z-enol ésteres cíclicos, para dar lugar a β -hidroxisulfuros con dos centros estereogénicos, mediante un proceso de resolución cinética dinámica.

En el Capítulo 3 se detalla una cascada bienzimática empleando una hidrolasa y una transaminasa, para la síntesis de β -sulfanil aminas quirales, estableciéndose dos centros estereogénicos en el proceso a partir de un enol éster proquiral. En este sistema, también ocurre un proceso de resolución cinética dinámica.

Finalmente, en el Capítulo 4 se estudian las condiciones de expresión de las ADHs ensayadas en los capítulos anteriores. Se estudia la optimización del rendimiento de los preparados liofilizados de *E.coli*/ADH, además de la modulación de la selectividad de las enzimas, mediante la reducción de un β -cetosulfuro cíclico.

Summary

This Thesis deals with chemoenzymatic processes in cascade or sequential manner, employing oxidoreductases, hydrolases and transaminases, applied to the synthesis of relevant enantioenriched compounds.

Initially, in Chapter 1, an asymmetric multicomponent reaction is developed for the synthesis of β -O-acyl sulfides, by the use of a chiral halohydrin, potassium thioacetate and electrophiles of different nature. The enantioselective preparation of the employed halohydrins is carried out through the bioreduction of haloketones with ADHs. Besides, it is demonstrated that the stereochemistry of the final product can be controlled through the use of enantioenriched halohydrins.

Furthermore, Chapter 2 has been splitted into two sections. In the first one, a bienzymatic cascade has been developed, employing hydrolases and ADHs, for the obtention of β -hydroxysulfides with one stereogenic center, starting from sulfur-containing Z-enol esters. In the second section, same bienzymatic cascade has been carried out, but over cyclic Z-enol esters instead of linear ones, in order to synthesize β -hydroxysulfides with two stereogenic centers, through a Dynamic Kinetic Resolution.

In Chapter 3 it is detailed a bienzymatic cascade using a hydrolase and a transaminase, for the synthesis of chiral β -sulfanyl amines, establishing two stereogenic centers in the process, starting from an achiral enol ester. In this system, it also occurs a Dynamic Kinetic Resolution process.

Finally, in Chapter 4, expression conditions are studied for the ADHs employed in previous chapters. Then, the conditions for a better performance of lyophilized *E.coli*/ADH preparations are studied. In addition, it is also studied the modulation of the enzyme selectivity on the reduction of a cyclic β -ketosulfide.

Introducción

La importancia de los procesos catalíticos asimétricos

En una era donde los químicos orgánicos han demostrado que las moléculas más complejas tanto naturales como no naturales pueden sintetizarse, el énfasis de la síntesis orgánica ha cambiado radicalmente. El foco se ha centrado principalmente en cómo realizar métodos sintéticos en una forma verdaderamente práctica.¹ Entre los importantes objetivos que tiene la síntesis orgánica, se encuentra el desarrollo de reacciones estereoselectivas para la síntesis de compuestos ópticamente activos, imprescindibles en la industria farmacéutica, agraria/agroquímica y química.² Esto se debe a que la quiralidad es un elemento principal en la naturaleza, donde un amplio rango de funciones biológicas y físicas dependen de un reconocimiento molecular preciso relacionado a la distribución espacial de los átomos que conforman las moléculas intervinientes.³ Los sistemas biológicos, en la mayoría de los casos, reconocen a un par de enantiómeros como diferentes sustancias, mostrando diferentes respuestas en cada caso. Esto implica que, en la síntesis química de un agente terapéutico natural en su forma racémica o un principio activo novedoso, un enantiómero puede actuar de manera efectiva, mientras que el otro, en el peor de los casos, puede interactuar con un objetivo completamente diferente resultando en efectos negativos no deseados.⁴ Sin lugar a dudas, la naturaleza es la fuente más rica de compuestos quirales enantiopuros, aunque la variedad de estos compuestos es limitada. Debido a esto, los químicos sintéticos han estado explorando constantemente diferentes métodos para la síntesis de análogos o nuevos compuestos con el fin de expandir nuevas reactividades y aplicaciones en diferentes áreas.

En este contexto, cabe mencionar que las drogas quirales comprenden más de la mitad de los fármacos aprobados en el mundo, incluyendo muchas de las drogas más comercializadas.⁵ Históricamente, los compuestos enantioméricamente enriquecidos han sido sintetizados, ya sea por la transformación de un precursor quiral enantioenriquecido (usualmente un producto natural o derivado), o por la resolución de una mezcla racémica. Estos métodos poseen marcados inconvenientes, como son la necesidad de cantidades estequiométricas del precursor quiral

¹ a) E. J. Corey, X. M. Cheng. *The Logic of Chemical Synthesis*; Wiley: New York, **1989**. b) K. C. Nicolaou, S. A. Snyder *Classics in Total Synthesis II: More Targets, Strategies, Methods*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2003**.

² E. N. Jacobsen, A. Pfaltz, H. Yamamoto. *Comprehensive Asymmetric Catalysis Vol. I-III*, Springer, **1999**).

³ R. Noyori. *Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis*; Wiley: New York, **1994**.

⁴ F. G. Adly, A. Ghanem. *Catalysts*, **2019**, *9*, 775.

⁵ P. Van Arnum. *Pharm. Technol.* **2006**, *30*, 58-66.

adecuado o la obtención del 50% como máximo del enantiómero requerido, respectivamente.⁶ Debido a los costos asociados a estos métodos de producción, el desarrollo de métodos catalíticos asimétricos, particularmente para moléculas pequeñas en los primeros pasos de síntesis de compuestos ópticamente activos relevantes, es de gran interés para la industria.⁷ La importancia de los catalizadores homogéneos o heterogéneos radica en la capacidad de éstos para interactuar con la molécula interviniente, acelerando la velocidad de reacción al disminuir la energía de activación. Como el catalizador no cambia su identidad química ni es consumido, este puede estar presente en cantidades subestequiométricas y puede transformar grandes cantidades de sustrato. En catálisis asimétrica, la presencia de un entorno quiral en el catalizador lleva a una activación y orientación específica del sustrato en relación al centro catalítico. Esto implica una alta restricción espacial en el acceso al sitio catalítico por parte de ciertas moléculas. Es tal esa restricción, que la orientación espacial de los sustituyentes influye considerablemente en la coordinación del sustrato en el sitio activo, lo cual se traduce muchas veces en una diferencia en la aceptación de estereoisómeros de una misma molécula.⁸

Entre las diferentes aproximaciones desarrolladas para acceder a compuestos de alta pureza óptica, el empleo de metales de transición acomplejados con ligandos quirales,⁹ organocatalizadores enantioenriquecidos¹⁰ y enzimas¹¹ han sido herramientas esenciales para la síntesis orgánica asimétrica.

La química sustentable en la síntesis orgánica asimétrica

En la actualidad, los nuevos procesos sintéticos persiguen no sólo ser eficientes, selectivos y de alto rendimiento, sino que además buscan ser ambientalmente amigables. La disminución de la producción de residuos, el tratamiento de estos, el ahorro energético y la

⁶ J. Halpern, B. M. Trost. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2004**, 101, 5347.

⁷ J. S. Carey, D. Laffan, C. Thomson, M. T. Williams. *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 2337–2347.

⁸ E. Roduner. *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, 43, 8226–8239.

⁹ a) C. Bolm, M. Beller. *Transition Metals for Organic Synthesis: Building Blocks and Fine Chemicals*. In Second Revised and Enlarged Edition; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2008**. b) M.L. Crawley, B.M. Trost. *Applications of Transition Metal Catalysis in Drug Discovery and Development: An Industrial Perspective*; JohnWiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, **2012**.

¹⁰ A. Berkessel, H. Gröger. *Asymmetric Organocatalysis: From Biomimetic Concepts to Applications in Asymmetric Synthesis*; JohnWiley & Sons: Weinheim, Germany, **2006**.

¹¹ K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 5th ed., Springer, Berlin, **2004**.

seguridad en los procesos, por mencionar algunos aspectos relevantes, no sólo presentan ventajas a nivel del medio ambiente, sino también en cuestión de costos para la industria.¹²

Además de lo mencionado, el diseño de nuevos métodos selectivos tiende a la producción de compuestos con la mayor pureza posible, lo que a su vez lleva a una menor generación de desechos. Aunque históricamente el rendimiento de la reacción ha sido la forma principal de medir la eficiencia de una metodología sintética, actualmente han adquirido relevancia también algunas métricas que consideran parámetros relacionados a la “química verde”¹³, como por ejemplo el factor *E*.¹⁴ Asimismo, procesos con una gran “economía de átomos”, es decir, el número de átomos intervinientes que se encuentran en la estructura del producto final, resultan de particular interés dentro del marco de la química sustentable.¹⁵

En este marco, es lógico pensar que los métodos catalíticos asimétricos se destacan como metodologías de elección a la hora del desarrollo de métodos estereoselectivos para la síntesis de compuestos quirales de interés.

Reacciones multicomponente

En el afán de desarrollar metodologías con gran capacidad de formación de enlaces y más amigables con el medioambiente, donde la producción de desechos, los costos operacionales y los tiempos de reacción se reduzcan al mínimo, se ha explotado la reactividad de ciertos grupos funcionales en reacciones altamente eficientes. Lo que se ha buscado es la generación de nuevas moléculas con alta diversidad química, donde los átomos presentes en los reactivos se encuentren idealmente en su totalidad en el producto sintetizado. A este tipo de reacciones, que involucran tres o más sustratos cuyos átomos están en su mayoría (si no todos) en el producto de la reacción, se las ha llamado reacciones multicomponente (RMC).¹⁶ Estas reacciones datan de más de 150 años, y han sido usadas ampliamente tanto en la industria como en el laboratorio, debido a su versatilidad, alto poder de formación de enlaces, y la capacidad de modular los sustituyentes en el producto final, siempre y cuando se mantenga al grupo funcional involucrado en la reacción. Debido a estas características, no es sorprendente que las RMCs se consideren

¹² P. J. Walsh, H. Li, C. Anaya de Parrodi. *Chem. Rev.*, **2007**, *107*, 2503–2545.

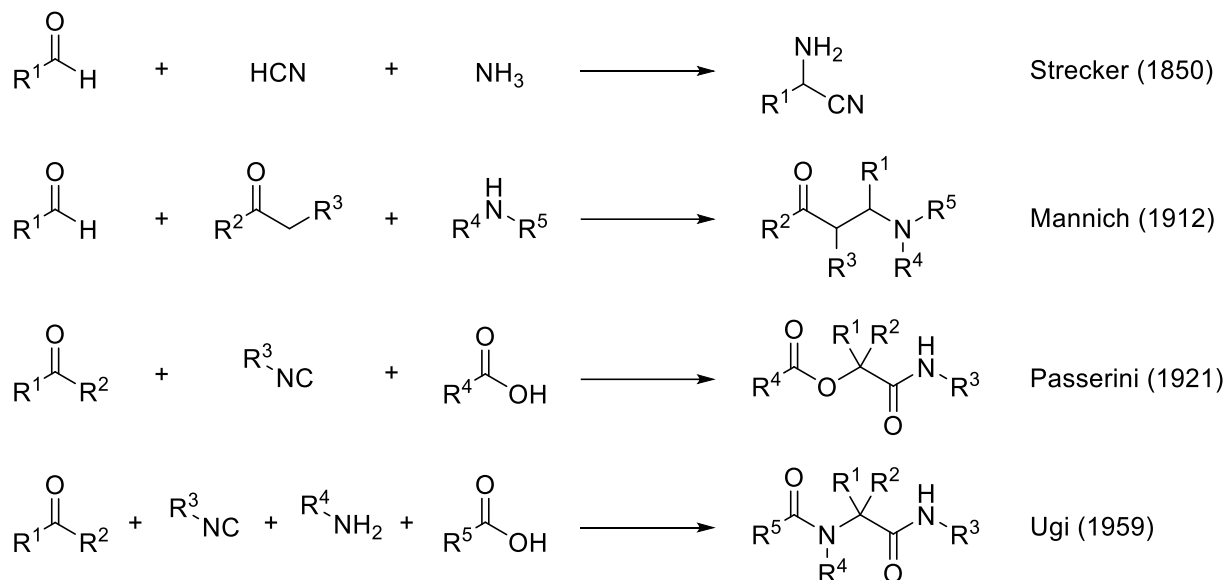
¹³ a) P. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 301–312. b) J. M. Clark, *Nature Chem.*, **2009**, *1*, 12–13.

¹⁴ R. A. Sheldon. *Green Chem.*, **2017**, *19*, 18–43.

¹⁵ B. M. Trost. *Science*, **1991**, *254*, 1471–1477.

¹⁶ J. Zhu, H. Bienaymé. *Multicomponent Reactions*, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.

enmarcadas dentro de la química verde.¹⁷ La primera reacción multicomponente fue descrita por Strecker en 1850,¹⁸ para la síntesis de aminoácidos, y sigue siendo en la actualidad una estrategia de elección para la síntesis de estos compuestos. Algunos ejemplos de estas reacciones se resumen a continuación en el Esquema 1.10.



Esquema 1.10. Ejemplos de reacciones multicomponente.

En estas reacciones se han estudiado diversos grupos funcionales. Como puede observarse en el Esquema 1.10, la reacción de Strecker involucra un aldehído, amoníaco y ácido cianhídrico, para dar lugar a la formación de un α -amino nitrilo generando agua como desecho. Por otra parte, en la reacción de Mannich,¹⁹ participan un aldehído, una cetona y una amina, para dar lugar a la formación de una β -aminocetona y su desecho también es agua. Para la reacción de Passerini,²⁰ se emplea un isonitrilo, compuesto esencial para el desarrollo de varias reacciones multicomponente subsiguientes, en conjunto con un ácido carboxílico y una cetona para producir una α -aciloxi amida. Esta reacción posee una economía de átomos absoluta, lo que implica que no se genera ningún residuo como producto de la reacción. Finalmente, una reacción análoga a la anterior es el procedimiento desarrollado por Ugi,²¹ el cual comprende cuatro componentes y genera agua como desecho. Los reactivos intervinientes en esta RMC son una cetona, un isonitrilo, una amina primaria y un ácido carboxílico y dan lugar a la formación de una diamida.

¹⁷ R. C. Cioc, E. Ruijter, R. V. A Orru. *Green Chem.*, **2014**, *16*, 2958–2975.

¹⁸ A. Strecker. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1850**, *75*, 27–45.

¹⁹ C. Mannich, W. Krösche. *Arch. Pharm.*, **1912**, *250*, 647–667.

²⁰ M. Passerini. *Gazz. Chim. Ital.*, **1921**, *51*, 126–129.

²¹ I. Ugi, R. Meyr, U. Fetzer, C. Steinbrückner. *Angew. Chem.*, **1959**, *71*, 386.

Debido a las ventajas previamente mencionadas, cabe remarcar que las RMCs han sido empleadas en síntesis de fármacos o derivados.²²

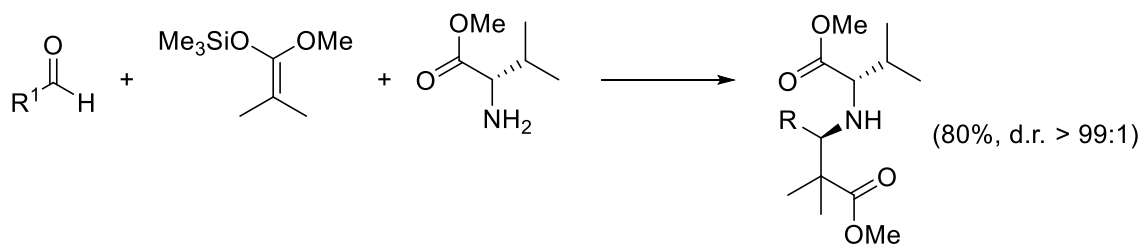
Reacciones multicomponente asimétricas

Como se ha comentado anteriormente, cuando la síntesis está orientada hacia la obtención de compuestos con una actividad biológica específica, la preparación selectiva del isómero activo es indispensable. En muchas RMCs, durante la formación de los nuevos enlaces se pueden generar centros quirales en el producto final. No obstante, en las reacciones multicomponente clásicas, no hay un control de la selectividad de la reacción, por lo que el producto no se encuentra ópticamente enriquecido. Las reacciones multicomponente asimétricas (RMCAs) son aquellas que involucran tres o más compuestos, quirales o no, en un mismo sistema de reacción, para formar estereoselectivamente un nuevo compuesto quiral que contenga la mayoría (o todas) las partes intervinientes de los sustratos.²³ Con respecto a la estrategia para introducir la quiralidad, se la puede dividir en dos aproximaciones: una aproximación diastereoselectiva, donde uno de los reactivos ya contiene un centro quiral definido (quiralidad provista por reactivo), y una aproximación enantioselectiva, donde se forma un producto quiral a partir de reactivos aquirales en presencia de un catalizador quiral (quiralidad provista por catalizador). En el Esquema 1.11, mostrado a continuación, se puede observar una reacción de Mannich asimétrica empleando ambas aproximaciones.

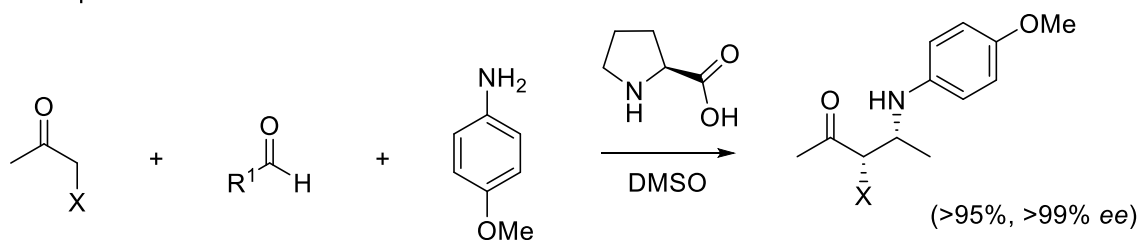
²² a) L. Weber. *Curr. Med. Chem.*, **2002**, *9*, 2085-2093. b) M. Pedrola, M. Jorba, E. Jardas, F. Jardi, O. Ghashghaei, M. Viñas, R. Lavilla. *Front. Chem.*, **2019**, *7*, 475. c) T. Zarganes-Tzitzikas, A. Dömling. *Org. Chem. Front.*, **2014**, *1*, 834-837.

²³ D. J. Ramón, M. Yus. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, *44*, 1602 - 1634.

A. Aproximación diastereoselectiva



B. Aproximación enantioselectiva



Esquema 1.11. Reacciones de Mannich asimétricas empleando un sustrato enantioenriquecido o un catalizador quiral.

Aunque las mejoras sobre este tipo de reacciones han sido numerosas a lo largo de los años, el desarrollo de nuevas RMCA's sigue siendo de gran interés debido a que es una excelente alternativa a la síntesis asimétrica tradicional debido a las múltiples ventajas que presentan. En este sentido, sobresalen su alta economía atómica, el ahorro de energía, tiempo y costos además de ser procedimientos simples en términos de condiciones y equipamiento. Más aún, la formación de un único producto y el mínimo desecho generado, hacen a las RMC como una estrategia de primera elección para la combinación con otras metodologías.

Importancia de la catálisis enzimática

En base a la demanda de la industria farmacéutica y de fragancias y aromas, además considerando la necesidad de drogas enantiopuras, el desarrollo de métodos sintéticos generales que puedan producir compuestos en ambas formas enantioméricas de alta pureza, sigue siendo el objetivo principal de la síntesis asimétrica. Considerando que la naturaleza provee la mayor fuente de compuestos enantioenriquecidos, los químicos han aprovechado la maquinaria sintética asimétrica de los sistemas biológicos a su favor. Debido a esto e influenciados por el auge de la síntesis asimétrica en la década de 1980¹¹, los estudios sobre la catálisis enzimática (o

biocatálisis), inicialmente centrados en la elucidación de vías metabólicas o mecanismos enzimáticos, se han ampliado enormemente, orientando su aplicación a la transformación de sustratos no naturales. Notablemente, hoy en día, la biocatálisis constituye una de las estrategias más importantes para la síntesis de compuestos enantioenriquecidos, donde cada vez más las enzimas son empleadas en procesos a gran escala dentro de la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética.²⁴ No obstante, cabe mencionar que una de las razones principales de este aumento en las aplicaciones de los procesos enzimáticos se debe fundamentalmente a los importantes avances en Biología Molecular, Bioquímica y Bioinformática (3era y 4ta “ola” de la biocatálisis).^{25, 26} En este sentido, la secuenciación de nuevas enzimas, la disponibilidad de amplias bases de datos de proteínas, el uso de herramientas bioinformáticas para el diseño racional o evolución dirigida, y la utilización de métodos más eficientes para el muestreo, han contribuido notablemente a expandir los límites de la biocatálisis y su aplicación en procesos a gran escala. Esto ha llevado al diseño y obtención de nuevas enzimas con mayor tolerancia a las condiciones de reacción, actividades mejoradas o incluso nuevas actividades.²⁷ Sumado a esto y en términos de sustentabilidad, las enzimas son catalizadores capaces de actuar en condiciones suaves de reacción de manera eficiente y selectiva. Además, la posibilidad de llevar a cabo las reacciones en medios acuosos evita el empleo de solventes orgánicos en altas cantidades, lo que finalmente implica un proceso más ecológico y más económico al evitar la remediación de dichos solventes. Más aún, las enzimas poseen la ventaja intrínseca de ser catalizadores altamente eficientes, motivo por el cual la biocatálisis constituye, hoy en día, una de las estrategias más adecuadas para el desarrollo de nuevos métodos sintéticos asimétricos dentro del paradigma de la química sustentable.²⁸

En base a las reacciones que catalizan, las enzimas se han clasificado en siete grupos diferentes, en las que se encuentran las oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas, ligasas y traslocasas. A continuación, se detallan algunos grupos de enzimas con los que se trabajó en la presente Tesis doctoral.²⁹

²⁴ S. Wu, R. Snajdrova, J. C. Moore, K. Baldenius, U. T. Bornscheuer. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, *59*, 2–34.

²⁵ U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature*, **2012**, *485*, 185–194.

²⁶ U. T. Bornscheuer, *Philos. Trans. R. Soc. A*, **2018**, *376*, 20170063.

²⁷ a) G. Qu, A. Li, C. G. Acevedo-Rocha, Z. Sun, M. T. Reetz, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, *59*, 13204–13231.

b) H. Renata, Z. J. Wang, F. H. Arnold. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 3351–3367. c) U. Markel, K. D. Essani, V. Besirlioglu, J. Schiffels, W. R. Streit, U. Schwaneberg. *Chem. Soc. Rev.*, **2020**, *49*, 233–262.

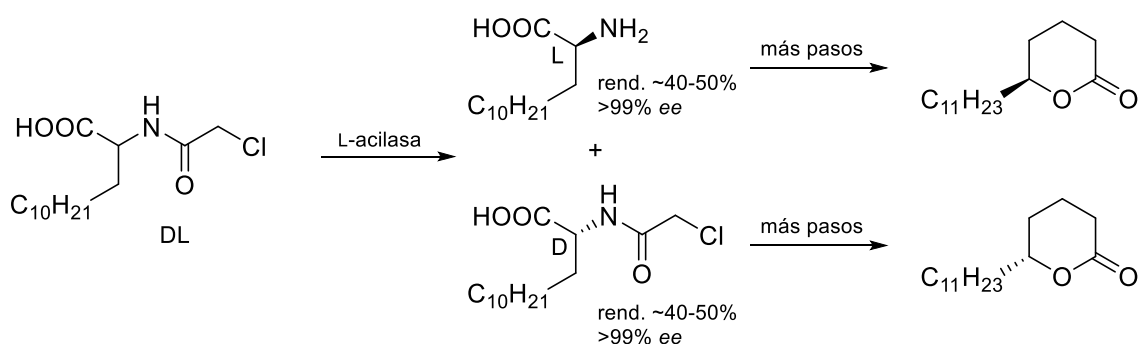
²⁸ R. A. Sheldon, J. M. Woodley. *Chem. Rev.*, **2018**, *118*, 801–838.

²⁹ Enzyme Nomenclature 1992, **1992**, 1st Edition, Academic Press.

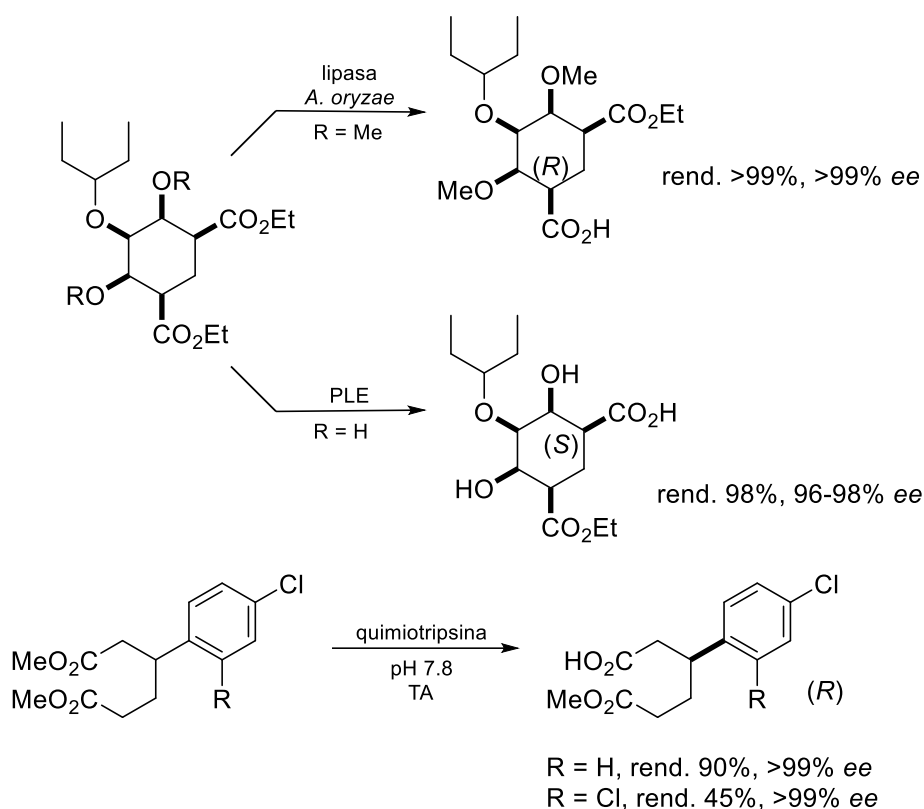
Hidrolasas

Las hidrolasas son un grupo de enzimas que catalizan la ruptura de enlaces mediante la reacción con agua. En su mayoría, la función natural es digestiva, hidrolizando los nutrientes en unidades aptas para la digestión. En procesos de síntesis, estas enzimas poseen ciertas características que las ubican como catalizadores de elección en procesos hidrolíticos, donde se destaca tanto una amplia aceptación de sustratos y alta estereoselectividad (incluso frente a sustratos no naturales) además de que no necesitan la presencia de cofactores para el desarrollo de la reacción.

Durante las últimas cuatro décadas, el empleo de hidrolasas en procesos catalíticos ambientalmente amigables bajo condiciones suaves de reacción ha sido ampliamente estudiado y empleado en la industria, predominando la resolución cinética de alcoholes, aminas o ácidos carboxílicos quirales. Debido a esto, cabe mencionar que alrededor de dos tercios de los estudios biocatalíticos publicados durante el siglo XXI corresponden a enzimas hidrolíticas.^{11, 30} En este sentido, las transformaciones que involucran la ruptura de amidas o ésteres han sido llevadas a cabo con diversas hidrolasas principalmente utilizando proteasas, esterasas y lipasas (Esquema 1.12).



³⁰ U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas. *Hydrolases in Organic Synthesis*, 2006, 2nd ed. Wiley-VCH, Weinheim.



Esquema 1.12. Reacciones que involucran hidrolasas para la ruptura de ésteres y amidas.

En la Esquema 1.12 se pueden observar algunos ejemplos de hidrolasas empleadas en la ruptura de ésteres y amidas en procesos de resoluciones cinéticas para la obtención de compuestos de alto valor industrial. En este contexto, se ha estudiado la hidrólisis de amidas derivadas de aminoácidos mediante la acilasa I de riñón porcino y la acilasa I de *Aspergillus* sp.³¹ La estrategia de llevar a cabo una resolución cinética de la mezcla racémica del aminoácido acilado con una selectividad perfecta se ha aplicado a la síntesis de feromonas que se encuentran en la reina del avispon oriental, *Vespa orientalis*.³² En el siguiente ejemplo del mismo esquema, se muestra la desimetrización enzimática enantioselectiva de *meso*-diésteres de ácidos 1,3-dicarboxílicos cíclicos en un paso para la síntesis del fármaco fosfato de oseltamivir, un inhibidor selectivo de neuraminidasas del virus influenza. Por otra parte, mediante el uso de la esterasa de hígado porcino (PLE) o la lipasa de *Aspergillus oryzae*, se logró obtener ambos enantiómeros al cambiar el preparado enzimático.³³ Finalmente, en el mismo esquema se muestra una hidrólisis altamente selectiva para la desimetrización de un diéster mediante el uso de la proteasa

³¹ H. K. Chenault, J. Dahmer, G. M. Whitesides. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*, 6354-6364.

³² R. Ikan, R. Gottlieb, E. D. Bergmann. *J. Insect Physiol.*, **1969**, *15*, 1709-1712.

³³ U. Zutter, H. Iding, P. Spurr, B. Wirz. *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 4895-4902.

quimiotripsina, que además ha sido empleada en la producción de nuevos inhibidores de la neurotoxina botulínica de serotipo A.³⁴

Como contraparte, la reacción reversa de condensación, que da lugar a la síntesis de ésteres o amidas, también ha sido ampliamente investigada en sistemas con baja concentración de agua (alcoholólisis, aminólisis).³⁵ Más aún, además de su actividad nativa, estas enzimas son capaces de llevar a cabo reacciones no naturales, lo cual representa una promiscuidad catalítica.³⁶ Esto ha motivado a que los químicos presten particular atención al estudio y aplicación de estos catalizadores para la formación de nuevos enlaces C-C, C-heteroátomo, procesos oxidativos y reacciones hidrolíticas novedosas.³⁷

Con respecto al mecanismo de reacción de la hidrólisis promovida por estas enzimas, consiste en un ataque nucleofílico de un residuo presente en el sitio activo al carbonilo del sustrato (éster o amida). Este residuo puede ser, entre otros, el carboxilo del ácido aspártico,³⁸ el tiol de una cisteína,³⁹ o el hidroxilo de una serina. Particularmente, este último es el mecanismo que opera en la mayoría de las lipasas microbianas y otras hidrolasas de interés sintético: por lo que ha sido estudiado en gran detalle (serina hidrolasas) debido a su importancia.⁴⁰ (Esquema 1.13).

³⁴ G. N. Stowe, P. Silhár, M. S. Hixon, N. R. Silvaggi, K. N. Allen, S. T. Moe, A. R. Jacobson, J. T. Barbieri, K. D. Janda. *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 756-759.

³⁵ J. Whittall, P. W. Sutton, W. Kroutil. *Practical Methods for Biocatalysis and Biotransformations* 3, 2016. Wiley-VCH, Weinheim.

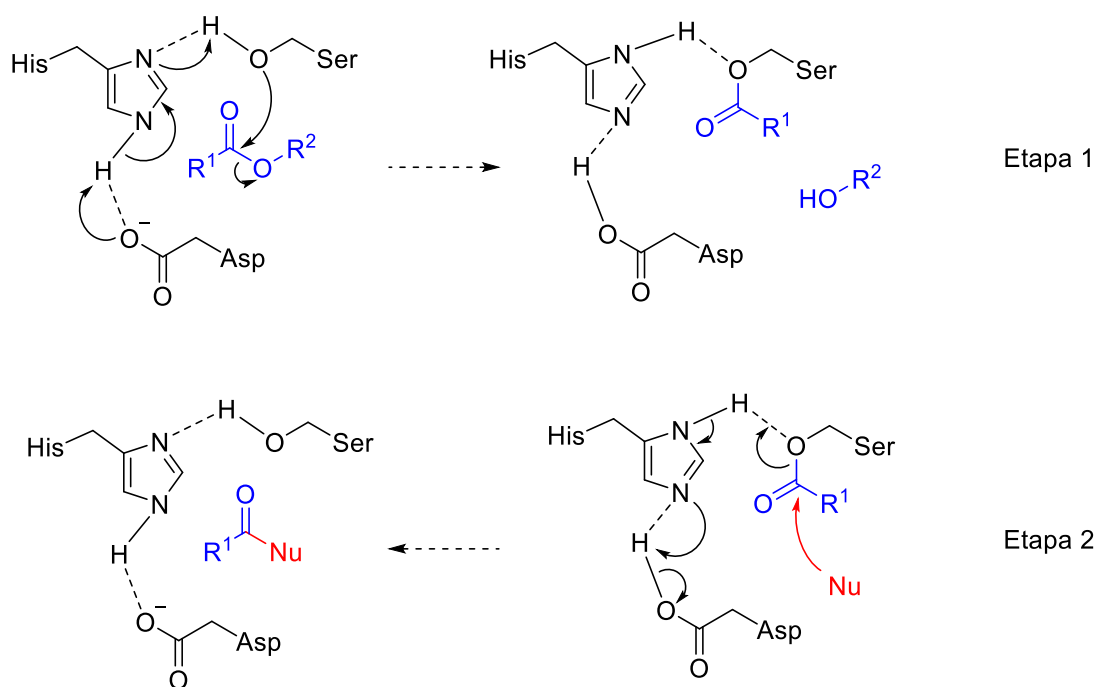
³⁶ K. Hult, P. Berglund. *Trends Biotechnol.*, **2007**, *25*, 231-238.

³⁷ E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor. *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 4504-4523.

³⁸ N. S. Andreeva, L. D. Rumsh. *Protein Sci.*, **2001**, *10*, 2439-2450.

³⁹ H-H. Otto, T. Schirmeister. *Chem. Rev.*, **1997**, *97*, 133-172.

⁴⁰ I. Botos, A. Wlodawer. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2007**, *17*, 683-690.

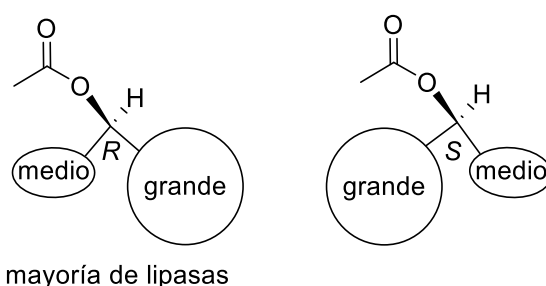


Esquema 1.13. Mecanismo de acción general de hidrolasas.

En el esquema 1.13 se puede observar la llamada “tríada catalítica”, la cual está formada generalmente, además de la serina, por un ácido aspártico y una histidina, que se encuentran próximas. En una primera etapa, ocurre el ataque nucleofílico de la serina, previamente activada por la histidina, al grupo carbonilo del sustrato, uniéndose covalentemente al grupo acilo y liberando el grupo saliente ($R^2\text{-OH}$). Luego, en una segunda etapa, un nucleófilo, que usualmente es agua, ataca al intermediario acil-enzima regenerando la enzima y dando como resultado la liberación de un ácido carboxílico ($R^1\text{-COOH}$).

El hecho de que varias lipasas sean capaces de hidrolizar ésteres más allá de glicéridos, hace que las hidrolasas sean particularmente útiles en síntesis orgánica. Debido a que los sustratos naturales de estas enzimas son los ésteres de glicerol, formados por la condensación de glicerol y un ácido aquiral, es esperable que las lipasas sean enzimas más adecuadas para la hidrólisis de ésteres de alcoholes quirales que ésteres de ácidos quirales. Esta aseveración se cumple para la mayoría de las lipasas, aunque hay una menor fracción que presenta el reconocimiento de la quiralidad sobre la parte relativa al ácido. Para la mayoría de las lipasas que hidrolizan ésteres de alcoholes secundarios, la estereopreferencia es la misma: considerando que el sitio activo presenta un bolsillo “grande” y uno “mediano” donde se ubica el sustrato, y que el residuo que se ubica hacia el bolsillo grande tiene mayor prioridad en las reglas de Cahn-Ingold-Prelog, la configuración del alcohol resultante es (*R*) (Regla de Kazlauskas,

Esquema 1.14).⁴¹ Por el contrario, hay algunas proteasas (como α -quimotripsina y subtilisina) y la esterasa de hígado porcino (por sus siglas en inglés, PLE, *Pig Liver Esterase*) que presentan una selectividad opuesta: esto se debe a que la tríada catalítica se orienta de manera diferente en el sitio activo, análogamente a la imagen especular de esta tríada en las mencionadas lipasas.⁴² Por ende, la posibilidad de poder emplear hidrolasas con selectividad opuesta lleva a que la hidrólisis enzimática sea una estrategia poderosa con un alto estereocontrol del resultado de la reacción.



Esquema 1.14. Regla de Kazlauskas para la hidrólisis de ésteres por hidrolasas. Se asume que tiene mayor prioridad el residuo ubicado en el bolsillo “grande” que aquel que se ubica en el bolsillo “medio”.

Debido a la versatilidad en procesos a gran escala de estas enzimas, se han logrado obtener preparados con hidrolasas inmovilizadas los cuales se encuentran disponibles comercialmente. Estas hidrolasas han sido aisladas de diferentes organismos y en distintos ambientes: en esta búsqueda por caracterizar enzimas de organismos extremófilos con potencial aplicación industrial, vale la pena hacer hincapié en las lipasas aisladas de la levadura *Candida antarctica*, consideradas catalizadores ideales para llevar a cabo biotransformaciones preparativas. En este sentido, se destacan dos isoenzimas particulares: la lipasa A (CAL-A) y la lipasa B (CAL-B). Ambas proteínas son catalizadores robustos, termoestables, con diferente especificidad de sustratos; no obstante, CAL-B sobresale por su gran actividad frente a ésteres no naturales, su selectividad y su resistencia a solventes orgánicos.⁴³ Aunque en la actualidad se reportan nuevos trabajos relacionados a lipasas novedosas, en términos de robustez, versatilidad y selectividad, CAL-B sigue siendo una de las primeras opciones a evaluar cuando se trata del diseño de una hidrólisis enzimática.

⁴¹ R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia. *J. Org. Chem.*, **1991**, 56, 2656–2665.

⁴² Z. S. Derewenda, Y. Wei. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 2104–2105.

⁴³ a) J. Uppenberg, S. Patkar, T. Bergfors, T. A. Jones. *J. Mol. Biol.* **1994**, 235, 790–792. b) C. Ortiz, M. L. Ferreira, O. Barbosa, J. C. S. dos Santos, R. C. Rodrigues, Á. Berenguer-Murcia, L. E. Briand, R. Fernández-Lafuente. *Catal. Sci. Technol.*, **2019**, 9, 2380–2420.

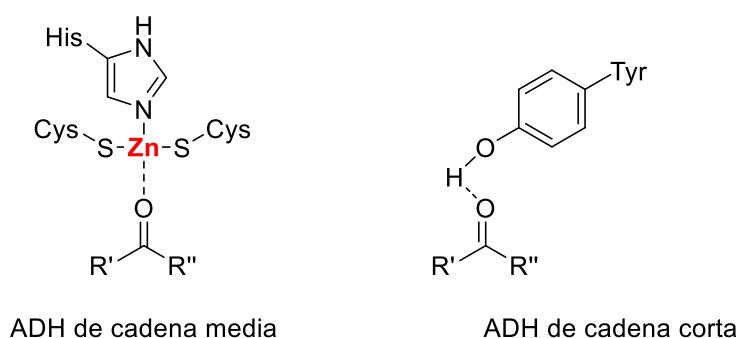
Alcohol deshidrogenasas

Los procesos de oxidación y reducción involucran la transferencia de electrones entre dos componentes. En los sistemas biológicos, las enzimas son las encargadas de llevar a cabo este tipo de reacciones mediante la utilización de intermediarios químicos (oxidorreductasas). Estos intermediarios pueden clasificarse, por un lado, como grupos prostéticos, en el caso de que formen parte de la enzima, es decir, están unidos covalentemente y forman parte del sitio activo; y por otro, como cofactores (o coenzimas), cuando tienen la capacidad de difundir libremente y no permanecer constantemente unidos al sitio activo. Ejemplos de estas especies son los derivados de flavina (por ejemplo, la riboflavina, FMN y FAD).

En la preparación de intermediarios quirales farmacéuticos y en química fina, el empleo de alcohol deshidrogenasas (ADHs) ha sido explorado exhaustivamente con el fin de examinar su aplicación industrial en la producción de alcoholes secundarios. La principal diferencia entre las hidrolasas mencionadas anteriormente y las enzimas que promueven reacciones de óxido-reducción, es que estas últimas necesitan cofactores redox para llevar a cabo la catálisis, donando o aceptando equivalentes químicos para la reducción u oxidación del sustrato. Para la mayoría de las enzimas redox, en particular las ADHs, el cofactor requerido es la nicotinamida adenina dinucleótido [NAD(H)] o su derivado fosforilado, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato [NADP(H)]. En el caso de procesos de reducción, estos cofactores funcionan generalmente como fuentes de hidruro, generalmente para la reducción de enlaces dobles. En base a las características estructurales, las ADHs se encuentran divididas en dos categorías importantes, las cuales difieren en su sitio catalítico: las ADHs de cadena corta y ADHs de cadena media. Desde un punto de vista sintético, la diferencia radica en el proceso de catálisis que ocurre en el sitio activo: en las ADHs de cadena corta interviene una tirosina la cual dona un protón (ácido de Brønsted), y en el caso de las ADHs de cadena media, un átomo de Zn actúa como ácido de Lewis para la activación del carbonilo.⁴⁴ Específicamente, las ADHs de cadena corta no poseen metales en su sitio activo, aunque la presencia de iones Mg^{2+} estabilizan la estructura cuaternaria de la proteína y le brindan mayor estabilidad a temperaturas altas y en solventes orgánicos. Por lo general, estas ADHs de cadena corta, poseen una estructura tetramérica, donde un átomo del metal se ubica coordinado a un homodímero de la proteína, por lo que la enzima constaría de dos iones Mg^{2+} . El empleo de quelantes para capturar estos iones ha demostrado la inactivación de

⁴⁴ K. L. Kavanagh, H. Jörnvall, B. Persson, U. Opperman. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2008**, 65, 3895–3906.

estas enzimas, incluso aun cuando la estructura cuaternaria no se ve drásticamente afectada.⁴⁵ El mecanismo de acción catalítica se basa en la activación del sustrato por la tirosina presente en el sitio activo, que debe estar en su forma aniónica para abstraer el protón del alcohol cuando es oxidado, o en su forma protonada para ceder el protón ácido y generar el enlace O-H del alcohol en el proceso reductivo. Por otro lado, las ADHs de cadena media presentan un átomo de Zn en su sitio activo que se encuentra tetra-coordinado por dos residuos de cisteína, uno de histidina y una molécula de agua. Dicho átomo de Zn no se remueve en presencia de agentes quelantes, por lo que se entiende que la coordinación del metal a los aminoácidos intervinientes es muy fuerte.⁴⁶ En este tipo de ADHs, el Zn actúa posiblemente como un ácido de Lewis, activando al sustrato para la oxidación o reducción del mismo según corresponda. (Esquema 1.15)



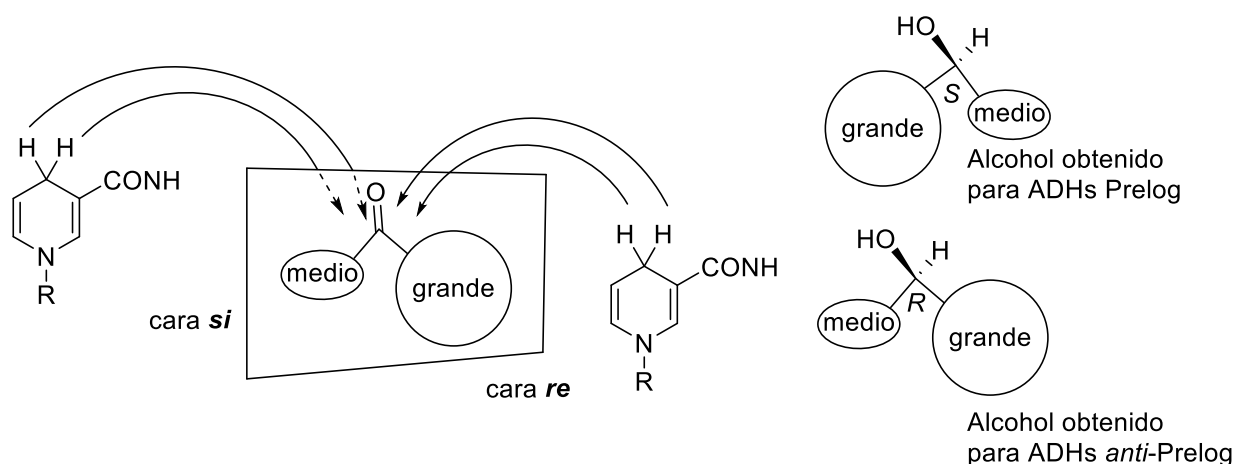
Esquema 1.15. Representación resumida de los componentes que participan de la catálisis en el sitio activo de las ADHs de cadena media y cadena corta para una reacción de reducción.

Durante el transcurso de la reacción, la enzima (mediante el cofactor) cataliza la transferencia del hidruro preferentemente por el lado *si* o por el lado *re* de la cetona, para dar lugar a los correspondientes alcoholes (*R*) o (*S*) respectivamente (Esquema 1.16). De manera análoga a la Regla de Kazlauskas, la mayoría de las ADHs dan lugar a alcoholes (*S*), considerando que el bolsillo más grande tiene mayor prioridad que el pequeño y esto se conoce como Regla de Prelog.⁴⁷ Actualmente se encuentran disponibles, incluso comercialmente, una amplia variedad de enzimas tanto Prelog como *anti*-Prelog, lo cual ha hecho que la reducción estereoselectiva de cetonas promovidas por ADHs sea un método de elección al momento de decidir una estrategia de síntesis.

⁴⁵ N. H. Schlieben, K. Niefind, J. Müller, B. Riebel, W. Hummel, D. Schomburg. *J. Mol. Biol.*, **2005**, *349*, 801–813.

⁴⁶ a) O. Danielsson, S. Atrian, T. Luque, L. Hjelmquist, R. González-Duarte, H. Jörnvall. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1994**, *91*, 4980–4984. b) B. Kosjek, W. Stampfer, M. Pogorevc, W. Goessler, K. Faber, W. Kroutil. *Biotechnol. Bioeng.*, **2004**, *86*, 55–62.

⁴⁷ V. Prelog. *Pure Appl. Chem.*, **1964**, *9*, 119–130.



Esquema 1.16. Transferencia de hidruro dentro del sitio activo y alcoholes obtenidos según la Regla de Prelog. Se hace la misma asunción que la Regla de Kazlauskas con respecto a los sustituyentes.

La mayoría de las ADHs que han sido utilizadas en procesos sintéticos presentan una amplitud de tolerancia de sustratos relativamente reducida. Las cetonas que preferentemente son reducidas son aquellas que presentan al menos un sustituyente pequeño, por ende, con pocas restricciones estéricas.⁴⁸ Sin embargo, se han podido purificar, caracterizar y sobreexpresar ADHs capaces de aceptar cetonas con dos sustituyentes voluminosos de diferente naturaleza como arilos, cetoésteres, o cadenas alquílicas largas, entre otros.⁴⁹ El hecho de contar con estas enzimas hace que el potencial de aplicación en procesos de bioreducción sea muy alto, y siga siendo un área de gran interés para la biocatálisis y los procesos industriales de síntesis de compuesto enantioenriquecidos. A continuación, en el Esquema 1.17 se puede observar ejemplos para la reducción de cetonas con al menos un sustituyente pequeño empleando la ADH-A de *Rhodococcus ruber*⁵⁰ y *LBADH* de *Lactobacillus brevis*,⁵¹ y la reducción de cetonas con ambos sustituyentes voluminosos con *RasADH* de *Ralstonia* sp o *SyADH* de *Sphingobium yanoikuyae*,⁵² y con la levadura *Rhodotorula mucilaginosa*.⁵³

⁴⁸ S. M. A. de Wildeman, T. Sonke, H. E. Schoemaker, O. May. *Acc. Chem. Res.*, **2007**, *40*, 1260–1266.

⁴⁹ I. Lavandera, A. Kern, B. Ferreira-Silva, A. Glieder, S. de Wildeman, W. Kroutil. *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 6003–6005.

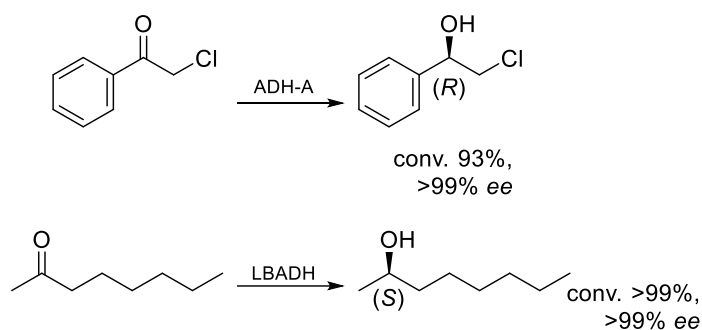
⁵⁰ J. H. Schrittwieser, I. Lavandera, B. Seisser, B. Mautner, J. H. L. Spelberg and W. Kroutil, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2009**, *20*, 483–488.

⁵¹ M. Eckstein, M. Villela, A. Liese, U. Kragl, *Chem. Commun.*, **2004**, 1084–1085.

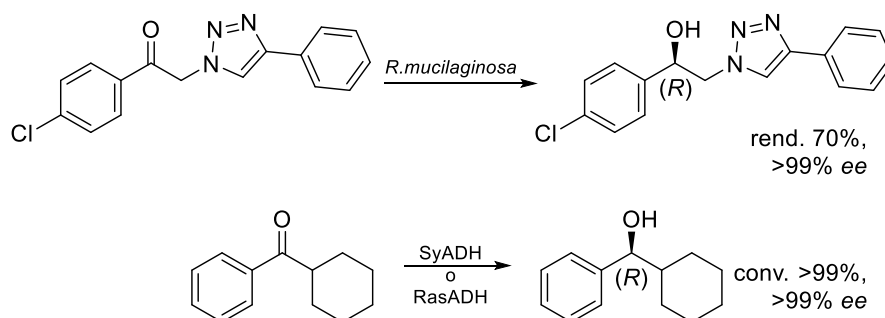
⁵² I. Lavandera, G. Oberdorfer, J. Gross, S. de Wildeman, W. Kroutil. *Eur. J. Org. Chem.*, **2008**, 2539–2543

⁵³ C. Aguirre-Pranzoni, R. D. Tosso, F. R. Bisogno, M. Kurina-Sanz, A. A. Orden. *ProcessBiochem.*, **2019**, *79*, 114–117.

A. Reducción de cetonas *small-bulky*



A. Reducción de cetonas *bulky-bulky*



Esquema 1.17. Ejemplos de sustratos aceptados por diferentes ADHs.

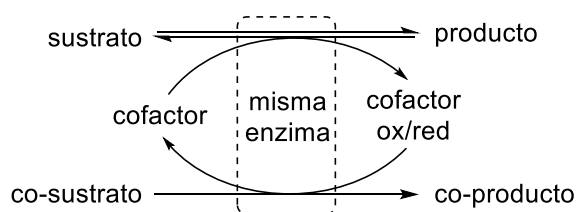
Reciclaje de cofactores rédox

En los procesos biocatalíticos a gran escala, particularmente en las transformaciones que no involucran células enteras, el empleo de cofactores es un tema fundamental a considerar. Por ejemplo, su alto costo hace que sea muy poco atractiva su utilización en cantidades estequiométricas, particularmente las especies reducidas, como así los problemas de inhibición enzimática que pudieran presentarse. Debido a que los cofactores usualmente presentan cambios reversibles durante el transcurso de la reacción (por ejemplo, cambios en el estado de oxidación,¹¹ o transferencia de grupos),⁵⁴ estos pueden ser regenerados mediante una segunda reacción que devuelva al cofactor al estado necesario para que transcurra la reacción de interés. Es por esto que, la regeneración *in situ* de cofactores ha sido ampliamente estudiada con el fin de emplear cantidades catalíticas del cofactor, lo que lleva indefectiblemente a una reducción

⁵⁴ D. Roura Padrosa, R. Alaux, P. Smith, I. Dreveny, F. López-Gallego, F. Paradisi. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2019, 7, 282.

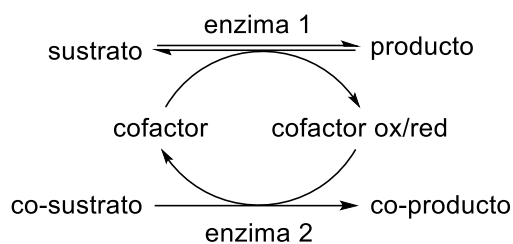
drástica de los costos. En el Esquema 1.18 se muestran las estructuras posibles de los diferentes isómeros de los cofactores nicotinámicos. Además de la regeneración del cofactor, es necesario remarcar que estas estrategias a su vez buscan desplazar el equilibrio hacia la formación de los productos deseados en reacciones termodinámicamente no favorecidas. A continuación, se resumen las estrategias más importantes para regenerar el cofactor en procesos enzimáticos redox.

Acople de un segundo sustrato empleando la misma enzima (“coupled substrate approach”): con el fin de asegurar la constante regeneración del cofactor a su estado requerido para la biotransformación, por lo general se adiciona un segundo sustrato que es transformado por la misma enzima, pero en sentido opuesto. Para desplazar el equilibrio a la formación del cofactor y por ende a la dirección deseada, este segundo sustrato se agrega en exceso. Este sustrato adicional generalmente es de bajo costo, es tolerado en altas concentraciones por la enzima y, además, el subproducto generado no interfiere en la reacción (Esquema 1.19).



Esquema 1.18. Estrategia para el reciclaje del cofactor mediante el empleo de la misma enzima y un co-sustrato.

Acople de una segunda reacción enzimática con una enzima distinta: esta aproximación, denominada “enzima acoplada” (“coupled-enzyme”) consiste en el empleo de una segunda enzima que cataliza una reacción diferente a expensas del cofactor en su forma no útil para la reacción principal. De esta manera, se regenera el cofactor a la forma necesaria para que ocurra la reacción catalizada por la enzima principal. En esta aproximación, se busca que la reacción catalizada por la segunda enzima sea cuasi-irreversible, ya sea por el mismo equilibrio de la reacción o por transformaciones espontáneas del sustrato, además de que el subproducto generado no interfiera en la reacción, y que no dificulte el procesado de la reacción. (Esquema 1.20).



Esquema 1.19. Estrategia para el reciclaje del cofactor mediante el empleo de una segunda enzima y un co-sustrato.

Dentro de esta estrategia se han empleado diversas enzimas principalmente para el reciclaje de cofactores de nicotinamida. En la siguiente tabla se resumen algunas estrategias para la regeneración de estos cofactores en su forma reducida:

Enzima	Sustrato	Producto	Referencia
formiatodeshidrogenasa (FDH)	HCOO ⁻	CO ₂	55
fosfitodeshidrogenasa (PTDH)	HPO ₃ ²⁻	HPO ₄ ²⁻	56
glucosadeshidrogenasa (GDH)	glucosa	ácidoglucónico	57
glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH)	glucosa-6-fosfato	6-fosfogluconolactona	58

Otros métodos

Químicos: se han reportado algunos ejemplos de regeneración química del cofactor. El principal inconveniente de estos métodos radica en la incompatibilidad de las condiciones de reacción entre la reacción biocatalítica y la regeneración, la inactivación, reactivos caros y generación de subproductos no deseados. Además, es importante la regioselectividad para el isómero 1,4 del cofactor de nicotinamida sobre los isómeros enzimáticamente inactivos 1,2 y 1,6; en estos sistemas es necesaria la compatibilidad de las condiciones de reacción entre la

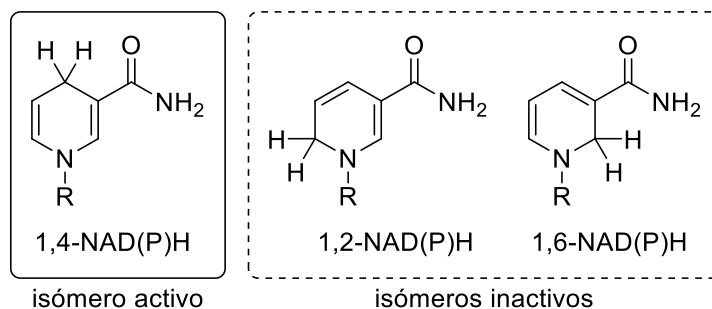
⁵⁵ B. Li., Y. Li., D. Bai, X. Zhang, H. Yang, J. Wang, G. Liu, J. Yue, Y. Ling, D. Zhou, H. Chen. *Sci. Rep.*, **2014**, *4*, 6750.

⁵⁶ A. Mourelle-Insua, F. S. Aalbers, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, M. W. Fraaije. *Tetrahedron*, **2019**, *75*, 1832–1839.

⁵⁷ A. Weckbecker, W. Hummel. **2005** Glucose Dehydrogenase for the Regeneration of NADPH and NADH. In: Barredo J.L. (eds) *Microbial Enzymes and Biotransformations. Methods in Biotechnology*, vol 17. Humana Press.

⁵⁸ M. Dreifke, F. J. Brieler, M. Fröba. *Eur. J. Org. Chem.*, **2018**, 2228–2232.

regeneración regioselectiva del cofactor y la reacción enzimática deseada (Esquema 1.20). Ejemplos de esta estrategia de reciclaje de cofactores de nicotinamida son el empleo de agentes reductores como ditionito de sodio,⁵⁹ y la combinación de hidrógeno con complejos de metales de transición (rodio, iridio, hierro, rutenio o platino, entre otros).⁶⁰



Esquema 1.20. Estructuras de los diferentes isómeros de los cofactores nicotinamídicos.

Electroquímicos: la regeneración electroquímica de cofactores, tanto para su estado oxidado como reducido, tiene la ventaja de ser una estrategia de gran potencial dentro de la química sustentable por el hecho de no necesitar una segunda enzima ni co-sustrato adicionales.⁶¹ La reducción u oxidación directa del cofactor es posible, aunque para ello es necesario aplicar altos sobrepotenciales que pueden llevar a reacciones secundarias no deseadas. El principal inconveniente de la regeneración directa es la falta de especificidad en la regeneración del isómero activo 1,4.⁶² Con el fin de superar estos inconvenientes, se han desarrollado mediadores capaces de transferir electrones desde el electrodo al cofactor a sobrepotenciales considerablemente menores y con mayor selectividad al isómero activo. Entre estos mediadores se encuentran el metilviológeno, ABTS y la 1,10-fenantrolina-5,6-diona,⁶³ como así también mediadores con centros metálicos.⁶⁴

⁵⁹ J. B. Jones, D. W. Sneddon, W. Higgins, A. Lewis. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1972**, 1972, 856–857.

⁶⁰ a) P. S. Wagenknecht, J. M. Penney, R. T. Hembre. *Organometallics*, **2003**, *22*, 1180–1182. b) Y. Maenaka, T. Suenobu, S. Fukuzumi. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 367–374 c) I. Zachos, C. Nowak, V. Sieber. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2019**, *49*, 59–66. d) W. Dong, J. Tang, L. Zhao, F. Chen, L. Deng, M. Xian. *Green Chem.*, **2020**, *22*, 2279–2287. e) X. Wang, H. H. P. Yiu. *ACS Catal.*, **2016**, *6*, 1880–1886.

⁶¹ C. S. Morrison, W. B. Armiger, D. R. Dodds, J. S. Dordick, M. A. G. Koffas. *Biotechnol Adv.*, **2018**, *36*, 120–131.

⁶² F. Hollmann, K. Hofstetter, A. Schmid. *Trends Biotechnol.*, **2006**, *24*, 163–171.

⁶³ M. D. Truppo. *Comprehensive Chirality*, **2012**, *7*, 46–70.

⁶⁴ S-H. Kim, G-Y. Chung, S-H. Kim, G. Vinothkumar, S-H. Yoon, K-D. Jung. *Electrochimica Acta*, **2016**, *210*, 837–845.

Considerando el empleo de mediadores, una estrategia alternativa es la utilización de una enzima intermediaria capaz de regenerar al cofactor de nicotinamida de manera selectiva. En 2019, Minteer ha descrito un sistema donde el uso de una diaforasa, una metaloporfirina de hierro, se utiliza para regenerar selectivamente el NADH necesario para una bio-reducción mediada por ADH. La regeneración del centro metálico de la enzima fue llevada a cabo electroquímicamente empleando un electrodo de carbono vítreo y un polímero de polialilamina modificado con cobaltoceno, funcionando como transportador de electrones entre el electrodo y la diaforasa.⁶⁵

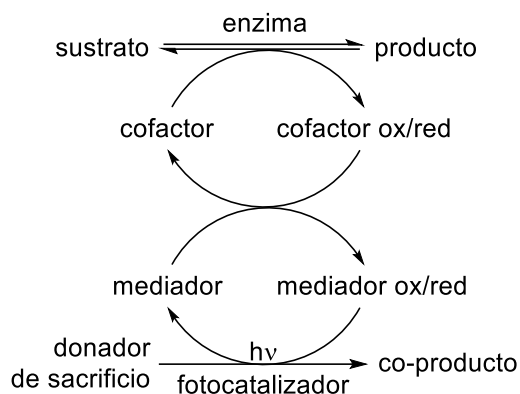
Aunque esta tecnología ha sido empleada de manera satisfactoria en los sistemas mencionados, los inconvenientes que acarrearán la electroquímica a escala industrial, como la pasivación del electrodo, el empleo de altos sobrepotenciales y la necesidad de grandes áreas de exposición del electrodo, llevan a que esta estrategia no sea usada ampliamente.

Fotoquímicos: En las últimas décadas, se ha expandido considerablemente el acople de procesos fotocatalíticos con biocatalíticos, llamado fotobiocatálisis. Dentro de esta área emergente, la mayor cantidad de ejemplos presentados consisten en una reacción fotocatalítica que provee equivalentes redox para una transformación biocatalítica. En general, un fotosensibilizador es excitado con luz y es capaz de tomar electrones o un hidruro de un donador de sacrificio para regenerar al cofactor directamente o indirectamente si se emplea un mediador (Esquema 1.21).⁶⁶ Se han aplicado fotosensibilizadores de diferente naturaleza, como *quantum dots*, nanopartículas metálicas y colorantes orgánicos, entre otros, y entre los donadores de electrones se ha utilizado EDTA, trietanolamina, ácido ascórbico y agua.⁶⁷

⁶⁵ M. Yuan, M. J. Kummer, R. D. Milton, T. Quah, S. D. Minteer. *ACS Catal.*, **2019**, 9, 5486–5495.

⁶⁶ S. H. Lee, D. S. Choi, S. K. Kuk, C. B. Park. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, 57, 7958–7985.

⁶⁷ L. Schmermund, V. Jurkaš, F. F. Özgen, G. D. Barone, H. C. Büchenschütz, C. K. Winkler, S. Schmidt, R. Kourist, W. Kroutil. *ACS Catal.*, **2019**, 9, 4115–4144.



Esquema 1.21. Reciclaje fotocatalítico de cofactores redox empleando mediadores.

Transaminasas

Se estima que el 40% de los compuestos farmacéuticos contienen un grupo amino en su estructura, por lo que la síntesis de aminas enantioenriquecidas para la producción de intermediarios claves es de gran importancia en la industria farmacéutica.⁶⁸ En este contexto, la aproximación biocatalítica para la síntesis de aminas ópticamente puras de alto valor comprende una variedad de enzimas relativamente amplia; no obstante, las transaminasas (TA) han sido las más estudiadas.

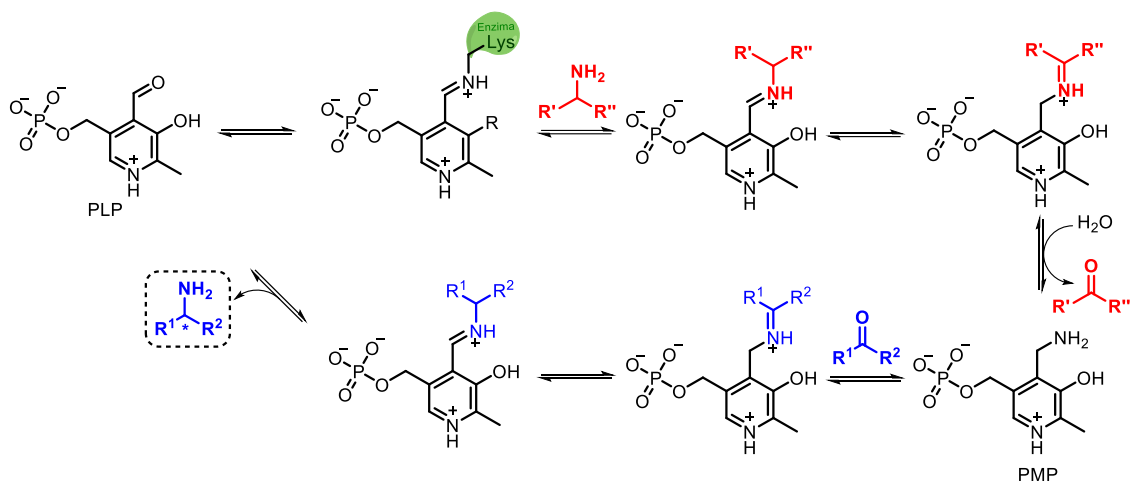
Las transaminasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo amino desde un donador de amina a un aceptor carbonílico (cetona o aldehído). Estas pueden ser clasificadas en α -transaminasas o ω -transaminasas, basado en la posición del grupo amino transferido relativo al carboxilo del sustrato. Las α -transaminasas requieren la presencia de un grupo carboxilo en posición alfa al carbonilo y, por ende, estas enzimas sólo permiten la formación de α -aminoácidos. En cambio, las ω -transaminasas representan al resto de las transaminasas, en donde al menos uno de los compuestos no es un α -aminoácido o un α -cetoácido.⁶⁹

Estas enzimas requieren de piridoxal-5' fosfato (PLP), un derivado de la vitamina B₆, como cofactor y, en su mecanismo de acción, la reacción de transaminación se divide en dos semirreacciones: una desaminación oxidativa del donador de amina y una aminación reductiva del aceptor (Esquema 1.8). En la primera reacción, el PLP se une a una lisina de la enzima

⁶⁸ D. Ghislieri, N. J. Turner. *Top. Catal.*, **2014**, 57, 284–300.

⁶⁹ F. Guo, P. Berglund. *Green Chem.*, **2017**, 19, 333–360.

mediante la formación de un enlace imina, y a ese complejo enzima-PLP se transfiere el grupo amino del donador, que resulta en la generación de piridoxamina-5' fosfato (PMP) y la cetona correspondiente del donador de amina. En una segunda etapa, el grupo amino del PMP es transferido al aceptor, llevando a la formación de la amina deseada y la regeneración del PLP (Esquema 1.22).



Esquema 1.22. Mecanismo de reacción de transaminasas.

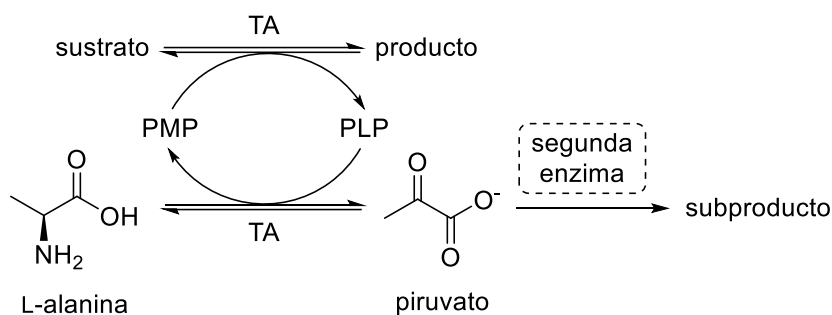
Debido a la mencionada regeneración del PLP en el mecanismo, sólo se necesitan cantidades catalíticas del cofactor para la conversión de cetonas.⁷⁰ Como la reacción es reversible, el desplazamiento del equilibrio puede controlarse con la cantidad del reactivo que está en exceso; aunque la reacción de transaminación para el sustrato está desfavorecida, grandes cantidades del donador de amina provocan el desplazamiento hacia la formación de la amina quiral. Por otra parte, en relación al empleo industrial de estas enzimas, los inconvenientes se asocian a un equilibrio termodinámico no favorable en la síntesis asimétrica y la inhibición enzimática por el producto o subproducto generado.⁷¹ Es por esto que, a diferencia de las enzimas redox, el esfuerzo en los estudios sobre transaminasas no se ha focalizado en métodos de regeneración del cofactor sino en el empleo de donadores de amina de bajo costo que sean compatibles en grandes cantidades con las transaminasas, o la regeneración de donadores de amina efectivos (y/o caros) por otros métodos. Además, se ha estudiado la

⁷⁰ S. A. Kelly, S. Pohle, S. Wharry, S. Mix, C. C. R. Allen, T. S. Moody, B. F. Gilmore. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 349–367.

⁷¹ M. S. Malik, E-S. Park, J-S. Shin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2012**, *94*, 1163–1171.

remoción *in-situ* de subproductos (cetonas usualmente) con el fin de mejorar los rendimientos de la reacción.⁷²

En la búsqueda de un sistema que sea eficiente, y a su vez se minimice la inhibición enzimática, ya sea por el donador de amina o su subproducto, se han estudiado numerosas especies para la transferencia del grupo amino. Entre los donadores de aminas más empleados se destacan la alanina y la isopropilamina (IPA). La alanina es aceptada por casi todas las transaminasas naturales y, normalmente, sólo es aceptada en una forma enantiomérica: las transaminasas (*S*)-selectivas requieren L-alanina, un donador quiral económicamente accesible. En el caso de las transaminasas con selectividad opuesta, se incrementa el costo y el empleo de mezclas racémicas de alanina sólo permite que el 50% puede ser usado, haciendo ineficiente a este proceso en términos de economía atómica y complejizando el procesado de la reacción.⁷³ Por otra parte, cabe mencionar que, para desplazar el equilibrio de la reacción, se han aplicado algunas estrategias para la remoción del piruvato generado por la transaminación empleando una segunda enzima. (Esquema 1.23).



Esquema 1.23. Empleo de una segunda enzima para la conversión de piruvato y desplazamiento de la reacción de transaminación.

Como se puede observar en el esquema anterior, evidentemente, la segunda enzima involucrada debe ser específica para piruvato sobre todas las demás especies que intervienen en la reacción. Al actuar sobre los carbonilos, esta enzima debe diferenciar entre el carbonilo del piruvato y el carbonilo del sustrato para no afectar el rendimiento de la reacción. Particularmente, los métodos más usados debido a la compatibilidad de las enzimas en las condiciones de reacción comprenden una enzima netamente específica para piruvato. Entre algunos métodos desarrollados, se puede mencionar aquellos que involucran lactato deshidrogenasa (LDH), que convierte piruvato en lactato, el cual es capaz de aumentar

⁷² S. Heintz, T. Börner, R. H. Ringborg, G. Rehn, C. Grey, M. Nordblad, U. Krühne, K. V. Gernaey, P. Adlercreutz, J. M. Woodley. *Biotechnol. Bioeng.*, **2017**, *114*, 600–609.

⁷³ P. Kelefiotis-Stratidakis, T. Tyrikos-Ergas, I. V. Pavlidis. *Org. Biomol. Chem.*, **2019**, *17*, 1634–1642.

considerablemente la producción de la amina deseada.⁷⁴ Otra aproximación es el empleo de piruvato descarboxilasa (PDC), una enzima específica para la conversión de piruvato a CO₂. La irreversibilidad de la reacción y el producto generado, hacen que sea una estrategia más atractiva para el acople con transaminasas.⁷⁵

Contrariamente, el empleo de IPA, una amina aquiral económica, permite el empleo de transaminasas tanto (*S*)-selectivas como (*R*)-selectivas, y la remoción del subproducto (acetona) puede ser fácilmente eliminado por evaporación⁷⁶ o reducido enzimáticamente a isopropanol. En esta última aproximación, se han estudiado ADHs con un rango acotado de aceptación de sustratos: la ADH de *Saccharomyces cerevisiae* sólo puede actuar, a velocidades considerables, sobre compuestos pequeños menores a cuatro carbonos y, por ende, puede actuar específicamente sobre la acetona generada y no sobre el sustrato a convertir. Debido a que la ADH necesita del cofactor en su estado reducido para realizar la reducción y por los inconvenientes mencionados anteriormente, el NADH debe reciclarse. En este sentido, cabe mencionar que Berglund y colaboradores han sido capaces de combinar en conjunto con una transaminasa, la ADH de *Saccharomyces cerevisiae* y una formiato deshidrogenasa (FDH), lo cual permite emplear NADH en cantidades catalíticas en combinación con formiato como fuente de hidrógeno.⁷⁷

Las estrategias de remoción del subproducto generado, luego de la transferencia de grupo del donador de amina al sustrato, han permitido favorecer constantemente el equilibrio hacia la producción de la amina asimétrica de interés. Esta estrategia para superar los inconvenientes mencionados, ha llevado a que el empleo de las transaminasas sea una estrategia de elección a la hora de llevar a cabo la síntesis de aminas quirales enantioenriquecidas de alto valor.

Procesos concurrentes

Con el fin de mejorar la eficiencia metabólica, los seres vivos han evolucionado para llevar a cabo complejos procesos metabólicos que involucran una serie de catalizadores extremadamente selectivos que actúan simultáneamente y de manera coordinada. Para lograr

⁷⁴ J-S. Shin, B-G. Kim. *Biotechnol. Bioeng.*, **2009**, 65, 206–211.

⁷⁵ M. Höhne, S. Köhl, K. Robins, U. T. Bornscheuer. *ChemBioChem.*, **2008**, 9, 363–365.

⁷⁶ P. Tufvesson, C. Bach, J. M. Woodley. *Biotechnol. Bioeng.*, **2014**, 111, 309–319.

⁷⁷ K. E. Cassimjee, C. Branney, V. Abedi, A. Wells, P. Berglund. *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 5569–5571.

esto, es altamente importante una regulación perfecta y delicada de los diferentes catalizadores que trabajan en simultáneo. De esta manera, en las vías metabólicas biosintéticas, el producto de una reacción es el sustrato de la siguiente y, debido a esto se evita la acumulación de intermediarios y, por ende, la aparición de reacciones secundarias.

A menudo, los químicos emplean métodos sintéticos de múltiples pasos que involucran reacciones catalíticamente eficientes con el fin de mejorar la economía de átomos global; por eso no es sorprendente que estas metodologías sean ampliamente adoptadas por la industria.⁷⁸ En este contexto, las estrategias que combinan catalizadores y múltiples pasos en un único vial de reacción (“*one-pot*”), evitando costosas etapas de aislamiento y purificación de intermediarios, son llamadas “concurrentes”.⁷⁹ Además de evitar el manejo de intermediarios inestables, se incrementa la reactividad y la selectividad al prevenir desequilibrios no favorables por el efecto cooperativo de los múltiples catalizadores participantes.⁸⁰

Dentro de esta categoría de reacciones de múltiples pasos en un único vial, se puede subdividir en aquellas que se realizan de manera secuencial (o en pasos), cuando las acciones como el agregado de catalizadores, reactivos o modificaciones en la temperatura o la atmósfera, se aplican durante el transcurso del proceso para asegurar una reactividad adecuada; o en simultáneo (también llamado en cascada o dominó) donde las condiciones no se modifican durante el transcurso de la reacción y el agregado de catalizadores y reactivos se hace al comienzo, por lo que sólo hay un único paso operacional.⁸¹ Para los químicos orgánicos, el principal desafío a la hora de elaborar y aplicar estas metodologías (ya sea secuencial o en simultáneo) radica en encontrar las condiciones apropiadas para combinar armónicamente las reacciones intervinientes.⁸²

Procesos en cascada que involucran enzimas

Como se ha mencionado anteriormente, en la naturaleza se ha evolucionado a sistemas altamente eficientes que involucran procesos de reacciones en cascada, los cuales conforman las

⁷⁸ R. A. Sheldon. *Pure Appl. Chem.*, **2000**, *72*, 1233–1246.

⁷⁹ a) F. R. Bisogno, A. Rioz-Martínez, C. Rodríguez, I. Lavandera, G. de Gonzalo, D. E. Torres-Pazmiño, M. W. Fraaije, V. Gotor. *ChemCatChem*, **2010**, *2*, 946–949. b) Wasilke, J.-C., Obrey, S. J., Baker, R. T., Bazan, G. C. *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 1001–1020.

⁸⁰ R. Kourist, S. Schmidt, K. Castiglione. *Chem. Eur. J.*, **2017**, *23*, 1–15.

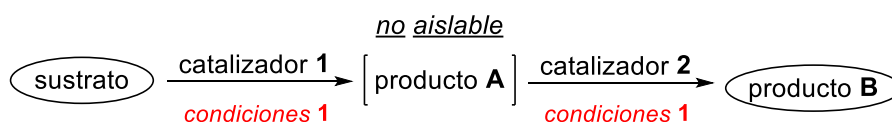
⁸¹ F. R. Bisogno, M. G. López-Vidal, G. de Gonzalo. *Adv. Synth. Catal.*, **2017**, *359*, 2026–2049.

⁸² a) Cuetos, A., Bisogno, F. R., Lavandera, I., Gotor, V. *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 2625–2627. b) G. de Gonzalo, G. Ottolina, G. Carrea, M. W. Fraaije. *Chem. Commun.*, **2005**, 3724–3726.

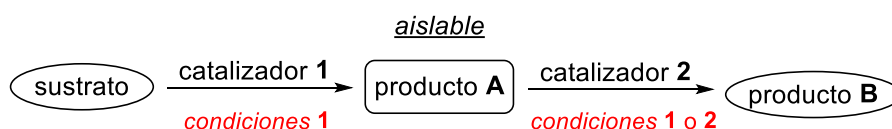
redes metabólicas que sostienen el crecimiento y la supervivencia de todos los sistemas vivos. Estos sistemas multienzimáticos constituyen un excelente ejemplo de catálisis concurrente, y podemos nombrar como ejemplos a la biosíntesis de policétidos,⁸³ la biosíntesis de aminoácidos⁸⁴ y la fotosíntesis (ciclo de Calvin),⁸⁵ entre otros.

Más aún, las enzimas pueden combinarse con catalizadores organometálicos o reacciones químicas tradicionales para realizar cascadas o procesos secuenciales quimioenzimáticos, con el fin de obtener transformaciones “*one-pot*” de interés, que serían inaccesibles con enzimas u otros catalizadores por separado.⁸⁶ Como no hay necesidad de aislar y purificar los intermediarios, disminuyen los tiempos operacionales, costos de producción y desechos, y consecuentemente, el proceso es más eficiente y los rendimientos aumentan.

CASCADA



SECUENCIAL



Esquema 1.24. Representación general de transformaciones en cascada y secuenciales

Aunque el mayor desafío sigue siendo las incompatibilidades en las condiciones de reacción entre las enzimas y los catalizadores o reactivos, este problema cada vez es menor. Por un lado, los avances en ingeniería de proteínas han llevado a las enzimas a poder trabajar en condiciones de reacción más drásticas (mayor tolerancia a solventes orgánicos, concentraciones altas de sustrato y mayores temperaturas). Por otro lado, en la síntesis química, el desarrollo de nuevos catalizadores que puedan adaptarse a los principios de la química verde ha permitido una mayor compatibilidad con las enzimas.

⁸³ C. Khosla. *Chem. Rev.*, **1997**, 97, 2577-2590.

⁸⁴ G. Deferrari, I. Mannuci, G. Garibotto. *Amino Acid Biosynthesis*. Encyclopedia of Life Sciences, **2010**, John Wiley & Sons.

⁸⁵ J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer. *Biochemistry* 5th edition, **2002**. New York, W. H. Freeman.

⁸⁶ F. Rudroff, M. D. Mihovilovic, H. Gröger, R. Snajdrova, H. Iding, U. T. Bornscheuer. *Nat. Catal.*, **2018**, 1, 12-22.

Procesos dinámicos que involucran enzimas

Usualmente, los procesos enzimáticos se emplean para la síntesis de compuestos de alta pureza óptica. Dentro de estos procesos, se pueden diferenciar aquellos que parten de sustratos aquirales o sustratos quirales como mezclas racémicas.

Muchas enzimas son capaces de distinguir entre las dos caras proquirales de sustratos aquirales que poseen un plano de simetría en la molécula, por ejemplo, alquenos o enol ésteres. Una vez que se encuentra el sustrato en el sitio activo, el ataque del nucleófilo preferentemente ocurre por una de las caras: durante este proceso se genera un nuevo centro estereogénico.⁸⁷ Por otra parte, si el sustrato proquiral posee dos grupos funcionales idénticos enantiotópicamente reactivos, ocurre una discriminación quiral durante la transformación del grupo funcional por parte de la enzima. Durante el transcurso de la reacción, se rompe el plano de simetría, llevando a la formación de un compuesto quiral enantioenriquecido.⁸⁸

Por otro lado, en la transformación de una mezcla racémica, se tiene la limitante del 50% de rendimiento, producto de la enantiodiscriminación entre un isómero y el otro por parte de la enzima. En el mejor de los casos, la enzima puede convertir completamente a uno de los enantiómeros mientras que la velocidad de conversión del enantiómero restante es muy baja. A este proceso se lo denomina Resolución Cinética (o por sus siglas en inglés KR, *Kinetic Resolution*). En la práctica, esta situación ideal donde un enantiómero es consumido y el otro permanece intacto, generalmente no ocurre. No se observa un detenimiento completo de la reacción al 50%, sino que ocurre una disminución marcada de la velocidad de reacción alrededor de ese punto. En los sistemas que presentan este comportamiento, hay algunos factores cruciales. La velocidad de reacción de cada enantiómero varía según el grado de conversión, debido a que la relación de los dos enantiómeros se va modificando con el curso de la reacción. Así, la pureza óptica tanto del sustrato como del producto tiene relación con la conversión.¹¹

Con el fin de superar esta limitación intrínseca de las resoluciones cinéticas, si se acopla un proceso de racemización lo suficientemente rápido, se soluciona el inconveniente al restablecer continuamente la relación comparablemente equitativa de ambos enantiómeros (Resolución Cinética Dinámica, o *Dynamic Kinetic Resolution*, DKR). De esta manera se logra que la máxima conversión ahora sea del 100%, e incluso pueden mejorar los excesos enantioméricos

⁸⁷ K. Matsumoto, S. Tsutsumi, T. Ihori, H. Ohta. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 9614–9619.

⁸⁸ F. Björkling, J. Boutelje, S. Gatenbeck, K. Hult, T. Norin, P. Szmulik. *Tetrahedron*, **1985**, *41*, 1347–1352.

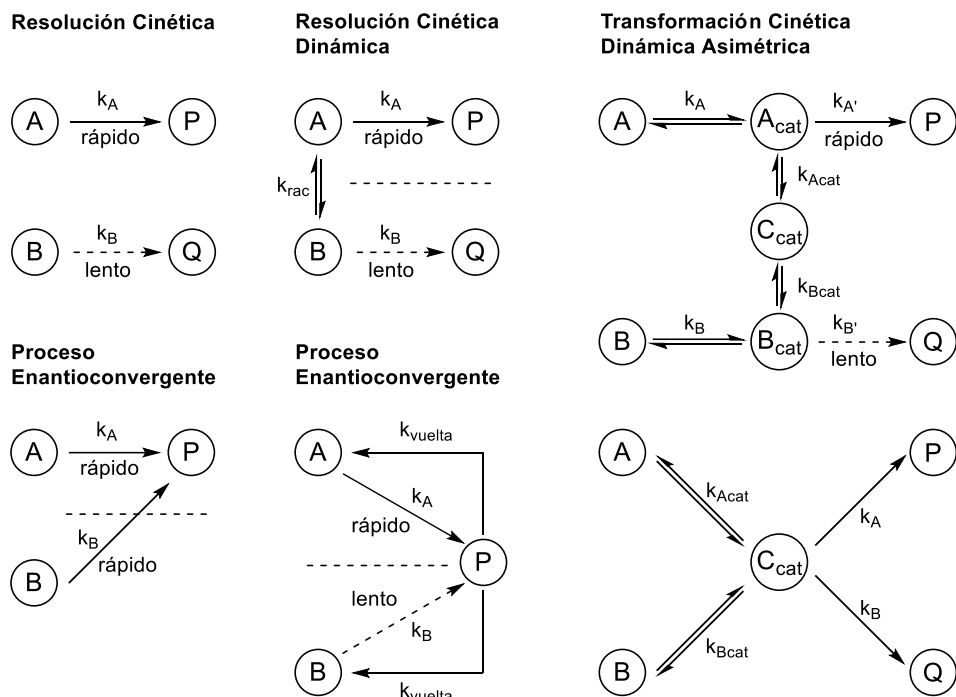
al no existir el desbalance en la cantidad de cada enantiómero del sustrato.⁸⁹ Otra estrategia para el inconveniente de la resolución cinética es el empleo de dos catalizadores donde la reacción enzimática ocurre sobre uno de los enantiómeros, mientras que el restablecimiento de la mezcla racémica ocurre por el otro catalizador pasando por un intermediario aquiral (*Dynamic Kinetic Asymmetric Transformation, DYKAT*).

Considerando la selectividad de los procesos enzimáticos, además de que existen enzimas y catalizadores de naturaleza enantiocomplementaria, se han descritos procesos enantioconvergentes, donde se hace uso de dos catalizadores para la transformación de una mezcla racémica en un único producto.

Por último, también se ha tomado ventaja de las velocidades de reacción de un catalizador sobre una mezcla racémica para la desracemización cíclica de estas mezclas. Así, al emplear un segundo catalizador que lleve a cabo la reacción opuesta al primero, pero de manera no selectiva, el sistema empieza a enriquecerse en el enantiómero que no es consumido por el primer catalizador.⁹⁰ En el Esquema 1.25 mostrado a continuación, se resumen todas las estrategias mencionadas para la obtención de compuestos enantioenriquecidos a partir de mezclas racémicas.

⁸⁹ K. Nakano, M. Kitamura. **2014**. Dynamic Kinetic Resolution (DKR). In Separation of Enantiomers, M. Todd (Ed.).

⁹⁰ J. Steinreiber, K. Faber, H. Griengl. *Chem. Eur. J.*, **2008**, *14*, 8060–8072.



Esquema 1.25. Representación de las estrategias dinámicas para la obtención de compuestos enantioenriquecidos a partir de mezclas racémicas.

CAPÍTULO 1

Biocatálisis rédox como estrategia para el desarrollo de reacciones multicomponente asimétricas. Síntesis de β -*O*-acil sulfuros enantioenriquecidos.

En los últimos años, los procesos denominados “sostenibles” han experimentado una gran demanda por parte de la industria química.⁹¹ Por esta razón, la eficiencia de un proceso de síntesis no sólo está relacionada a su alto rendimiento químico sino también a la baja producción de desechos y el tratamiento posterior de estos.⁹² En esta línea y desde un punto de vista ambiental, la elección de una metodología de síntesis con gran poder de formación de enlaces y con bajo impacto ambiental es de vital importancia para asegurar la sostenibilidad de un proceso productivo. En este contexto es necesario destacar que se ha logrado diseñar con éxito reacciones multicomponentes (RMCs), las cuales son definidas como aquellas reacciones que combinan al menos tres reactivos en el mismo recipiente de reacción, para generar productos que contengan la mayor cantidad de los átomos que conforman los materiales de partida, tal como se describió en la introducción.⁹³

Por otra parte, los compuestos azufrados que presentan hidroxilos en posición β son importantes estructuras presentes en diversos productos naturales.⁹⁴ Estos compuestos poseen además una amplia gama de bioactividades y aplicaciones como agentes anticancerígenos, antiasmáticos e inhibidores de la ADN topoisomerasa, entre otras actividades biológicas.⁹⁵ Por lo tanto, varias estrategias sintéticas han sido desarrolladas para la obtención de β -O-acilsulfuros quirales. La mayoría de ellas involucra la apertura de epóxidos o tiiranos.⁹⁴ No obstante, se han informado pocos métodos asimétricos para la obtención de estos compuestos (Esquema 1.1.).

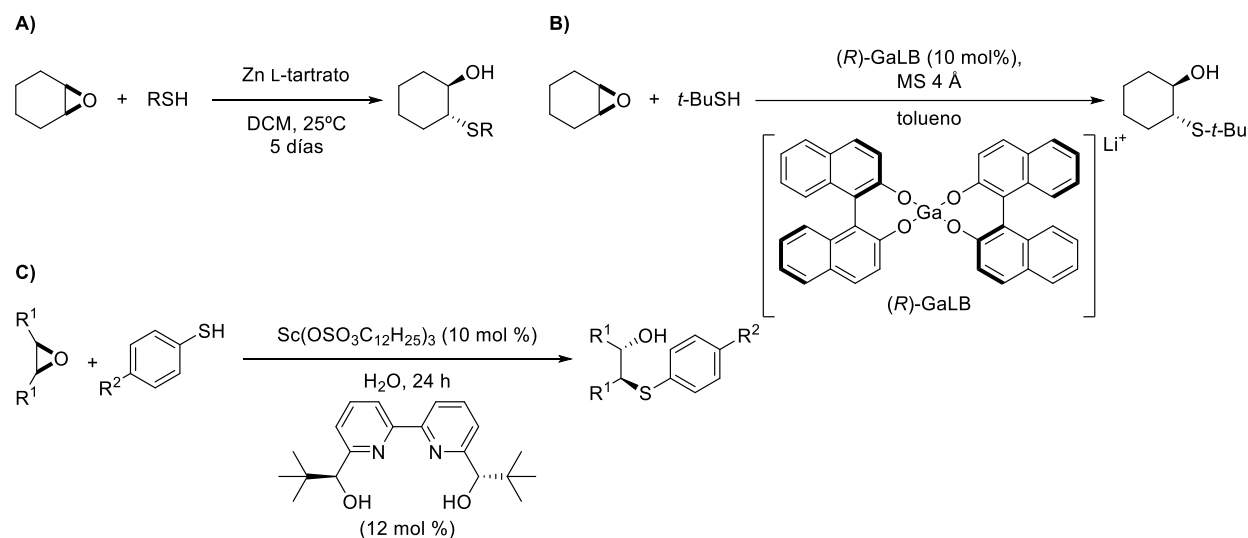
⁹¹ R. A. Sheldon. *Green Chem.*, **2017**, *19*, 18–43.

⁹² a) P. T. Anastas, J. C. Warner. *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, New York, **1998**. b) M-G Braun, A. Díaz-Rodríguez, L. Diorazio, Z. Fei, K. Fraunhoffer, J. Hayler, M. Hickey, S. Hughes, M. McLaws, P. Richardson, M. Schober, A. G. Smith, A. Steven, J. Terrett, T. White, J. Yin. *Org. Process Res. Dev.* **2018**, *22*, 12, 1699–1711.

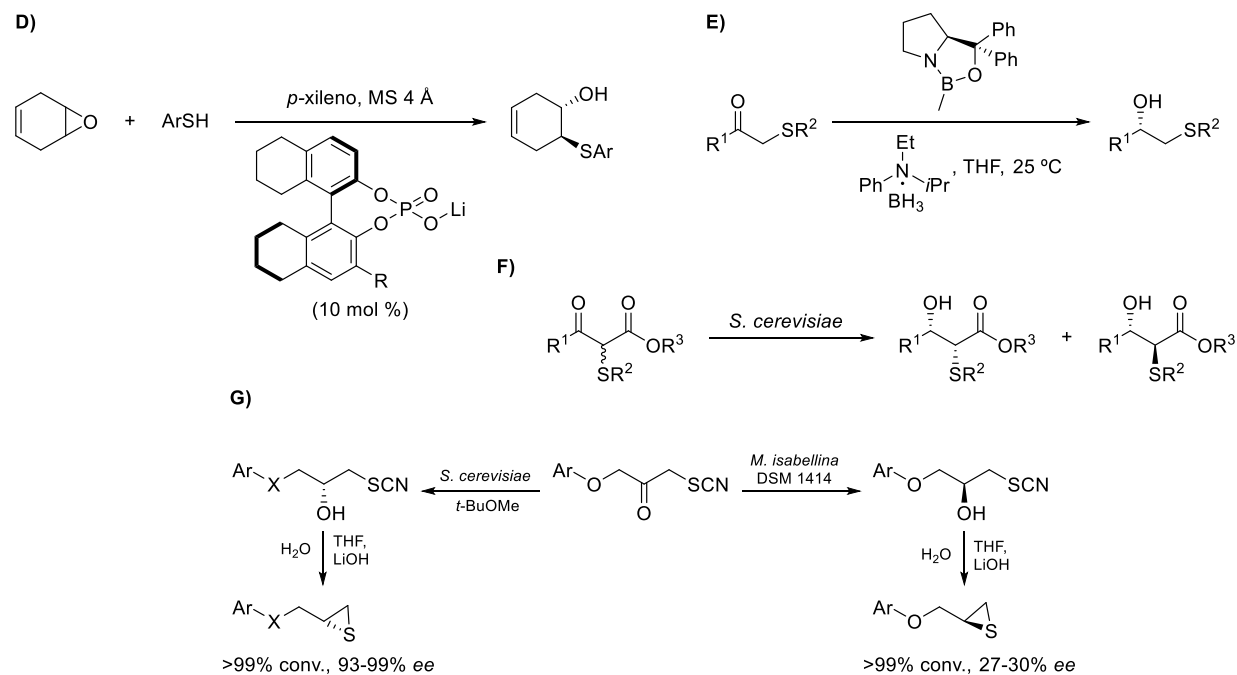
⁹³ R. C. Cioc, E. Ruijter, R.V.A. Orru. *Green Chem.*, **2014**, *16*, 2958-2975.

⁹⁴ M. B. Marakalala, E M. Mmutlane and H. H. Kinfe. *Beilstein J. Org. Chem.*, **2018**, *14*, 1668–1692.

⁹⁵ K. L. Dunbar, D. H. Scharf, A. Litomska, C. Hertweck. *Chem. Rev.*, **2017**, *117*, 5521–5577.



Esquema 1.1. Estrategias para la preparación de β -hidroxisulfuros enantioenriquecidos empleando metales de transición



Esquema 1.2. Otros métodos descriptos para síntesis de β -hidroxisulfuros enantioenriquecidos.

Entre ellos cabe destacar la apertura de epóxidos *meso* utilizando tioles como nucleófilos en presencia de diferentes catalizadores: metálicos (Zn, Ga, In, Sc) acomplejados con ligandos

quirales (tartrato, binoles o tipo Salen)⁹⁶ (Esquema 1.1) o fosfatos quirales (Esquema 1.2, **D**).⁹⁷ Por otro lado, en cuanto a los métodos que no involucran la apertura de epóxidos, se encuentra la reducción enantioselectiva de α -tioetonas catalizada por una oxazaborolidina quiral (catalizador de Corey-Bakshi-Shibata),⁹⁸ la reducción de α -sulfenil- β -cetoésteres por *Saccharomyces cerevisiae*⁹⁹ y la reducción de α -tocianato cetonas promovida por *S. cerevisiae* o *M. isabelina*¹⁰⁰ (Esquema 1.2, **E**, **F** y **G** correspondientemente). A pesar de estos últimos ejemplos, es necesario mencionar que el empleo de biocatalizadores para la síntesis de β -hidroxisulfuros o derivados sigue siendo un área que no ha sido explorada.

Es importante destacar que el empleo de metales de transición y ligandos quirales supone generalmente altos costos en la síntesis, además de que la utilización de disolventes orgánicos no es recomendable desde el punto de vista de la química verde. Más aún, el empleo de tioles no resulta metodológicamente conveniente debido a su mal olor y a su inestabilidad frente a la oxidación promovida por el aire. Adicionalmente a dichos inconvenientes, se le suma la poca versatilidad de estos métodos en lo que respecta al control de los sustituyentes.

Debido a lo expresado en párrafos anteriores y en base al desarrollo previo de una reacción multicomponente llevada a cabo en nuestro grupo de trabajo para la obtención de *Z*-enolésteres,¹⁰¹ y aprovechando las ventajas de este tipo de metodologías (versatilidad, diversidad química, alto poder de formación de enlace, economía de átomos, entre otros),¹⁰² resulta importante promover el desarrollo de una metodología multicomponente quiral para la síntesis de derivados de β -hidroxisulfuros enantioenriquecidos, empleando condiciones suaves de reacción y evitando el uso de tioles.

⁹⁶ a) H. Yamashita, T. Mukaiyama. *Chem. Lett.*, **1985**, *14*, 1643–1646. b) T. Iida, N. Yamamoto, H. Sasai, M. Shibasaki. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 4783–4784. c) M. V. Nandakumar, A. Tschöp, H. Araitscheid, C. Schneider. *Chem. Commun.*, **2007**, 2756–2758. d) A. Tschöp, M. V. Nandakumar, O. Pavlyuk, C. Schneider. *Tetrahedron Lett.*, **2008**, *49*, 1030–1033. e) M. V. Nandakumar, S. Ghosh, C. Schneider. *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, 6393–6398.

⁹⁷ a) Z. Wang, W. K. Law, J. Sun. *Org. Lett.*, **2013**, *15*, 5964–5966. b) G. Ingle, M. G. Mormino, J. C. Antilla. *Org. Lett.*, **2014**, *16*, 5548–5551.

⁹⁸ B. T. Cho, O. K. Choi, D. J. Kim. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 697–703. B. T. Cho, S. H. Shin. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 6959–6966.

⁹⁹ T. Fujisawa, T. Itoh, T. Sato. *Tetrahedron Lett.*, **1984**, *25*, 5083–5086.

¹⁰⁰ E. Łukowska, J. Plenkiewicz. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2007**, *18*, 1202–1209.

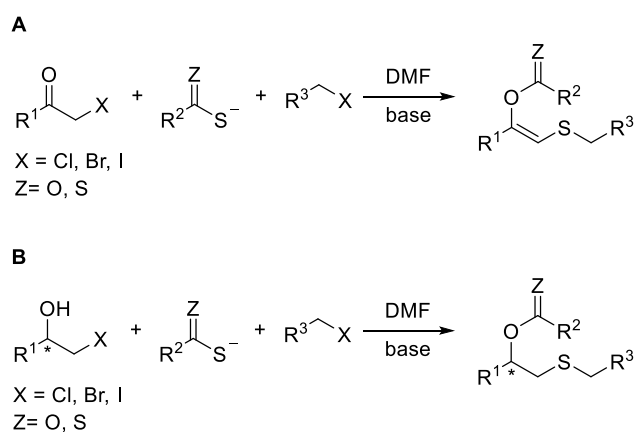
¹⁰¹ A. A. Heredia, S. M. Soria-Castro, L. M. Bouchet, G. Oksdath-Mansilla, C. A. Barrionuevo, D. A. Caminos, F. R. Bisogno, J. E. Argüello, A. B. Peñéñory. *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 6516–6526.

¹⁰² C. de Graaff, E. Ruijter, R.V.A. Orru. *Chem. Soc. Rev.*, **2012**, *41*, 3969–4009.

Objetivos particulares

De acuerdo a estos antecedentes, se propuso el desarrollo de una reacción multicomponente asimétrica para la síntesis de β -O-acil sulfuros, empleando una reducción biocatalítica para la obtención de un sustrato de partida enantioenriquecido para la reacción multicomponente.

De manera análoga a la reacción multicomponente desarrollada por nuestro grupo de trabajo,¹⁰¹ se propuso llevar a cabo una reacción similar, pero cambiando la α -haloacetona por una halohidrina. De esta manera, partiendo de una halohidrina quiral con la estereoquímica deseada, se planteó la posibilidad de controlar la estereoquímica del producto final en una reacción multicomponente (Esquema 1.3).



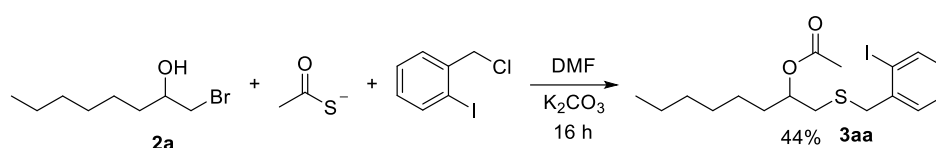
Esquema 1.3. Comparación de la metodología previamente descrita para la obtención de Z-enol ésteres (A) y la reacción multicomponente propuesta para los correspondientes β -O-acilsulfuros (B).

En base a lo anteriormente expuesto, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar una reacción multicomponente asimétrica para sintetizar de manera eficiente una serie de β -O-acilsulfuros quirales.
- Investigar una serie de ADHs como catalizadores de elección para la reducción de α -haloacetonas, obteniendo las correspondientes halohidrinas enantioenriquecidas.
- Optimizar las condiciones de reacción sin perjuicio de la estereoquímica del producto final.

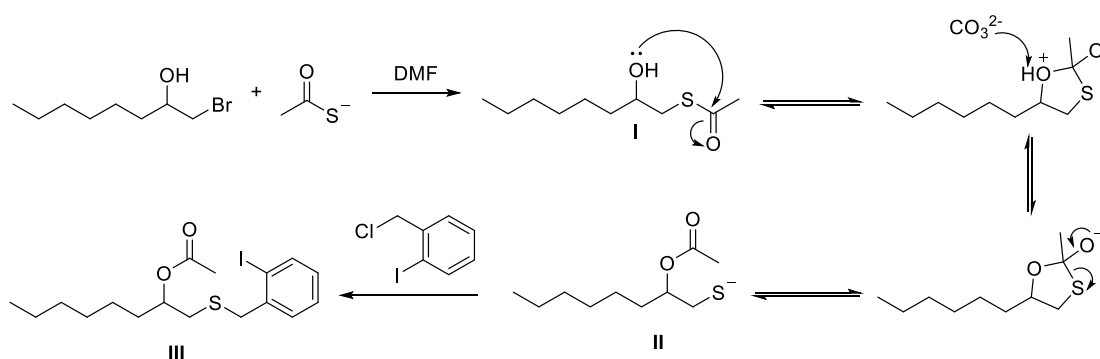
Reacción multicomponente con halohidrinás racémicas para la obtención de β -hidroxisulfuros

En una primera aproximación, se llevó a cabo un experimento a temperatura ambiente y utilizando 1-bromooctan-2-ol (**2a**) como sustrato modelo. Se utilizó tioacetato de potasio como fuente de azufre, 1-(clorometil)-2-iodobenceno como electrófilo y carbonato de potasio como base (Esquema 1.4).



Esquema 1.4. Primera aproximación a la reacción multicomponente en estudio.

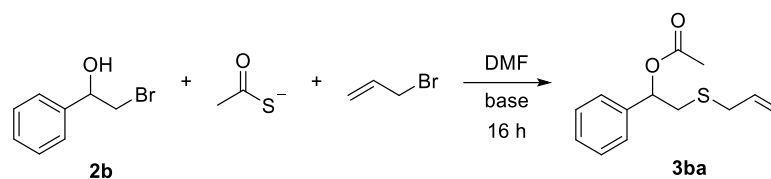
En este contexto, se planteó que la reacción podría comenzar a través de una reacción S_N2 entre la halohidrina y el compuesto tiocarboxílico, que luego, promovido por la base, permite que se establezca un equilibrio que involucra la migración del grupo acilo por parte del azufre al oxígeno, para formar así un β -*O*-aciltiolato, el cuál es atrapado por el electrófilo (Esquema 1.5).¹⁰³ Como pruebas mecanísticas se llevó a cabo la primera reacción S_N2 entre la halohidrina y el tiocarboxilato, obteniéndose el β -hidroxitioéster (**I**). A su vez, este compuesto, en presencia de una base y un electrófilo, evoluciona al β -*O*-acilsulfuro (**III**), lo que pone en evidencia la formación de un anión tiolato (**II**), el cual es atrapado por el electrófilo a medida que se va generando. En ausencia de base y en presencia del electrófilo, se aísla únicamente el β -hidroxitioéster.



Esquema 1.5. Mecanismo propuesto para la reacción multicomponente.

¹⁰³ Para migraciones de acilo catalizada por base, ver por ejemplo: a) F. Capitta, A. Frongia, P. P. Piras, P. Pitzanti, F. Secci. *Adv. Synth. Catal.*, **2010**, 352, 2955–2960. b) P. Botti, M. Villain, S. Manganiello, H. Gaertner. *Org. Lett.*, **2004**, 6, 4861–4864.

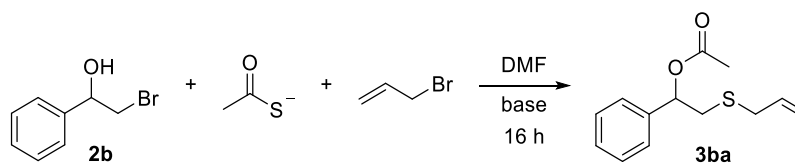
Una vez confirmada la posibilidad de la reacción mediante una reacción de prueba, se llevó a cabo otra experiencia, pero utilizando una halohidrina aromática bajo las mismas condiciones de reacción, aunque cambiando el electrófilo por bromuro de alilo (Esquema 1.6).



Esquema 1.6. Reacción modelo para estudio de halohidrinás aromáticas.

Más aún, con el objetivo de optimizar las condiciones para obtener la mayor versatilidad posible de la metodología de trabajo también se llevó a cabo un muestreo utilizando diferentes bases. Para la reacción modelo se utilizó 2-bromo-1-feniletanol (**2b**), tioacetato de potasio y bromuro de alilo en DMF como solvente. Para ello, se ensayaron bases orgánicas e inorgánicas, incluyendo nitrogenadas.

Tabla 1.1. Estudio de bases para la reacción con halohidrinás aromáticas.



entrada	bases	rendimiento
1	K ₂ CO ₃	-
2	K ₃ PO ₄	>99%
3	<i>t</i> -BuOK	>99%
4	Et ₃ N	Mezcla compleja
5	DMAP	Mezcla compleja
6	Ph ₃ P	Incompleta*

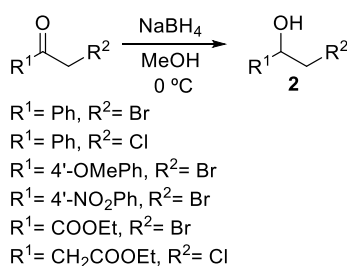
Se empleó 2 equivalentes para el estudio de cada base. *Se detectó la presencia mayoritaria de otro producto.

Dada la compatibilidad de la primera base con la metodología previamente desarrollada y la reacción modelo para este sistema, se consideró inicialmente utilizar K₂CO₃ (entrada 1). Contrariamente a lo observado para la reacción del 1-bromooctan-2-ol, el uso de 2 equiv. K₂CO₃ no dio lugar a la reacción esperada, lo cual podría estar indicando que esta base sólo sería compatible con halohidrinás alifáticas. Tras procesar el crudo de reacción de las reacciones fallidas, se aisló el producto mayoritario y se caracterizó por RMN, donde se observó presencia del producto de sustitución del tioacetato sobre la halohidrina. Este resultado, considerando el mecanismo propuesto, llevó a utilizar bases de Brønsted más fuertes. Tanto con K₃PO₄ como con

t-BuOK (entradas 2 y 3 respectivamente) mostraron, al ser analizadas por Cromatografía Gaseosa, una única señal correspondiente al producto deseado (conversión completa de la halohidrina de partida); entre estas bases, se prefirió al K₃PO₄ debido a su menor costo. Por otra parte, y diferencia de las bases anteriores, las bases nitrogenadas, Et₃N y DMAP, fueron utilizadas debido a su solubilidad en DMF y DMSO. No obstante, al ser analizadas por Cromatografía Gaseosa, en ambos casos se obtuvo una mezcla compleja de productos. Este resultado puede deberse a la capacidad de las aminas para funcionar como intermediario en reacciones de transferencia de acilo¹⁰⁴. Por último, al emplear Ph₃P (entrada 6) no se observó el producto deseado, aunque en los análisis por Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas, se detectó una señal correspondiente al sulfuro de trifenilfosfina. Aquí es necesario mencionar que posiblemente pueda ocurrir una situación similar a la contracción de azufre de Eschenmoser¹⁰⁵ o la reacción de Barton-Kellogg,¹⁰⁶ entre otras.

Considerando los alentadores resultados obtenidos al trabajar con los compuestos **2a** y **2b** y con el fin de explorar el alcance de nuestra metodología de trabajo con respecto a las halohidrinadas utilizadas como sustratos de partida, se procedió a llevar a cabo reacciones utilizando diferentes halohidrinadas aromáticas y alifáticas, empleadas de forma racémica. Todas ellas fueron previamente sintetizadas por reducción de sus correspondientes α -halocetonas con NaBH₄ (Tabla 1.2).¹⁰⁷

Tabla 1.2. Reducción no selectiva de halocetonas.



¹⁰⁴ A.C. Spivey, S. Arseniyadis. *Asymmetric Organocatalysis. Topics in Current Chemistry*. Springer, Berlin, Heidelberg, **2010**.

¹⁰⁵ M. Roth, P. Dubs, E. Götschi, A. Eschenmoser. *Helv. Chem. Acta.*, **1971**, *54*, 710-734.

¹⁰⁶ a) D. H. R. Barton, B. J. Willis. *J. Chem. Soc. D*, **1970**, 1225-1226. b) R. M. Kellogg. *Tetrahedron*, **1976**, *32*, 2165-2184.

¹⁰⁷ F. R. Bisogno, A. Cuetos, A. A. Orden, M. Kurina-Sanz, I. Lavandera, V. Gotor. *Adv. Synth. Catal.*, **2010**, *352*, 1657 – 1661.

entrada	sustrato	producto	rendimiento (%) ^a
1	R ¹ = Ph, R ² = Br	2b	60%
2	R ¹ = Ph, R ² = Cl	2b'	44%
3	R ¹ = 4'-OMePh, R ² = Br	2c	38%
4	R ¹ = 4'-NO ₂ Ph, R ² = Br	2d	36%
5	R ¹ = COOEt, R ² = Br	2e	45%
6	R ¹ = CH ₂ COOEt, R ² = Cl	2f	53%

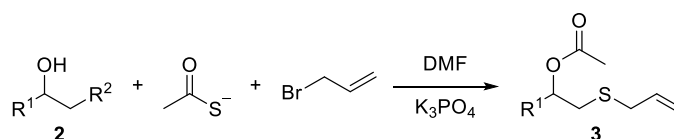
1 g de sustrato en 5 mL de MeOH a 0 °C con 1.4 equiv. de NaBH₄. ^a Rendimiento aislado.

Como se puede observar en la Tabla 1.2, la metodología empleada no presentó una apreciable variación con respecto a los rendimientos de los productos obtenidos con los diferentes grupos sustituyentes empleados. Sólo en el caso de las halocetonas aromáticas sustituidas se obtuvieron rendimientos levemente inferiores a la reducción de las demás halocetonas (entradas 3 y 4). Estos rendimientos relativamente bajos pueden deberse a las pérdidas en el procesado de la reacción que son significativamente mayores cuando la escala de las reacciones es baja. Por otra parte, en la reducción de la halocetona conteniendo el grupo nitro en posición *para* (**2d**) se observó por cromatografía en capa delgada la presencia del producto de deshalogenación (*p*-nitroacetofenona) (entrada 4).

Por otro lado, para la halocetona aromática con el sustituyente CH₃O- (donador de electrones - 2-bromo-*p*-metoxiacetofenona, **2c**), la disminución en el rendimiento de la reacción se atribuye a la baja pureza del sustrato, que fue observado al monitorear la reacción de reducción por Cromatografía en Capa Delgada (entrada 3).

Una vez obtenidas estas halohidrinas y para estudiar los alcances de la metodología desarrollada, se llevó a cabo una serie de reacciones multicomponentes, utilizando bromuro de alilo como electrófilo. Los resultados obtenidos pueden ser observados a continuación en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3. Alcances de la metodología según las halohidrinas empleadas.

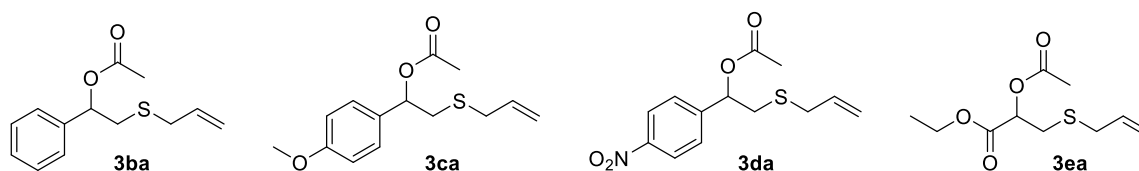


2b, R¹= Ph, R²= Br
2b', R¹= Ph, R²= Cl
2c, R¹= 4'-OMe-Ph, R²= Br
2d, R¹= 4'-NO₂-Ph, R²= Br
2e, R¹= COOEt, R²= Br
2f, R¹= CH₂COOEt, R²= Cl

entrada	sustrato	producto	rendimiento (%)
1	2b	3ba	75% ^a
2	2b'	3ba	73% ^c
3	2c	3ca	56% ^a
4	2d	3da	50% ^{a, d}
5	2e	3ea	54% ^a (96%) ^b
6	2f	3fa	mezcla compleja

^a 0.13 mmol de **2**, 1.1 equiv de tioacetato de potasio, 1.2 equiv de bromuro de alilo y 1.2 equiv de *t*-BuOK. ^b 0.5 mmol de **2e** ^c La reacción se calentó a 60°C para acelerar la sustitución nucleofílica entre el tioacetato y la halohidrina y observar conversión completa de la halohidrina. ^d La reacción se realizó con el compuesto (*S*)-**2d**.

Como se puede observar en la tabla anterior, mediante la estrategia de reacción multicomponente se lograron sintetizar los siguientes productos mostrados a continuación en el Esquema 1.7.



Esquema 1.7. Productos obtenidos empleando bromuro de alilo como electrófilo.

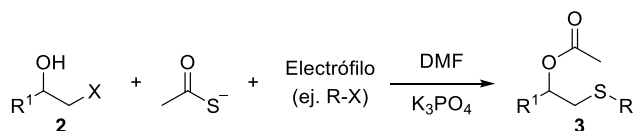
Con respecto a lo observado para las halohidrinas aromáticas, mostradas en la Tabla 1.3 (entradas 1 y 2) sólo se modificó el halógeno utilizado como grupo saliente. En el caso de la entrada 2, cuando se llevó a cabo la reacción entre la clorhidrina **2b'** y el tioacetato a temperatura ambiente, la reacción fue incompleta hasta transcurridas 2 horas. Debido a esto, se llevó a cabo otra experiencia, pero trabajando a 60°C, y a esta temperatura, el reactivo de partida se consumió totalmente. A diferencia del compuesto **2b'**, la bromhidrina **2b** fue consumida completamente en 15 minutos por el nucleófilo azufrado. Estos resultados pueden ser relacionados a la diferente capacidad como grupo saliente que poseen el bromo y el cloro. Si la reacción transcurre vía un mecanismo S_N2, la bromhidrina posee mayor reactividad ya que el bromo resulta ser un mejor grupo saliente.

Por otra parte, con respecto a los sustituyentes ubicados sobre el anillo aromático, se llevaron a cabo experimentos utilizando un grupo donador de electrones y un aceptor. En ambos casos, como se puede observar en la Tabla 1.3 (entradas 3 y 4) se obtuvieron resultados similares. Esto demuestra la versatilidad de la metodología desarrollada en cuanto a los sustituyentes ubicados sobre el anillo aromático de este tipo de halohidrinas. Debido a esto, la reacción es compatible tanto con sustituyentes donadores de electrones como con sustituyentes aceptores de electrones.

Por otro lado, en base a los resultados obtenidos con la halohidrina de 8 carbonos estudiada inicialmente (**2a**, Esquema 1.4), se estudiaron otras halohidrinas alifáticas. Utilizando como sustrato el compuesto **2e**, se obtuvo el producto deseado con rendimientos similares a los anteriores (entrada 5). Se evidenció además la tolerancia frente a otros grupos funcionales, al menos en el caso de un éster, presentes en el compuesto halogenado de partida. Es remarcable el aumento en el rendimiento de la reacción al aumentar escala (96% vs 56%), lo que indica que hay pérdidas en el procesado que se minimizan a mayor escala. En cambio, con respecto a la halohidrina **2f**, se obtuvo una mezcla compleja de productos (entrada 6). En el caso de esta halohidrina, existe un metileno en posición alfa al alcohol (y alfa al éster) que presenta protones con elevada acidez que compiten por la base. Esto lleva a la generación de especies aniónicas distintas, las cuales pueden reaccionar en presencia del electrófilo, dando lugar a reacciones en paralelo que originan una variedad de otros compuestos, en detrimento del rendimiento del producto deseado.

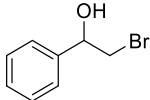
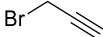
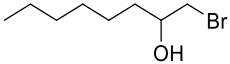
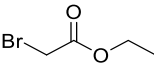
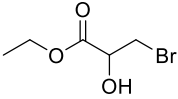
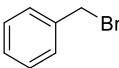
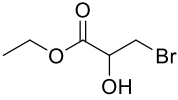
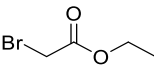
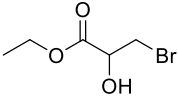
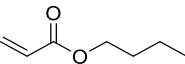
Por otro lado, para extender el alcance de la metodología, el estudio se amplió con respecto a la naturaleza de los electrófilos utilizados. Considerando la reactividad del tiolato como nucleofílico intermediario,¹⁰⁸ se ensayaron diferentes electrófilos modificando su naturaleza química. Los resultados pueden ser observados a continuación en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Alcances de la metodología según los electrófilos utilizados.

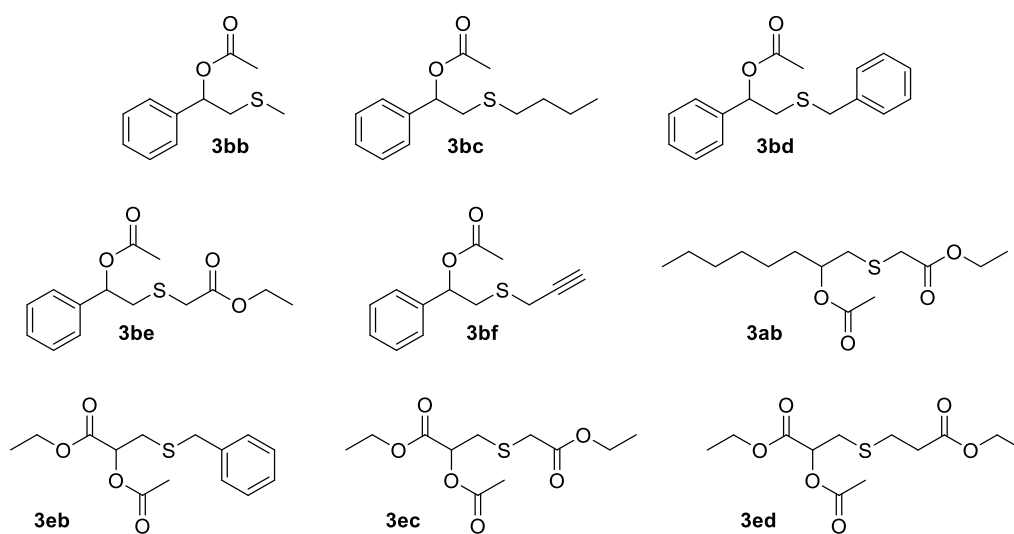


entrada	halohidrina	electrófilo	base	producto	rendimiento (%)
1		Mel	<i>t</i> -BuOK	3bb	68%
2			<i>t</i> -BuOK	3bc	53%
3			K ₃ PO ₄	3bd	85%
4			<i>t</i> -BuOK	3be	52%

¹⁰⁸ J. W. Chan, C. E. Hoyle, A. B. Lowe, M. Bowman. *Macromolecules*, **2010**, *43*, 6381–6388.

5			<i>t</i> -BuOK	3bf	61%
6			K ₃ PO ₄	3ab	68%
7			<i>t</i> -BuOK	3fb	54%
8			K ₃ PO ₄	3ec	68%
9			K ₃ PO ₄	3ed	54%

Como se puede observar en la Tabla 1.4, a partir de las reacciones entre las halohidrinas, el tioacetato de potasio y los electrófilos seleccionados se obtuvieron los siguientes compuestos mostrados en el Esquema 1.8.

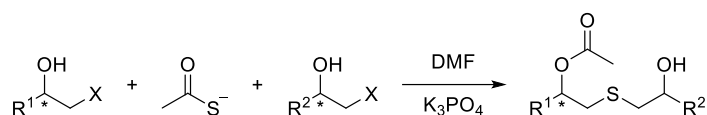


Esquema 1.8. Productos obtenidos de la reacción multicomponente al emplear diversas halohidrinatas y electrófilos distintos a bromuro de alilo.

A partir de los productos sintetizados se seleccionó al compuesto **2b** para estudiar la variedad de sustituyentes que pueden insertarse sobre el átomo de azufre, utilizando esta metodología. Tanto sustituyentes con cadenas alifáticas (entradas 1 y 2) como el grupo bencilo (entrada 3) funcionaron de manera similar, no obstante, este último resultó ser un poco más eficiente. Además del ejemplo con alilo mencionado anteriormente, otros electrófilos conteniendo grupos funcionales como ésteres o alquinos (entrada 4 y 5 respectivamente)

también fueron estudiados. Por otra parte, y debido a que la especie nucleofílica es un tiolato, el cual posee un alto poder nucleofílico, la naturaleza del electrófilo no presentó una influencia significativa por lo que no se observan diferencias notables en cuanto a los porcentajes de rendimientos de los productos sintetizados dependiendo del electrófilo empleado. Con respecto a la halohidrina de 8 carbonos, se obtuvieron resultados similares cuando se empleó bromoacetato de etilo de electrófilo (entrada 6) en comparación al estudio inicial con 1-(clorometil)-2-iodobenceno como electrófilo (Esquema 1.4). En el caso de los electrófilos evaluados con el compuesto **2e**, también se encontraron resultados similares. Al emplear tanto bromuro de bencilo como bromoacetato de etilo (entradas 7 y 8 respectivamente) se obtuvieron resultados muy buenos, lo que demuestra la compatibilidad de las halohidrinas alifáticas con una variedad de electrófilos conteniendo diversos otros grupos funcionales. Por último, aprovechando la especie nucleofílica centrada en azufre que se genera, se estudió la adición de Michael del tiolato a acrilato de butilo (entrada 9), obteniéndose resultados similares a los halogenuros de alquilo en términos de rendimiento. De esta forma, se demostró la versatilidad de la metodología ante la variedad de halohidrinas y electrófilos, permitiendo controlar la diversidad química de los productos, ya que es capaz de tolerar diversos grupos funcionales presentes en estas estructuras.

Por otra parte, al poder utilizar halogenuros de alquilo como electrófilos ante el ataque del tiolato resultante, se estableció también la posibilidad de utilizar una halohidrina quiral como electrófilo con el objetivo de incorporar un centro estereogénico adicional al producto final (Esquema 1.9).

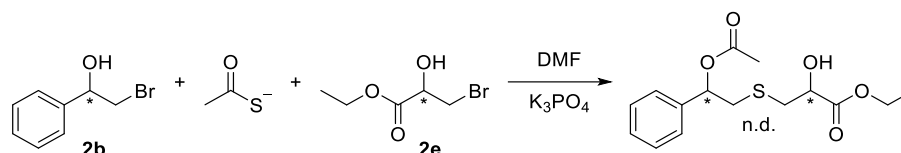


Esquema 1.9. *Reacción multicomponente empleando únicamente halohidrinas como electrófilos para la obtención de dioles ortogonalmente protegidos.*

Esta estrategia podría permitir la obtención de dioles quirales ortogonalmente protegidos, los cuales representan un gran desafío para los procedimientos de síntesis orgánica.¹⁰⁹

El estudio se inició utilizando al compuesto **2b** como halohidrina de partida y al compuesto **2f** como electrófilo final (Esquema 1.10).

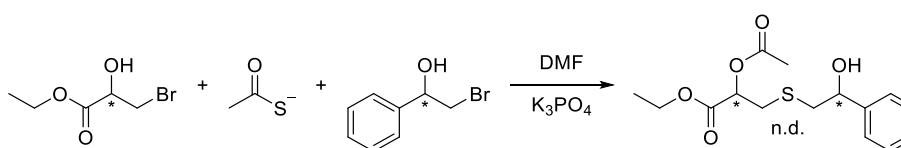
¹⁰⁹ T. J. Boltje, C. Li, G-J. Boons. *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 20, 4636–4639.



Esquema 1.10. Reacción multicomponente inicial con halohidrinás

Al procesar la reacción, se observó una mezcla compleja de productos. Se detectó por Cromatografía Gaseosa al producto de S_N2 de la halohidrina inicial **2b** con el tioacetato de potasio además del correspondiente epóxido del compuesto **2e**.

Con el fin de corroborar si el problema se debe a la halohidrina a sustituir por el tiolato, se decidió realizar la reacción invirtiendo las halohidrinás intervinientes (Esquema 1.11).

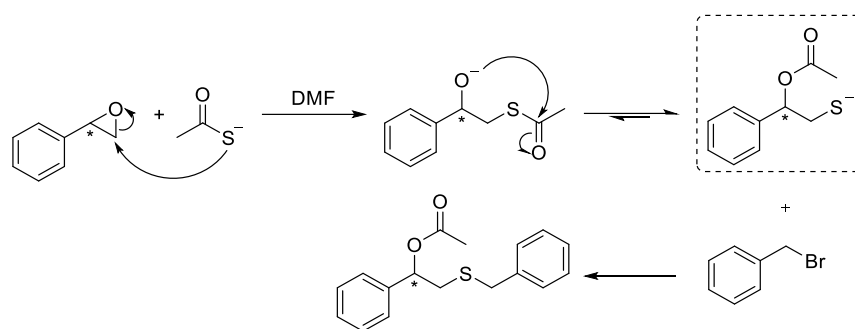


Esquema 1.11. Reacción multicomponente con halohidrinás en orden inverso al Esquema 1.8.

Al igual que la reacción anterior, no se obtuvo el producto esperado sino una mezcla compleja, donde se detectó el epóxido correspondiente al compuesto **2b**. Esto indica que la presencia de base en el medio de reacción, necesaria para la migración de acilo, provoca el cierre de la halohidrina utilizada como electrófilo final. El epóxido obtenido, bajo estas condiciones, no puede ser abierto por el tiolato generado previamente, por ende, la reacción no avanza y no se obtiene el producto de la reacción multicomponente.

Con el fin de independizarse de la base, se planteó una estrategia a partir del epóxido y su apertura con tioacetato de potasio. Esto daría lugar a un alcóxido, intermediario que se plantea en el mecanismo propuesto, que provocaría la migración de acilo y la generación del tiolato deseado (Esquema 1.12). Para ello se utilizó al óxido de estireno y bromuro de bencilo como electrófilo.¹¹⁰

¹¹⁰ H. R. Thomas, A. J. Marsden, M. Walker, N. R. Wilson, J. P. Rourke. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, 53, 1–7.



Esquema 1.12. Mecanismo propuesto para la apertura de epóxidos en una reacción multicomponente análoga.

Bajo las condiciones estudiadas, no se produjo la apertura del epóxido. Se repitió la reacción a 60 °C, y otra con 10% de KI,¹¹¹ pero no pudo activarse lo suficiente al epóxido para que ocurra la apertura. Particularmente con el óxido de estireno, la apertura presenta problemas de regioselectividad, además de ser necesaria la presencia de agua en muchos casos para que ocurra.¹¹² La posibilidad de acoplar un activante del epóxido que no interfiera con la reacción multicomponente permitiría la expansión de esta metodología hacia otros electrófilos. De esta manera, se podría independizar la RMC del agregado de una base adicional, lo que permitiría el empleo de electrófilos inestables en medio básico, como lo son las halohidrinás.

¹¹¹ H. Chang, Q. Li, X. Cui, H. Wang, C. Qiao, Z. Bu, T. Lin. *Mol. Catal.*, **2018**, 449, 25-30.

¹¹² S. Bonollo, D. Lanari, L. Vaccaro. *Eur. J. Org. Chem.*, **2011**, 2587–2598.

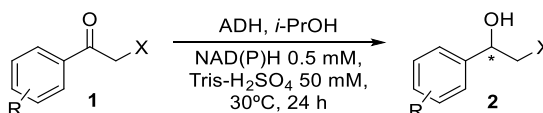
Estudio y síntesis de halohidrinas enantioenriquecidas. Reacción multicomponente con halohidrinas obtenidas mediante bioreducción con ADHs.

Una vez obtenidos los productos racémicos provenientes de la reacción multicomponente con halohidrinas racémicas, se prosiguió a realizar la versión asimétrica. La reducción de halocetonas por métodos biocatalíticos ha sido ampliamente estudiada debido a la importancia de halohidrinas enantioenriquecidas en la síntesis de compuestos de alto valor para la industria farmacéutica.¹¹³

A partir de estos antecedentes y en colaboración con el Prof. Iván Lavandera García de la Universidad de Oviedo (España), se evaluaron los diversos preparados enzimáticos para la reducción de α -halocetonas (**2a-2e**). Las preparaciones enzimáticas estudiadas fueron ADH-A de *Rhodococcus ruber*, ADH-T de *Thermoanaerobium Brockii*, TesADH de *Thermoanaerobacter ethanolicus*, SyADH de *Sphingobium yanoikuyae*, RasADH de *Ralstonia sp.* y LBADH de *Lactobacillus brevis*. Estos preparados corresponden a células enteras de *Escherichia coli* que sobreexpresan alcohol deshidrogenasas de diversos microorganismos (*E. coli*/ADH) liofilizadas en ausencia de crioprotectores y usadas como tal. Esto garantiza la ruptura parcial de la pared y membrana bacteriana, mejorando la transferencia de masa entre el medio y el sitio activo. Por otro lado, los desechos de membranas forman una especie de microambiente que protege a la enzima de condiciones adversas (pH, solventes, etc.).¹¹⁴

Inicialmente se estudió la reducción estereoselectiva de las halocetonas aromáticas. Para ello, se utilizaron las condiciones experimentales reportadas previamente para estos preparados enzimáticos. La determinación de los excesos enantioméricos (*ee*) fue realizada mediante Cromatografía Gaseosa con columna quiral.¹¹⁵

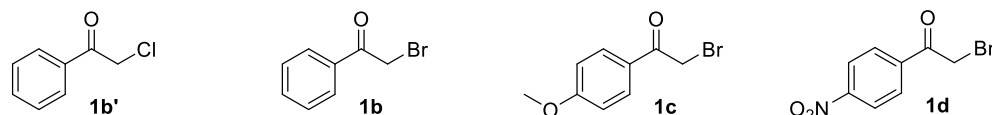
Tabla 1.5. Muestreo de enzimas para la reducción de α -haloacetofenonas.



¹¹³ F Hollmann, D. J. Opperman, C. E. Paul. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59, 2–24

¹¹⁴ G. de Gonzalo, I. Lavandera, W. Kroutil. *Org. Lett.* **2007**, 9, 2163–2166.

¹¹⁵ A. Cuetos, A. Rioz-Martínez, F. B. Bisogno, B. Grischek, I. Lavandera, G. de Gonzalo, W. Kroutil, V. Gotor. *Adv. Synth. Catal.*, **2012**, 354, 1743 – 1749.



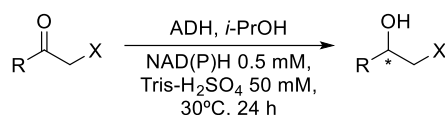
	conv. ^a (%)	ee ^b (%)	conv. ^a (%)	ee ^b (%)	conv. ^a (%)	ee ^b (%)	conv. (%) ^a	ee ^b (%)
ADH-A	>99 ^c	>99(<i>R</i>) ^c	>99	46(<i>R</i>)	72	>99 (<i>R</i>)	8	90(<i>R</i>)
ADH-T			>99	98(<i>R</i>)	90	>99 (<i>R</i>)	80	98(<i>R</i>)
TesADH			>99	74(<i>R</i>)	19	78 (<i>R</i>)	97	96(<i>R</i>)
SyADH			>99	96(<i>R</i>)	94	97 (<i>R</i>)	>99	-
RasADH			>99	-	98	8(<i>R</i>)	77	16(<i>R</i>)
LBADH			>99	88(<i>S</i>)	90	>99 (<i>S</i>)	>99	>99(<i>S</i>)

^a Los valores fueron determinados mediante CG en fase aquiral. ^b Los valores fueron determinados mediante CG en fase quiral. ^c Los valores fueron tomados de la referencia ¹¹⁴.

Para **1b'** ya ha sido reportada la reducción estereoselectiva utilizando estas proteínas, destacándose la reducción con ADH-A de *Rhodococcus ruber*,¹¹⁶ con excelente conversión y perfecto exceso enantiomérico en estas condiciones. Debido a la diferencia de velocidades de reacción entre la clorhidrina y la bromhidrina para la reacción multicomponente, se evaluó también al compuesto **1b**. Bajo las condiciones de estudio, se obtuvo un excelente *ee* (98%) con ADH-T de *Thermoanaerobium brockii* y con SyADH de *Sphingobium yanoikuyae* (96%). Sin embargo, para la ADH enantiocomplementaria, LBADH de *Lactobacillus brevis*, el exceso enantiomérico obtenido no fue excelente (88%). En la reducción de la halocetona aromática con el grupo donador de electrones **1c**, los mejores resultados fueron obtenidos con ADH-A, ADH-T y LBADH. Es notable la selectividad de LBADH sobre este compuesto, ya que permite el acceso a la correspondiente halohidrina de manera enantiocomplementaria a ADH-A y ADH-T con excelente *ee* (>99%), por lo que es posible acceder a cualquier enantiómero de los productos de la reacción multicomponente con esta halohidrina con alta pureza óptica. Con respecto a la conversión, todas las enzimas excepto TesADH mostraron muy buenas conversiones sobre este sustrato. Sobre el compuesto **1d**, el mejor resultado fue encontrado también con ADH-T, presentando un excelente exceso enantiomérico (98%), como así también con LBADH (>99%). Para este sustrato, las conversiones obtenidas fueron muy buenas, excepto para ADH-A (8%).

Luego se realizó el mismo estudio con las halocetonas alifáticas ensayadas previamente (Tabla 1.6)

Tabla 1.6. Muestreo de enzimas para la reducción de α -haloacetonas alifáticas.



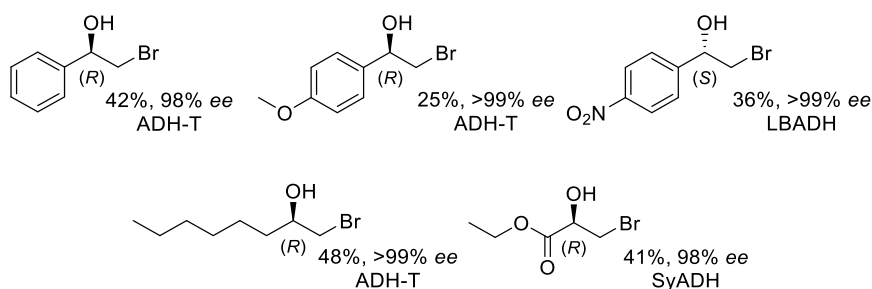
	1a		1e	
	conv. (%)	ee (%)	conv. (%)	ee (%)
ADH-A			>99	98(R)
ADH-T	>99 ^a	>99 (R) ^a	>99	91(R)
TesADH			>99	91(R)
SyADH			>99	98(R)
RasADH			>99	-
LBADH	>99 ^a	>99 (S) ^a	>99	90(S)

^a Los valores corresponden a la referencia ¹¹⁶

La reducción estereoselectiva del compuesto **1a** ya ha sido previamente reportada.¹¹⁶ **Error! Bookmark not defined.** Con respecto a la haloacetona **1e**, se obtuvo la reducción con un exceso enantiomérico del 98% tanto para ADH-A como para SyADH.

La menor selectividad que presentan sobre estos compuestos la ADH de la especie bacteriana *Ralstonia sp.* es esperable ya que estas enzimas son capaces de aceptar sustratos que presentan sustituyentes voluminosos a ambos lados del grupo carbonilo a ser reducido.

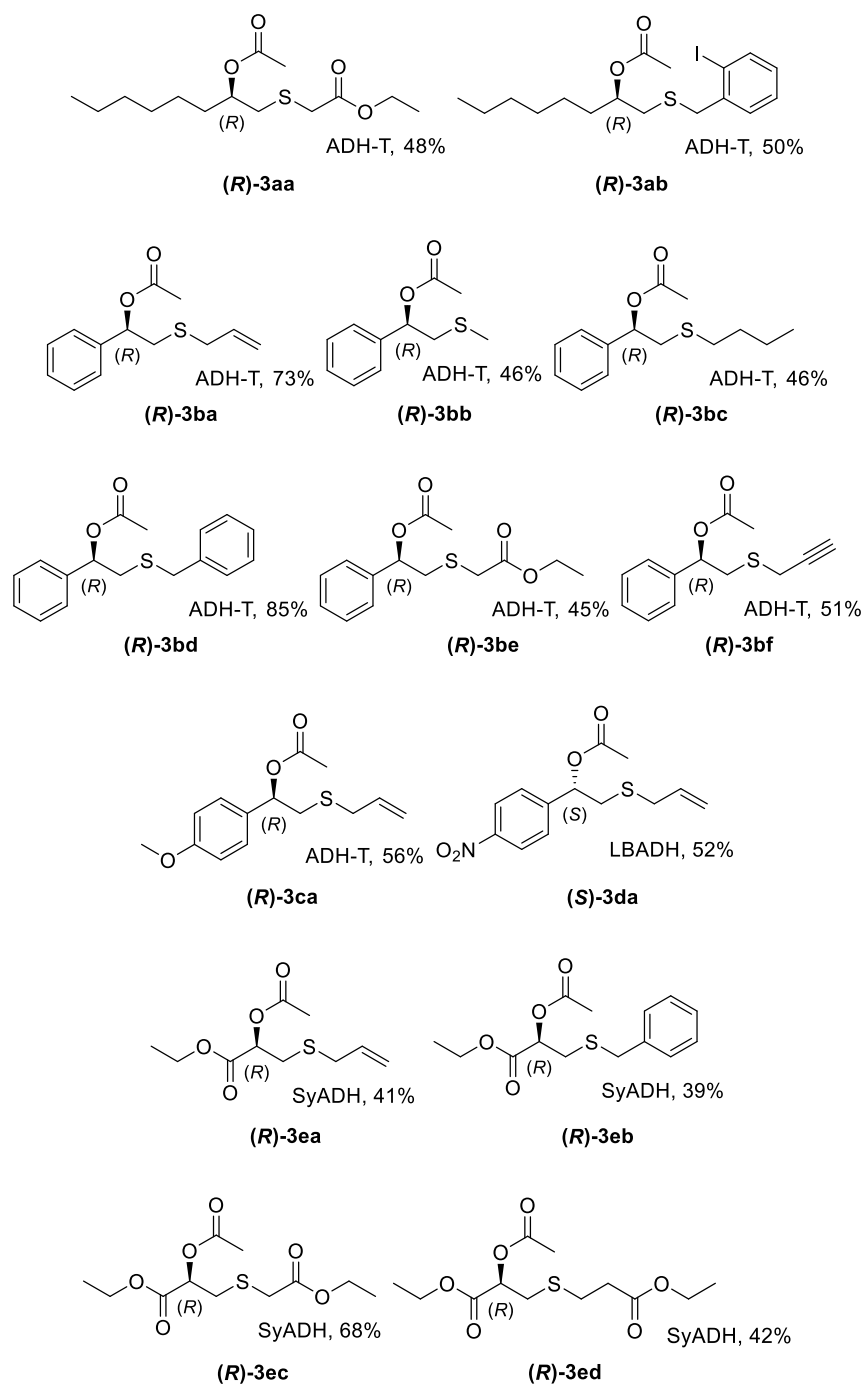
Una vez realizado el estudio sobre las haloacetonas ensayadas, se llevó a cabo la reducción de estos compuestos a mayor escala. Para las haloacetonas ensayadas, se realizó el escalado con los preparados enzimáticos de ADH-T, LBADH y SyADH. A continuación, se muestran los rendimientos aislados obtenidos en la reducción enzimática de α -haloacetonas con las ADHs correspondientes (Esquema 1.13).



Esquema 1.13. Halohidrinas enantioenriquecidas obtenidas mediante la reducción de α -haloacetonas con ADHs.

¹¹⁶ F. R. Bisogno, A. Cuetos, A. A. Orden, M. Kurina-Sanz, I. Lavandera, V. Gotor. *Adv. Synth. Catal.*, **2010**, 352, 1657–1661.

Luego, las reacciones multicomponente correspondientes se llevaron a cabo a partir de las halohidrinan enantioenriquecidas para sintetizar los compuestos con la estereoquímica definida que se observa a continuación en el Esquema 1.14.

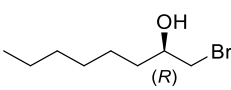
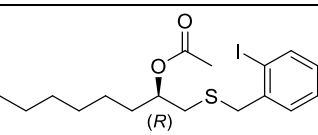
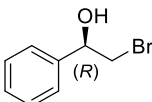
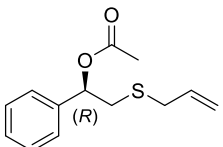
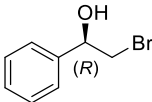
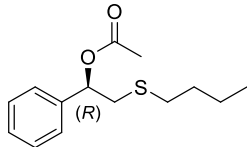
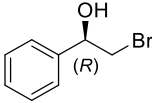
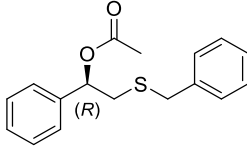
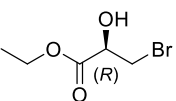
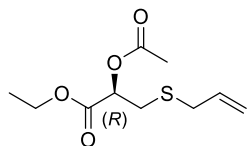


Esquema 1.14. Compuestos obtenidos mediante la reacción multicomponente empleando halohidrinan enantioenriquecidas obtenidas a partir de la reducción de halocetonas con ADHs.

Con esta estrategia multicomponente, se pudo obtener 14 productos enantioenriquecidos con buenos rendimientos, considerando la cantidad de enlaces que se

forman y se rompen durante la RMC. En comparación con los obtenidos para los compuestos racémicos (realizados a mayor escala con las halohidrinadas obtenidas por reducción química), estos rendimientos pueden ser incluso mayores al aumentar la escala de la reacción. Con el fin de evaluar el exceso enantiomérico del producto final respecto de la halohidrina, se midieron los *ee* de los productos enantioenriquecidos **3aa**, **3ba**, **3bc**, **3bd** y **3ea** por HPLC en fase quiral y se compararon con los *ee* de las halohidrinadas de partida (Tabla 1.7).

Tabla 1.7. Comparación de los *ee* de las halohidrinadas vs los *ee* de los β -O-acilsulfuros enantioenriquecidos

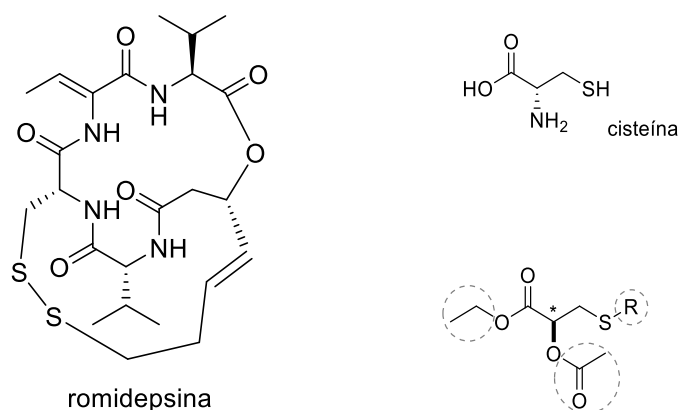
Halohidrina 2	<i>ee</i> ^a	β -O-acilsulfuro 3	<i>ee</i> ^b
	>99%		98%
	98%		>99%
	98%		>99%
	98%		>99%
	98%		>99%

^a Los *ee* se midieron por CG en fase quiral. ^b Los *ee* se midieron por HPLC en fase quiral.

De esta forma, al evaluar compuestos en los cuales se empleó ADH-T y SyADH para la formación de la halohidrina enantioenriquecida de partida, se puso en evidencia que el exceso enantiomérico de la halohidrina de partida controla la estereoquímica del producto final y no se deteriora en el curso de la reacción.

El acceso a α -hidroxiácidos es de gran importancia para la síntesis de depsipéptidos. Estos compuestos tienen relevancia farmacológica principalmente, *e.g.* tratamiento de linfoma

de células T, como es el caso de la romidepsina.¹¹⁷ En el ejemplo particular del compuesto **2e**, los productos de la reacción multicomponente cuando se emplea esta halohidrina serían análogos hidroxilados de cisteína. Al poseer los grupos ácido y alcohol protegidos, se permitiría el control de la reactividad, permitiendo la sustitución del átomo de azufre por electrófilos de interés, sin afectar otra parte de la molécula. Además, otro valor importante sobre la obtención de estos compuestos, radica en la posibilidad de controlar la estereoquímica por la reducción selectiva del grupo carbonilo. El uso de enzimas enantiocomplementarias permitiría la síntesis de los análogos de *D* y *L*-cisteína (Esquema 1.14).



Esquema 1.14. Compuestos análogos posibles a los productos de la reacción multicomponente con la halohidrina **2e**.

¹¹⁷ C. Grant, F. Rahman, R. Piekarz, C. Peer, R. Frye, R. W. Robey, E. R. Gardner, W. D. Figg, S. E. Bates. *Expert Rev Anticancer Ther.*, **2010**, *10*, 997–1008.

Conclusiones Parciales

Mediante el uso de una halohidrina, tioacetato de potasio y un electrófilo, fue posible establecer una reacción multicomponente asimétrica novedosa para la síntesis de β -*O*-acil sulfuros quirales. Más aún, las propiedades electrónicas de la halohidrina de partida no influyen significativamente en el rendimiento de la reacción multicomponente: sustratos con sustituyentes aromáticos (ya sean grupos tomadores o donadores de electrones) fueron aceptados de igual manera que aquellos sustratos conteniendo sustituyentes alifáticos. Además, fue posible emplear eficientemente electrófilos de distinta naturaleza (halogenuros de alquilo, olefinas con grupos tomadores de electrones) lo que indica una alta versatilidad de la metodología.

Empleando una reducción enzimática de halocetonas, seguida de una reacción multicomponente en dos etapas, fue posible la síntesis efectiva de β -*O*-acil sulfuros enantioenriquecidos. En este sentido, se observó que la estereoquímica de la reacción es controlada por la quiralidad de presente la halohidrina de partida, lo que evidencia que no hay erosión del *ee* durante el transcurso de la RMC.

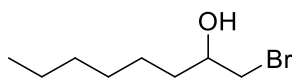
Por otra parte, cuando el procedimiento fue realizado en una escala semipreparativa, se obtuvo un alto rendimiento del producto aislado (76 %), demostrando así que esta metodología puede ser empleada a mayores escalas de manera exitosa.

De catorce β -*O*-acilsulfuros sintetizados, doce no habían sido descritos previamente (los compuestos **3bb** y **3bc** ya han sido reportados en la literatura) en forma racémica ni enantioenriquecida.

La metodología de trabajo desarrollada expande el repertorio de reacciones multicomponente asimétricas. Esta estrategia resulta útil para la preparación de compuestos azufrados quirales importantes que contienen *O*-acetilos en posición beta al átomo de azufre.

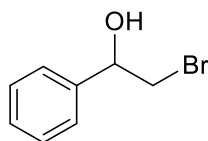
Procedimientos para la síntesis de halohidrinas ¹⁰⁷

*Síntesis de 1-bromo-octan-2-ol (2a)*¹⁰⁷: a una solución de 2 g de 1-octeno (17.86 mmol) disuelto en una mezcla de acetona (23.8 mL) y H₂O (4.2 mL) se le agregó 137.5 mg acetato de amonio (0.1 equiv., 1.786 mmol) y 3.5 g de N-Bromosuccinimida (19.646 mmol). La reacción se llevó a cabo con agitación a temperatura ambiente por un intervalo de tiempo de 24 h. A continuación, se evaporó el solvente orgánico y se extrajo con CH₂Cl₂ (3x10 mL). Las fracciones orgánicas se combinaron y se secó con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido fue sometido a cromatografía en columna utilizando una mezcla de polaridad acetato de etilo/hexano (9:1). Se obtuvo 1.6464 g de producto (44% rendimiento aislado).



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.83 – 3.72 (m, 1H), 3.55 (dd, J = 10.3, 3.2 Hz, 1H), 3.38 (dd, J = 10.3, 7.1 Hz, 1H), 2.09 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 1.61 – 1.25 (m, 10H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H).

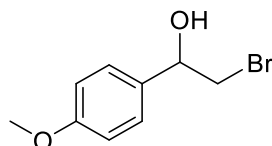
*Síntesis de 2-bromo-1-feniletan-1-ol (2b)*¹¹⁸: a una solución de bromoacetofenona (10 mmol) en MeOH (10 mL) a 0°C, se adicionó NaBH₄ lentamente. Cuando la halocetona de partida fue consumida completamente (TLC), se evaporó el MeOH y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 15mL) y H₂O (45 mL). Las fracciones orgánicas se combinaron y se secó con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido fue sometido a cromatografía en columna utilizando una mezcla de CH₂Cl₂/hexano (1:1). Se obtuvo 1.216 g de producto (60% rendimiento aislado).



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.29 (m, 1H), 4.93 (dt, J = 9.0, 3.3 Hz, 1H), 3.65 (dd, J = 10.5, 3.3 Hz, 1H), 3.55 (dd, J = 10.4, 9.0 Hz, 1H), 2.63 (d, J = 3.2 Hz, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 140.27, 128.72, 128.50, 125.98, 73.83, 40.27.

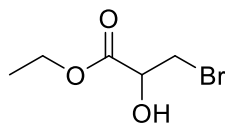
¹¹⁸ C. Aguirre-Pranzoni, F. R. Bisogno, A. A. Orden, M. Kurina-Sanz. *J. Mol. Catal. B.*, **2015**, *114*, 19-24.

*Síntesis de 2-bromo-1-(4-metoxifenil)etan-1-ol (2c)*¹¹⁸: a una solución de 2-bromo-1-(4-metoxifenil)etan-1-ona (100 mg, 0.437 mmol) en MeOH (700 μ L) a 0°C, se adicionó NaBH₄ lentamente (0.12 mmol, 4.5 mg). Cuando la halocetona de partida fue consumida completamente (TLC), se evaporó el MeOH y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 5mL) y H₂O (15 mL). Las fracciones orgánicas se combinaron y se secó con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó a presión reducida. El producto no se aisló, sino que se empleó directamente en la reacción multicomponente subsiguiente.



*Síntesis de 2-bromo-1-(4-nitrofenil)etan-1-ol (2d)*¹¹⁸: El compuesto racémico no pudo obtenerse debido a que predominó la reacción de deshalogenación sobre la reducción del carbonilo con NaBH₄.

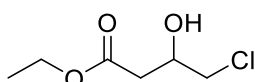
*Síntesis de 3-bromo-2-hidroxiopropanoato de etilo (2e)*¹¹⁹: a una solución de 2-bromo-1-(4-metoxifenil)etan-1-ona (1.00 g, 5.131 mmol) en MeOH (2.5 mL) a 0°C, se adicionó NaBH₄ lentamente (1.796 mmol, 67.9 mg). Cuando la halocetona de partida fue consumida completamente (TLC), se evaporó el MeOH y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 10mL) y H₂O (30 mL). Las fracciones orgánicas se combinaron y se secó con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido fue sometido a cromatografía en columna utilizando una mezcla de Acetato de etilo/hexano (1:3). Se obtuvo 570 mg de producto (56% rendimiento aislado).



¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.54 – 4.46 (m, 1H), 4.42 – 4.22 (m, 2H), 3.69 (dd, J = 7.5, 3.5 Hz, 2H), 3.25 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 1.64 (s, 1H), 1.33 (t, J = 7.1 Hz, 4H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 171.50 (C), 69.75 (CH), 62.55 (CH₂), 35.09 (CH₂), 14.18 (CH₃).

¹¹⁹ P. Sharma, R. K. Sharma. *New. J. Chem.*, **2016**, 40, 9038-9041.

*Síntesis de 4-cloro-3-hidroxi-butanoato de etilo (2f)*¹²⁰: a una solución de 4-cloroacetoacetato de etilo (1 g, 6.08 mmol) en MeOH (5 mL) a 0°C, se adicionó NaBH₄ lentamente (1.672 mmol, 63.2 mg). Cuando la halocetona de partida fue consumida completamente (TLC), se evaporó el MeOH y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 10mL) y H₂O (30 mL). Las fracciones orgánicas se combinaron y fueron secadas con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido fue sometido a cromatografía en columna utilizando una mezcla de CH₂Cl₂/hexano (1:1). Se obtuvo 0.538 g de producto (53% rendimiento aislado).



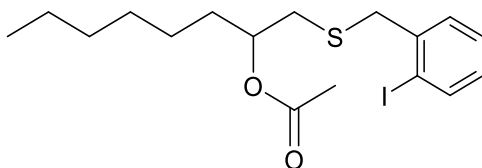
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.30 – 4.22 (m, 1H), 4.19 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.66 – 3.56 (m, 2H), 3.21 – 3.14 (m, 1H), 2.70 – 2.57 (m, 2H), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

Procedimiento general para la reacción multicomponente con halohidrinras racémicas

A una solución de la halohidrina de partida en 2 mL de DMF, se adicionó 1.05 equiv. de tioacetato de potasio. La mezcla fue agitada a temperatura ambiente. Cuando la halohidrina de partida fue consumida completamente (TLC, alrededor de 30'), se agregó el electrófilo restante (1.1 equiv.) y el K₃PO₄ (1.1 equiv.). La reacción se mantuvo bajo agitación durante 12 horas. Luego, se agregó H₂O (5 mL) y se extrajo la reacción con acetato de etilo (3 x 5 mL). Las fracciones orgánicas se combinaron y se extrajo con H₂O (3 x 15 mL). La fase orgánica fue secada con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido fue sometido a cromatografía en columna utilizando una mezcla de acetato de etilo/hexano.

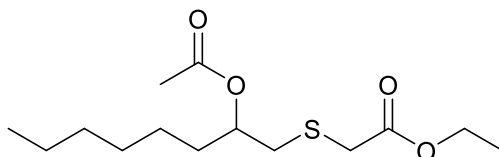
¹²⁰ H. Engelking, R. Pfaller, G. Wich, D. Weuster-Botz. *Tetrahedron: Asymmetry*, **2004**, *15*, 3591-3593.

1-((2-iodobencil)tio)octan-2-il acetato (3aa)



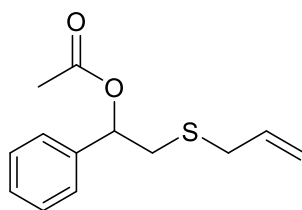
El procedimiento mencionado anteriormente fue llevado a cabo en DMF (0.5 mL) pero utilizando 1-bromooctan-2-ol (20 mg, 0.11 mmol), tioacetato de potasio (14 mg, 0.12 mmol), 1-(clorometil)-2-iodobenceno (30 mg, 0.12 mmol) y *t*-BuOK (14 mg, 0.12 mmol). Luego de la extracción, el crudo fue purificado por columna con sílica-gel, utilizando de fase móvil una mezcla de hexano/acetato (9:1). Se obtuvo un aceite amarillo (20 mg, 45%). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ = 7.84 (dd, *J* = 7.9, 1.0 Hz, 1H), 7.36 (dd, *J* = 7.6, 1.7 Hz, 1H), 7.30 (td, *J* = 7.5, 1.1 Hz, 1H), 6.93 (td, *J* = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 5.0 (m, 1H), 3.85 (s, 2H), 2.63 (dd, *J* = 6.1, 3.3 Hz, 2H), 2.07 (s, 3H), 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ = 170.7 (C), 140.7 (C), 139.9 (CH), 130.1 (CH), 128.8 (CH), 128.3 (CH), 100.6 (C), 72.9 (CH), 41.8 (CH₂), 35.5 (CH₂), 33.2 (CH₂), 31.7 (CH₂), 29.0 (CH₂), 25.2 (CH₂), 22.6 (CH₂), 21.2 (CH₃), 14.1 (CH₃). Para el compuesto (*R*)-enantioenriquecido $[\alpha]_D^{20} = -7.4$ (c 0.1, CHCl₃).

2-((2-acetoxioctil)tio)acetato de etilo (3ab)



El procedimiento mencionado anteriormente fue llevado a cabo en DMF (0.5 mL) pero utilizando 1-bromooctan-2-ol (50 mg, 0.24 mmol), tioacetato de potasio (28 mg, 0.25 mmol), 2-iodoacetato de etilo (56 mg, 0.26 mmol) y fosfato de potasio (57 mg, 0.26 mmol). Luego de la extracción, el crudo fue purificado por columna con sílica-gel, utilizando como fase móvil una mezcla de hexano/acetato (3:1). Se obtuvo un aceite amarillo (47 mg, 68%). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ = 5.03 (m, 1H), 4.21 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.27 (dd, *J* = 35.5, 14.7 Hz, 2H), 2.88 (dd, *J* = 14.0, 4.9 Hz, 1H), 2.75 (dd, *J* = 14.0, 7.0 Hz, 1H), 2.09 (s, 3H), 1.65 (m, 2H), 1.31 (m, 12H), 0.90 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ = 170.6 (C), 170.2 (C), 72.3 (CH), 61.4 (CH₂), 36.2 (CH₂), 33.8 (CH₂), 33.3 (CH₂), 31.6 (CH₂), 29.0 (CH₂), 25.2 (CH₂), 22.5 (CH₂), 21.1 (CH₃), 14.1 (CH₂), 14.0 (CH₃).

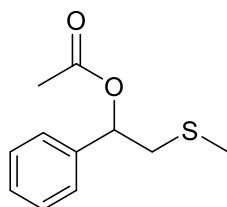
2-(aliltio)-1-feniletil acetato (3ba)



El procedimiento mencionado anteriormente fue llevado a cabo en DMF (0.5 mL) pero utilizando 2-bromo-1-feniletan-1-ol (25 mg, 0.13 mmol), tioacetato de potasio (16 mg, 0.14 mmol), bromuro de alilo (18 mg, 0.15 mmol) y *t*-BuOK (17 mg, 0.15 mmol). Luego de la extracción, el crudo fue purificado por columna con sílica-gel, utilizando CH₂Cl₂ como fase móvil. Se obtuvo un aceite amarillo (22 mg, 75%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.33 (m, 6H), 5.85 (dd, *J* = 7.9, 5.7 Hz, 1H), 5.74 (ddt, *J* = 17.1, 10.0, 7.2 Hz, 1H), 5.09 (m, 2H), 3.06 (m, 2H), 2.91 (dd, *J* = 14.0, 8.0 Hz, 1H), 2.81 (dd, *J* = 14.0, 5.7 Hz, 1H), 2.10 (s, 2H). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ = 170.1 (C), 139.3 (C), 134.1 (CH), 128.5 (CH), 128.3 (CH), 126.6 (CH), 117.6 (CH₂), 74.7 (CH), 36.1 (CH₂), 35.0 (CH₂), 21.2 (CH₃). Para el compuesto (*R*)-enantioenriquecido $[\alpha]_D^{20} = -76.6$ (c 0.1, CHCl₃).

2-(metiltio)-1-feniletil acetato (3bb)¹²¹

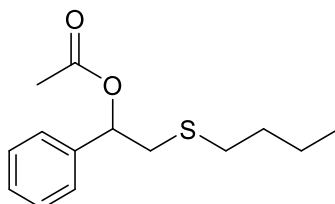


El procedimiento mencionado anteriormente fue llevado a cabo en DMF (0.5 mL) pero utilizando 2-bromo-1-feniletan-1-ol (30 mg, 0.15 mmol), tioacetato de potasio (19 mg, 0.16 mmol), yoduro de metilo (24 mg, 0.17 mmol) y *t*-BuOK (19 mg, 0.17 mmol). Luego de la extracción, el crudo fue purificado por columna con sílica-gel, utilizando una fase móvil de hexano/acetato (9:1). Se obtuvo un aceite amarillo (21 mg, 68%). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ = 7.34 (m, 1H), 5.89 (dd, *J* = 7.8, 5.8 Hz, 1H), 2.97 (dd, *J* = 13.9, 7.9 Hz, 1H), 2.83 (dd, *J* = 13.9, 5.7 Hz, 1H), 2.11 (s, 1H), 2.08 (s, 1H). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ = 170.1 (C), 139.3 (C), 128.6 (CH), 128.4 (CH), 126.7 (CH),

¹²¹ N. Taniguchi. *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 7874-7876.

74.5 (CH), 40.2 (CH₂), 21.2 (CH₂), 16.3 (CH₃). Para el compuesto (*R*)-enantioenriquecido, $[\alpha]_D^{20} = -67.4$ (c 0.1, CHCl₃).

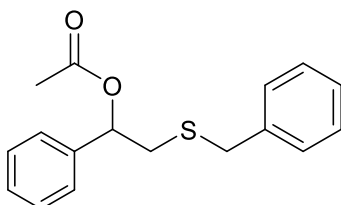
2-(butiltio)-1-feniletil acetato (3bc)¹²²



El procedimiento mencionado anteriormente fue llevado a cabo en DMF (0.5 mL) pero utilizando 2-bromo-1-feniletan-1-ol (30 mg, 0.15 mmol), tioacetato de potasio (19 mg, 0.16 mmol), bromuro de butilo (24 mg, 0.17 mmol) y *t*-BuOK (19 mg, 0.17 mmol). Luego de la extracción, el crudo fue purificado por columna con sílica-gel, utilizando una fase móvil de hexano/acetato (9:1). Se obtuvo un aceite amarillo (20 mg, 53%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 7.34$ (m, 1H), 5.85 (dd, $J = 7.8, 5.9$ Hz, 1H), 2.98 (dd, $J = 13.9, 7.8$ Hz, 1H), 2.86 (dd, $J = 13.9, 5.9$ Hz, 1H), 2.48 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 2.10 (s, 3H), 1.53 (quint, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.37 (sext, $J = 7.3$ Hz, 2H), 0.89 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): $\delta = 170.1$ (C), 139.4 (C), 128.5 (CH), 128.3 (CH), 126.7 (CH), 75.0 (CH), 37.9 (CH₂), 32.4 (CH₂), 31.6 (CH₂), 21.9 (CH₂), 21.2 (CH₃), 13.6 (CH₃). Para el compuesto (*R*)-enantioenriquecido, $[\alpha]_D^{20} = -56.6$ (c 0.1, CHCl₃).

2-(benciltio)-1-feniletil acetato (3bd)¹²²



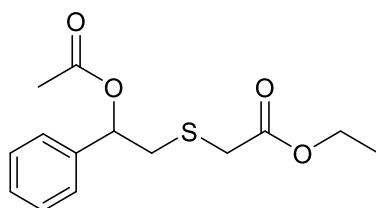
El procedimiento mencionado anteriormente fue llevado a cabo en DMF (0.5 mL) pero utilizando 2-bromo-1-feniletan-1-ol (40 mg, 0.2 mmol), tioacetato de potasio (24 mg, 0.21 mmol), bromuro de bencilo (39 mg, 0.23 mmol) y K₃PO₄ (50 mg, 0.23 mmol). Luego de la extracción, el crudo fue

¹²² R. Zhang, Z. Yan, S. Lin. *Synlett*, **2018**, 29, 336-339.

purificado por columna con sílica-gel, utilizando una fase móvil de CH₂Cl₂. Se obtuvo un aceite amarillo (46 mg, 80 %).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.44 – 7.17 (m, 10H), 5.83 (dd, *J* = 7.9, 5.7 Hz, 1H), 3.64 (dd, *J* = 16.0, 13.5 Hz, 2H), 2.86 (dd, *J* = 14.0, 8.0 Hz, 1H), 2.72 (dd, *J* = 14.1, 5.7 Hz, 1H), 2.10 (s, 3H). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ = 170.1 (CH₂), 139.3 (C), 137.9 (C), 129.1 (CH), 128.6 (CH), 128.4 (CH), 127.2 (CH), 126.7 (CH), 74.6 (CH), 36.8 (CH₂), 36.5 (CH₂), 21.2 (CH₃). Para el compuesto (*R*)-enantioenriquecido [α]_D²⁰ = -69.6 (c 0.1, CHCl₃).

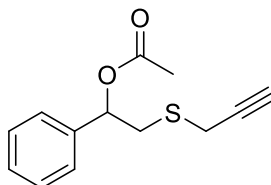
2-((2-acetoxi-2-feniletil)tio)acetato de etilo (3be)



El procedimiento mencionado anteriormente fue llevado a cabo en DMF (0.5 mL) pero utilizando 2-bromo-1-feniletan-1-ol (50 mg, 0.25 mmol), tioacetato de potasio (31 mg, 0.27 mmol), 2-iodoacetato de etilo (61 mg, 0.28 mmol) y *t*-BuOK (32 mg, 0.28 mmol). Luego de la extracción, el crudo fue purificado por columna con sílica-gel, utilizando una fase móvil de hexano/acetato (3:1). Se obtuvo un aceite amarillo (35 mg, 52%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.35 (m, 5H), 5.93 (dd, *J* = 7.4, 6.1 Hz, 1H), 4.18 (q, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.20 (d, *J* = 14.6 Hz, 1H), 3.15 (d, *J* = 14.7 Hz, 1H), 3.07 (dd, *J* = 14.2, 7.6 Hz, 1H), 3.03 (dd, *J* = 14.1, 5.9 Hz, 1H), 2.11 (s, 3H), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ = 170.2 (C), 170.1 (C), 139.0 (C), 128.6 (CH), 128.4 (CH), 126.6 (CH), 74.2 (CH), 61.4 (CH₂), 38.0 (CH₂), 33.7 (CH₂), 21.1 (CH₃), 14.2 (CH₃). Para el compuesto (*R*)-enantioenriquecido [α]_D²⁰ = -78.9 (c 0.1, CHCl₃).

1-fenil-2-(prop-2-in-1-iltio)etil acetato (3bf)

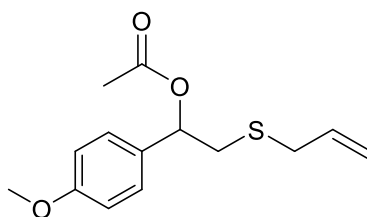


El procedimiento mencionado anteriormente fue llevado a cabo en DMF (0.5 mL) pero utilizando 2-bromo-1-feniletan-1-ol (50 mg, 0.25 mmol), tioacetato de potasio (29 mg, 0.27 mmol), cloruro

de propargilo (21 mg, 0.29 mmol) y *t*-BuOK (32 mg, 0.29 mmol). Luego de la extracción, el crudo fue purificado por columna con sílica-gel, utilizando una fase móvil de hexano/acetato (9:1). Se obtuvo un aceite amarillo (35 mg, 61%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.35 (m, 5H), 5.94 (dd, *J* = 7.6, 5.9 Hz, 1H), 5.30 (s, 1H), 3.19 (dd, *J* = 7.7, 2.6 Hz, 2H), 3.10 (dd, *J* = 6.7, 3.5 Hz, 2H), 2.27 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 2.12 (s, 3H). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ = 170.1 (C), 139.1 (C), 128.6 (CH), 128.4 (CH), 126.6 (CH), 79.5(C), 74.2(CH), 71.6(CH), 37.0(CH₂), 21.2(CH₂), 19.6(CH₃).

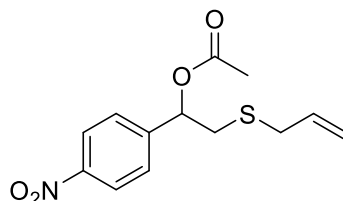
2-(aliltio)-1-(4-metoxifenil)etil acetato (3ca)



El procedimiento mencionado anteriormente fue llevado a cabo en DMF (0.5 mL) pero utilizando 2-bromo-1-(4-metoxifenil)etan-1-ol (25 mg, 0.11 mmol), tioacetato de potasio (13 mg, 0.114 mmol), bromuro de alilo (20 mg, 0.12 mmol) y *t*-BuOK (14 mg, 0.12 mmol). Luego de la extracción, el crudo fue purificado por placa preparativa de sílica-gel, utilizando una fase móvil de hexano/acetato de etilo (3:1). Se obtuvo un aceite incoloro (16 mg, 56%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.29 (m, 2H), 6.88 (m, 2H), 5.80 (dd, *J* = 7.7, 6.1 Hz, 1H), 5.75 (ddt, *J* = 17.1, 10.0, 7.2 Hz, 1H), 5.14 (bd, *J* = 10.0), 5.09 (dq, *J* = 16.9, 1.3 Hz, 1H), 3.80 (s, 1H), 3.09 (bdd, *J* = 13.2, 6.5 Hz, 1H), 3.04 (dd, *J* = 13.2, 6.9 Hz, 1H), 2.91 (dd, *J* = 13.9, 7.8 Hz, 1H), 2.79 (dd, *J* = 13.9, 6.0 Hz, 1H), 2.08 (s, 1H). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ = 170.1 (CH₂), 159.6 (CH₂), 134.1 (CH₂), 131.4 (CH₂), 128.1 (CH₂), 117.6 (CH₂), 113.9 (CH₂), 74.4 (CH₂), 55.3 (CH₂), 35.9 (CH₂), 35.0 (CH₂), 21.3 (CH₂).

2-(aliltio)-1-(4-nitrofenil)etil acetato (3da)

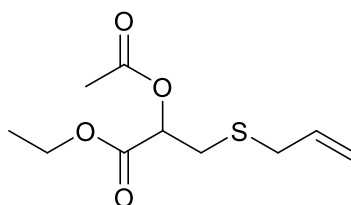


El procedimiento mencionado anteriormente fue llevado a cabo en DMF (0.2 mL) pero utilizando 2-bromo-1-(4-nitrofenil)etan-1-ol (7 mg, 0.03 mmol), tioacetato de potasio (4 mg, 0.033 mmol),

bromuro de alilo (5 mg, 0.036 mmol) y K_3PO_4 (9 mg, 0.04 mmol). Luego de la extracción, el crudo fue purificado por columna con sílica-gel, utilizando una fase móvil de hexano/acetato (9:1). Se obtuvo un aceite verde (4 mg, 50%).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 8.23 (m, 1H), 7.52 (m, 1H), 5.90 (dd, J = 7.5, 5.9 Hz, 1H), 5.74 (m, 1H), 5.11 (m, 2H), 3.10 (m, 2H), 2.91 (dd, J = 14.1, 7.5 Hz, 1H), 2.81 (dd, J = 14.1, 6.0 Hz, 1H), 2.14 (s, 3H). **^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$):** δ = 169.7 (C), 147.7 (C), 146.5 (C), 134.0 (CH), 127.7 (CH), 123.7 (CH), 118.1 (CH_2), 73.9 (CH), 36.0 (CH_2), 35.4 (CH_2), 21.2 (CH_3).

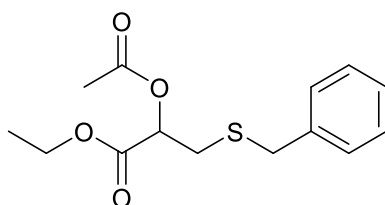
2-acetoxi-3-(aliltio)propanoato de etilo (3ea)



El procedimiento mencionado anteriormente fue llevado a cabo en DMF (0.5 mL) pero utilizando 3-bromo-2-hidroxiopropanoato de etilo (50 mg, 0.25 mmol), tioacetato de potasio (31 mg, 0.27 mmol), bromuro de alilo (35 mg, 0.29 mmol) y K_3PO_4 (62 mg, 0.29 mmol). Luego de la extracción, el crudo fue purificado por columna con sílica-gel, utilizando una fase móvil de hexano/acetato (3:1). Se obtuvo un aceite amarillo (32 mg, 54%).

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 5.78 (m, 1H), 5.17 (m, 3H), 4.23 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.21 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 2.94 (dd, J = 14.4, 4.2 Hz, 1H), 2.86 (dd, J = 14.4, 7.7 Hz, 1H), 2.17 (s, 3H), 1.29 (t, J = 7.1 Hz, 3H). **^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$):** δ = 170.1 (C), 168.7 (C), 133.6 (CH), 117.9 (CH_2), 72.1 (CH), 61.7 (CH_2), 35.3 (CH_2), 31.2 (CH_2), 20.6 (CH_3), 14.1 (CH_3). Para el compuesto (*R*)-enantioenriquecido, $[\alpha]_D^{20}$ = -53.8 (c 0.1, $CHCl_3$).

2-acetoxi-3-(benciltio)propanoato de etilo (3eb)

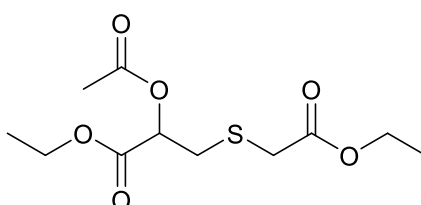


El procedimiento mencionado anteriormente fue llevado a cabo en DMF (0.5 mL) pero utilizando 3-bromo-2-hidroxiopropanoato de etilo (50 mg, 0.25 mmol), tioacetato de potasio (31 mg, 0.27 mmol), bromuro de bencilo (50 mg, 0.29 mmol) y *t*-BuOK (62 mg, 0.29 mmol). Luego de la

extracción, el crudo fue purificado por columna con sílica-gel, utilizando una fase móvil de hexano/acetato (3:1). Se obtuvo un aceite incoloro (44 mg, 54%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.30 (m, 5H), 5.19 (dd, J = 7.6, 4.3 Hz, 1H), 4.21 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.79 (s, 2H), 2.87 (dd, J = 14.4, 4.3 Hz, 1H), 2.80 (dd, J = 14.4, 7.6 Hz, 1H), 2.17 (s, 3H), 1.27 (t, J = 7.1 Hz, 5H). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ = 170.2 (C), 168.6 (C), 137.6 (C), 129.0 (CH), 128.6 (CH), 127.3 (CH), 72.1 (CH), 61.7 (CH₂), 36.7 (CH₂), 31.8 (CH₂), 20.7 (CH₃), 14.1 (CH₃). Para el compuesto (*R*)-enantioenriquecido, $[\alpha]_D^{20}$ = -31.3 (c 0.1, CHCl₃).

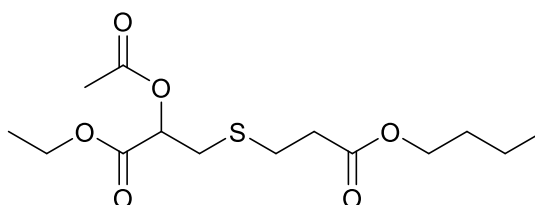
2-acetoxi-3-((2-etoxi-2-oxoetil)tio)propanoato de etilo (3ec)



El procedimiento mencionado anteriormente fue llevado a cabo en DMF (0.5 mL) pero utilizando 3-bromo-2-hidroxiopropanoato de etilo (25 mg, 0.13 mmol), tioacetato de potasio (16 mg, 0.14 mmol), 2-iodoacetato de etilo (33 mg, 0.15 mmol) y K₃PO₄ (33 mg, 0.15 mmol). Luego de la extracción, el crudo fue purificado por columna con sílica-gel, utilizando una fase móvil de hexano/acetato (3:1). Se obtuvo un aceite incoloro (25 mg, 68%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 4.27 – 4.17 (m, 5H), 3.38 (d, J = 15.0 Hz, 1H), 3.28 (d, J = 15.0 Hz, 1H), 3.17 (dd, J = 14.5, 3.9 Hz, 1H), 3.05 (dd, J = 14.5, 7.7 Hz, 1H), 2.17 (s, 3H), 1.30 (td, J = 7.1, 1.2 Hz, 6H). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ = 170.1 (C), 170.0 (C), 168.4 (C), 72.0 (CH), 61.9 (CH₂), 61.5 (CH₂), 34.0 (CH₂), 33.0 (CH₂), 20.6 (CH₃), 14.2 (CH₃), 14.1 (CH₃). Para el compuesto (*R*)-enantioenriquecido, $[\alpha]_D^{20}$ = -41.5 (c 0.1, CHCl₃).

2-acetoxi-3-((3-butoxi-3-oxopropil)tio)propanoato de etilo (3ee)



El procedimiento mencionado anteriormente fue llevado a cabo en DMF (0.5 mL) pero utilizando 3-bromo-2-hidroxiopropanoato de etilo (50 mg, 0.25 mmol), tioacetato de potasio (31 mg, 0.27 mmol), acrilato de butilo (36 mg, 0.29 mmol) y K₃PO₄ (62 mg, 0.29 mmol). Luego de la extracción,

el crudo fue purificado por columna con sílica-gel, utilizando una fase móvil de hexano/acetato (3:1). Se obtuvo un aceite incoloro (44 mg, 54%).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.20 (dd, J = 7.5, 4.1 Hz, 1H), 4.21 (q, J = 7.1, 2H), 4.08 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.00 (dd, J = 14.4, 4.1 Hz, 1H), 2.93 (dd, J = 14.4, 7.5 Hz, 1H), 2.86 (bt, J = 7.7 Hz, 2H), 2.60 (bt, J = 7.7 Hz, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.59 (quint, J = 6.7, 2H), 1.36 (sext, J = 7.6 Hz, 2H), 1.27 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.91 (t, J = 7.4 Hz, 3H). **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ = 171.7 (C), 170.0 (C), 168.5 (C), 72.4 (CH), 64.6 (CH₂), 61.7 (CH₂), 34.8(CH₂), 33.1(CH₂), 30.6(CH₂), 27.9(CH₂), 20.6(CH₃), 19.1(CH₂), 14.1(CH₃), 13.6(CH₃).

Protocolos enzimáticos y muestreo de enzimas

Procedimiento general para bioreducción E.coli/ADH-A, ADH-T o TesADH¹¹⁵

A una solución de la halocetona correspondiente (20 mM) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 1 mM NADH (570 μ L) e *i*-PrOH (30 μ L), se agregó 20 mg del preparado enzimático correspondiente, en un tubo Eppendorf de 1,5 mL. La reacción se permaneció bajo agitación orbital a 250 rpm y 30°C por un intervalo de 24 h. Luego, se extrajo con AcOEt (3 x 2 mL) y H₂O (3 x 2mL). Las fracciones orgánicas se combinaron y se secó con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido fue analizado por CG.

Procedimiento general para bioreducción E. coli/SyADH, RasADH o LBADH.¹¹⁵

A una solución de la halocetona correspondiente (20 mM) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 1 mM NADPH (570 μ L) e *i*-PrOH (30 μ L), se agregó 20 mg del preparado enzimático correspondiente, en un tubo Eppendorf de 1,5 mL. La reacción se dejó en agitación orbital a 250 rpm y 30°C por 24 h. Luego, se extrajo con AcOEt (3 x 2 mL) y H₂O (3 x 2mL). Las fracciones orgánicas se combinaron y se secó con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido fue analizado por CG.

*Procedimiento general para la síntesis preparativa de halohidrinas enantiopuras con preparados enzimáticos liofilizados de E.coli/ADH-T.*¹¹⁵

A una solución de la halocetona correspondiente (20 mM) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,5 (20.8 mL) e *i*-PrOH (1.2 mL), se agregó NADH (0,3 mM) y 500 mg del preparado enzimático correspondiente, en un tubo falcon de 50 mL. En el caso de la cetona **1d**, fue necesaria la adición de 100 μ L de DMSO para la correcta solubilización del sustrato. La reacción se mantuvo bajo agitación orbital a 250 rpm y 30°C por 24 h. Luego, se extrajo con AcOEt (3 x 20mL) y H₂O (3x20mL). Las fracciones orgánicas se combinaron y se secó con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido fue sometido a una purificación por cromatografía en columna.

*Procedimiento general para la síntesis preparativa de halohidrinas enantiopuras con preparados enzimáticos liofilizados de E.coli/SyADH o E.coli/LBADH.*¹¹⁵

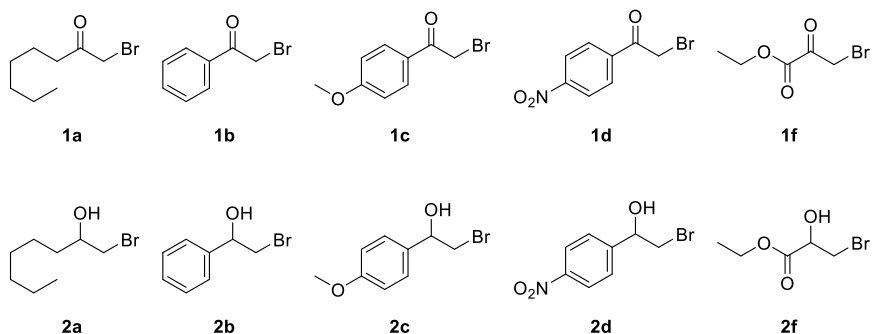
A una solución de la halocetona correspondiente (20 mM) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,5 (20.8 mL) e *i*-PrOH (1.2 mL), se agregó NADPH (0,3 mM) y 500 mg del preparado enzimático correspondiente, en un tubo falcon de 50 mL. En el caso de la cetona **1d**, fue necesaria la adición de 100 μ L de DMSO para la correcta solubilización del sustrato. La reacción se mantuvo bajo agitación orbital a 250 rpm y 30°C por 24 h. Luego, se extrajo con AcOEt (3 x 20mL) y H₂O (3x20mL). Las fracciones orgánicas se combinaron y se secó con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido fue purificado por cromatografía en columna.

Analítica

Tiempos de retención por Cromatografía Gaseosa y cromatogramas de las halohidrinas enantioenriquecidas

Los análisis por CG fueron llevados a cabo en un equipo Agilent 6890 GC-FID. Para la conversión y la determinación de *ee* se empleó la columna de fase estacionaria quiral ChiralsilDex CB (25 m x 0.25 mm x 0.25 μ m, 12.2 psi N₂).

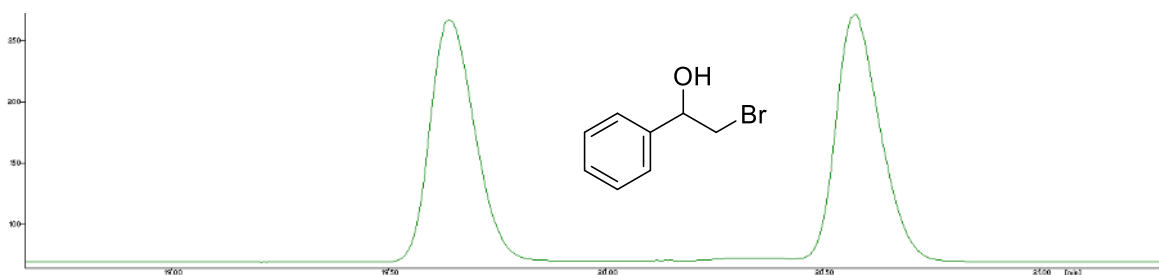
Separación analítica por CG-FID para la medición de la conversión en la bio-reducción de α -halocetonas.



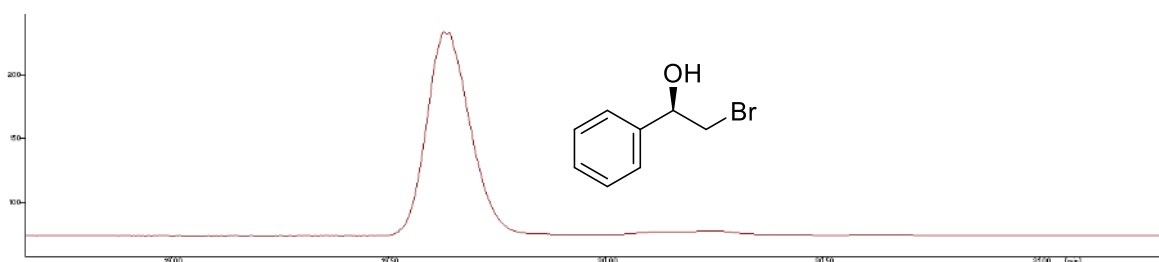
Compuesto	Programa de temperatura ^a	Tiempo (min)
1b	100/0/2/150/0/20/170/5	18.9
1c	115/0/20/150/20/170/5	23.7
1d	115/7/20/170/7	12.2
1f	70/0/2/100/0/0.5/110/0/20/170/8	24.8
2b	100/0/2/150/0/20/170/5	19.6 (R), 20.6 (S)
2c	115/0/20/150/20/170/5	19.5 (R), 20.4 (S)
2d	115/7/20/170/7	13.1 (R), 13.3 (S)
2f	70/0/2/100/0/0.5/110/0/20/170/8	26.8 (S), 28.4 (R)

^a Temperatura inicial (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ temperatura final (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ temperatura final (°C)/ tiempo (min)

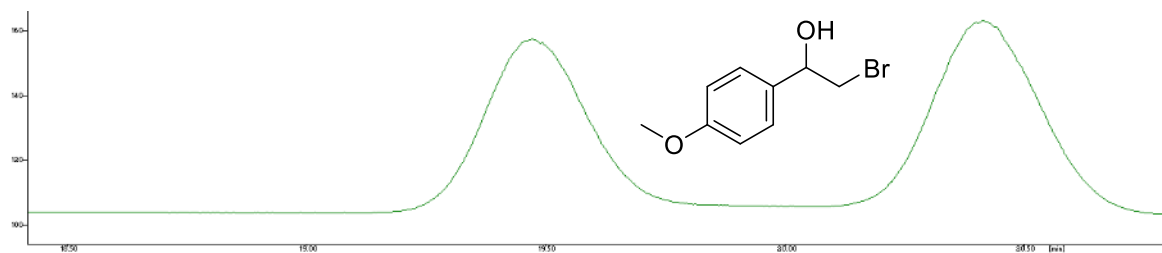
2b obtenido por reducción química



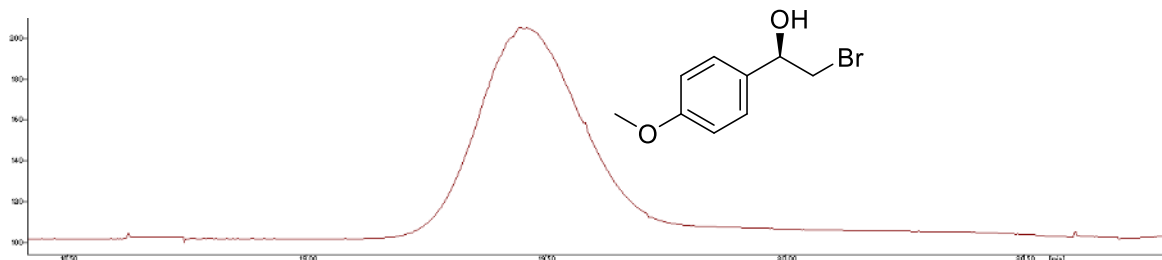
(R)-2b obtenido por reducción con ADH-T



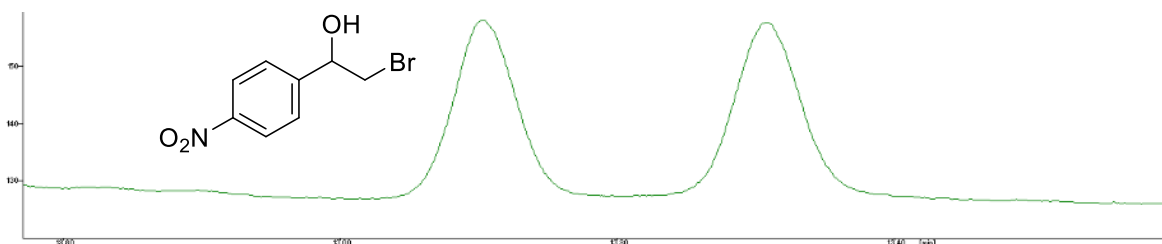
2c obtenido por reducción química



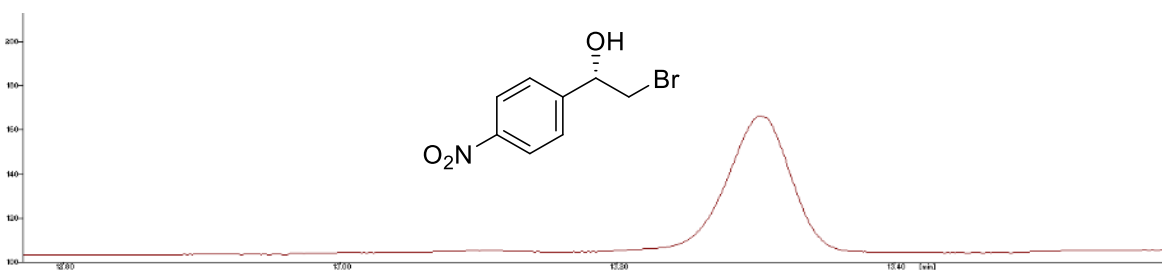
(R)-2c obtenido por reducción con ADH-T



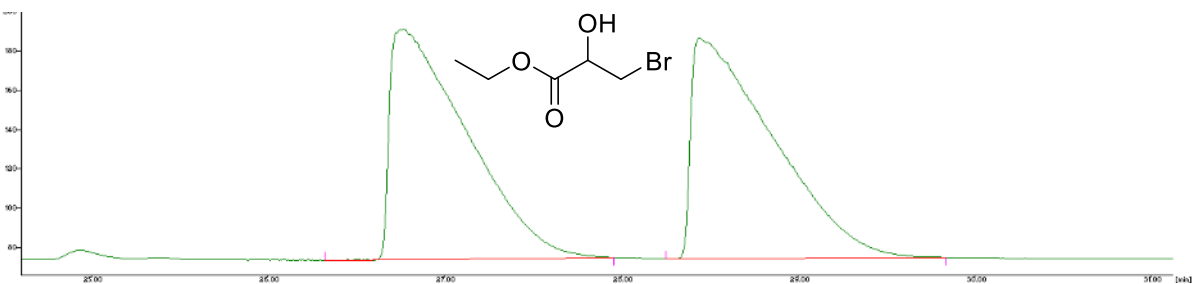
2d obtenido por reducción química



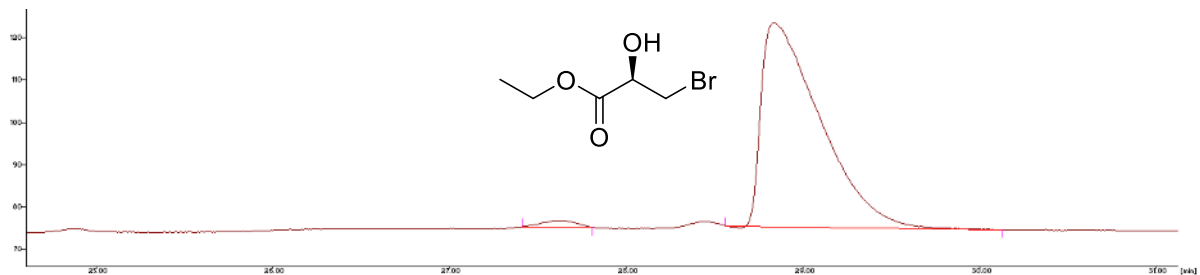
(S)-2d obtenido por reducción con LBADH



2f obtenido por reducción química

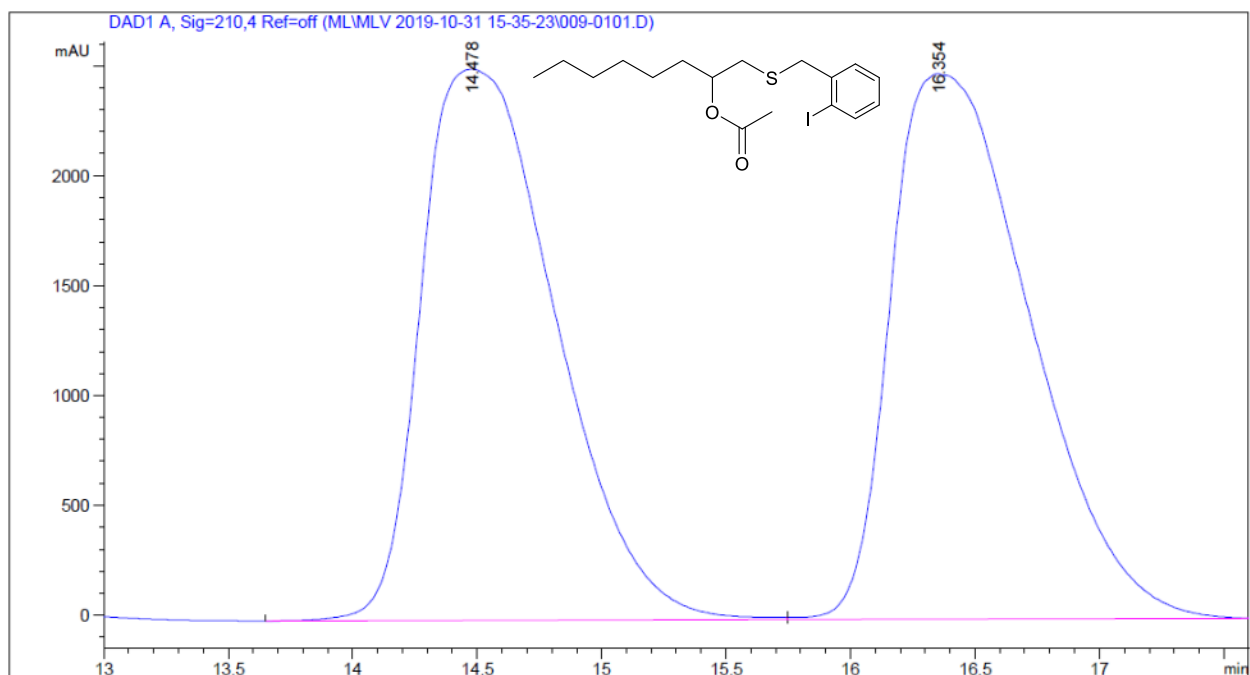


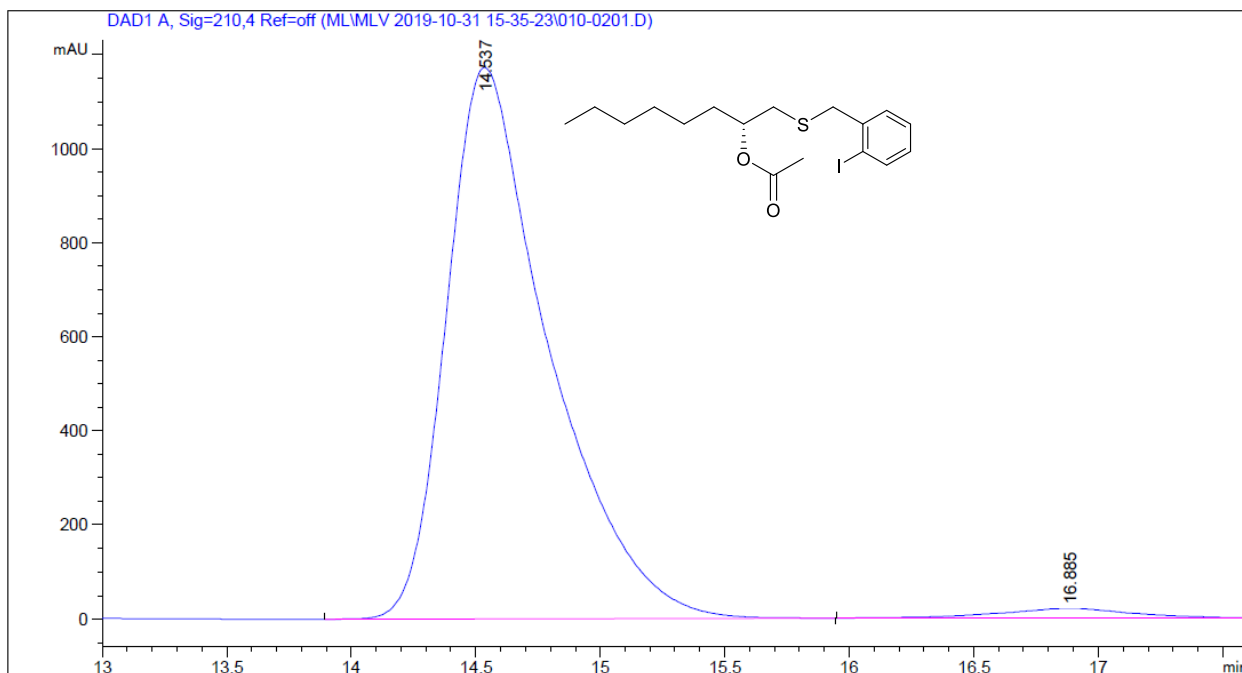
(R)-2f obtenido por reducción con SyADH



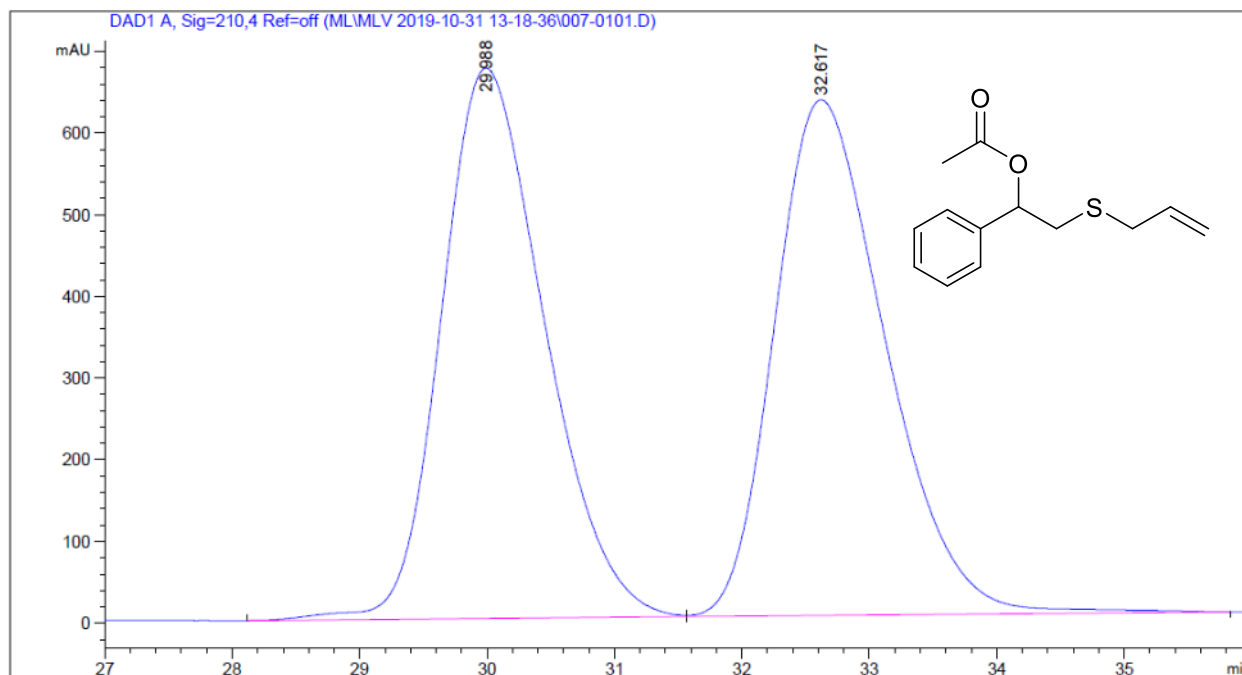
Tiempos de retención por HPLC y cromatogramas de los productos de la reacción multicomponente

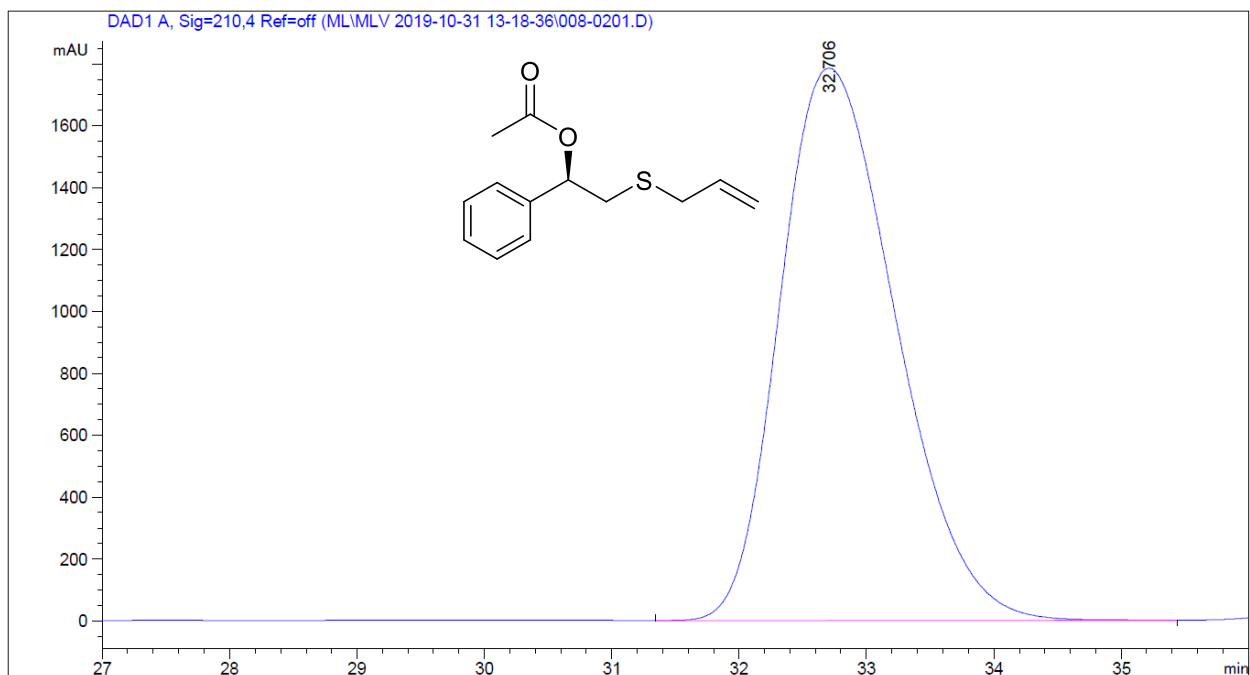
Las condiciones para el análisis por HPLC del compuesto **3aa** fueron las siguientes: columna Chiralpak OD (0.46 cm x 25 cm, Daicel Chemical Ind. Ltd.); elución isocrática: *n*-hexano / *i*-propanol (99:1), 30 °C, flujo 0.3 mL min⁻¹. Tiempos de retención: 14.5 (*S*), 16.4 (*R*). 98% *ee*.



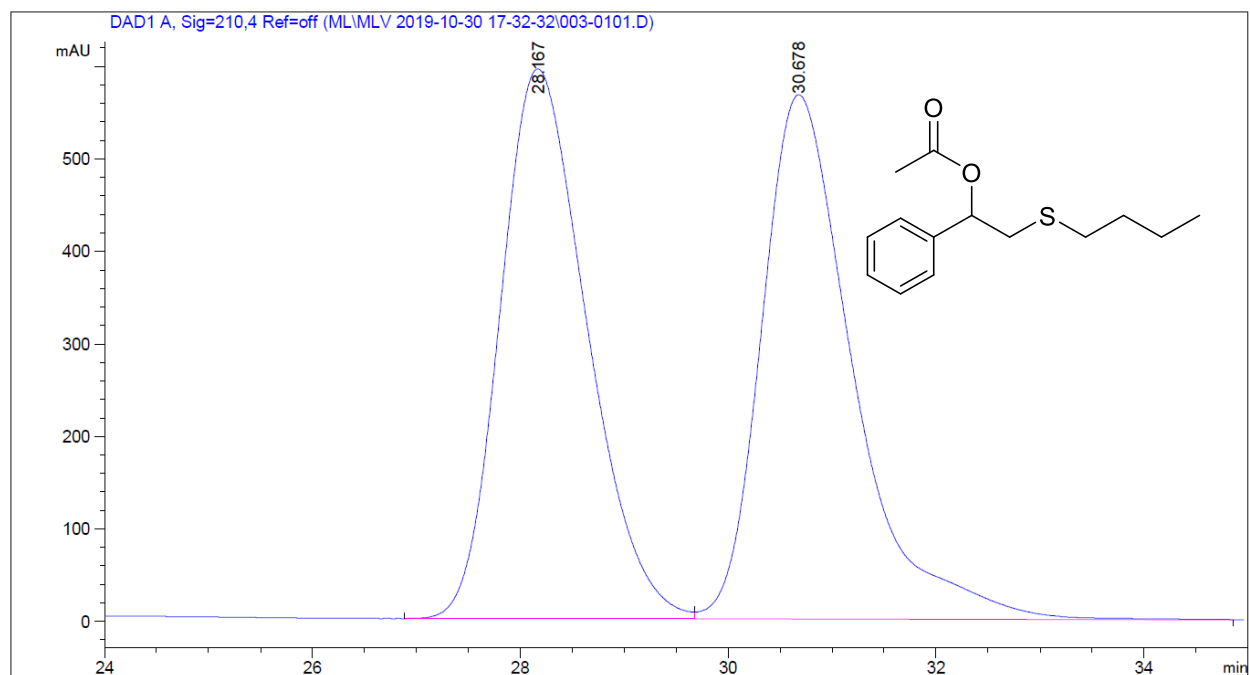


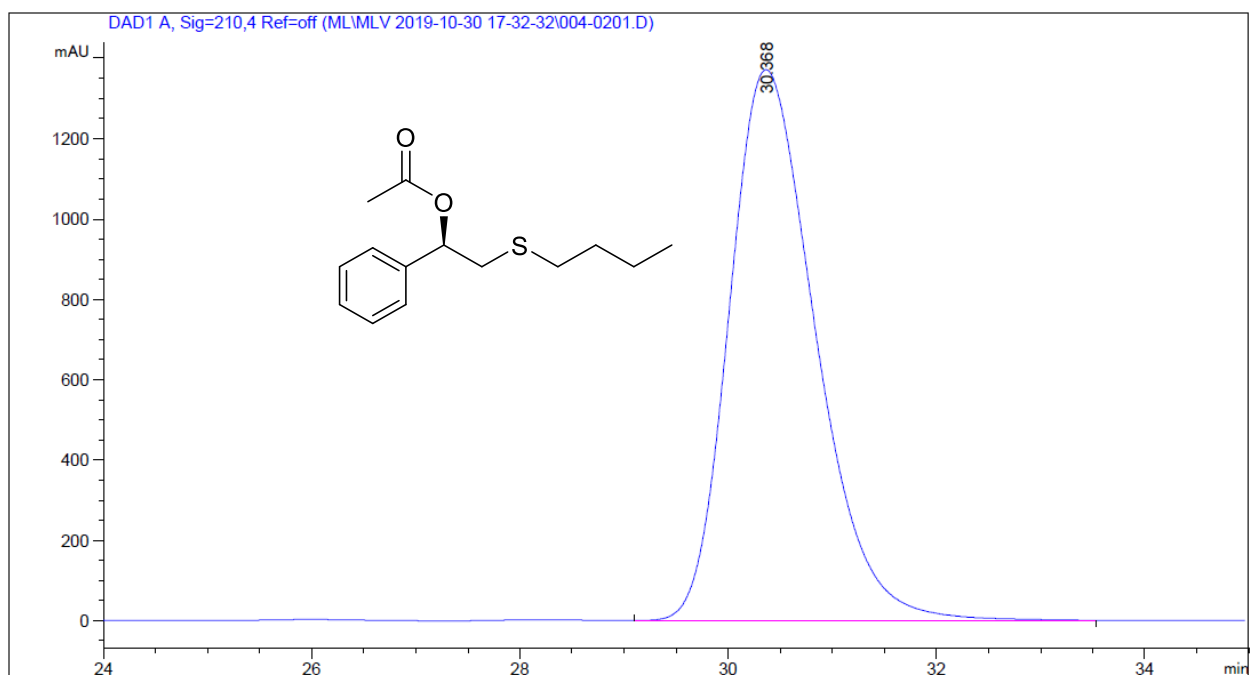
Las condiciones para el análisis por HPLC del compuesto **3ba** fueron las siguientes: columna Chiralpak OD (0.46 cm x 25 cm, Daicel Chemical Ind. Ltd.); elución isocrática: *n*-hexano / *i*-propanol (99:1), 30 °C, flujo 0.3 mL min⁻¹. Tiempos de retención: 30.0 (*S*), 32.6 (*R*). >99% *ee*.



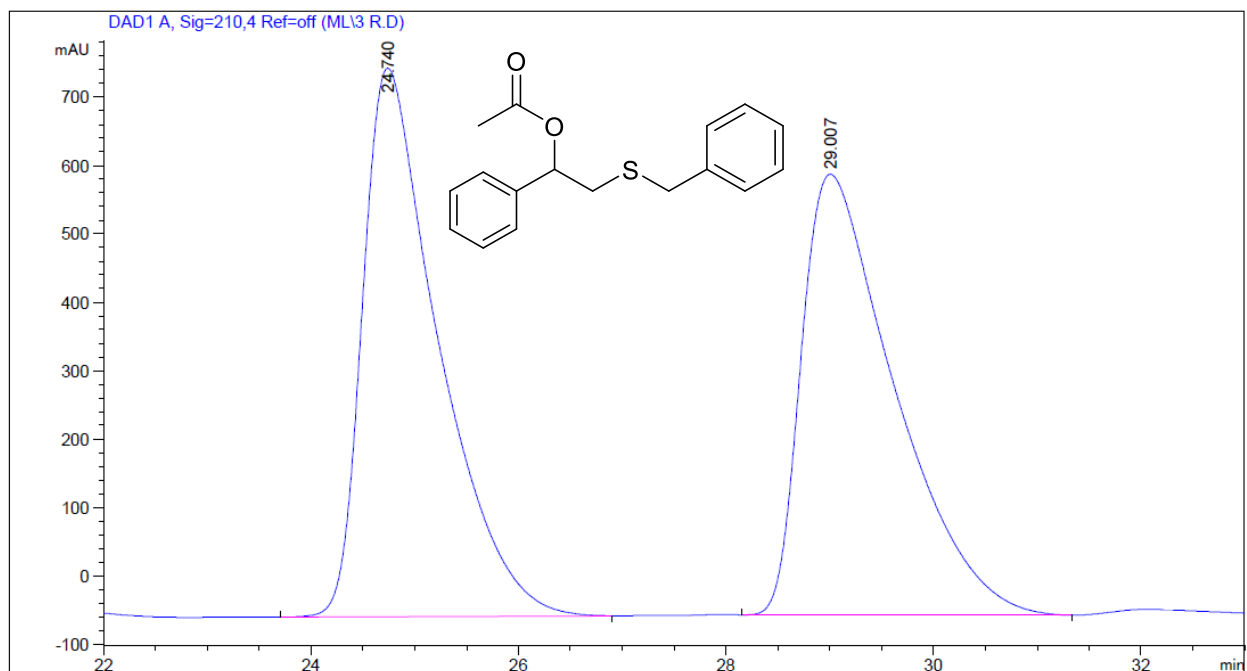


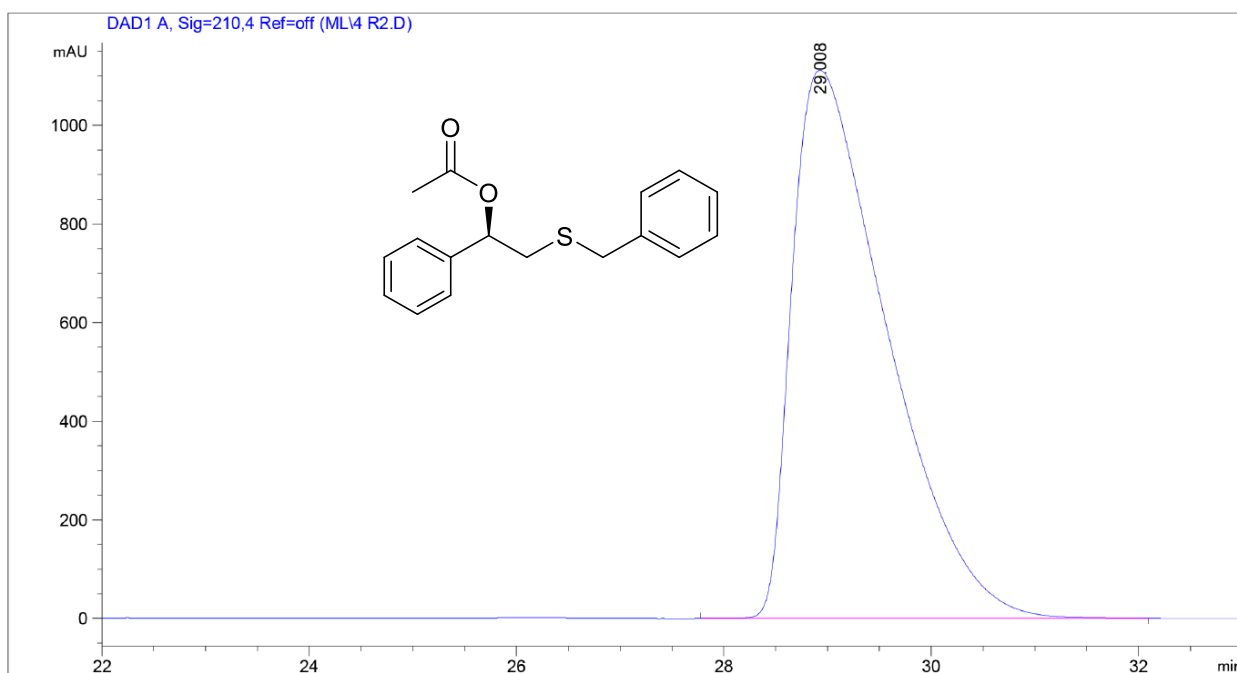
Las condiciones para el análisis por HPLC del compuesto **3bc** fueron las siguientes: columna Chiralpak OD (0.46 cm x 25 cm, Daicel Chemical Ind. Ltd.); elución isocrática: *n*-hexano / *i*-propanol (99:1), 30 °C, flujo 0.3 mL min⁻¹. Tiempos de retención: 28.2 (*S*), 30.4 (*R*). >99% *ee*.



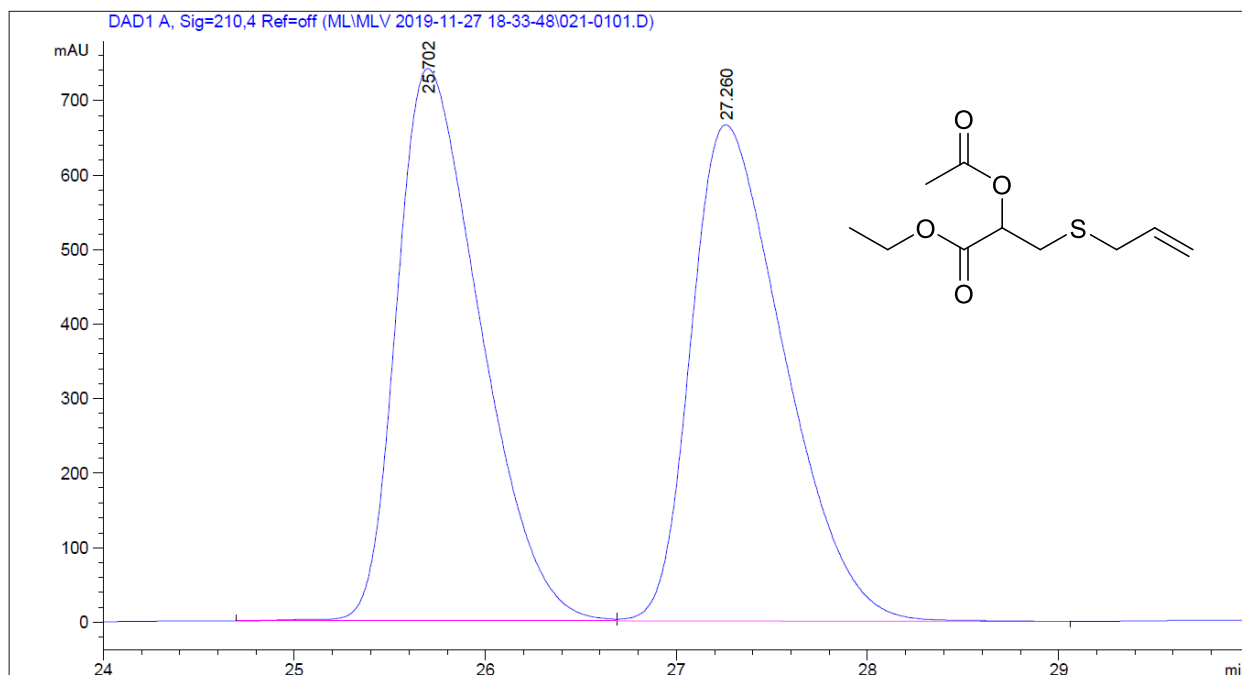


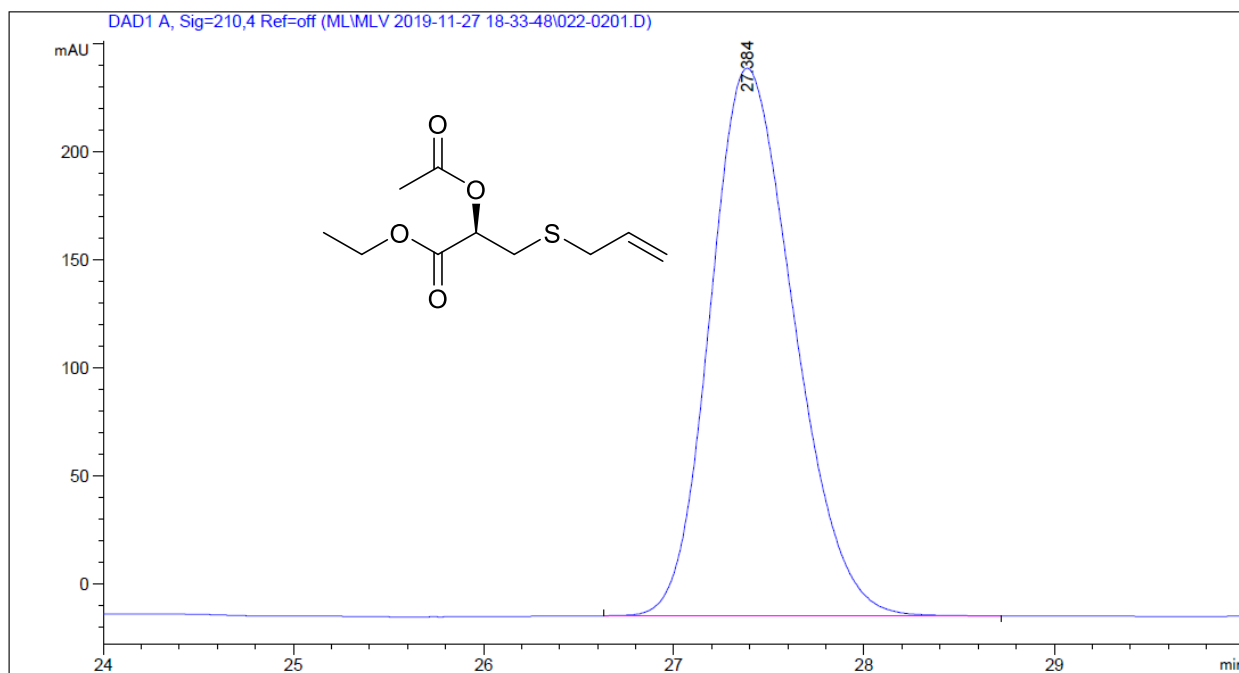
Las condiciones para el análisis por HPLC del compuesto **3bd** fueron las siguientes: columna Chiralpak OD (0.46 cm x 25 cm, Daicel Chemical Ind. Ltd.); elución isocrática: *n*-hexano / *i*-propanol (99:1), 30 °C, flujo 0.4 mL min⁻¹. Tiempos de retención: 24.7 (*S*), 29.0 (*R*). >99% *ee*.





Las condiciones para el análisis por HPLC del compuesto **3fa** fueron las siguientes: columna Chiralpak OJ-H (0.46 cm x 25 cm, Daicel Chemical Ind. Ltd.); elución isocrática: *n*-hexano / *i*-propanol (98:2), 30 °C, flujo 0.5 mL min⁻¹. Tiempos de retención: 14.5 (*S*), 16.4 (*R*). >99% *ee*.





Para el resto de los compuestos, no pudo encontrarse condiciones adecuadas con las columnas disponibles para la separación y cuantificación por HPLC de los excesos enantioméricos.

CAPÍTULO 2

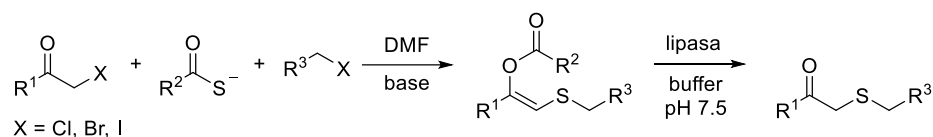
Cascada bienzimática empleando lipasas y ADHs.
Síntesis de β -hidroxisulfuros cíclicos enantioenriquecidos.

Como fue mencionado en la introducción, los procesos catalíticos en cascada presentan ventajas comparativas como resultado de la disminución en los pasos operacionales al evitar el aislamiento de los intermediarios generados. En el capítulo anterior, se desarrolló una estrategia para la síntesis de β -*O*-acil sulfuros quirales enantioenriquecidos, controlando la estereoquímica de uno de los sustratos de partida. La formación de este alcohol protegido podría permitir, por ejemplo, llevar a cabo reacciones de oxidación sobre otros grupos funcionales presentes en la molécula sin afectar al centro estereogénico. Sin embargo, para la desprotección posterior del alcohol, las condiciones de desacetilación necesarias para hidrolizar estos ésteres pueden afectar otras partes de la molécula y podrían afectar la estereoquímica del producto final. Considerando la importancia de los productos mencionados en los antecedentes del capítulo anterior, resulta de interés el desarrollo de nuevos métodos asimétricos capaces de controlar uno o más centros quirales, para llevar a cabo la obtención de β -hidroxisulfuros enantioenriquecidos.

Es importante mencionar que este trabajo fue realizado en colaboración con la Lic. Sofía Caby en el marco de su Practicanato Profesional de la Licenciatura en Química.

Objetivos particulares

Durante el transcurso de la Tesis Doctoral, se desarrolló una estrategia de síntesis de β -cetosulfuros, en la que fue posible agregar una hidrolasa después de una reacción multicomponente (Esquema 2.1) en el mismo recipiente de reacción. Así, se llevó a cabo con éxito una reacción multicomponente, seguida del agregado de un *buffer* y una lipasa comercial, en un único recipiente de reacción, para llevar a cabo la síntesis en dos pasos de β -cetosulfuros a partir de compuestos de partida comerciales y de fácil acceso.¹²³

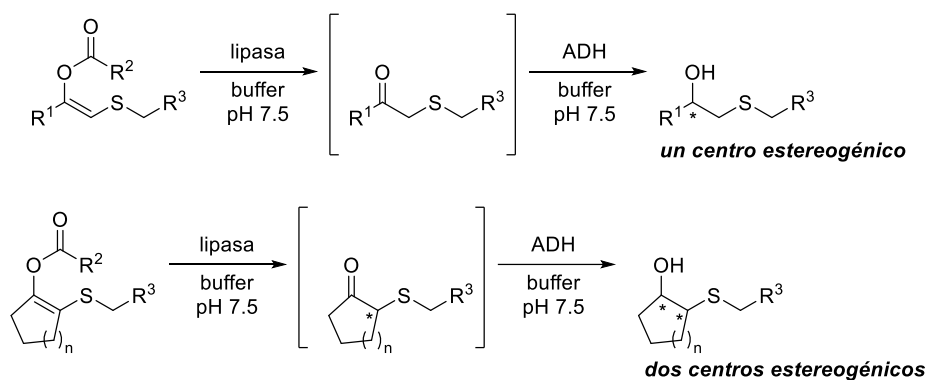


Esquema 2.1. Estrategia quimioenzimática para la síntesis de β -cetosulfuros.

En base a este antecedente, se planteó la posibilidad de realizar una cascada bienzimática empleando lipasas junto a alcohol deshidrogenasas (ADHs). Así, una vez obtenida la cetona, producto de la hidrólisis enzimática del *Z*-enoléster, la ADH llevaría a cabo la reducción selectiva del carbonilo al correspondiente alcohol de manera estereoselectiva, dando lugar a la síntesis de β -hidroxisulfuros quirales enantioenriquecidos. De esta manera, sería posible acceder directamente al alcohol deseado sin la necesidad de aislar el intermediario cetona, y la estereoquímica del alcohol podría ser fácilmente definida mediante el uso de ADHs enantiocomplementarias.

Una vez demostrada la factibilidad de la cascada bienzimática, se planteó la posibilidad de establecer dos centros estereogénicos empleando enol ésteres cíclicos. (Esquema 2.1)

¹²³A. A. Heredia, M. G. López-Vidal, M. Kurina-Sanz, F. R. Bisogno, A. B. Peñeñory, *Beilstein J. Org. Chem.*, **2019**, *15*, 378–387.



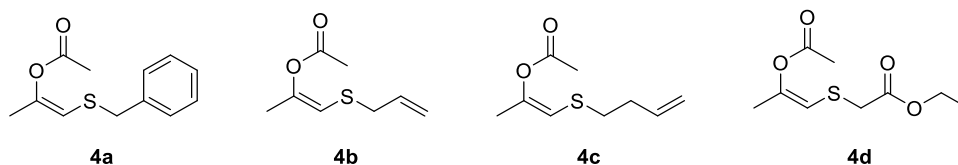
Esquema 2.1. Estrategias propuestas para la obtención de β -hidroxisulfuros quirales con uno y dos centros estereogénicos.

En base a esto, se plantearon los siguientes objetivos:

- Sintetizar nuevos Z-enol ésteres lineales y cíclicos como sustratos de partida del proceso enzimático.
- Optimizar las condiciones para una hidrólisis eficiente de los Z-enol ésteres mediada por hidrolasas.
- Estudiar una serie de ADHs para la reducción de β -cetosulfuros, y así obtener los correspondientes β -hidroxisulfuros enantioenriquecidos.
- Optimizar las condiciones para el uso conjunto de una hidrolasa y una ADH en un proceso en cascada.

Sección 1: Cascada bienzimática para la síntesis de β -hidroxisulfuros quirales con un centro estereogénico

Utilizando la estrategia descrita previamente, se realizó un estudio empleando diversas lipasas y alcohol deshidrogenasas para llevar a cabo la hidrólisis y posterior reducción de los enolésteres mostrados a continuación en el Esquema 2.2.



Esquema 2.2. Enol ésteres ensayados en la cascada bienzimática con ADH y lipasa.

En primer lugar, teniendo en cuenta la robustez tanto de la lipasa B de *Candida antarctica* (CAL-B),¹²⁴ como de la enzima alcohol deshidrogenasa de *Rhodococcus ruber* (ADH-A),¹²⁵ se realizó un ensayo empleando el compuesto **4a** y utilizando dichas enzimas para la hidrólisis y posterior reducción. Para ello, se utilizó un exceso de *i*-PrOH como dador de hidrógeno. Luego, se extendió el estudio a una hidrolasa diferente, la lipasa de páncreas porcino (PPL), y las ADHs de *Lactobacillus brevis* (LBADH),¹²⁶ *Thermoanaerobium brockii* (ADH-T)¹²⁷ y *Thermoanaerobacter ethanolicus* (TesADH).¹²⁸ Es importante mencionar que, la LBADH presenta una estereoselectividad *anti*-Prelog, mientras que las otras tres se comportan según las reglas de Prelog.¹²⁹ A continuación en la Tabla 2.1 se pueden observar los resultados obtenidos para la cascada enzimática sobre los sustratos ensayados, variando las proporciones de las enzimas utilizadas como catalizadores.

¹²⁴ C. Ortiz, M. L. Ferreira, O. Barbosa, J. C. S. dos Santos, R. C. Rodrigues, Á. Berenguer-Murcia, L. E. Briand, R. Fernández-Lafuente. *Catal. Sci. Technol.*, **2019**, *9*, 2380-2420.

¹²⁵ W. Stampfer, B. Kosjek, C. Moitzi, W. Kroutil, K. Faber, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 1014-1017.

¹²⁶ C. Rodríguez, W. Borzęcka, J. H. Sattler, W. Kroutil, I. Lavandera, V. Gotor. *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 673-681.

¹²⁷ M. Kurina-Sanz, F. R. Bisogno, A. A. Orden, I. Lavandera, V. Gotor, *Adv. Synth. Catal.* **2009**, *351*, 1842-1848.

¹²⁸ K. I. Ziegelmann-Fjeld, M. M. Musa, R. S. Phillips, J. G. Zeikus, C. Vieille, *Protein Eng. Des. Sel.*, **2007**, *20*, 47-55.

¹²⁹ V. Prelog, *Pure Appl. Chem.*, **1964**, *9*, 119-130.

se emplearon diferentes lotes de la proteína sobreexpresada, en el cual el lote empleado para la conversión del sustrato **4a** tenía mayor actividad. Elevando la cantidad de oxidorreductasa al doble, se obtuvo únicamente el alcohol enantiopuro correspondiente (entrada 6). Con el fin de confirmar el disparo de la cascada enzimática por la presencia de la lipasa agregada, se realizó un estudio empleando únicamente *E. coli*/ADH-A (entrada 4). En este caso, se observó que en presencia del preparado enzimático conteniendo ADH-A, sólo se detectó el enol éster de partida. Esto evidencia que las hidrolasas del preparado enzimático no actúan sobre el sustrato y que el proceso en cascada se dispara únicamente cuando se adiciona la lipasa en el medio.

Debido a la disponibilidad en el laboratorio de la lipasa de páncreas porcino (PPL), se realizaron estudios para evaluar la aceptación de los sustratos frente a dicho preparado enzimático. Al emplear el preparado de PPL, éste dejaba una gran cantidad de lípidos en la mezcla de reacción, lo cual dificultó el procesado de la reacción y la purificación de los compuestos. Para remover los lípidos, se desgrasó y lavó previamente a su utilización la PPL con *n*-hexano y se evaporó el solvente a presión reducida. Una vez obtenido el preparado enzimático desgrasado, se ensayaron cantidades crecientes de hidrolasa sobre el sustrato **4b** (entradas 7-9): se encontró que 50 mg de PPL consumen completamente al enol éster inicial y se obtiene únicamente el alcohol enantiopuro correspondiente cuando se emplea en conjunto con ADH-A (entrada 9). Nuevamente, se realizó la reacción empleando solamente la hidrolasa y sólo pudo detectarse la cetona (entrada 10). Posteriormente, se realizaron pruebas con otras ADHs sobreexpresadas: ADH-T, TesADH y LBADH. En el caso de las dos primeras, no se detectó el alcohol y sólo se observó la acumulación de la cetona correspondiente (entradas 11 y 12). En el caso de LBADH, se detectó únicamente el alcohol (*R*), por lo que se obtuvo una excelente conversión y exceso enantiomérico en el proceso en cascada (entrada 13). Estos resultados indican que ADH-A y LBADH son enzimas enantiocomplementarias para la formación del producto **6b** (entrada 9 vs 13), lo que permite controlar la estereoquímica del alcohol deseado sólo con el cambio de la ADH utilizada. Más aún, en ambos casos la conversión y el exceso enantiomérico fueron excelentes.

Con respecto al sustrato con el sustituyente homoalílico **4c**, la hidrólisis enzimática con CAL-B fue excelente (entrada 15), mientras que para el caso de PPL no fue completa la conversión (entrada 14). Además, la bioreducción con ADH no fue tan eficiente como la observada para los sustratos nombrados anteriormente. Incluso trabajando con una concentración del doble de ADH-A que la empleada para los demás sustratos, se observó en todos los casos cetona remanente en el mismo tiempo de reacción para ambas

cascadas (entradas 14 y 15). No obstante, cabe mencionar que se observó un excelente exceso enantiomérico para el alcohol obtenido. Por otro lado, es probable que la aceptación del sustrato **4c** tanto por parte de la hidrolasa como de la ADH se ve menos favorecida que los ejemplos anteriores, dando cuenta que el largo de la cadena alquílica o la flexibilidad de dicha cadena pueden ser un impedimento para la correcta ubicación del sustrato en el sitio activo. En la situación de la bio-reducción con ADH-A, aunque se pueda ver dificultada la ubicación del sustrato en el sitio activo, la orientación de este no se ve afectada, lo que se traduce en una transferencia de hidruro siempre sobre la misma cara y por ende con un excelente exceso enantiomérico. En cambio, con LBADH también se observó únicamente el alcohol *anti*-Prelog con excelente exceso enantiomérico (entrada 16).

Por último, el sustrato **4d**, que tiene dos grupos hidrolizables, presentó complicaciones con respecto a la hidrólisis. Cuando la reacción se llevó a cabo empleando CAL-B (entrada 17), no se observó conversión alguna y sólo pudo detectarse el enol éster de partida. Sin embargo, cuando PPL fue ensayada, se obtuvo conversión completa (entrada 18). Esto puede atribuirse a que en el caso de CAL-B, el sustrato no es aceptado en el sitio activo de la enzima, posiblemente debido a la presencia de los dos grupos carbonilos. Al no detectarse conversión del sustrato inicial, esto podría indicar que ninguno de los dos grupos ésteres son hidrolizables por CAL-B. Como contraparte, otra posible interpretación sería que el sustrato actúe como un inhibidor irreversible de la hidrolasa, lo cual impediría la conversión del enol éster. Finalmente, y con respecto a PPL, la conversión fue completa y se detectó únicamente la cetona y el alcohol correspondiente (entrada 18). Por ende, la hidrólisis enzimática presentó regioselectividad hacia el enol éster frente al grupo etiléster. En dicha cascada, el alcohol **6d** fue obtenido con excelente pureza óptica.

Conclusiones Parciales

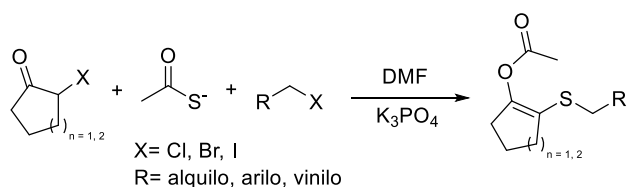
En base a los resultados descritos en el presente capítulo, fue posible acoplar estas dos enzimas (una hidrolasa y una alcohol deshidrogenasa) en un proceso en cascada, obteniéndose condiciones adecuadas para la conversión completa del sustrato de partida. De esta manera, a partir de Z-enol ésteres azufrados proquirales obtenidos mediante una reacción multicomponente, fue posible sintetizar β -hidroxisulfuros enantioenriquecidos, en un proceso bienzimático en cascada con excelentes conversiones y excesos enantioméricos.

Debe notarse que ambos enantiómeros del producto final resultaron igualmente accesibles, mediante la correcta elección de la ADH empleada, ya que la estereoquímica final es controlada únicamente por esta enzima.

Sección 2: Cascada bienzimática para la síntesis de β -hidroxisulfuros quirales con dos centros estereogénicos partiendo de enol ésteres cíclicos

Como fue mencionado anteriormente, los β -hidroxisulfuros, o sus derivados, son de particular interés en la Síntesis Orgánica. En la sección anterior, se describió el proceso de síntesis de estos compuestos que poseen un solo centro estereogénico. En la presente sección, se expone la síntesis de β -hidroxisulfuros cíclicos con dos centros estereogénicos.

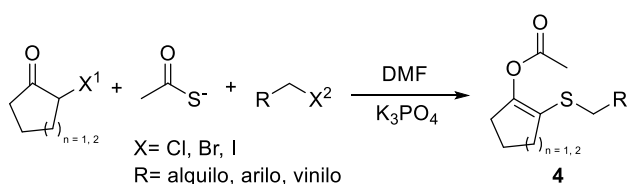
Tomando como referencia la síntesis de enol ésteres desarrollada en nuestro grupo de investigación¹⁰¹, se llevó a cabo la obtención de diferentes enol ésteres, variando la halocetona cíclica empleada y el electrófilo (Esquema 2.3).



Esquema 2.3. Síntesis multicomponente de Z-enol ésteres cíclicos

En la siguiente tabla (Tabla 2.2) se detallan todos los sustratos sintetizados empleando esta metodología.

Tabla 2.2. Rendimientos de la estrategia multicomponente para la síntesis de los compuestos **4e-m**.

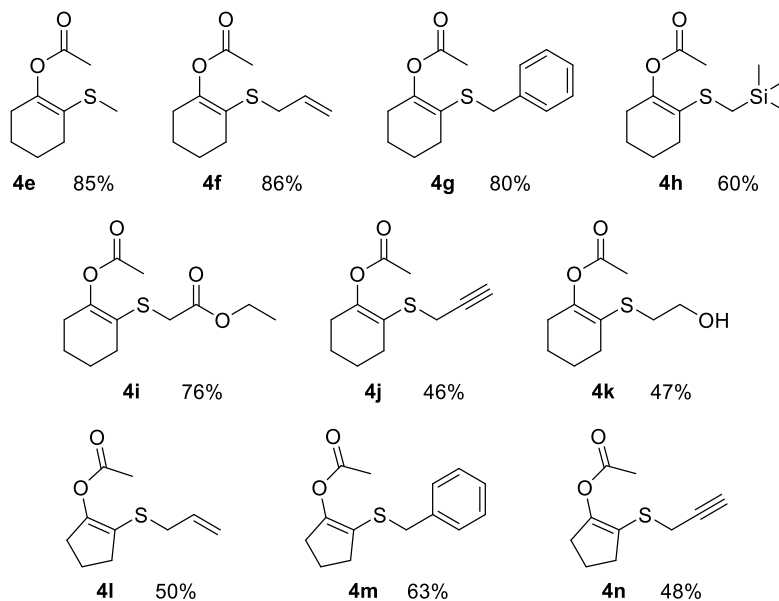


entrada	Compuesto	n	R	X ¹	X ²	rendimiento (%)
1	4e	2	H	Cl	I	86
2	4f	2	CH=CH ₂	Cl	Br	85
3	4g	2	Ph	Cl	Br	80
4	4h	2	Si(CH ₃) ₃	Cl	Cl	60
5	4i	2	COOCH ₂ CH ₃	Cl	I	77
6	4j	2	C≡CH	Cl	OTs	46
7	4k	2	CH ₂ CH ₂ OH	Cl	I	47
8	4l	1	CH=CH ₂	Br	Br	50

9	4m	1	Ph	Br	Br	63
10	4n	1	C≡CH	Br	OTs	48
11	4o	1	CH ₂ CN	Br	Br	-

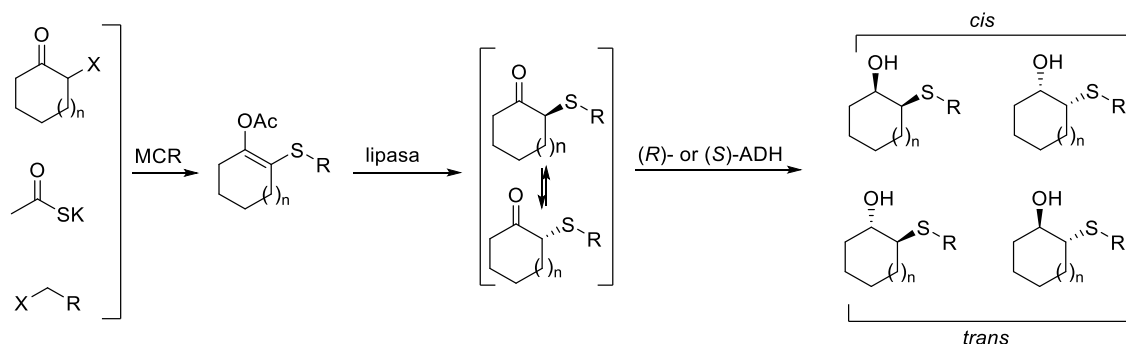
Los enol ésteres producto de las multicomponente, pudieron obtenerse en buenos a muy buenos rendimientos. Con respecto a las halocetonas cíclicas de seis carbonos ($n = 2$, entradas 1-7), los rendimientos fueron muy buenos, aunque un poco menores en el caso de electrófilos más pobres como clorometil(trimetil)silano y tosilato de propargilo (entradas 4 y 5, respectivamente). Cabe destacar que el efecto del tosilato como grupo saliente en estas reacciones multicomponente ya se ha observado en el capítulo 1, donde el cambio de grupo saliente de tosilato a bromo, mejora considerablemente el rendimiento de la reacción. Por otra parte, cuando el grupo saliente es bromo o yodo, no hay cambios significativos en el resultado de la síntesis. En el caso de las halocetonas cíclicas de 5 miembros ($n = 1$, entradas 8-10), los rendimientos fueron menores en comparación con los ejemplos mencionados anteriormente y esto puede deberse al empleo de la halocetona bromada. La posibilidad de los aniones de azufre de realizar reacciones de reducción de un electrón frente a este sustrato de mayor reactividad, justificaría la mayor presencia de subproductos. Otra posible causa puede ser la escala de la reacción. La síntesis de los productos de multicomponente cíclicos de cinco miembros se realizó con la mitad de concentración de sustrato que la empleada para la de los de seis miembros, por ende, la pérdida en el procesado de la reacción es mayor y, en consecuencia, su rendimiento disminuyó. Por último, cuando se utilizó 3-bromopropionitrilo como electrófilo (entrada 11), no se obtuvo el producto de la reacción multicomponente, sino una mezcla de subproductos donde tampoco se detecta al electrófilo empleado.

En el siguiente esquema se resumen todos los productos sintetizados utilizando esta metodología (Esquema 2.4).



Esquema 2.4: Estructura y rendimiento aislado de los enol ésteres sintetizados

Una vez obtenidos estos enol ésteres cíclicos proquirales que contienen un resto alquil sulfuro en el carbono vinílico, se planteó la combinación de la RMC en conjunto con una cascada bienzimática para dar un acceso directo a *cis* o *trans* 1,2-hidroxisulfuros diastereo- y enantioenriquecidos. El hecho de obtener un intermediario quiral (β -cetosulfuro cíclico) en donde el estereocentro posee un protón con elevada acidez, permite el acceso a una resolución cinética dinámica mediante la acción selectiva de una ADH, logrando la reducción selectiva del carbonilo y estableciendo también el estereocentro contiguo. Mediante la combinación de hidrólisis-reducción, podría determinarse con éxito dos centros quirales a partir de una molécula inicial aquiral (Esquema 2.5).

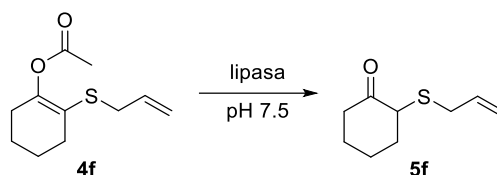


Esquema 2.5: Representación de la cascada bienzimática a partir de la reacción multicomponente.

Como primera aproximación, se realizó una prueba de hidrólisis enzimática sobre el compuesto **4f** empleando las hidrolasas comerciales disponibles en nuestro laboratorio: lipasa A de *Candida antártica* (CAL-A), lipasa B de *Candida antártica* (CAL-B), lipasa de

Pseudomonas cepacia (PSL-IM), lipasa de páncreas porcino (PPL), lipasa de *Candida rugosa* (CRL), lipasa de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL-IM) y lipasa de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM) (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Muestreo de lipasas sobre el compuesto **4f**.



entrada	hidrolasa	conversión (%)
1	-	-
2	CAL-A	>99
3	CAL-B	>99
4	PSL-IM	>99
5	PPL	>99
6	CRL	>99
7	TL-IM	>99
8	RM	>99

Condiciones de reacción: **4f** 20 mM, 2 mg de hidrolasa excepto PPL (20 mg), buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5.

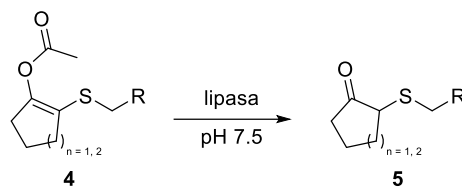
Como se puede observar en la Tabla 2,3, todas las enzimas ensayadas sobre el sustrato **4f** presentaron actividad y conversión completa en el tiempo de reacción del estudio. Esta amplia aceptación del sustrato por las hidrolasas estudiadas puede deberse a la usual actividad que poseen estas enzimas sobre los enol ésteres. Debe recordarse que, en las reacciones de acilación promovidas por hidrolasas, generalmente los dadores de acilo más empleados son enol ésteres como acetato de vinil o acetato de isopropenilo.¹³⁰

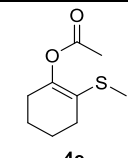
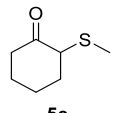
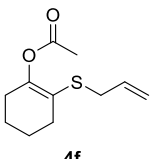
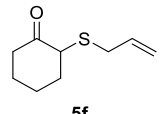
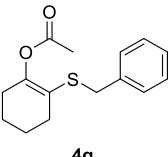
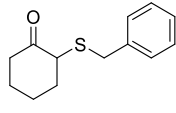
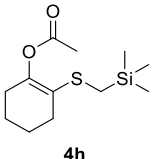
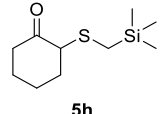
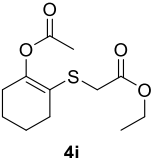
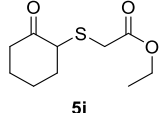
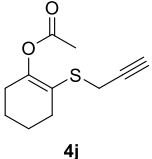
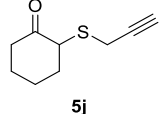
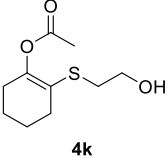
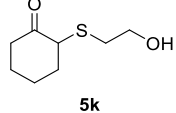
Una vez realizado estos ensayos, se continuó con la hidrólisis enzimática de los enol ésteres sintetizados anteriormente empleando CAL-B y PPL, debido a la disponibilidad de estos preparados enzimáticos en el laboratorio.

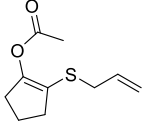
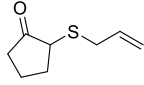
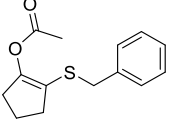
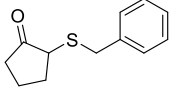
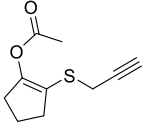
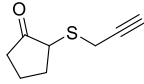
¹³⁰ Kazlauskas, R. *Chapter 5-Hydrolysis and formation of carboxylic acid and alcohol derivatives*. En *Organic Synthesis Using Biocatalysis*; Goswami, A., Stewart, J.D., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2016, 127–148.

Los correspondientes rendimientos para los diferentes compuestos hidrolizados se detallan a continuación en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Hidrólisis enzimática de enol ésteres cíclicos proquirales.



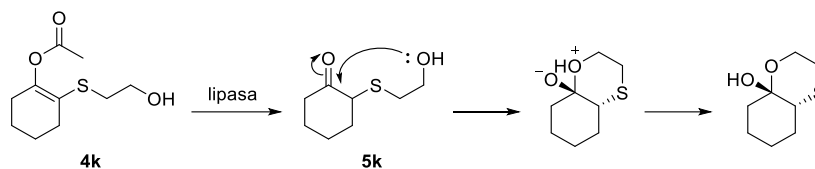
entrada	sustrato	hidrolasa	producto	rendimiento (%)	ee(%)
1	 4e	CAL-B ó PPL	 5e	-	-
2	 4f	PPL	 5f	80	<1
3	 4g	PPL	 5g	52	<1
4	 4h	PPL	 5h	40	<1
5	 4i	CAL-B ó PPL	 5i	-	-
6	 4j	PPL	 5j	73	<1
7	 4k	PPL	 5k	94	<1

8		PPL		86	<1
	4i		5i		
9		PPL		60	<1
	4m		5m		
10		PPL		68	<1
	4n		5n		

Condiciones de reacción: **4f** 20 mM, 2 mg de CAL-B o 20 mg de PPL, buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5.

De los diez sustratos ensayados, se encontraron condiciones para hidrolizar ocho de estos en rendimientos que van de aceptables a muy buenos. Se obtuvieron cetonas correspondientes a los enol ésteres cíclicos de seis carbonos (entradas 2-4 y 6-7), como de cinco carbonos (entradas 8-10). Como puede observarse en la Tabla 2.4, tanto sustratos con sustituyentes alifáticos, aromáticos, alílicos y propargílicos fueron aceptados, como así también algunos grupos funcionales con heteroátomos, como el derivado de silicio, y el derivado que posee un alcohol primario (entradas 4 y 7 respectivamente). Los rendimientos sobre los compuestos hidrolizados fueron similares entre los sustratos cíclicos de seis y cinco átomos de carbono no evidenciándose una influencia del tamaño del ciclo sobre el proceso hidrolítico. Con respecto a los enol ésteres de seis miembros (entrada 1), con el sustituyente de metilo, no se pudo obtener la cetona correspondiente. Esto se debió principalmente a la volatilidad de la cetona y la presencia de impurezas con un perfil cromatográfico similar, lo que dificultó la tarea de aislar y caracterizar debidamente al producto en cuestión. El mismo resultado fue obtenido empleando tanto CAL-B como PPL. Por otro lado, cabe destacar que los sustratos con sustituyentes más voluminosos presentaron menores rendimientos en comparación al resto (entradas 3 y 4) y para obtener su conversión completa, tuvo que utilizarse una mayor concentración de enzima además de prolongar los tiempos de reacción. Estos rendimientos menores pueden explicarse por la escala de trabajo sumado a un procesado de la reacción más engorroso, al tener mayor cantidad de preparado enzimático, lo cual dificulta específicamente la separación de fases durante el proceso de la extracción. En el estudio del compuesto **4i** (entrada 5), no se encontraron condiciones para la obtención del producto de hidrólisis con las dos enzimas ensayadas. Un ejemplo a detallar es el del compuesto **4k** (entrada 7). En

este caso, si bien la hidrólisis fue efectiva y no se observó enol éster de partida, el producto detectado por resonancia magnética nuclear correspondió a la forma hemiacetal, el cual puede ser explicado por el ataque del alcohol primario al carbono carbonílico (Esquema 2.5).



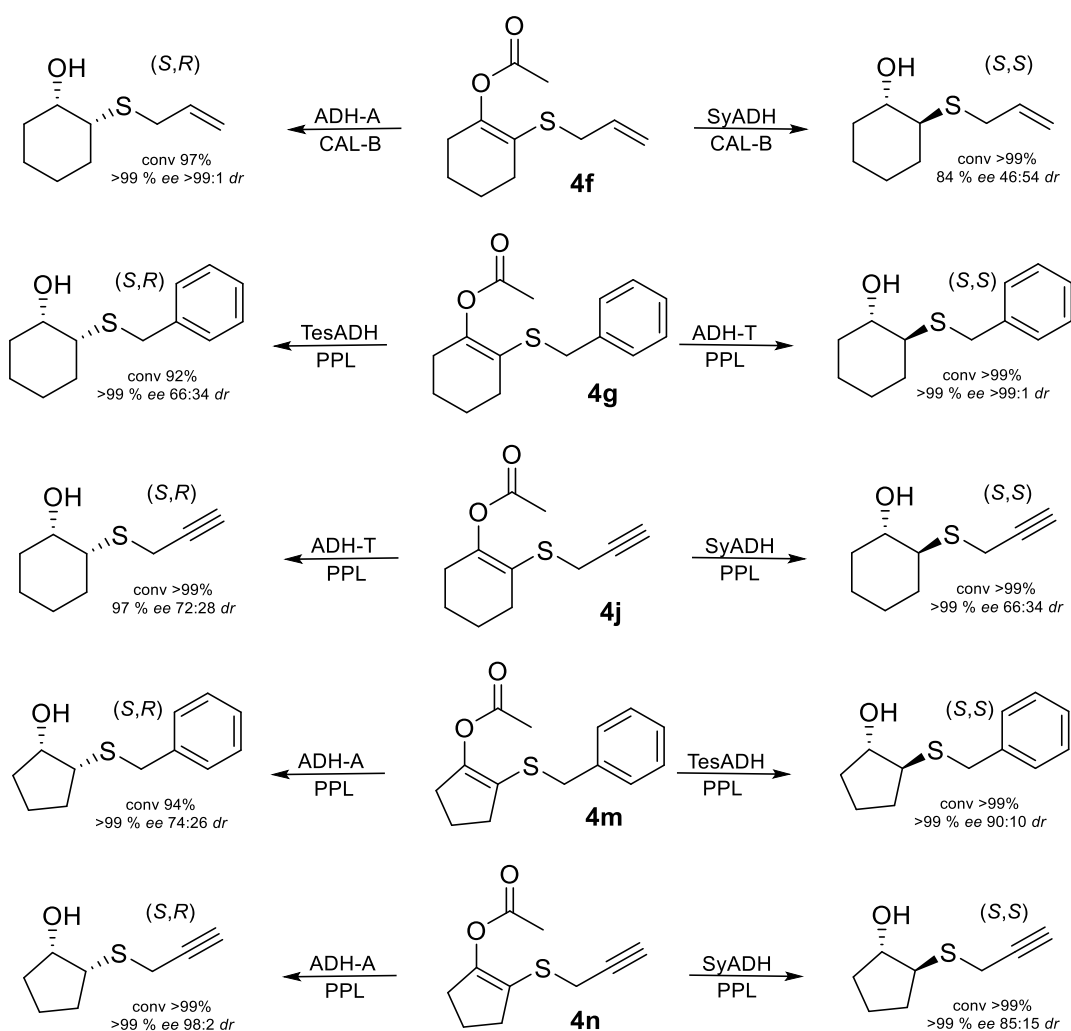
Esquema 2.5. Formación del hemiacetal del compuesto 5k.

Con respecto a los compuestos cíclicos de cinco carbonos, para los tres compuestos ensayados se encontraron condiciones para la obtención de las cetonas correspondientes en muy buenos rendimientos. La diferencia en estos rendimientos puede deberse a la pequeña escala de las reacciones enzimáticas y a pérdidas en el procesado de la reacción, ya que, en todos los ejemplos, la conversión fue completa. Por último, cabe destacar el exceso enantiomérico de las cetonas obtenidas: en todos los casos, el exceso enantiomérico del producto fue nulo. El mecanismo de acción aceptado para las lipasas involucra una hidrólisis del grupo éster y posterior protonación dentro del sitio activo, por lo que se esperaría un cierto exceso enantiomérico del producto ya que esta protonación ocurre dentro de un entorno quiral y confinado como es el sitio activo de la enzima. Al estudiar el exceso enantiomérico de la cetona cíclica obtenida por hidrólisis enzimática, se observó el producto racémico: aunque opere lo anteriormente expuesto con respecto al mecanismo de hidrólisis enzimática, y la enzima de lugar a un compuesto enantioenriquecido, la elevada acidez del protón del carbono estereogénico permite un proceso de racemización (tautomería cetona-enólica) lo suficientemente rápido como para que, al analizar el *ee*, no se observen valores significativos, en las condiciones de reacción empleadas.

Al obtener, luego de la hidrólisis enzimática, cetonas quirales racémicas cuyo centro estereogénico se encuentra en posición α al carbonilo, se planteó la posibilidad de establecer un sistema de reducción enzimática mediante una resolución cinética dinámica, o por sus siglas en inglés, DKR (*Dynamic Kinetic Resolution*), estrategia que ya fue mencionada y descrita en la introducción de esta Tesis. Esto indica que la velocidad de racemización de la cetona es lo suficientemente rápida como para que la ADH encuentre en todo momento ambos enantiómeros del sustrato en una proporción similar. Así, el enantiómero preferido puede ser convertido al correspondiente β -hidroxisulfuro, mientras que aquel con menor velocidad de conversión, sufre un proceso de racemización constante.

Luego de finalizar estos ensayos de hidrólisis enzimática, se continuó con el estudio de la reducción estereoselectiva mediada por ADHs, sobre las cetonas obtenidas por la hidrólisis enzimática. Con el objeto de estudiar analíticamente el sistema por Cromatografía Gaseosa, se probó la reducción no selectiva con borohidruro de sodio de las cetonas obtenidas previamente. Los alcoholes sintetizados fueron acilados con diversos agentes acilantes para una eficiente separación cromatográfica.

Luego de un muestreo con la batería de ADHs sobreexpresadas en *E. coli*, diversos β -hidroxisulfuros pudieron ser preparados a partir de la reducción selectiva de las correspondientes cetonas. En base a los resultados obtenidos en los estudios de hidrólisis enzimática y bioreducción, a continuación, en el Esquema 2.6 se resumen los resultados obtenidos para la síntesis de los β -hidroxisulfuros enantioenriquecidos.



Esquema 2.6. Resultados más promisorios obtenidos en la combinación de hidrolasas y ADHs.

Como se puede observar en el Esquema 2.6, fue posible encontrar condiciones para obtener isómeros de alta pureza óptica a partir de la reducción enzimática de las cetonas

5f, 5g, 5j, 5m, 5n, y fue posible llevar a cabo la cascada enzimática a partir de los enol ésteres **4f, 4g, 4j, 4m, 4n**. Por otro lado, y debido a los recursos disponibles al momento, desafortunadamente no se encontraron condiciones que permitan determinar los excesos enantio- y diastereoméricos para los demás sustratos estudiados.

No debe perderse de vista que dentro de los preparados enzimáticos estudiados, los resultados obtenidos con LBADH, fueron similares a las demás enzimas en términos de estereoselectividad: en vista de estos datos, la reducción de las cetonas presentó la misma selectividad que las enzimas de tipo Prelog, cuando esta enzima ha sido tradicionalmente descrita como una enzima *anti*-Prelog (ver Materiales y métodos).¹³¹ Esto puede explicarse por una orientación diferente de los β -cetosulfuros cíclicos en el sitio activo de las enzimas. Considerando las características de las enzimas, pareciera haber dos posibilidades de unión del sustrato en el sitio activo. Generalmente, las ADHs presentan cavidades de diferente tamaño en los que se acomodan los sustituyentes de la cetona.¹³² En el caso de las enzimas Prelog, la preferencia en la coordinación en el sitio activo indica que la parte cíclica se ubicaría dentro de la cavidad voluminosa mientras que el sustituyente restante iría en dirección hacia la cavidad más pequeña. Al ubicarse de esa manera, la transferencia de hidruro se da por la cara *si*, dando lugar al correspondiente alcohol (*R*) en los compuestos obtenidos (debido a la inversión en la prioridad de Cahn-Ingold-Prelog). Por el contrario, la ubicación opuesta no se ve favorecida ya que la detección de los isómeros de estereoquímica (*S*) en el centro quiral unido a oxígeno son muy bajas. Es importante aclarar que incluso en las ADHs que poseen dos huecos voluminosos, *Sy*ADH y *Ras*ADH, siempre se observa una mayor proporción de alcoholes (*R*) que (*S*). Lo mismo se observó para LBADH, donde la transferencia del hidruro también ocurre mayoritariamente desde la cara *si* y prevalecen los alcoholes de configuración (*S*), nuevamente por la inversión en la prioridad de Cahn-Ingold-Prelog. Sin embargo, esta enzima está descrita como una enzima *anti*-Prelog por lo que se esperaría obtener el alcohol enantiocomplementario. Por este motivo, al observarse la misma estereoquímica, esto implicaría un modo de unión distinto. La parte cíclica se ubicaría en dirección al “bolsillo” pequeño, mientras que el sustituyente restante se ubicaría en el bolsillo más voluminoso y de esa manera, al transferirse el hidruro hacia la cara *si* pero con una posición inversa, el alcohol resultante sería de configuración (*R*). Cabe aclarar que los excesos enantioméricos

¹³¹ C. Rodríguez, W. Borzęcka, J. H. Sattler, W. Kroutil, I. Lavandera, V. Gotor. *Org. Biomol. Chem.*, **2014**, *12*, 673–681.

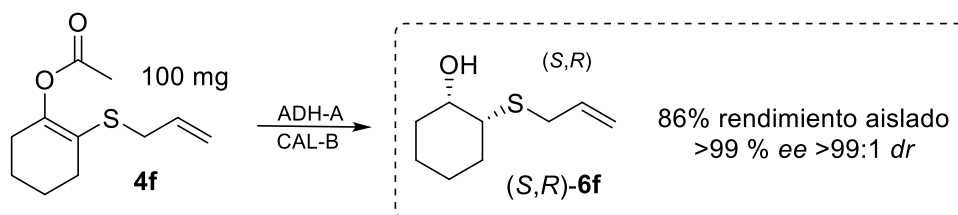
¹³² K. Niefind, J. Muller, B. Riebel, W. Hummel, D. Schomburg. *J. Mol. Biol.*, **2003**, *327*, 317–328.

obtenidos con LBADH son en su mayoría muy bajos, por lo que ambas opciones coexistirían sin una prevalencia marcada de un modo de unión sobre el otro. Además, se observa para LBADH que los compuestos con el sustituyente bencílico no son aceptados por esta enzima.

La aceptación de los sustratos dependiendo de la cantidad de carbonos del anillo no parece influir significativamente; tanto aquellos β -cetosulfuros cíclicos de 5 como de 6 átomos de carbono presentaron excelentes conversiones. Por otro lado, el sustituyente evidentemente influye en la enantioselectividad de la enzima: dependiendo del sustituyente, una misma enzima puede presentar una diastereoselectividad completamente opuesta. Esto significa que, aunque el anclaje del sustrato en el sitio activo y la transferencia de hidruro se mantengan, la ubicación espacial del sustituyente es fundamental en el reconocimiento del sustrato por parte de la enzima. Esto se observó particularmente en ADH-T, tanto dentro de las cetonas cíclicas de 6 como de 5 miembros, que, dependiendo del sustrato, se observan diastereoselectividades muy diferentes. Además, el tamaño del anillo para un mismo sustituyente puede influenciar significativamente en el resultado de la bioreducción. Para ADH-A se observó que la razón diastereomérica (*dr*) mejoró considerablemente cuando el anillo era de 5 miembros en comparación con el de 6 miembros para los sustratos con el sustituyente propargílico. Esto indicaría que la mayor rigidez relativa de los compuestos cíclicos de 5 carbonos produce una mayor diferencia en la aceptación de un enantiómero sobre el otro en esta enzima. Análogamente, con respecto a TesADH, las diastereoselectividades para el anillo de 6 miembros fueron bajas, con una leve tendencia a los isómeros *cis*, mientras que, en los anillos de 5 miembros, se favoreció considerablemente los isómeros *trans*.

En base al muestreo enzimático, el hecho de observar este modo de unión diferente para LBADH, que fue la única enzima *anti*-Prelog ensayada, limitó la posibilidad de acceso a isómeros de configuración (*S*) en el centro quiral unido a oxígeno. En el Esquema 2.6 se resumen los mejores resultados obtenidos para los demás isómeros, pudiéndose lograr selectividades excelentes, como en el caso del empleo de ADH-A con el compuesto **5f** y **5n**, y ADH-T con el compuesto **5g**. De esta manera, pudo encontrarse condiciones para la obtención de un único isómero de cuatro posibles.

Con el fin de demostrar la robustez de la cascada bienzimática y estudiar la configuración relativa (e indirectamente la absoluta), se llevó a cabo la hidrólisis y posterior reducción del enol éster **4f** a mayor escala. (Esquema 2.7).



Esquema 2.7. Reacción bienzimática escalada para la síntesis asimétrica de **6f**.

Así, pudo demostrarse el escalado de la cascada bienzimática y pudo obtenerse el compuesto enantioenriquecido (*S, R*)-**6f** con un muy buen rendimiento aislado y excelente pureza óptica.

Conclusiones Parciales

Combinando el uso de una lipasa robusta y una ADH selectiva en un proceso en cascada, fue posible preparar β -hidroxisulfuros *cis* o *trans* de manera enantiopura, con altas conversiones, enantio- y diastereoselectividades. Notablemente, en la mayoría de los casos con las enzimas ensayadas, fue posible obtener un isómero mayoritario de cuatro posibles productos *via* una DKR. Esta estrategia en cascada maximiza la economía atómica y permite el acceso a compuestos quirales conteniendo dos centros estereogénicos contiguos. La estereoquímica del proceso en cascada está controlada principalmente por la ADH usada, presentando diferentes escenarios dependiendo la sustitución del sustrato ensayado. De manera llamativa, la estereopreferencia de una enzima anti-Prelog (LBADH) se invirtió frente a los sustratos cíclicos de seis miembros, mientras que, frente a los sustratos cíclicos de cinco miembros, la estereoquímica fue la usual.

Debe notarse que, excepto el enol éster **4e**, el resto de los enol ésteres cíclicos sintetizados como sustrato son compuestos novedosos (nueve compuestos) además de la mayoría de los β -hidroxisulfuros (todos excepto **6m**).

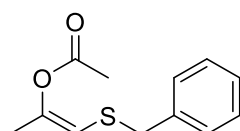
Por otra parte, cuando este procedimiento fue realizado en una escala semipreparativa, se consiguió un alto rendimiento aislado del correspondiente β -hidroxisulfuro (86 %), demostrando que puede ser empleado para transformaciones a mayor escala. Así, se logró la síntesis asimétrica del compuesto **6f** a partir del enol éster proquiral **4f**, con excelente *ee* y *dr*.

Esta estrategia corresponde a uno de los pocos ejemplos de cascadas bienzimáticas donde tienen lugar procesos dinámicos para la preparación de importantes compuestos azufrados que contienen hidroxilos quirales, con elevada economía atómica y excelentes selectividades.

Procedimiento general para la síntesis de *Z*-enol ésteres cíclicos¹⁰¹

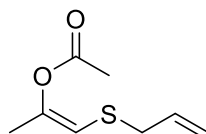
A una solución de 2-clorociclohexanona o 2-bromociclohexanona (3,8 mmol) o 2-bromociclopentanona (7,6 mmol) en DMF (2,5 y 5 mL respectivamente), se agregó 1.1 equivalente de tioacetato de potasio a temperatura ambiente. Después de agitarse por 1 hora o hasta completarse la reacción, se agregó el correspondiente electrófilo (1.2 equivalentes) y la base (K₂CO₃, 1.2 equivalentes). La reacción fue agitada por 18 horas a temperatura ambiente. Luego, se extrajo con AcOEt (3 x 10 mL), se lavó con agua (3 x 20 mL), se secó con sulfato de sodio y se evaporó a sequedad. El producto fue purificado por columna cromatográfica en sílica-gel para obtener el correspondiente *Z*-enol éster cíclico como un aceite coloreado.

Acetato de (*Z*)-1-(benciltio)prop-1-en-2-ilo(4a)



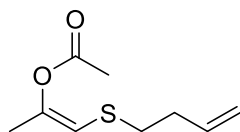
Aceite incoloro. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 7.29 (m, 5H), 5.49 (bq, J = 1.0 Hz, 1H), 3.82 (s, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.91 (d, J = 0.9 Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 168.2 (C), 145.3 (C), 137.5 (C), 128.9 (CH), 128.6 (CH), 127.3 (CH), 110.7 (CH), 37.6 (CH₂), 20.7 (CH₃), 19.8 (CH₃). HRMS ESI calculado para C₁₂H₁₄O₂SNa [M+Na]⁺: 245.0607, encontrado: 245.0598.

Acetato de (*Z*)-1-(aliltio)prop-1-en-2-ilo (4b)



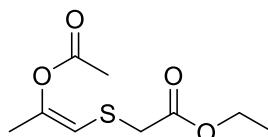
Aceite naranja. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 5.81 (ddt, J = 17.0, 9.9, 7.1 Hz, 1H), 5.51 (bs, 1H), 5.16 (m, 2H), 3.24 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 2.18 (s, 3H), 1.95 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 168.2 (C), 145.0 (C), 134.0 (C), 117.7 (CH), 110.6 (CH), 36.1 (CH₂), 20.7 (CH₃), 19.8 (CH₃). HRMS ESI calculado para C₈H₁₂O₂SNa [M+Na]⁺: 195.0450, encontrado: 195.0436.

Acetato de (Z)-1-(but-3-en-1-iltio)prop-1-en-2-ilo (4c)



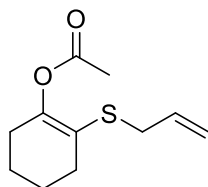
Aceite naranja. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 5.80 (m, 1H), 5.54 (s, 1H), 5.06 (m, 2H), 2.68 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.36 (m, 2H), 2.17 (s, 3H), 1.95 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 168.1 (C), 145.3 (C), 136.1 (C), 116.3 (CH), 111.7 (CH), 34.4 (CH_2), 32.9 (CH_2), 20.7 (CH_3), 19.8 (CH_3). HRMS ESI calculado para $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{O}_2\text{SNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 209.0607, encontrado: 209.0597.

(Z)-2-((2-acetoxiprop-1-en-1-il)tio)acetato de etilo (4d)



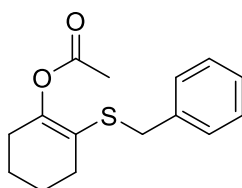
Aceite naranja. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 5.68 (s, 1H), 4.18 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.27 (s, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.95 (s, 3H), 1.27 (t, J = 7.2 Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 169.7, 168.1, 146.9, 110.1, 61.7, 35.1, 20.8, 19.9, 14.2.

Acetato de 2-(aliltio)ciclohex-1-en-1-ilo (4f)



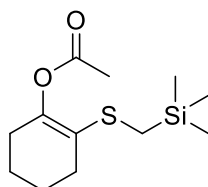
Aceite naranja (661 mg, 82%). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400,16 MHz): δ = 1.70 (m, 4H), 2.15 (s, 3H), 2.24 (m, 4H), 3.26 (d, 2H), 5.04 (d, 1H), 5.13 (d, 1H), 5.78 (m, 1H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100,62 MHz): δ = 20.9 (CH_3), 22.5 (CH_2), 23.0 (CH_2), 28.6 (CH_2), 29.5 (CH_2), 34.1 (CH_2), 116.9 (CH_2), 118.7 (C), 134.7 (CH), 147.5 (C), 168.8 (C); EM (m/z): 41, 43, 67 (100), 95, 100, 101, 129, 170, 212 (M^+).

Acetato de 2-(benciltio)ciclohex-1-en-1-ilo (4g)



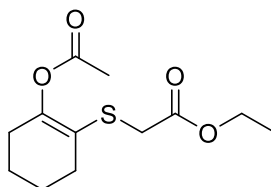
Aceite verdoso (797 mg, 80%). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300.13 MHz): $\delta = 7.33 - 7.16$ (m, 5H), 3.81 (s, 2H), 2.23 - 2.12 (m, 4H), 2.10 (s, 3H), 1.69 - 1.55 (m, 4H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz): $\delta = 168.7$ (C), 147.8 (C), 138.17 (C), 128.9 (C), 128.5 (C), 127.1 (C), 119.2 (C), 36.0 (CH_2), 30.0 (CH_2), 28.6 (CH_2), 23.1 (CH_2), 22.5 (CH_2), 20.9 (CH_3).

Acetato de 2-(((trimetilsilil)metil)tio)ciclohex-1-en-1-ilo (4h)



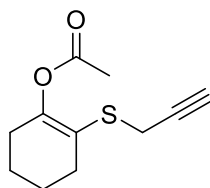
Aceite incoloro: $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400,16 MHz): $\delta = 2.31$ (d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 2.20 - 2.11 (m, 5H), 1.88 (s, 2H), 1.75 - 1.63 (m, 4H), 0.08 (s, 9H) $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz) $\delta = 168.8$ (C), 144.7 (C), 121.4 (C), 28.5 (CH_2), 28.2 (CH_2), 23.2 (CH_2), 22.7 (CH_2), 20.9 (CH_3), 16.2 (CH_2), -1.7 (CH_3).

2-((2-acetoxiciclohex-1-en-1-il)tio)acetato de etilo (4i)



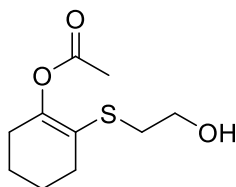
Aceite amarillo: $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400,16 MHz): $\delta = 4.15$ (q, $J = 7.1$ Hz, 2H), 3.31 (s, 2H), 2.40 - 2.29 (m, 2H), 2.21 - 2.09 (m, 5H), 1.77 - 1.65 (m, 2H), 1.26 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz) $\delta = 170.0$ (C), 168.6 (C), 148.6 (C), 118.0 (CH), 61.5 (CH_2), 33.2 (CH_2), 31.0 (CH_2), 29.2 (CH_2), 28.7 (CH_2), 23.1 (CH_2), 22.5 (CH_2), 20.8 (CH_2), 14.2 (CH_3).

Acetato de 2-(prop-2-in-1-iltio)ciclohex-1-en-1-ilo (4j)



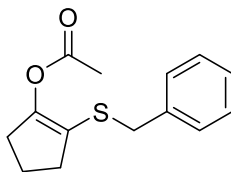
Aceite naranja (368 mg, 46%). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300.13 MHz): $\delta = 3.37$ (d, $J = 2.6$ Hz, 2H), 2.46 – 2.38 (m, 2H), 2.30 – 2.21 (m, 3H), 2.19 (s, 3H), 1.75 (dtt, $J = 6.3, 4.2, 2.1$ Hz, 4H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz): $\delta = 168.8$ (C), 147.5 (C), 134.7 (CH), 118.7 (C), 116.9 (CH₂), 34.1 (CH₂), 29.5 (CH₂), 28.6 (CH₂), 23.0 (CH₂), 22.5 (CH₂), 20.9 (CH₃).

Acetato de 2-((2-hidroxietil)tio)ciclohex-1-en-1-ilo (4k)



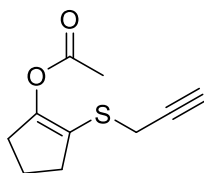
Aceite incoloro: $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400,16 MHz): $\delta = 3.68$ (dd, $J = 11.5, 5.9$ Hz, 2H), 2.83 – 2.75 (m, 3H), 2.38 – 2.29 (m, 2H), 2.19 (s, 3H), 2.23 – 2.12 (m, 2H), 1.78 – 1.65 (m, 4H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz) $\delta = 169.6$ (C), 148.1 (C), 118.7 (C), 62.4 (CH₂), 33.6 (CH₂), 29.1 (CH₂), 28.7 (CH₂), 23.1 (CH₂), 22.6 (CH₂), 21.0 (CH₃).

Acetato de 2-(benciltio)ciclopent-1-en-1-ilo (4m)



Aceite verdoso (681 mg, 63%): $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400,16 MHz): $\delta = 7.41 - 7.20$ (m, 5H), 3.91 (s, 1H), 2.57 – 2.51 (m, 2H), 2.49 – 2.44 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.95 (bquin, $J = 7.7$ Hz, 2H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz) $\delta = 168.1$ (C), 148.6 (C), 138.1 (C), 128.7 (C), 128.5 (C), 127.2 (C), 119.1 (C), 36.0 (CH₂), 32.8 (CH₂), 31.5 (CH₂), 20.8 (CH₃), 20.1 (CH₂).

Acetato de 2-(prop-2-in-1-iltio)ciclopent-1-en-1-ilo (4n)



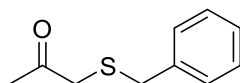
Aceite naranja (378 mg, 51%): $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400,16 MHz): δ = 3.37 (bd, J = 2.5 Hz, 2H), 2.62 – 2.54 (m, 4H), 2.24 (bt, J = 2.5 Hz, 1H), 2.17 (s, 3H), 2.06 – 1.97 (m, 2H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz) δ = 168.0 (C), 149.3 (C), 117.7 (C), 80.1 (C), 71.5 (CH), 32.2 (CH_2), 31.5 (CH_2), 20.8 (CH_3), 20.0 (CH_2), 19.5 (CH_2).

Procedimiento general para la síntesis de β -cetosulfuros cíclicos¹⁰¹

Síntesis a partir de la hidrólisis enzimática de Z-enol ésteres cíclicos

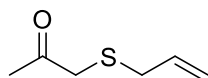
A una solución del enol éster correspondiente (20 mM) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y DMSO 5%, se agregó CAL-B en una relación 1:1 en peso. Se dejó con agitación orbital por 24 horas a 30°C. Luego, se extrajo con AcOEt (3x), se lavó con agua (3x), se secó con sulfato de sodio y se evaporó a sequedad. El producto fue purificado por columna cromatográfica sobre sílica-gel para obtener el correspondiente β -cetosulfuro cíclico como un aceite coloreado.

1-(benciltio)propan-2-ona (5a)



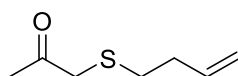
Aceite incoloro. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 7.30 (m, 5H), 3.69 (s, 2H), 3.11 (s, 2H), 2.24 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 203.6 (C), 137.2 (C), 129.2 (CH), 128.6 (CH), 127.3 (CH), 40.8 (CH_2), 36.0 (CH_2), 28.0 (CH_3). GC-MS (EI) m/z 180 [M]⁺, 123 (22), 122 (11), 91 (100).

1-(aliltio)propan-2-ona (5b)



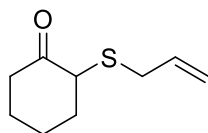
Aceite amarillo. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 5.72 (ddt, J = 16.0, 11.0, 7.3 Hz, 1H), 5.10 (m, 2H), 3.17 (s, 2H), 3.09 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 2.25 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 203.7 (C), 132.9 (C), 118.3 (CH), 40.3 (CH_2), 36.5 (CH_2), 29.6 (CH_3). GC-MS (EI) m/z 130 (39) $[\text{M}]^+$, 87 (100), 73 (79).

1-(but-3-en-1-iltio)propan-2-ona (5c)



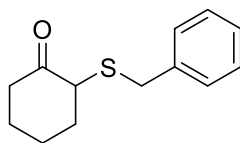
Aceite amarillo. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 5.81 (m, 1H), 5.08 (m, 2H), 3.48 (s, 2H), 2.78 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.45 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 2.31 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 203.2 (C), 136.0 (C), 116.7 (CH), 48.9 (CH_2), 37.8 (CH_2), 33.3 (CH_2), 28.5 (CH_3). HRMS ESI calculado para $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 145.0682, encontrado: 145.0647.

2-(aliltio)ciclohexan-1-ona (5f)



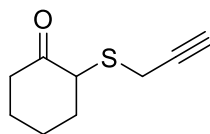
Aceite verdoso (B, 600 mg, 46%): $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400,16 MHz): δ = 5.73 (ddt, J = 14.4, 9.9, 7.2 Hz, 1H), 5.18 – 5.06 (m, 2H), 3.31 (t, J = 4.5 Hz, 1H), 3.08 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 2.99 – 2.86 (m, 1H), 2.27 – 2.08 (m, 2H), 2.01 – 1.89 (m, 2H), 1.86 – 1.63 (m, 3H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz) δ = 208.2 (C), 133.4 (C), 118.1 (CH), 50.7 (CH_2), 38.1 (CH_2), 34.3 (CH_2), 33.1 (CH_2), 27.0 (CH_2), 22.2 (CH_2).

2-(benciltio)ciclohexan-1-ona (5g)



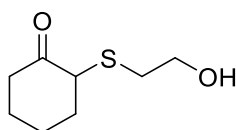
Aceite amarillento (B, 637 mg, 40%): $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400,16 MHz): $\delta = 7.38 - 7.18$ (m, 5H), 3.66 (s, 2H), 3.24 (bt, $J = 4.4$ Hz, 1H), 2.98 (ddd, $J = 14.6, 11.0, 5.8$ Hz, 1H), 2.34 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 2.23 (dt, $J = 14.5, 4.7$ Hz, 1H), 2.15 - 1.58 (m, 5H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz) $\delta = 208.1$ (C), 137.7 (C), 129.2 (CH), 128.5 (CH), 127.2 (CH), 50.9 (CH), 37.8 (CH_2), 35.7 (CH_2), 29.8 (CH_2), 26.9 (CH_2), 21.9 (CH_2).

2-(prop-2-in-1-iltio)ciclohexan-1-ona (5j)



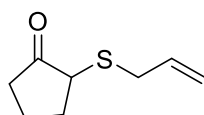
Aceite amarillento (B, 613 mg, 48%): $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300,13 MHz): $\delta = 3.67 - 3.61$ (m, 1H), 3.30 (dd, $J = 16.9, 2.6$ Hz, 1H), 3.19 (dd, $J = 16.9, 2.6$ Hz, 1H), 2.93 - 2.82 (m, 1H), 2.36 - 2.21 (m, 2H), 2.24 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 2.06 - 1.68 (m, 5H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz) $\delta = 207.4$ (C), 79.4 (C), 71.3 (CH), 51.8 (CH), 38.5 (CH_2), 32.9 (CH_2), 26.9 (CH_2), 22.6 (CH_2), 19.0 (CH_2).

2-((2-hidroxietil)tio)ciclohexan-1-ona (5k)



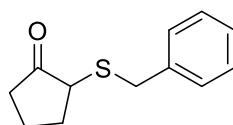
Debido al equilibrio entre la forma ceto y el hemicetal, no se puede asignar sin ambigüedades los desplazamientos de RMN. En el Apéndice se encuentra la comparación entre las estructuras simuladas de la forma ceto y la forma hemicetálica, con el espectro obtenido experimentalmente.

2-(aliltio)ciclopentan-1-ona (5l)



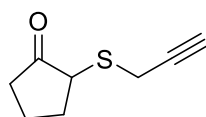
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300,13 MHz): δ = 5.80 (dddd, J = 16.9, 9.9, 8.3, 6.1 Hz, 1H), 5.21 (ddd, J = 17.0, 2.6, 1.5 Hz, 1H), 5.13 (bd, J = 9.9 Hz, 1H), 3.38 (dd, J = 13.8, 8.3 Hz, 1H), 3.13 (dd, J = 13.8, 6.1 Hz, 1H), 3.12 – 3.07 (m, 1H), 2.53 – 2.39 (m, 1H), 2.35 – 2.02 (m, 3H), 1.99 – 1.79 (m, 2H). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz): δ = 214.4 (C), 133.4 (CH), 118.3 (CH_2), 45.8 (CH_2), 36.3 (CH_2), 33.7 (CH_2), 30.3 (CH_2), 20.7 (CH_2).

2-(benciltio)ciclopentan-1-ona (5m)



$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300,13 MHz): δ = 7.43 – 7.11 (m, 5H), 3.85 (d, J = 13.4 Hz, 1H), 3.65 (d, J = 13.4 Hz, 1H), 2.93 – 2.85 (m, 1H), 2.50 – 2.37 (m, 1H), 2.19 – 1.93 (m, 3H), 1.89 – 1.68 (m, 2H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz): δ = 214.0 (C), 137.6 (C), 129.2 (CH), 128.5 (CH), 127.1 (CH), 45.7 (CH_2), 36.1 (CH_2), 34.9 (CH_2), 30.0 (CH_2), 20.6 (CH_2).

2-(prop-2-in-1-iltio)ciclopentan-1-ona (5n)

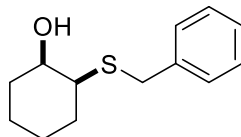


$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400,16 MHz): δ = 3.57 (dd, J = 16.8, 2.5 Hz, 1H), 3.39 (bt, 1H, J = 5.9 Hz, 1H), 3.23 (dd, J = 16.8, 2.5 Hz, 1H), 2.51 – 2.41 (m, 1H), 2.39 – 2.30 (m, 1H), 2.29 – 2.19 (m, 2H), 2.16 – 2.03 (m, 1H), 2.03 – 1.86 (m, 2H). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 213.9 (C), 79.5 (C), 71.4 (CH), 46.4 (CH_2), 36.2 (CH_2), 29.9 (CH_2), 20.7 (CH_2), 18.7 (CH_2).

Reducción no selectiva de cetonas. Síntesis de β -hidroxisulfuros racémicos¹¹⁶

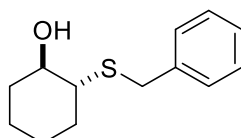
A una solución de 1M de la correspondiente cetona en MeOH, se agregó 0,4 equivalentes de NaBH₄. Se dejó en agitación a temperatura ambiente por 24 h. Se evaporó el solvente orgánico y se extrajo con CH₂Cl₂ (3x10 mL). Las fracciones orgánicas se combinaron y se secó con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó a presión reducida. Con el fin de analizar la estereoquímica del proceso por CG, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL se agregó 3 mg de DMAP y 50 μ L del agente acilante correspondiente (anhídrido trifluoroacético o propiónico). Cuando se observó la completa disolución de la DMAP, se agregó 3 mg del β -cetosulfuro disuelto en 300 μ L de AcOEt y se dejó en agitación orbital por 1 hora. Luego, se agregaron 350 μ L de agua y se dejó en agitación nuevamente por otras 2 horas adicionales. Al terminar la reacción, se extrajo con AcOEt (3 veces), se lavó con agua (3 veces), se secó con sulfato de sodio y se evaporó a sequedad, donde se obtuvo el β -hidroxisulfuro acilado correspondiente.

(*cis*)-2-(benciltio)ciclohexan-1-ol (6g)



Aceite verde: ¹H-RMN (CDCl₃, 400,16 MHz): δ = 7.38 – 7.23 (m, 1H), 3.82 (bs, J = 2.5 Hz, 1H), 3.75 (q, J = 13.4 Hz, 2H), 2.91 – 2.81 (m, 1H), 2.44 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 1.86 – 1.75 (m, 1H), 1.71 – 1.56 (m, 4H), 1.54 – 1.42 (m, 1H), 1.38 – 1.25 (m, 2H); ¹³C-RMN (CDCl₃, 100.62 MHz) δ = 168.8(C), 144.7 (C), 121.4(C), 28.5(CH₂), 28.2(CH₂), 23.2 (CH₂), 22.7 (CH₂), 20.9 (CH₃), 16.2(CH₂), -1.7(CH₃).

(*trans*)-2-(benciltio)ciclohexan-1-ol (6g)



No se pudo obtener una fracción pura de los correspondientes isómeros.

Protocolos enzimáticos y muestreo de enzimas

Procedimiento general para la hidrólisis de Z-enol ésteres empleando CAL-B¹²³

CAL-B (2 mg) y 5% v.v⁻¹ DMSO (50 μ L) fueron añadidos a un tubo Eppendorf conteniendo el enoléster (25 mM) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,5 (450 μ L). La reacción fue agitada a 30°C y a 250 rpm por 24 horas. Luego, la mezcla fue extraída con AcOEt (2 x 500 μ L), las fases orgánicas fueron separadas por centrifugación (1 min, 13000 rpm), combinadas y finalmente secadas con Na₂SO₄. Las conversiones en los correspondientes β -cetosulfuros fueron determinados por CG-FID.

Procedimiento general para la cascada bienzimática sobre Z-enol ésteres con hidrolasas y ADHs sobreexpresadas.

A una solución del Z-enol éster correspondiente (20 mM) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 1 mM NAD(P)H (570 μ L) e *i*-PrOH (30 μ L), se le agregó el preparado enzimático rico en ADHs y la hidrolasa correspondiente, en un tubo Eppendorf de 1,5 mL. La reacción se mantuvo con agitación orbital a 250 rpm y 30°C por 24 h. Luego, se extrajo con AcOEt (3 x 1 mL) y H₂O (3 x 1 mL). Las fracciones orgánicas se combinaron y se secó con Na₂SO₄ anhidro.

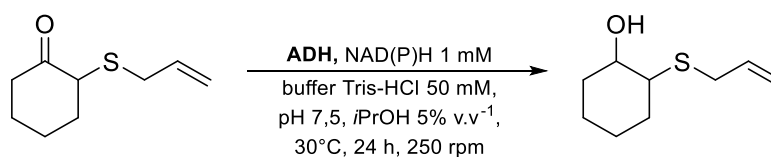
Procedimiento general para la bio-reducción de β -cetosulfuros con E. coli/ADH-A, ADH-T o TesADH⁸²

A una solución del β -cetosulfuro correspondiente (20 mM) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 1 mM NADH (570 μ L) e *i*-PrOH (30 μ L), se le agregó 20 mg del preparado enzimático correspondiente, en un tubo Eppendorf de 1,5 mL. La reacción se mantuvo con agitación orbital a 250 rpm y 30°C por 24 h. Luego, se extrajo con AcOEt (3 x 1 mL) y H₂O (3 x 1 mL). Las fracciones orgánicas se combinaron y se secó con Na₂SO₄ anhidro. Con el fin de analizar la estereoquímica del proceso por CG, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL se agregó 3 mg de DMAP y 50 μ L del agente acilante correspondiente (anhídrido trifluoroacético o propiónico). Cuando se observó la completa disolución de la DMAP, se agregaron 300 μ L de la fase orgánica en AcOEt y se dejó en agitación orbital por 1 hora. Luego, se agregaron 350 μ L de agua y se dejó en agitación

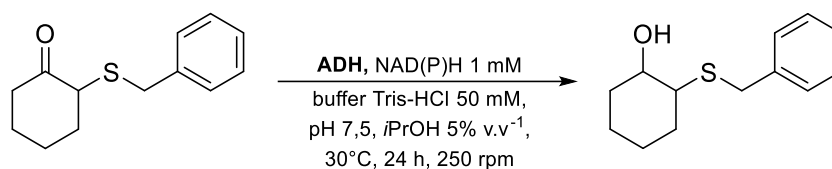
nuevamente por 2 horas adicionales. Al terminar la reacción, se extrajo con AcOEt (3 veces), se lavó con agua (3 veces), se secó con sulfato de sodio y se evaporó a sequedad, donde se obtuvo el β -hidroxisulfuro acilado correspondiente.

*Procedimiento general para la bioreducción de β -cetosulfuros con E. coli/SyADH, RasADH o LBADH*⁸²

A una solución de la β -cetosulfuro correspondiente (20 mM) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 1 mM NADPH (570 μ L) e *i*-PrOH (30 μ L), se le agregó 20 mg del preparado enzimático correspondiente, en un tubo Eppendorf de 1,5 mL. La reacción se dejó en agitación orbital a 250 rpm y 30°C por 24 h. Luego, se extrajo con AcOEt (3 x 2 mL) y H₂O (3 x 2 mL). Las fracciones orgánicas se combinaron y se secó con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido fue analizado por CG. Con el fin de analizar la estereoquímica del proceso por CG, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL se agregó 3 mg de DMAP y 50 μ L del agente acilante correspondiente (anhídrido acético, trifluoroacético o propiónico). Cuando se observó la completa disolución de la DMAP, se agregaron 300 μ L de la fase orgánica en AcOEt y se dejó en agitación orbital por 1 hora. Luego, se agregaron 350 μ L de agua y se dejó en agitación nuevamente por 2 horas adicionales. Al terminar la reacción, se extrajo con una AcOEt (3 veces), se lavó con agua (3 veces), se secó con sulfato de sodio y se evaporó a sequedad, donde se obtuvo el β -hidroxisulfuro acilado correspondiente.

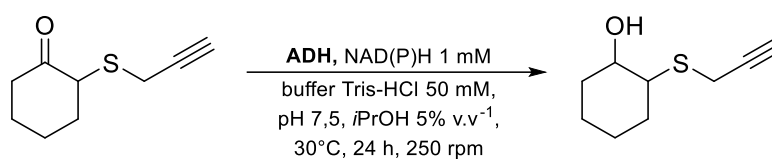


Entrada	Enzima	Conv (%)	<i>ee</i> _{cis} (%)	<i>ee</i> _{trans} (%)	<i>dr</i> _{cis trans} (%)
1	ADH-A	97	>99(<i>R, S</i>)	-	>99:1
2	ADH-T	>99	>99(<i>R, S</i>)	86 (<i>R, R</i>)	87:13
3	TesADH	90	>99(<i>R, S</i>)	80 (<i>R, R</i>)	68:32
4	SyADH	>99	>99(<i>R, S</i>)	84 (<i>R, R</i>)	54:46
5	RasADH	>99	34 (<i>R, S</i>)	46 (<i>R, R</i>)	53:47
6	LBADH	75%	54 (<i>R, S</i>)	34 (<i>R, R</i>)	91:9

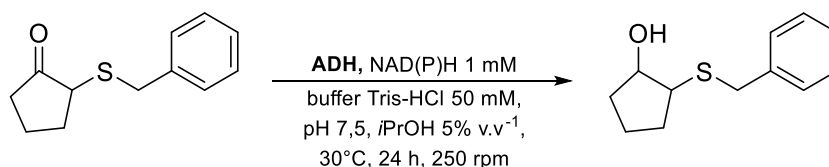


Entrada	Enzima	Conv (%)	<i>ee</i> _{cis} (%)	<i>ee</i> _{trans} (%)	<i>dr</i> _{cis trans} (%)
1	ADH-A	90	>99 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	55:45
2	ADH-T	>99	-	>99 (<i>R, R</i>)	<1:99
3	TesADH	92	>99 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	66:34
4	SyADH	>99	>91(<i>R, S</i>)	>66(<i>R, R</i>)	nd ^a
5	RasADH	>99	nd ^a	nd ^a	nd ^a
6	LBADH	8	-	-	nd ^a

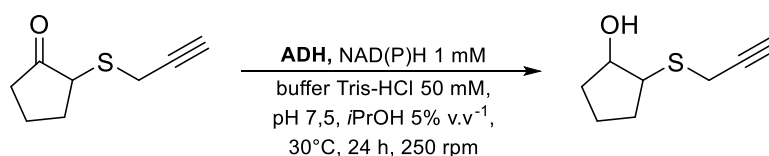
^{ha} Debido a la superposición de los picos correspondientes a un isómero *cis* y un isómero *trans*, no se pudo determinar el *ee* y/o el *dr*.



Entrada	Enzima	Conv (%)	<i>ee</i> _{cis} (%)	<i>ee</i> _{trans} (%)	<i>dr</i> _{cis trans} (%)
1	ADH-A	>99	>99 (<i>R, S</i>)	50 (<i>R, R</i>)	59:41
2	ADH-T	>99	97 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	72:28
3	TesADH	>99	>99 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	45:55
4	SyADH	>99	88 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	34:66
5	RasADH	>99	15 (<i>R, S</i>)	52 (<i>R, R</i>)	28:78
6	LBADH	>99	48 (<i>R, S</i>)	76 (<i>R, R</i>)	70:30



Entrada	Enzima	Conv (%)	<i>ee</i> _{cis} (%)	<i>ee</i> _{trans} (%)	<i>dr</i> _{cis trans} (%)
1	ADH-A	94	>99(<i>R, S</i>)	>99(<i>R, R</i>)	74:26
2	ADH-T	72	>99(<i>R, S</i>)	>99(<i>R, R</i>)	33:67
3	TesADH	98	>99(<i>R, S</i>)	>99(<i>R, R</i>)	10:90
4	SyADH	98	>99(<i>R, S</i>)	93 (<i>R, R</i>)	16:84
5	RasADH	93	17 (<i>R, S</i>)	32 (<i>R, R</i>)	12:88
6	LBADH	-	-	-	-



Entrada	Enzima	Conv (%)	<i>ee</i> _{cis} (%)	<i>ee</i> _{trans} (%)	<i>dr</i> _{cis trans} (%)
1	ADH-A	>99	>99(<i>R, S</i>)	>99(<i>R, R</i>)	98:2
2	ADH-T	>99	>99(<i>R, S</i>)	>99(<i>R, R</i>)	33:77
3	TesADH	>99	>99(<i>R, S</i>)	>99(<i>R, R</i>)	29:71
4	SyADH	>99	87 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	15:85
5	RasADH	>99	3 (<i>R, S</i>)	90 (<i>R, R</i>)	27:73
6	LBADH	10	32 (<i>R, S</i>)	43 (<i>S, S</i>)	71:29

Asignación de la configuración relativa y absoluta

Se realizaron sencillos cálculos del ángulo diedro formado entre el H unido al C1 con el H unido al C del otro estereocentro (C2) en *ChemBio3D Ultra* con inclusión de cálculos de minimización de energía con un campo de fuerza MM2 (Mecánica Molecular). Así, se determinó, teóricamente, el diedro *trans* (66.99°) y el *cis* (50.84°). Posteriormente, mediante la aplicación de la ecuación de Karplus (describe la correlación entre el ángulo diedro y la constante de acoplamiento ³J en 1H RMN) se determinaron los ³J teóricos (1.14 Hz para el *trans* y 2.39 Hz para el *cis*). Finalmente, del espectro de 1H RMN del alcohol aislado se obtuvo la ³J experimental (3J: 2.4 Hz) y, por comparación, se determinó la estereoquímica de C2, (*S*), correspondiente a una configuración *cis* entre los H en los que se midió el diedro.



cis($\phi = 50,84^\circ$)



trans($\phi = 66,99^\circ$)

Valores teóricos: $^3J_{H-H} = 2,39$ Hz.

$^3J_{H-H} = 1,14$ Hz.

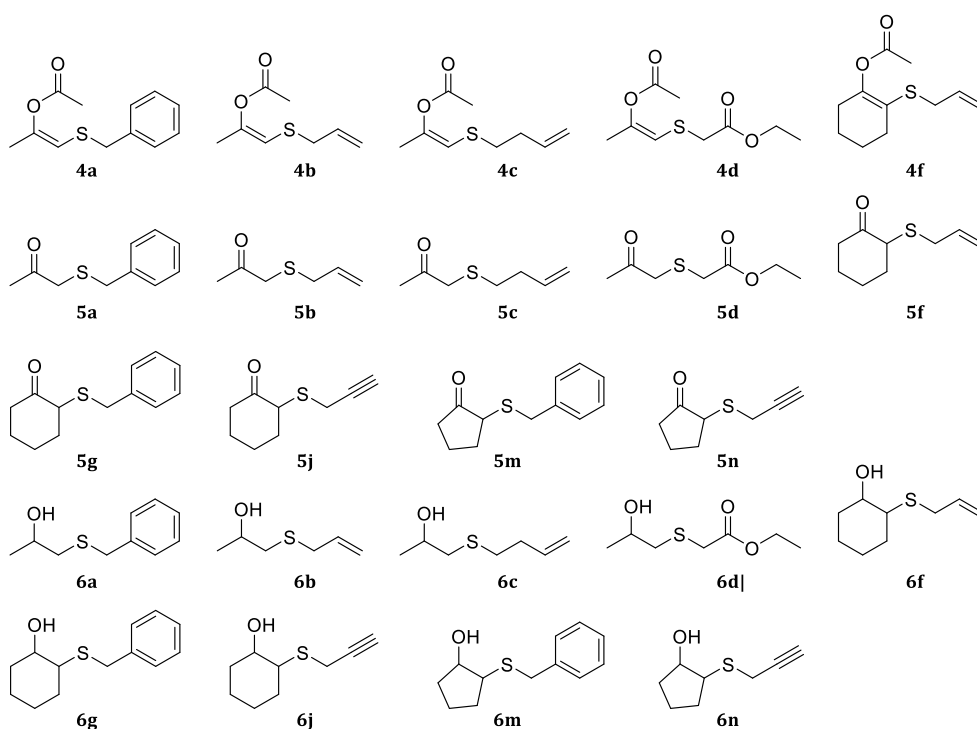
Valor experimental observado: $^3J_{H-H} = 2,4$ Hz.

Analítica

Tiempos de retención por Cromatografía Gaseosa

Los análisis por CG fueron llevados a cabo en un equipo Agilent 6890A GC-FID. Para la determinación de conversión, *ee* y *dr* se empleó la columna de fase estacionaria quiral ChiralsilDex CB (25 m x 0.25 mm x 0.25 μm , 12.2 psi N_2).

Separación analítica por CG para la medición en la conversión de la hidrólisis de *Z*-enolésteres y reducción de β -cetosulfuros.



Compuesto	Programa de temperatura ^a	Tiempo (min)
4a	105/0/0.5/113/0/30/170/4	-
4b	105/0/0.5/113/0/30/170/4	8.3
4c	105/0/0.5/113/0/30/170/4	14.0
4d	105/0/0.5/113/0/30/170/4	18.0
4f	105/0/0.5/113/0/30/170/4	-
4a	105/0/0.5/113/0/30/170/4	-
4b	105/0/0.5/113/0/30/170/4	4.7
4c	105/0/0.5/113/0/30/170/4	7.0

4d	105/0/0.5/113/0/30/170/4	17.3
4f	105/0/0.5/113/0/30/170/4	-

^a Temperatura inicial (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ temperatura final (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ temperatura final (°C)/ tiempo (min)

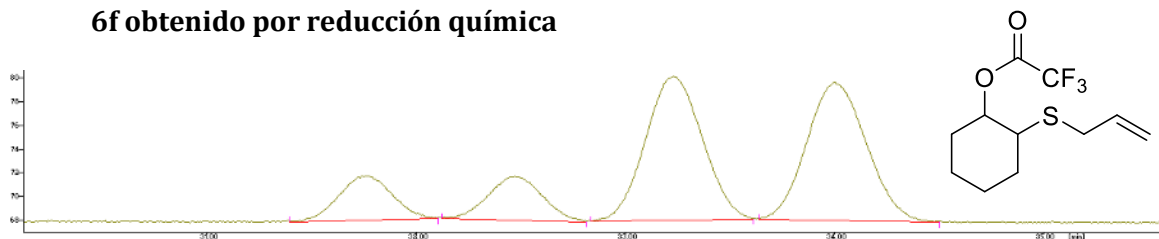
Separación analítica por CG para la medición de los ee y dr para la bio-reducción de β -cetosulfuros.

Compuesto	Programa de temperatura ^a	Tiempo (min)
4a	105/0/0.5/113/0/30/170/4	-
4b	105/0/0.5/113/0/30/170/4	4.7
4c	105/0/0.5/113/0/30/170/4	7.0
4d	105/0/0.5/113/0/30/170/4	17.3
4f	80/0/1/90/0.5/100/7/30/170/11	39, 39.1
4g	100/0/1/160/5/1/170/8	60.4, 60.7
4j	100/0/0.5/115/0/1/130/0/50/160/0/30/170/9	37.3
4m	110/0/1/155/20/30/170/5	43.5, 44
4n	100/0/0.5/115/0/1/130/0/50/160/0/30/170/9	32, 32.9
5a	105/0/0.5/113/0/30/170/4	-
5b	105/0/0.5/113/0/30/170/4	7.7, 8.6
5c	105/0/0.5/113/0/30/170/4	11.0, 11.3
5d	105/0/0.5/113/0/30/170/4	-

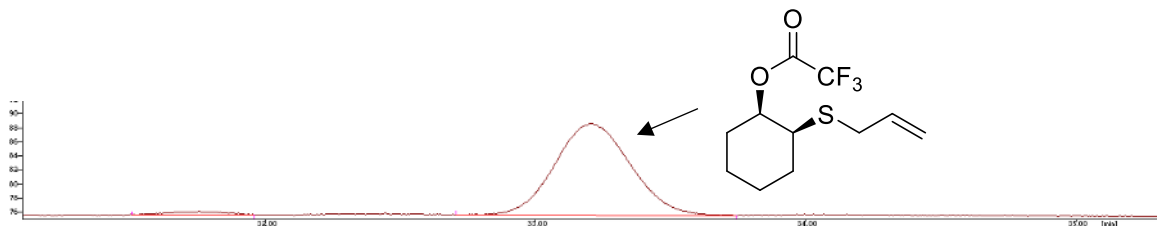
Compuesto	Agente derivatizante	Programa de temperatura ^a	<i>cis</i>	<i>trans</i>
5f	(CF ₃ CO) ₂ O	80/0/1/90/0.5/100/7/30/170/11	33.2 (R, S), 34.0 (S, R)	31.7 (R, R), 32.5 (S, S)
5g	(CH ₃ CH ₂ CO) ₂ O	100/0/1/160/5/1/170/8	74.2 (R, S), 74.9 (S, R)	73.5 (R, R), 74.9 (S, S)
5j	(CH ₃ CH ₂ CO) ₂ O	100/0/0.5/115/0/1/130/0/50/160/0/30/170/9	49.0 (R, S), 49.6 (S, R)	48.3 (R, R), 49.4 (S, S)
5m	(CH ₃ CH ₂ CO) ₂ O	110/0/1/155/20/30/170/5	57.7 (R, S), 60.3 (S, R)	55.8 (R, R), 56.5 (S, S)
5n	(CH ₃ CH ₂ CO) ₂ O	100/0/0.5/115/0/1/130/0/50/160/0/30/170/9	41.3 (R, S), 43.9 (S, R)	39.6 (R, R), 41.3 (S, S)

Cromatogramas de los β -hidroxisulfuros acilados ópticamente activos

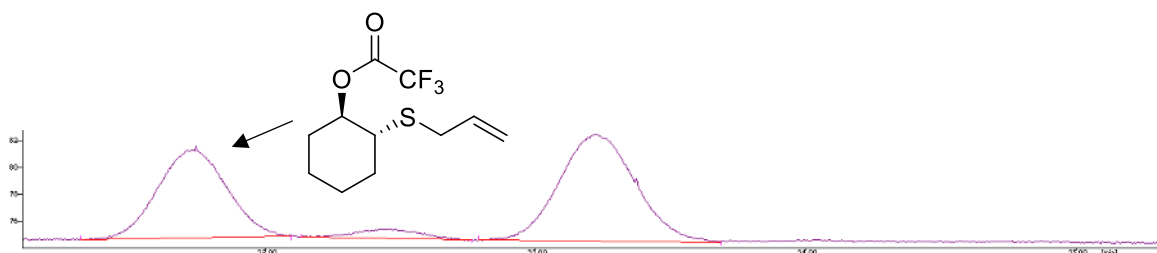
6f obtenido por reducción química



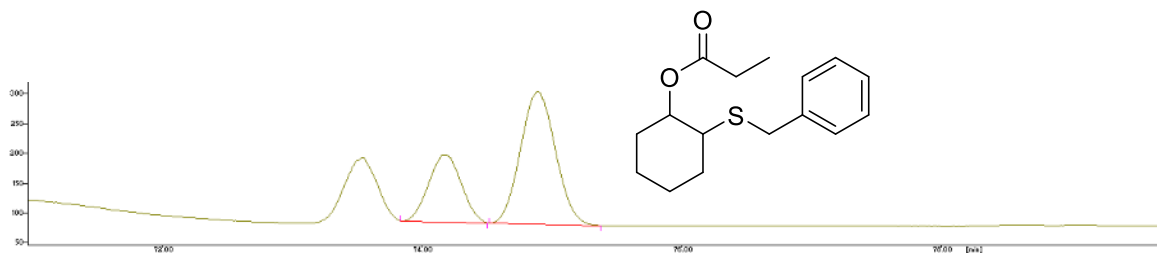
(1*R*, 2*S*)-6f obtenido por la bioreducción con ADH-A



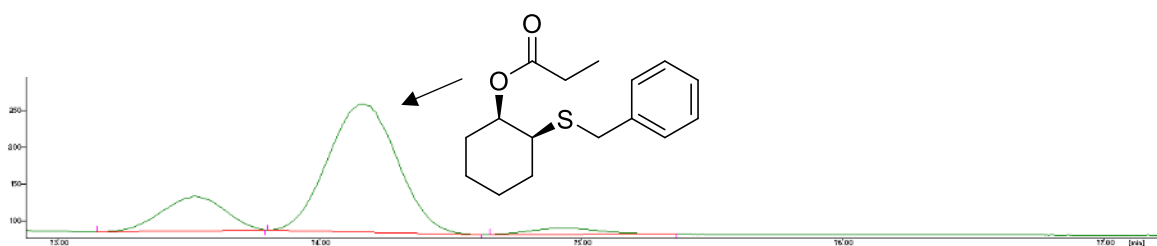
(1*R*, 2*R*)-6f obtenido por la bioreducción con SyADH



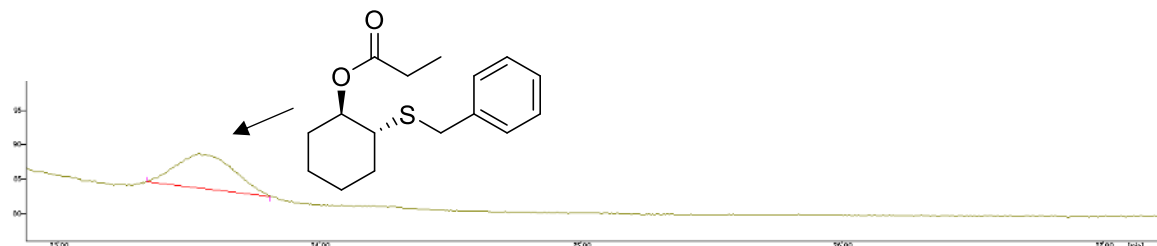
6g obtenido por reducción química



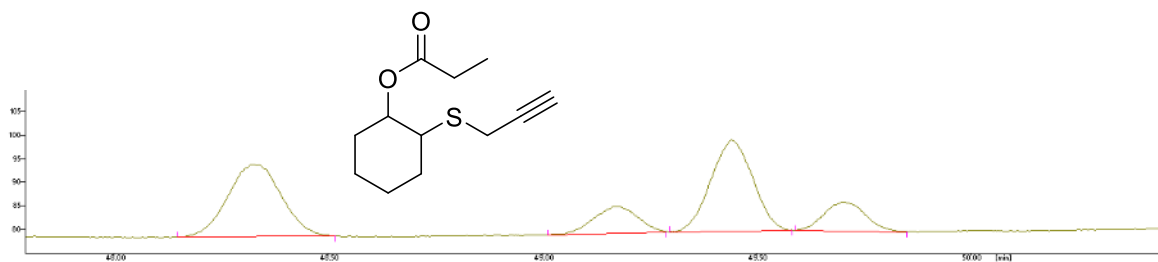
(1*R*, 2*S*)-6g obtenido por la bioreducción con SyADH



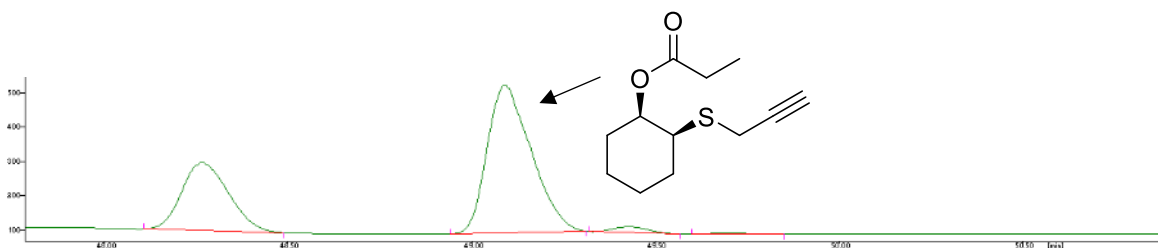
(1*R*, 2*R*)-6g obtenido por la bioreducción con ADH-T



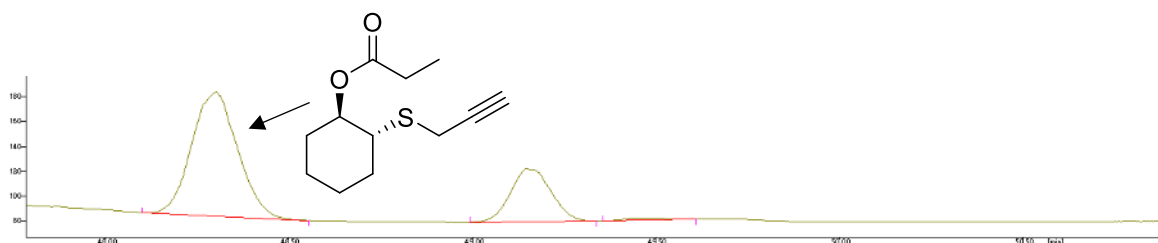
6j obtenido por reducción química



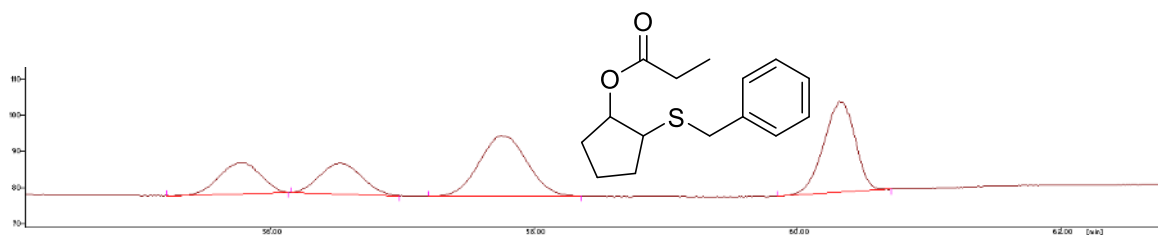
(1*R*, 2*S*)-6j obtenido por la bioreducción con SyADH



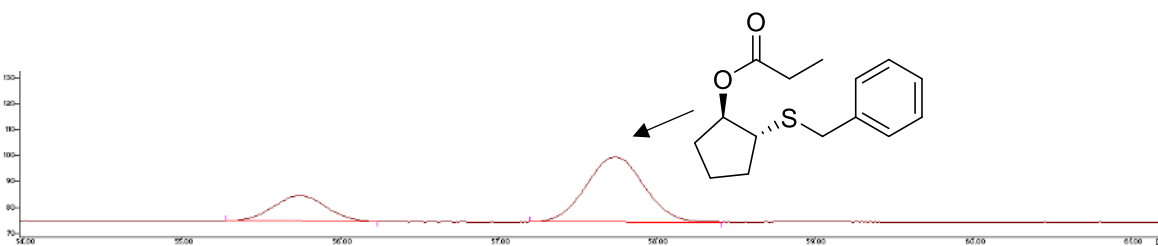
(1*R*, 2*R*)-6j obtenido por la bioreducción con ADH-T



6m obtenido por reducción química



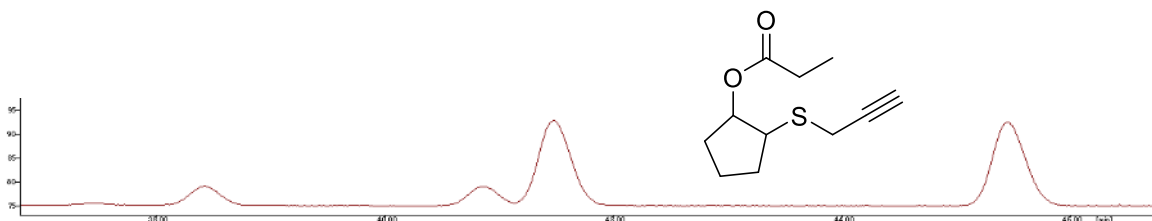
(1*R*, 2*S*)-6m obtenido por la bioreducción con ADH-A



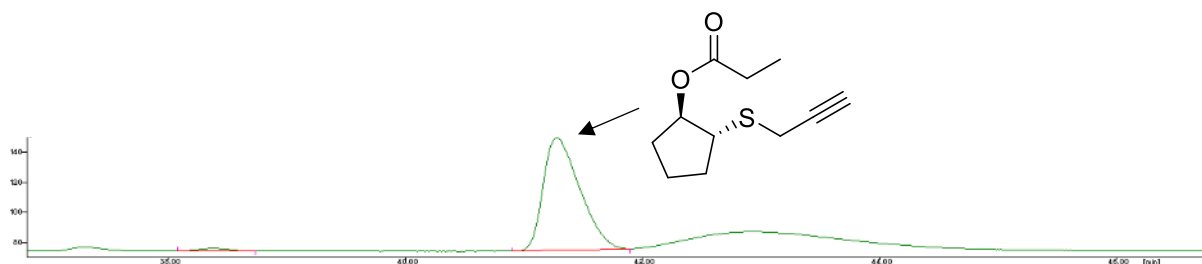
(1*R*, 2*R*)-6m obtenido por la bioreducción con TesADH



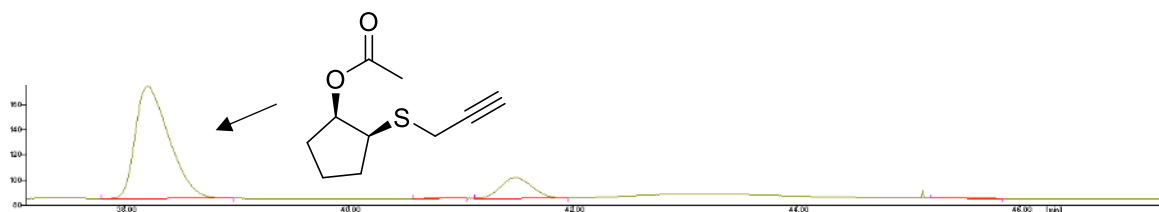
6n obtenido por reducción química



(1*R*, 2*S*)-6n obtenido por la bioreducción con ADH-A



(1*R*, 2*R*)-6n obtenido por la bioreducción con TesADH



CAPÍTULO 3

Cascada bienzimática para la síntesis asimétrica
de β -sulfanil aminas a partir de enol ésteres no
quirales

La preparación de aminas quirales enantioenriquecidos ha sido tradicionalmente lograda a partir de hidrogenaciones mediadas por metales, o por transferencia de hidrógeno sobre el correspondiente precursor imina o enamina.¹³³ Desde una perspectiva biocatalítica, las lipasas,¹³⁴ transaminasas,¹³⁵ y recientemente las monoamino oxidasas (MAO),¹³⁶ imino reductasas¹³⁷ y amino deshidrogenasas¹³⁸ son los catalizadores de elección cuando las aminas a sintetizar tienen como objetivo ser empleadas en pruebas biológicas o bien en la industria farmacéutica, para la cual la cantidad de metal remanente debe estar por debajo de un límite de seguridad dependiendo del metal en cuestión.¹³⁹

La mayoría de los sistemas empleados tradicionalmente involucran una resolución cinética (o por sus siglas en inglés, KR, por *Kinetic Resolution*) de una amina racémica accesible, tanto por una acilación (bio)catalítica o la precipitación de sales diastereoméricas.¹⁴⁰ Por supuesto, una resolución cinética tiene un rendimiento máximo del 50%, al menos que pueda ocurrir una interconversión dinámica entre ambos enantiómeros de la amina a una velocidad aceptable. Por otra parte, la resolución cinética dinámica (o por sus siglas en inglés, DKR, por *Dynamic Kinetic Resolution*), un proceso que combina la racemización del enantiómero remanente del sustrato junto con una resolución cinética, asegurando una alta selectividad y economía atómica, ha sido desarrollada con el fin de alcanzar conversiones cuantitativas (Esquema 3.1).¹⁴¹

¹³³ A. J. Minnaard, B. L. Feringa, L. Lefort, J. G. de Vries. *Acc. Chem. Res.*, **2007**, *40*, 1267–1277. b) S. Liu, J.-H. Xie, L.-X. Wang, Q.-L. Zhou. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 7506–7508. c) T. C. Nugent. *Chiral amine synthesis: Methods, Developments and Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, **2010**.

¹³⁴ E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor. *Chem. Rev.*, **2011**, *111*, 5, PR110-PR180. b) M.T. Reetz. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2002**, *6*, 145–150.

¹³⁵ a) D. Koszelewski, I. Lavandera, D. Clay, G. M. Guebitz, D. Rozzell, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 9337–9340. b) M. D. Patil, G. Grogan, A. Bommarius, H. Yun, *Catalysts*, **2018**, *8*, 254. c) A. Gomm, E. O'Reilly, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2018**, *43*, 106–112. d) P. Kelefiotis-Stratidakis, T. Tyrikos-Ergas, I. V. Pavlidis, *Org. Biomol. Chem.*, **2019**, *17*, 1634–1642.

¹³⁶ V. F. Batista, J. L. Galman, D. C. G. A. Pinto, A. M. S. Silva, N. J. Turner, *ACS Catal.*, **2018**, *8*, 11889–11907.

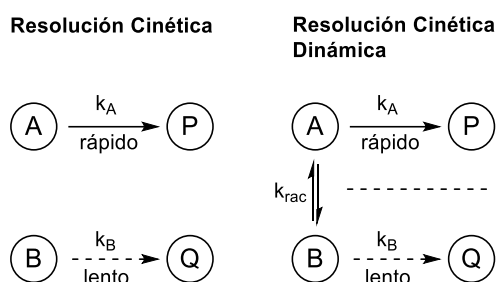
¹³⁷ J. Mangas-Sanchez, S. P. France, S. L. Montgomery, G. A. Aleku, H. Man, M. Sharma, J. I. Ramsden, G. Grogan, N. J. Turner, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2017**, *37*, 19–25. b) M. Höhne, *Nat. Catal.*, **2019**, *2*, 841–842.

¹³⁸ a) M.J. Abrahamson, E. Vazquez-Figueroa, N.B. Woodall, J.C. Moore, A.S. Bommarius, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 3969–3972. b) K.A. Samantha, R.B. Bettina, A. S. Bommarius, *ACS Catal.*, **2014**, *4*, 4021–4026. c) T. Knaus, W. Böhmer, F. G. Mutti, *Green Chem.* **2017**, *19*, 453–463.

¹³⁹ a) C. K. Savile, J. M. Janey, E. C. Mundorff, J. C. Moore, S. Tam, W. R. Jarvis, J. C. Colbeck, A. Krebber, F. J. Fleitz, J. Brands, P. N. Devine, G. W. Huisman, G. J. Hughes, *Science*, **2010**, *329*, 305–309. b) S. A. Kelly, S. Pohle, S. Wharry, S. Mix, C. C.R. Allen, T. S. Moody, B. F. Gilmore, *Chem. Rev.*, **2018**, *118*, 349–367.

¹⁴⁰ S. Arseniyadis, A. Valleix, A. Wagner, C. Mioskowski, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 3314–3317. b) F.O. Arp, G.C. Fu, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 14264–14265. c) B. Orsat, P.B. Alper, W. Moree, C-P. Mak, C-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 712–713. d) V. Gotor-Fernandez, R. Brieva, V. Gotor, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2006**, *40*, 111–120.

¹⁴¹ a) J. Paetzold, J. E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 17620–17621. b) M. M. Musa, F. Hollmann, F. G. Mutti, *Catal. Sci. Technol.*, **2019**, *9*, 5487–5503. c) A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor, *Curr. Green*



Esquema 3.1. Representación de la resolución cinética y la resolución cinética dinámica.

Usualmente, en estos protocolos la racemización de la amina se logra mediante el empleo de pasos concurrentes de oxidación/reducción mediados por metales.

Si la racemización del sustrato ocurre en un centro estereogénico y a su vez, el proceso enzimático sobre el centro proquiral (por ejemplo, la aminación reductiva de una cetona) está ocurriendo en otra posición de la molécula, una resolución cinética dinámica¹⁴² tendrá lugar y, en el mejor caso, uno de cuatro posibles isómeros será obtenido. En el caso de procesos mediados por transaminasas, diferentes protocolos dinámicos han sido descritos (Esquema 3.2). En la mayoría de los casos, estos procesos están basados en el uso de derivados carbonílicos racémicos que presentan una racemización espontánea en el medio de reacción debido a la acidez del protón α -carbonílico. Entonces, ésteres α -sustituidos o γ - o δ -aldo/ceto ésteres (Esquema 3.2.a),¹⁴³ β -ceto ésteres o amidas α -sustituidas (Esquema 3.2.b),¹⁴⁴ cetonas α -sustituidas (cíclicas) (Esquema 3.2.c)¹⁴⁵ o aldehídos (Esquema 3.2.d),¹⁴⁶ y una 4-piperidinona β -sustituida

Chem., **2015**, *2*, 192-211. d) O. Verho, J. E. Bäckvall, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137*, 3996-4009. e) Y.-W. Kim, J.-W. Park, M.-J. Kim, *Chem. Cat. Chem.*, **2011**, *3*, 271-277.

¹⁴² D. B. Berkowitz, *Adv. Synth. Catal.*, **2015**, *357*, 1619 – 1632.

¹⁴³ a) D. Koszelewski, D. Clay, K. Faber, W. Kroutil, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **2009**, *60*, 191–194. b) C. K. Chung, P. G. Bulger, B. Kosjek, K. M. Belyk, N. Rivera, M. E. Scott, G. R. Humphrey, J. Limanto, D. C. Bachert, K. M. Emerson, *Org. Process Res. Dev.*, **2014**, *18*, 215–227. c) N. Yasuda, E. Cleator, B. Kosjek, J. Yin, B. Xiang, F. Chen, S.-C. Kuo, K. Belyk, P. R. Mullens, A. Goodyear, J. S. Edwards, B. Bishop, S. Ceglia, J. Belardi, L. Tan, Z. J. Song, L. DiMichele, R. Reamer, F. L. Cabirol, W. L. Tang, G. Liu, *Org. Process Res. Dev.*, **2017**, *21*, 1851-1858. d) C. S. Fuchs, J. E. Farnberger, G. Steinkellner, J. H. Sattler, M. Pickl, R. C. Simon, F. Zepeck, K. Gruber, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.*, **2018**, *360*, 768-778.

¹⁴⁴ a) A. Cuetos, I. Lavandera, V. Gotor, *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 10688-10690. b) Á. Mourelle-Insua, D. Méndez-Sánchez, J. L. Galman, I. Slabu, N. J. Turner, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Catal. Sci. Technol.*, **2019**, *9*, 4083–4090.

¹⁴⁵ a) J. Limanto, E. R. Ashley, J. Yin, G. L. Beutner, B. T. Grau, A. M. Kassim, M. M. Kim, A. Klapars, Z. Liu, H. R. Strotman, M. D. Truppo, *Org. Lett.*, **2014**, *16*, 2716-2719. b) C. Molinaro, E. M. Phillips, B. Xiang, E. Milczek, M. Shevlin, J. Balsells, S. Ceglia, J. Chen, L. Chen, Q. Chen, Z. Fei, S. Hoerrner, J. Qi, M. de Lera Ruiz, L. Tan, B. Wan, J. Yin, *J. Org. Chem.*, **2019**, *84*, 8006-8018.

¹⁴⁶ a) C. S. Fuchs, M. Hollauf, M. Meissner, R. C. Simon, T. Besset, J. N. H. Reek, W. Riethorst, F. Zepeck, W. Kroutil, *Adv. Synth. Catal.*, **2014**, *356*, 2257-2265. b) S. Pedragosa-Moreau, A. Le Flohic, V. Thienpondt, F. Lefoulon, A.-M. Petit, N. Ríos-Lombardía, F. Morís, J. González-Sabín, *Adv. Synth. Catal.*, **2017**, *359*, 485-493.

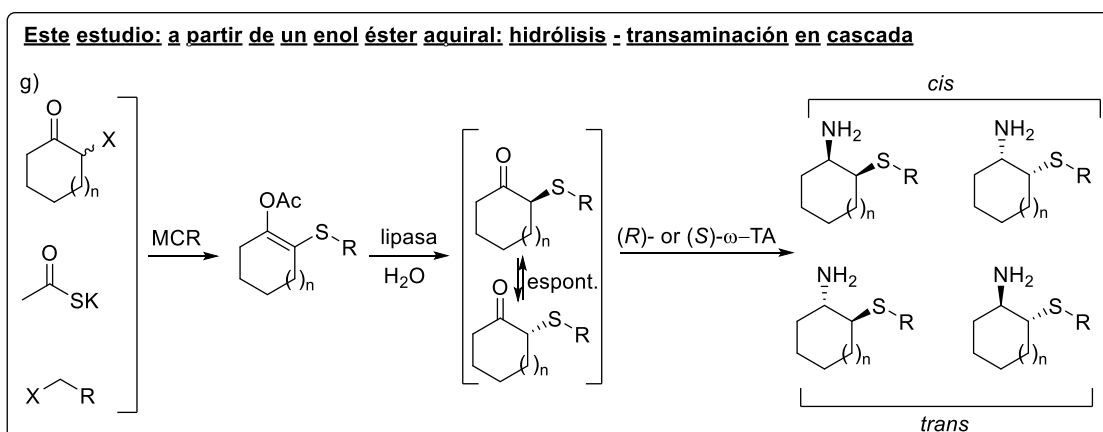
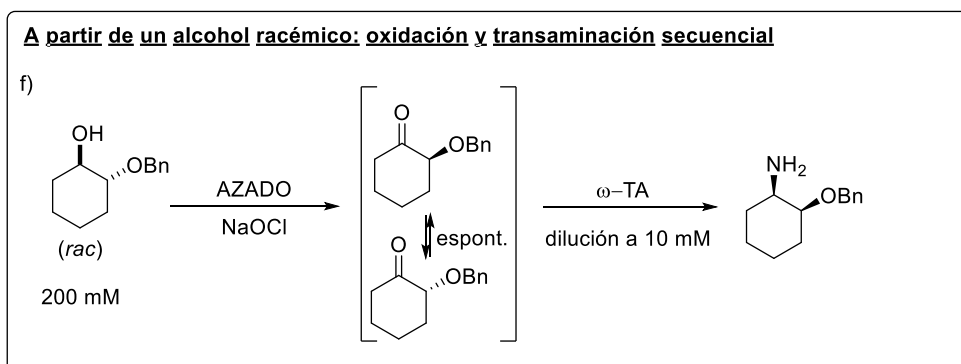
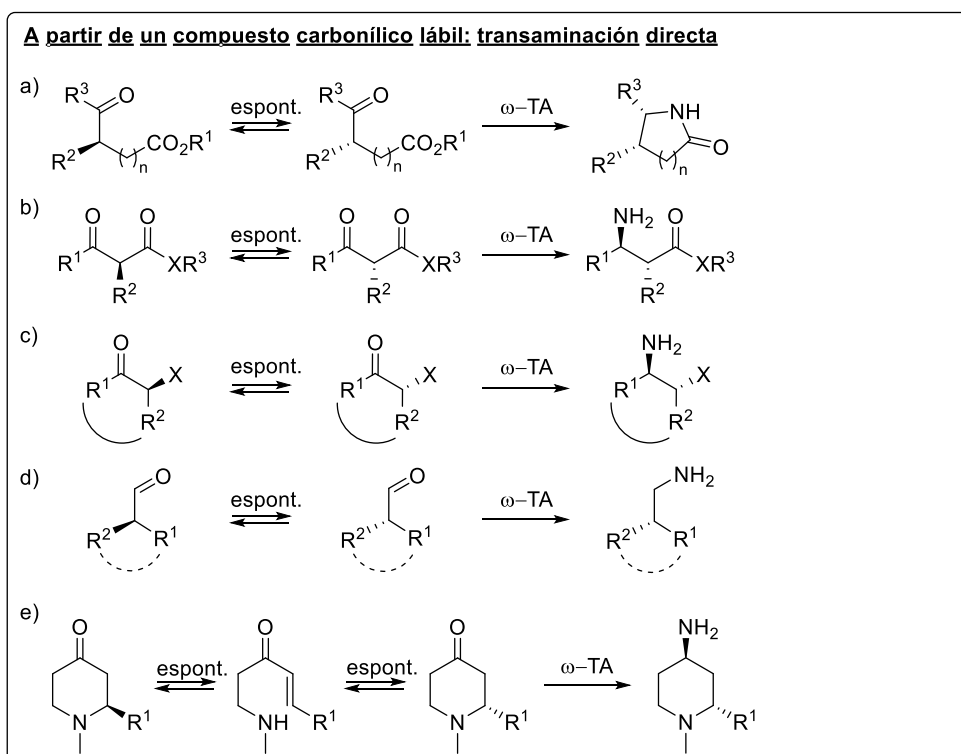
(Esquema 3.2.e)¹⁴⁷ han sido transformados en la lactama o amina enantioenriquecida correspondiente.

Por otra parte, la combinación de (bio)catalizadores para crear cascadas artificiales ha ganado interés debido a que dichos procesos presentan una disminución en pasos operacionales, solventes, desechos, tiempo y energía y, en consecuencia, una reducción de costos en comparación con la síntesis tradicional que se llevan a cabo paso a paso.¹⁴⁸ En esta línea, la combinación de enzimas redox, hidrolíticas o de transferencia de grupo han sido empleadas para la preparación eficiente de aminas quirales enantioenriquecidas mediante cascadas artificiales (Esquema 3.2).¹⁴⁹

¹⁴⁷ Z. Peng, J. W. Wong, E. C. Hansen, A. L. A. Puchlopek-Dermenci, H. J. Clarke, *Org. Lett.*, **2014**, *16*, 860-863.

¹⁴⁸ a) Cascade Biocatalysis: Integrating Stereoselective and Environmentally Friendly Reactions Ed. Sergio Riva Wolf-Dieter Fessner, **2014**, Wiley. b) E. Ricca, B. Brucher, J. H. Schrittwieser, *Adv. Synth. Catal.*, **2011**, *53*, 2239-2262. c) F. R. Bisogno, I. Lavandera, V. Gotor. *Biocatalytic Concurrent Processes*. 2011. d) J. H. Schrittwieser, S. Velikogne, M. Hall, W. Kroutil, *Chem. Rev.*, **2018**, *118*, 270-348. e) S. P. France, L. J. Hepworth, N. J. Turner, S. L. Flitsch, *ACS Catal.*, **2017**, *7*, 710-724.

¹⁴⁹ a) J. H. Sattler, M. Fuchs, K. Tauber, F. G. Mutti, K. Faber, J. Pfeffer, T. Haas, W. Kroutil, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 9156-9159. b) V. Köhler, Y. M. Wilson, M. Dürrenberger, D. Ghislieri, E. Churakova, T. Quinto, L. Knörr, D. Häussinger, F. Hollmann, N. J. Turner, T. R. Ward. *Nat. Chem.*, **2012**, *5*, 93-99. c) R. C. Simon, N. Richter, E. Busto, W. Kroutil, *ACS Catal.*, **2014**, *4*, 129-143.



Esquema 3.2: Estrategias de DKR para la síntesis de aminas quirales empleando ω -TAs: a partir de derivados carbonílicos racémicos lábiles (a-e), a partir de alcoholes racémicos y mediante un protocolo secuencial de oxidación quimioenzimática - transaminación (f), y el protocolo en cascada descrito en este capítulo (g).

Recientemente, Rebolledo y colaboradores,¹⁵⁰ han desarrollado un procedimiento *one-pot* en dos pasos mediante organocatálisis y biocatálisis para la preparación de aminas quirales enantioenriquecidas a partir de los correspondientes alcoholes racémicos (Esquema 3.2.f). De esta forma, empleando una oxidación no selectiva del alcohol catalizada por AZADO, seguido por una aminación reductiva formal catalizada por una ω -TA sobre el intermediario ceto, pudo obtenerse altas conversiones y selectividades del producto deseado. En este trabajo, los autores fueron capaces de establecer una DKR para α -benciloxiciclopentanona y α -benciloxiciclohexanona empleando la metodología descrita, que permitió la preparación selectiva de 1,2-amino alcoholes cíclicos *O*-protegidos con una gran enantio- y diastereoselectividad.

Al día de hoy, la mayoría de los procedimientos disponibles para la síntesis asimétrica de β -sulfanil aminas importantes (también llamadas 2-amino tioéteres, β -amino sulfuros, o 1,2-mercaptoaminas) depende de la apertura de aziridinas por nucleófilos azufrados, debido a que la apertura de tiiranos por nucleófilos centrados en nitrógeno generalmente lleva a eventos de polimerización.¹⁵¹ Las desventajas de las metodologías empleadas actualmente son la necesidad del empleo de materiales de partida enantioenriquecidos, la relativa inestabilidad de tioles que deben ser usados generalmente en altos excesos molares, aziridinas y, más importante, la pobre regioselectividad en aziridinas 1,2-disustituidas, que lleva a tediosos pasos de separación y purificación.¹⁵² Como resultado, la desimetrización de *meso*-aziridinas proquirales ha sido desarrollada con tioles en presencia de organocatalizadores como quinina,¹⁵³ ácido fosfórico quiral¹⁵⁴ y derivados de sales de fosfonio,¹⁵⁵ α,α -diaril-L-prolinoles,¹⁵⁶ o guanidinas quirales.¹⁵⁷ En este contexto, han sido publicadas algunas estrategias elegantes que involucran la α -alquilación estereoselectiva de hidrazonas α -sulfaniladas enantiopuras,¹⁵⁸ reacciones de Mannich asimétricas organocatalizadas,¹⁵⁹ RMC entre diazocompuestos, aldiminas o tioles

¹⁵⁰ E. Liardo, N. Ríos-Lombardía, F. Morís, F. Rebolledo, J. Gonzalez-Sabín, *ACS Catal.*, **2017**, *7*, 4768-4774.

¹⁵¹ W. Chew, D. N. Harpp, *Sulfur Reports*, **1993**, *15*, 1-39.

¹⁵² a) J. Luginina, M. Turks, *Synlett*, **2017**, *28*, 939-943. b) R. Chawla, A. K. Singh, L. D. S. Yadav, *Tetrahedron*, **2013**, *69*, 1720-1724. c) D. Sureshkumar, S. Murthy Koutha, S. Chandrasekaran, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 12760-12761. d) A. Alcaide, A. Llebaria, *TetrahedronLett.*, **2012**, *53*, 2137-2139. e) A. Alcaide, A. Llebaria, *J. Org. Chem.*, **2014**, *79*, 2993-3029.

¹⁵³ Z. Wang, X. Sun, S. Ye, W. Wang, B. Wang, J. Wu, *Tetrahedron: Asymm.*, **2008**, *19*, 964-969.

¹⁵⁴ a) G. Della Sala, A. Lattanzi, *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 3330-3333; b) S. E. Larson, J. C. Baso, G. Li, J. C. Antilla, *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 5186-5189.

¹⁵⁵ J. Zhang, D. Cao, H. Wang, G. Zhao, Y. Shang, *Tetrahedron*, **2015**, *71*, 1785-1791

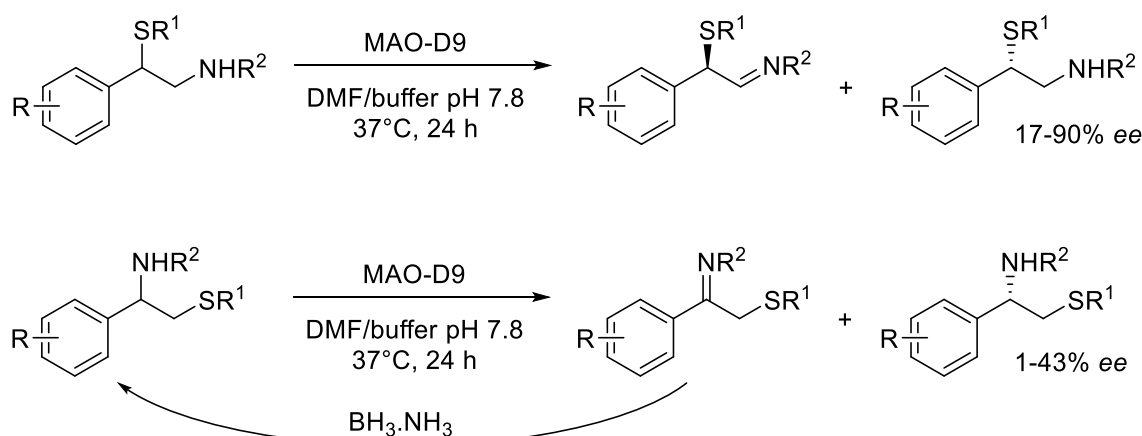
¹⁵⁶ A. Lattanzi, G. Della Sala, *Eur. J. Org. Chem.*, **2009**, 1845-1848.

¹⁵⁷ Y. Zhang, C. Wee Kee, R. Lee, X. Fu, J. Y.-T. Soh, E. M. F. Loh, K.-W. Huang, C.-H. Tan, *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 3897-3899.

¹⁵⁸ D. Enders, A. Moll, A. Schaadt, G. Raabe, J. Runsink, *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 3923-3938.

¹⁵⁹ T. Kano, R. Sakamoto, K. Maruoka, *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 942-944.

catalizadas por Rh(II)/ácido fosfórico quiral o la adición estereocontrolada de carbaniones quirales a aldminas N-protegidas, entre otras.¹⁶⁰ Con algunas excepciones,¹⁶¹ la fuente de nitrógeno está protegida, *e.g.* derivados *N*-acilo o *N*-tosilo, por lo que son necesarias reacciones subsiguientes de desprotección con el fin de obtener β-sulfanil aminas libres. Como inconvenientes adicionales, las reacciones generalmente requieren temperaturas muy altas o muy bajas, solventes halogenados tóxicos y reactivos dañinos como aziridinas, que en algunos casos puede ir en detrimento de los tiempos de reacción, conversiones y selectividad del proceso. Además, la mayoría de estas aproximaciones sintéticas llevan a la obtención exclusiva de diastereoisómeros *anti/trans*. Entonces, una aproximación sintética que tenga lugar en medios acuosos bajo condiciones suaves de reacción y cuya estereoquímica sea fácilmente ajustable resulta altamente atractiva. Recientemente, se ha publicado un estudio relacionado a la síntesis enzimática de aril β-sulfanil aminas enantioenriquecidas basada en un proceso de resolución cinética, usando una variante de una MAO de *Aspergillus niger* (MAO-N D9), o una deracemización cíclica combinando esta enzima con un agente reductor no selectivo (complejo borano-amoniaco).¹⁶² Desafortunadamente, los rendimientos aislados y la enantio pureza de los productos finales fueron moderados (Esquema 3.3).



Esquema 3.3. Síntesis enzimática de aril β-sulfanil aminas enantioenriquecidas.

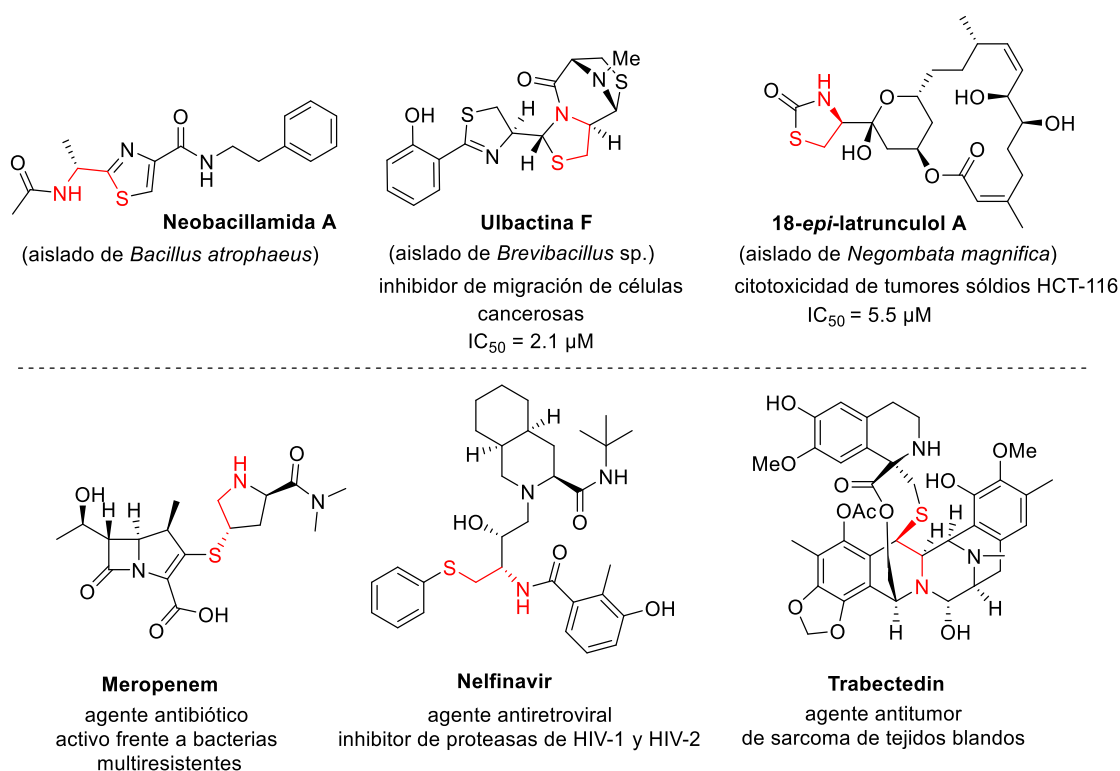
Las β-sulfanil aminas quirales son compuestos destacados que juegan un papel importante como ligandos quirales bidentados en catálisis asimétrica, y pueden encontrarse en

¹⁶⁰ a) Y. Arroyo, A. Meana, J. F. Rodríguez, M. Santos, M. A. Sanz-Tejedor, J. L. García Ruano, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 3914-3920. b) Y. Arroyo, A. Meana, M. A. Sanz-Tejedor, I. Alonso, J. L. García Ruano, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 764-772. c) Y. Arroyo, M. A. Sanz-Tejedor, I. Alonso, J. L. García-Ruano, *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 4534-4537.

¹⁶¹D. Tanini, C. Borgogni, A. Capperucci, *New J. Chem.*, **2019**, *43*, 6388-6393.

¹⁶² K. Lauder, D. Masci, A. Toscani, A. Al Mekdad, G. W. Black, N. L. Brown, N. J. Turner, R. Luisi, D. Castagnolo, *Org. Biomol. Chem.*, **2019**, *17*, 8982-8986.

productos naturales con potentes bioactividades, como son la ulbactina F, un potente inhibidor de migración de células cancerosas (IC_{50} 2.1 μ M) aislado de una bacteria derivada de esponja *Brevibacillus* sp.;¹⁶³ 18-*epi*-latrunculol A, un macrólido citotóxico selectivo para tumores (IC_{50} 5.5 μ M contra células HCT-116) aislado de la esponja marina *Negombata magnifica*,¹⁶⁴ y un alcaloide conteniendo un tiazol Neobacillamide A, aislado de una bacteria derivada de esponja *Bacillus atrophaeus*.¹⁶⁵ Además, productos farmacéuticos disponibles en el mercado que contienen β -sulfanil aminas han tenido un profundo impacto en la salud humana. Por nombrar algunos ejemplos, Meropenem es un antibiótico de amplio espectro comúnmente usado en neumonías intrahospitalarias entre otras enfermedades críticas.¹⁶⁶ Nelfinavir es un potente agente antiviral adecuado para el tratamiento de infecciones por HIV-1 and HIV-2.¹⁶⁷ Además, Trabectedin es un alcaloide (aislado de la ascidia marina *Ecteinascidia turbinata*) que es comercializado para ser utilizado en sarcoma avanzado de tejido blando y cáncer de ovario (Esquema 3.4).¹⁶⁸



Esquema 3.4. β -Sulfanil aminas quirales en productos naturales y sintéticos de interés farmacológico.

¹⁶³ Y. Igarashi, D. Asano, M. Sawamura, Y. In, T. Ishida, M. Imoto, *Org. Lett.*, **2016**, *18*, 1658-1661.

¹⁶⁴ T. Amagata, T. A. Johnson, R. H. Cichewicz, K. Tenney, S. L. Mooberry, J. Media, M. Edelstein, F. A. Valeriote, P. Crews, *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 7234-7242.

¹⁶⁵ a) L-L. Yu, Z-Y. Li, C-S. Peng, Z-Y. Li, Y-W. Guo, *Helv. Chim. Acta*, **2009**, *92*, 607-612. b) F. Liu, W. Sun, F. Su, K. Zhou, Z. Li, *J. Bacteriol*, **2012**, *194*, 4454.

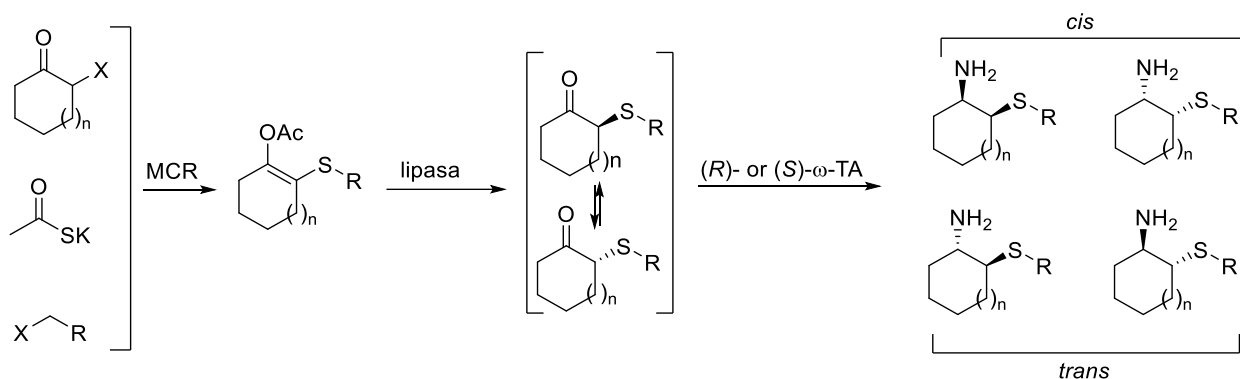
¹⁶⁶ C.M Baldwin, K. A. Lyseng-Williamson, S. J. Keam. *Drugs*, **2008**, *68*, 803-838.

¹⁶⁷ B. Jarvis, D. Faulds, *Drugs*, **1998**, *56*, 147-167.

¹⁶⁸ M. D'Incalci, C. M. Galmarini, *Mol. Cancer Ther.*, **2010**, *9*, 2157-2163.

Objetivos particulares

Considerando nuestro trabajo previo en reacciones multicomponentes (RMCs) involucrando compuestos azufrados y su combinación con enzimas hidrolíticas,¹²³ se ideó la combinación de la RMC y una cascada bienzimática para la síntesis de β -sulfanil aminas. Así, se genera un enol éster cíclico proquiral conteniendo un resto alquil sulfuro (producto de la RMC), que puede ser involucrado en una cascada bienzimática para dar un acceso directo a *cis* o *trans* 1,2-mercapto aminas diastereo- y enantioenriquecidas. La hipótesis detrás de este diseño es disparar la cascada con una lipasa, generando una α -mercapto cetona quiral, que puede sufrir una DKR mediante la acción selectiva de una ω -TA, logrando la *vic*-sulfanil amina deseada. En general, mediante esta transformación formal en tándem de acetilación-hidroaminación, podrían establecerse dos centros estereogénicos adyacentes a partir de una molécula inicial aquiral. (Esquema 3.5).

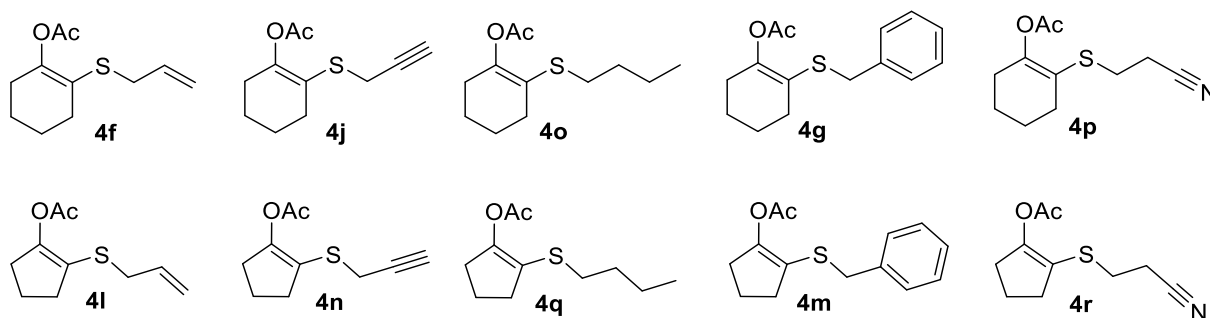


Esquema 3.5. Combinación de la reacción multicomponente con hidrólisis enzimática y transaminación

En base a lo planteado anteriormente, se establecieron los siguientes objetivos:

- Desarrollar un método enzimático en cascada para la síntesis asimétrica de 1,2-mercapto aminas mediante una DKR.
- Compatibilizar condiciones para que una hidrolasa y una transaminasa puedan llevar a cabo un proceso en cascada, evitando inhibiciones y reactividades cruzadas.
- Estudiar el potencial de la metodología para el control de la enantio- y diastereoselectividad de los productos obtenidos.
- Explorar los alcances y limitaciones respecto a los grupos funcionales compatibles.

Inicialmente, una familia de β -tioalquienol acetatos cíclicos de cinco y seis miembros (**4**, Esquema 3.6) fueron sintetizados de acuerdo a la metodología RMC previamente descrita.¹⁰¹ Gracias a la versatilidad de la metodología, fue posible instalar una variedad de sustituyentes de diversa índole, tanto electrónica como estérica, sobre el átomo de azufre, a saber: cadenas lineales alquílicas, sistemas alílicos, propargílicos, nitrilos y grupos bencilo.



Esquema 3.6: Sustratos enol acetatos utilizados en la cascada bienzimática

Como la hidrólisis enzimática de β -tioalquienol ésteres lineales puede ser fácilmente realizada utilizando la lipasa B de *Candida antarctica* (CAL-B) o la lipasa de páncreas porcino (PPL). Para generar las correspondientes α -mercapto cetonas, se estudió la hidrólisis por CAL-B de los sustratos **4** a escala pequeña (2 mg sustrato, 2 mg CAL-B en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 30 °C). Como resultado, a las 16 horas, todos los sustratos fueron hidrolizados completamente a las correspondientes cetonas.

Después de realizadas las reacciones a escala pequeña, se llevó a cabo la síntesis a escala de gramos de las correspondientes cetonas. La RMC a partir de una α -halocetona, seguida de la hidrólisis en “one-pot” catalizada por CAL-B del enoléster formado (no aislado) fue realizada usando 1 g del catalizador el cual fue eficientemente reutilizado (hasta 5 veces) después de una filtración cuidadosa y lavados con AcOEt y buffer. Dicha reacción permitió la obtención del intermediario cetona en 50-66% de rendimiento aislado general (dos etapas RMC-hidrólisis).

Posteriormente, se estudió si estas cetonas conteniendo un grupo tioéter en posición α podrían racemizar en condiciones de pH cercanas a la neutralidad (pH 7.5) a una velocidad compatible con la aminación reductiva formal catalizada por ω -TA. Aquí cabe mencionar que hasta al momento, ha sido reportado que grupos tomadores de electrones como sulfóxidos o sulfonas son necesarios para una velocidad de racemización adecuada.¹⁶⁹ Debido a esto, se evaluó la reacción de transaminación con un grupo de ω -TAs comercialmente disponibles las

¹⁶⁹ G. A. Applegate, D. B. Berkowitz, *Adv. Synth. Catal.*, **2015**, 357, 1619 – 1632.

cuales poseen diferente enantioselectividad sobre las correspondientes cetona y seguidamente se comparó con la cascada involucrando lipasas y ω -TAs. Considerando que luego de la hidrólisis del enoléster, la protonación del enolato ocurre dentro del sitio activo de la lipasa y, por lo tanto, la α -mercapto cetona tendrá un exceso enantiomérico distinto de cero. Resulta interesante determinar si existe diferencia estereoquímica, por un lado, cuando la ω -TA se encuentra a una gran concentración de cetona (escenario 1); y por otro (escenario 2) cuando la cetona no se acumula en el medio ya que tan pronto como es formada por la lipasa, es consumida por la ω -TA. Una posibilidad sería que la racemización sea tan rápida que la ω -TA se encontraría con una relación 1:1 de los enantiómeros, entonces, en dicho caso, se esperaría una diastereoselectividad muy similar en ambos procesos.

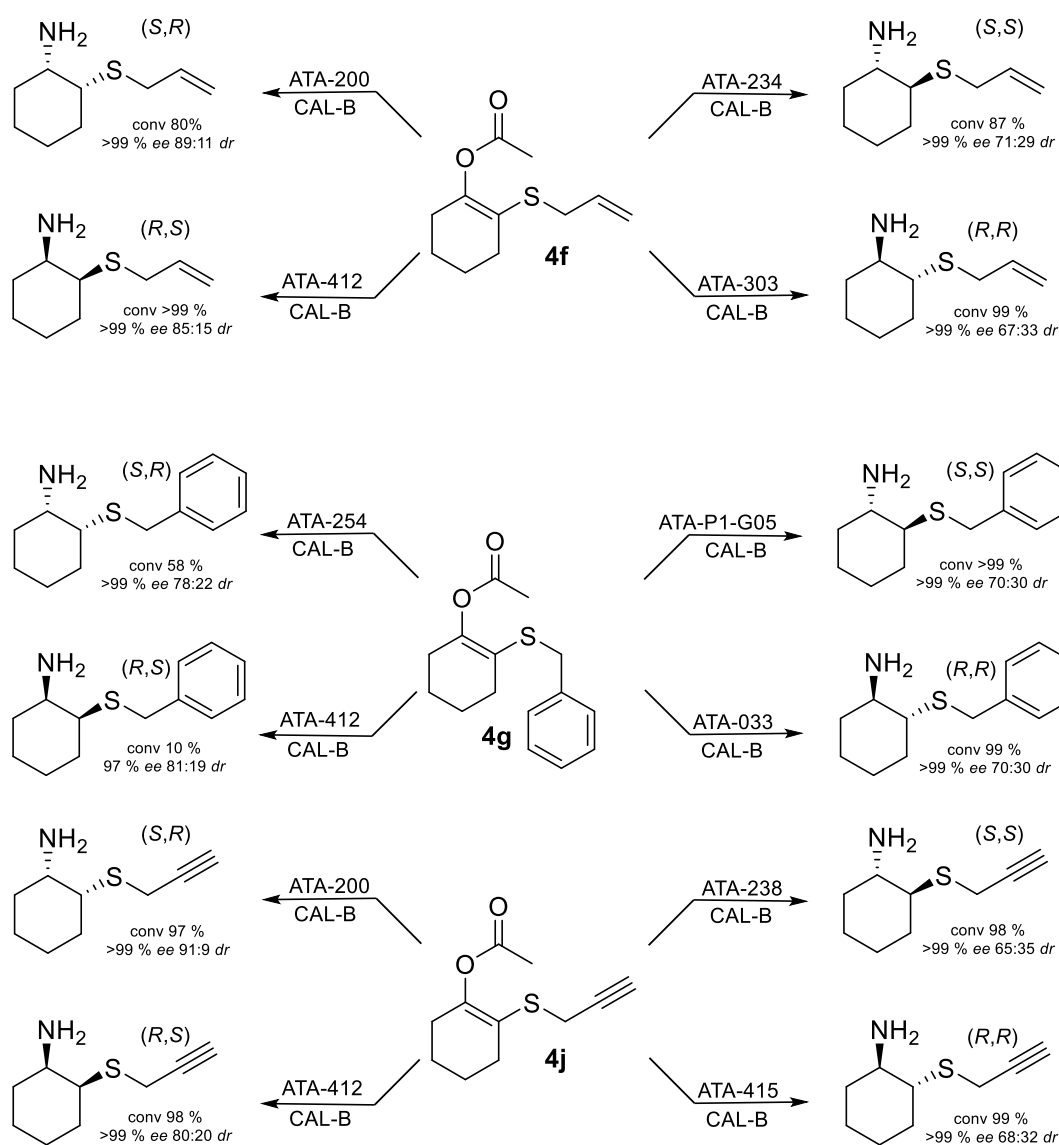
Tabla 3.1. Comparación entre protocolo en etapas vs. cascada para la preparación de amino sulfuros quirales.

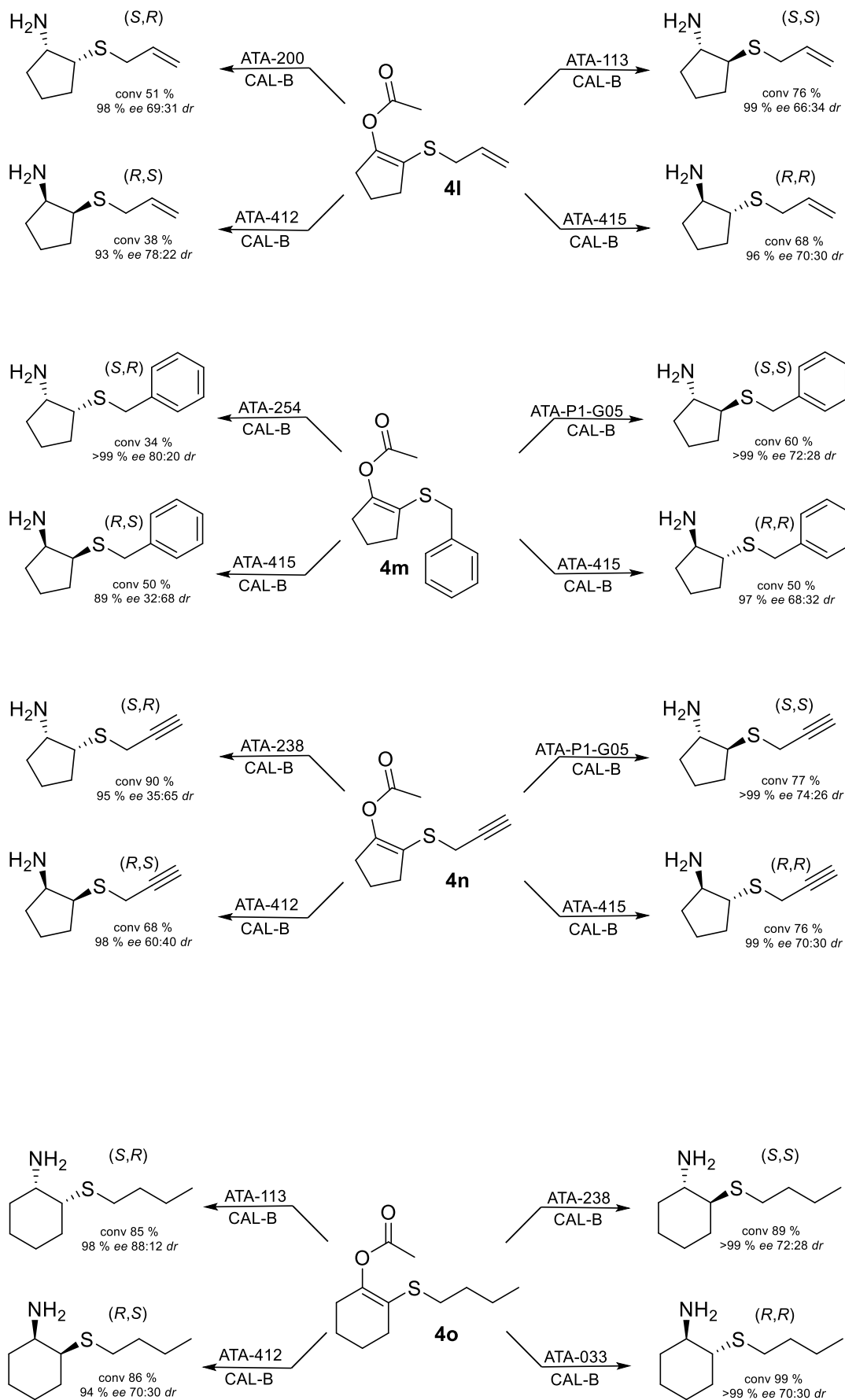
modo \ sust	4f		4j		4g		4n		4q	
	ATA-200	ATA-412	ATA-254	ATA-P1-G05	ATA-P1-G05	ATA-P1-G05	ATA-P1-G05	ATA-P1-G05	ATA-P1-G05	ATA-P1-G05
en etapas	conv.	80 %	98 %	58 %	77 %	66 %				
	ee	>99 %	>99 %	>99 %	>99 %	>99 %				
	dr	89:11	80:20	78:22	74:26	71:29				
cascada	conv.	88 %	85 %	78 %	72 %	66 %				
	ee	>99 %	>99 %	>99 %	>99 %	>99 %				
	dr	92:8	87:13	86:14	74:26	71:29				

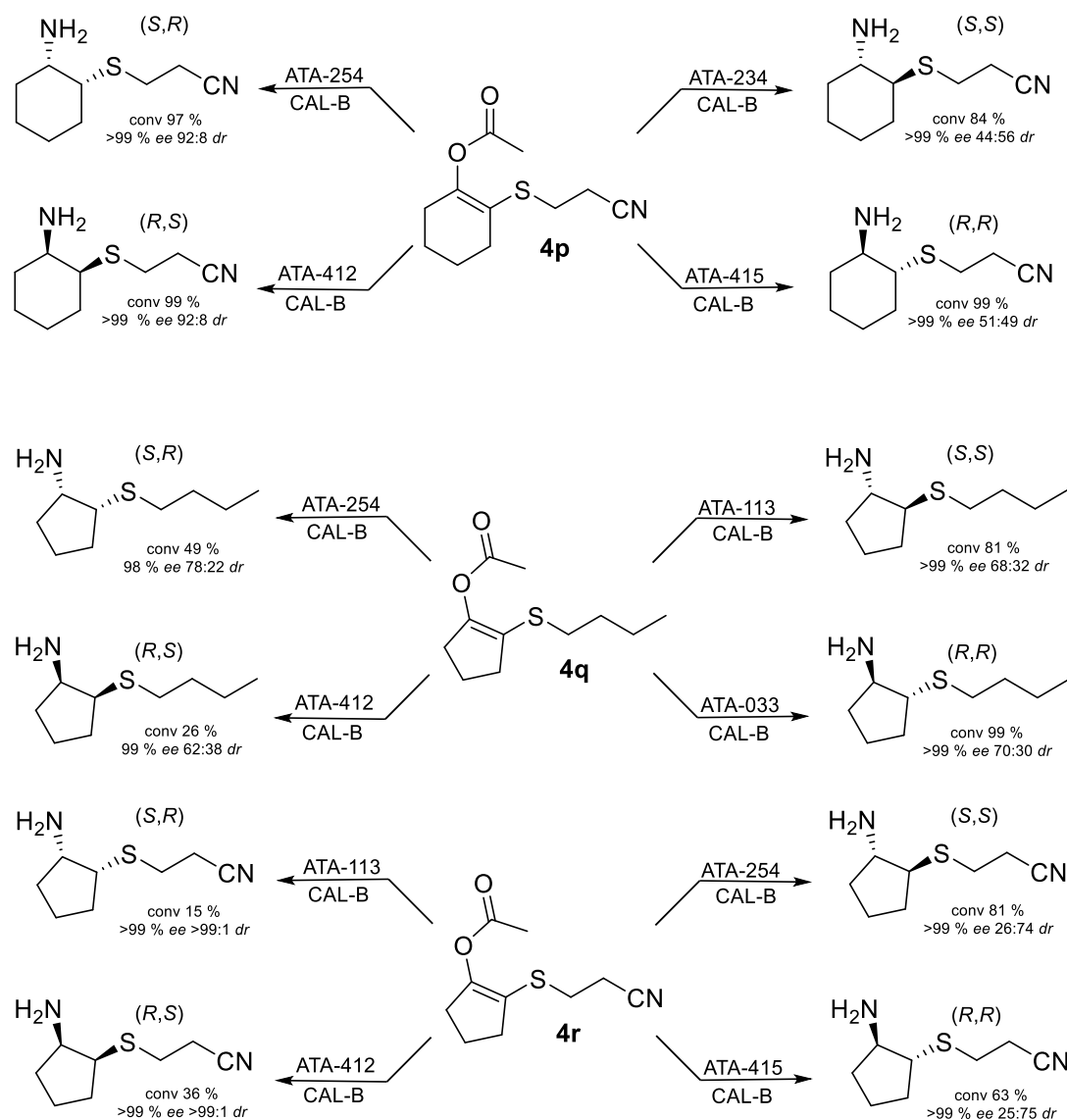
Como puede observarse en la Tabla 3.1, para la ATA-200 (enzima (*S*)-selectiva) se detectó un ligero incremento en el *dr* cuando la reacción fue realizada en cascada en comparación con el proceso en etapas para el sustrato **4f** (92:8 vs. 88:11, respectivamente). Para ATA-412 (enzima (*R*)-selectiva) la diferencia entre los procesos en cascada y en etapas fue un poco más pronunciada (87:13 vs. 80:20, respectivamente) y se evidenció una diferencia mayor para ATA-254 ((*S*)-selectiva) donde aumentó la selectividad de 78:22 (en etapas) a 86:14 (en cascada). Interesantemente, la conversión también se vio afectada para estas tres enzimas siendo mayor para ATA-200 y ATA-254 (ambas (*S*)-selectivas) y menor para ATA-412 ((*R*)-selectiva). Considerando que en el proceso en cascada la lipasa produciría la cetona con un cierto *ee*, y debido a que en el proceso de racemización dicho *ee* empieza a decrecer tan pronto como la cetona abandona el sitio activo de la lipasa, una posible explicación del comportamiento observado es que la lipasa puede generar un enantiómero dado de la cetona que es preferido por la ω -TA, provocando un aumento de la conversión. Por el contrario, cuando la ω -TA tiene una

selectividad opuesta, la reacción se ralentiza debido a que la racemización no es lo suficientemente rápida. Vale la pena mencionar que para ATA-P1-G05 no hubo cambios en el *dr* y hubo mínimos cambios en la conversión, demostrando que no solo (aunque principalmente) la ω -TA gobierna la estereoquímica general del proceso, sino que la velocidad de racemización juega un rol crítico. Estos resultados sugieren que, en el sistema de estudio, el control de la diastereoselectividad no depende considerablemente de la estructura del sustrato, asumiendo una velocidad de racemización similar para cetonas con una sustitución análoga.

Después de un exhaustivo *screening* de ω -TAs sobre las cetonas, las reacciones en cascada fueron llevadas a cabo en las condiciones más favorables para cada sustrato, como se demuestra en el Esquema 3.7.





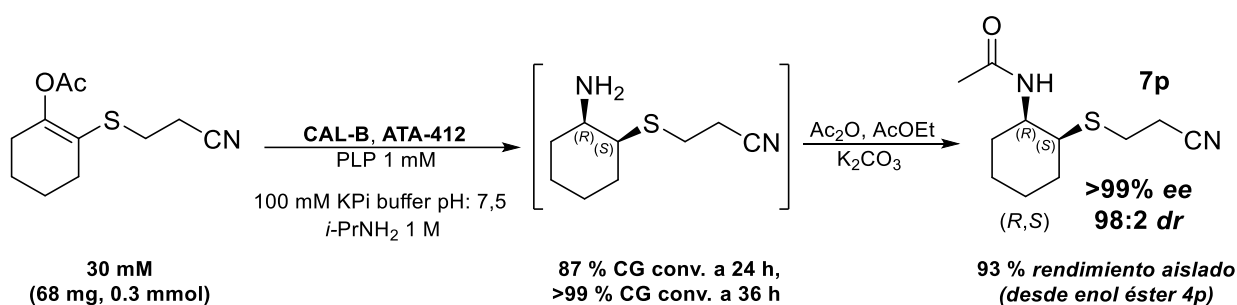


Esquema 3.7. Cascadas enzimáticas para obtener los posibles isómeros de las β-sulfanilaminas a partir de los correspondientes enol-ésteres.

Como se puede observar en el Esquema 3.7, con la combinación de una lipasa robusta y una adecuada ω-TA, los cuatro posibles isómeros pueden ser preparados a partir de los correspondientes enol-ésteres proquirales. Como una tendencia general, por un lado, las cetonas de seis miembros fueron mejores sustratos para las ω-TAs, en términos de conversión y diastereoselectividad. Dicho comportamiento puede ser atribuido a la mayor rigidez del anillo ciclopentanona, lo que llevaría a un reconocimiento menos favorable en el sitio activo de la ω-TA, o adoptar conformaciones menos productivas una vez que el PLP ha reaccionado con el carbonilo del sustrato. Por otro lado, y en la mayoría de los casos, se observó una mayor diastereopreferencia hacia los productos de configuración *cis* en la mayoría de los casos, en contraste con la menor preferencia *syn* (y *cis*) de estos biocatalizadores en la preparación de α-

alquil- β -amino amidas,¹⁷⁰ aunque las mercapto aminas de configuración *trans* fueron eficientemente obtenidas para todos los sustratos. Con respecto a la sustitución en el átomo de azufre, fueron tolerados los grupos alilo, propargilo, *n*-butilo, bencilo y remarcablemente, 2-etil carbonitrilo. Debe enfatizarse que, algunos efectos electrónicos pueden ser ejercidos por el grupo CN (compuestos **4p** y **4r**), ya que las mejores diastereoselectividades fueron alcanzadas con estos compuestos, dando una idea para el diseño de futuros sustratos. Desafortunadamente, la secuencia y la estructura de rayos X de estas ω -TAs comerciales no están disponibles, entonces no es posible realizar el modelado molecular. En la mayoría de los ejemplos, se obtuvo un excelente exceso enantiomérico (> 99 %) tanto para los isómeros *cis* como *trans*.

Con la finalidad de demostrar que el desarrollo de una cascada bienzimática dinámica puede ser aplicada eficientemente a la preparación enantioselectiva de una amina quiral, se llevó a cabo una reacción a mayor escala, a partir de 0.3 mmol del enol éster **4p** a 30 mM. A las 24 horas de reacción, la conversión a la amina correspondiente fue del 87 %, y se obtuvo una conversión completa a las 36 horas. Luego, la fracción orgánica en AcOEt fue acetilada con el fin de proteger a la amina de la descomposición. Con el proceso global (desde el enol éster a la amina protegida) pudo obtenerse el *cis*-*N*-acetil amino sulfuro **7p** (Esquema 3.8) con un rendimiento aislado del 93%, > 99 % *ee* y 98:2 *dr*.



Esquema 3.8. Escalado de la cascada bienzimática a partir del enol éster **4p** a la correspondiente 1,2-mercaptoamina *N*-protegida.

¹⁷⁰ Á. Mourelle-Insua, D. Méndez-Sánchez, J. L. Galman, I. Slabu, N. J. Turner, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, *Catal. Sci. Technol.*, **2019**, 9, 4083.

Conclusiones Parciales

Empleando la cascada bienzimática desarrollada fue posible preparar *vic*-sulfanil aminas *cis* o *trans* de manera enantiopura, con altas conversiones y diastereoselectividades. Este procedimiento involucra el uso de una lipasa robusta y una ω -TA selectiva. Notablemente, en la mayoría de los casos, fue posible obtener dos isómeros de cuatro posibles productos *via* una DKR. Esta estrategia en cascada maximiza la economía atómica y permite el acceso a compuestos quirales conteniendo dos centros estereogénicos contiguos. El resultado estereoquímico del proceso en cascada está controlado principalmente por la ω -TA utilizada, haciendo énfasis en que los sustratos estereoquímicamente impedidos pueden ser transformados en *vic*-sulfanil aminas enantiopuras si se utiliza la ω -TA adecuada.

Debe notarse que todos los enol ésteres cíclicos empleados son compuestos novedosos (diez compuestos), y también sus correspondientes β -sulfanil aminas.

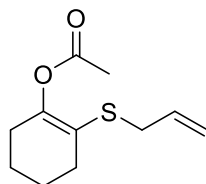
Es de destacar que cuando este procedimiento fue realizado en una escala semipreparativa, condujo a un alto rendimiento aislado (93 %) del producto sin pérdida de la pureza óptica, demostrando que puede ser empleado para transformaciones preparativas.

Esta estrategia expande el repertorio de cascadas biocatalíticas dinámicas para la preparación de compuestos azufrados importantes que contienen aminas quirales en su estructura.

Procedimiento general para la síntesis de Z-enol ésteres cíclicos

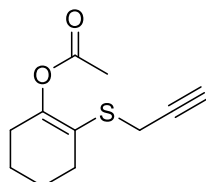
El protocolo correspondiente ya ha sido descrito en la sección de Materiales y métodos del capítulo 2 (página 101).

Acetato de 2-(aliltio)ciclohex-1-en-1-ilo (4f)



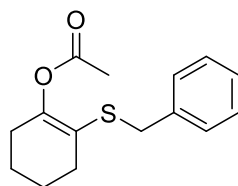
Aceite naranja (661 mg, 82%). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400,16 MHz): δ = 1.70 (m, 4H), 2.15 (s, 3H), 2.24 (m, 4H), 3.26 (d, 2H), 5.04 (d, 1H), 5.13 (d, 1H), 5.78 (m, 1H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100,62 MHz): δ = 20.9 (CH_3), 22.5 (CH_2), 23.0 (CH_2), 28.6 (CH_2), 29.5 (CH_2), 34.1 (CH_2), 116.9 (CH_2), 118.7 (C), 134.7 (CH), 147.5 (C), 168.8 (C); EM (m/z): 41, 43, 67 (100), 95, 100, 101, 129, 170, 212 (M+).

Acetato de 2-(prop-2-ino-1-iltio)ciclohex-1-en-1-ilo (4j)



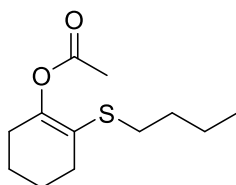
Aceite naranja (368 mg, 46%). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300.13 MHz): δ = 3.37 (d, J = 2.6 Hz, 2H), 2.46 – 2.38 (m, 2H), 2.30 – 2.21 (m, 3H), 2.19 (s, 3H), 1.75 (dtt aparente, J = 6.3, 4.2, 2.1 Hz, 4H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz): δ = 168.8 (C), 147.5 (C), 134.7 (CH), 118.7 (C), 116.9 (CH_2), 34.1 (CH_2), 29.5 (CH_2), 28.6 (CH_2), 23.0 (CH_2), 22.5 (CH_2), 20.9 (CH_3).

Acetato de 2-(benciltio)ciclohex-1-en-1-ilo (4g)



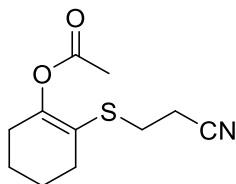
Aceite verdoso (797 mg, 80%). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300.13 MHz): δ = 7.33 – 7.16 (m, 5H), 3.81 (s, 2H), 2.23 – 2.12 (m, 4H), 2.10 (s, 3H), 1.69 – 1.55 (m, 4H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz): δ = 168.7 (C), 147.8 (C), 138.17 (C), 128.9 (C), 128.5 (C), 127.1 (C), 119.2 (C), 36.0 (CH_2), 30.0 (CH_2), 28.6 (CH_2), 23.1 (CH_2), 22.5 (CH_2), 20.9 (CH_3).

Acetato de 2-(butiltio)ciclohex-1-en-1-ilo (4o)



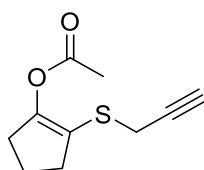
Aceite verdoso (564 mg, 65%). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300.13 MHz): δ = 2.63 – 2.58 (m, 2H), 2.35 – 2.26 (m, 2H), 2.23 – 2.17 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.78 – 1.65 (m, 4H), 1.56 – 1.44 (m, 2H), 1.44 – 1.32 (m, 2H), 0.90 (t, J = 7.2 Hz, 3H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz) δ = 168.7 (C), 146.4 (C), 119.1 (C), 32.1 (CH_2), 30.2 (CH_2), 28.9 (CH_2), 28.4 (CH_2), 23.3 (CH_2), 22.5 (CH_2), 21.8 (CH_2), 20.8 (CH_3), 13.6 (CH_3).

Acetato de 2-((2-cianoetil)tio)ciclohex-1-en-1-ilo (4p)



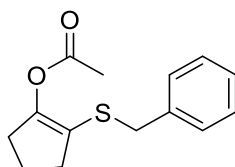
Aceite naranja (382 mg, 45%). $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300.13 MHz): δ = 2.82 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.53 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.34 – 2.26 (m, 2H), 2.25 – 2.16 (m, 2H), 2.18 (s, 3H), 1.77 – 1.68 (m, 4H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz): δ = 168.9 (C), 151.0 (C), 118.4 (C), 116.5 (C), 29.4 (CH_2), 28.7 (CH_2), 26.5 (CH_2), 23.1 (CH_2), 22.5 (CH_2), 20.9 (CH_3), 19.0 (CH_2).

Acetato de 2-(prop-2-ino-1-iltio)ciclopent-1-en-1-ilo (4l)



Aceite naranja (378 mg, 51%): $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400,16 MHz): $\delta = 3.37$ (bd, $J = 2.5$ Hz, 2H), 2.62 – 2.54 (m, 4H), 2.24 (bt, $J = 2.5$ Hz, 1H), 2.17 (s, 3H), 2.06 – 1.97 (m, 2H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): $\delta = 168.0$ (C), 149.3 (C), 117.7 (C), 80.1 (C), 71.5 (CH), 32.2 (CH_2), 31.5 (CH_2), 20.8 (CH_3), 20.0 (CH_2), 19.5 (CH_2).

Acetato de 2-(benciltio)ciclopent-1-en-1-ilo (4m)



Aceite verdoso (681 mg, 63%): $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400,16 MHz): $\delta = 7.41$ – 7.20 (m, 5H), 3.91 (s, 1H), 2.57 – 2.51 (m, 2H), 2.49 – 2.44 (m, 2H), 2.16 (s, 3H), 1.95 (bquin, $J = 7.7$ Hz, 2H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): $\delta = 168.1$ (C), 148.6 (C), 138.1 (C), 128.7 (C), 128.5 (C), 127.2 (C), 119.1 (C), 36.0 (CH_2), 32.8 (CH_2), 31.5 (CH_2), 20.8 (CH_3), 20.1 (CH_2).

Procedimiento general para la síntesis de β -cetosulfuros cíclicos¹²³

Síntesis a partir de la hidrólisis enzimática de Z-enol ésteres cíclicos (PROTOCOLO

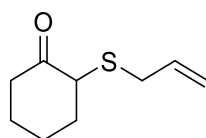
A)

A una solución del enol éster correspondiente (20 mM) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y DMSO 5%, se le agregó CAL-B en una relación 1:1 en peso. Se dejó con agitación orbital por 24 horas a 30°C. Luego, se extrajo con AcOEt (3x), se lavó con agua (3x), se secó con sulfato de sodio y se evaporó a sequedad. El producto fue purificado por columna cromatográfica en sílica-gel en una mezcla de Hexano:AcOEt de proporciones variables para obtener el correspondiente β -cetosulfuro cíclico como un aceite coloreado.

Síntesis mediante la reacción multicomponente seguida de la hidrólisis enzimática "one-pot" (PROTOCOLO B)

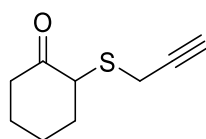
Se llevó a cabo el mismo protocolo que la reacción multicomponente indicado previamente para la síntesis de Z-enol ésteres cíclicos previo a la extracción, pero empleando 1 g de la halocetona de partida. Una vez completada la reacción, se agregó buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.5 estimando una concentración del enoléster de 60 mM (considerando una conversión cuantitativa a partir de la halocetona de partida) y DMSO 5%. Al cabo de 24 horas, se extrajo con AcOEt (3x), se lavó con agua (3x), se secó con sulfato de sodio y se evaporó a sequedad. El producto fue purificado por columna cromatográfica en sílica-gel en una mezcla de Hexano:AcOEt de proporciones variables para obtener el correspondiente β -cetosulfuro cíclico como un aceite coloreado.

2-(aliltio)ciclohexan-1-ona (5f)



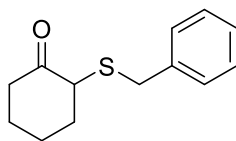
Aceite verdoso (B, 600 mg, 46%): $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400,16 MHz): δ = 5.73 (ddt, J = 14.4, 9.9, 7.2 Hz, 1H), 5.18 – 5.06 (m, 2H), 3.31 (t, J = 4.5 Hz, 1H), 3.08 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 2.99 – 2.86 (m, 1H), 2.27 – 2.08 (m, 2H), 2.01 – 1.89 (m, 2H), 1.86 – 1.63 (m, 3H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): δ = 208.2 (C), 133.4 (C), 118.1 (CH), 50.7 (CH_2), 38.1 (CH_2), 34.3 (CH_2), 33.1 (CH_2), 27.0 (CH_2), 22.2 (CH_2).

2-(prop-2-in-1-iltio)ciclohexan-1-ona (5j)



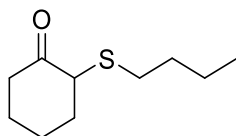
Aceite amarillento (B, 613 mg, 48%): $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300,13 MHz): δ = 3.67 – 3.61 (m, 1H), 3.30 (dd, J = 16.9, 2.6 Hz, 1H), 3.19 (dd, J = 16.9, 2.6 Hz, 1H), 2.93 – 2.82 (m, 1H), 2.36 – 2.21 (m, 2H), 2.24 (t, J = 2.6 Hz, 1H), 2.06 – 1.68 (m, 5H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz): δ = 207.4 (C), 79.4 (C), 71.3 (CH), 51.8 (CH), 38.5 (CH_2), 32.9 (CH_2), 26.9 (CH_2), 22.6 (CH_2), 19.0 (CH_2).

2-(benciltio)ciclohexan-1-ona (5g)



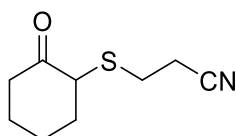
Aceite amarillento (B, 637 mg, 40%): $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400,16 MHz): $\delta = 7.38 - 7.18$ (m, 5H), 3.66 (s, 2H), 3.24 (bt, $J = 4.4$ Hz, 1H), 2.98 (ddd, $J = 14.6, 11.0, 5.8$ Hz, 1H), 2.34 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 2.23 (dt, $J = 14.5, 4.7$ Hz, 1H), 2.15 - 1.58 (m, 5H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): $\delta = 208.1$ (C), 137.7 (C), 129.2 (CH), 128.5 (CH), 127.2 (CH), 50.9 (CH), 37.8 (CH_2), 35.7 (CH_2), 29.8 (CH_2), 26.9 (CH_2), 21.9 (CH_2).

2-(butiltio)ciclohexan-1-ona (5o)



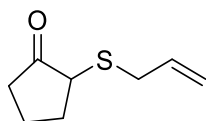
Aceite verdoso (B, 296 mg, 21%): $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300,13 MHz): $\delta = 3.64$ (t, $J = 5.8$ Hz, 1H), 3.30 (dd, $J = 16.9, 2.6$ Hz, 1H), 3.19 (dd, $J = 16.9, 2.6$ Hz, 1H), 2.93 - 2.81 (m, 1H), 2.36 - 2.24 (m, 2H), 2.23 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H), 2.06 - 1.64 (m, 8H), 1.26 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz): $\delta = 207.4$ (CH_2), 79.4 (CH_2), 71.3 (CH_2), 51.8 (CH_2), 38.5 (CH_2), 32.9 (CH_2), 29.7 (CH_2), 26.9 (CH_2), 22.6 (CH_2), 19.0 (CH_2).

3-((2-oxociclohexil)tio)propanonitrilo (5p)



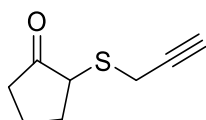
Aceite verdoso (A, 80 mg, 92%): $^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300,13 MHz): $\delta = 3.44$ (t, $J = 4.4$ Hz, 1H), 3.01 - 2.89 (m, 1H), 2.79 (dd, $J = 6.7, 2.4$ Hz, 1H), 2.76 (d, $J = 6.4$ Hz, 1H), 2.68 (d, $J = 6.7$ Hz, 1H), 2.65 (dd, $J = 6.6, 1.8$ Hz, 1H), 2.29 (dt, $J = 14.8, 4.7$ Hz, 1H), 2.24 - 2.15 (m, 1H), 2.24 - 2.15 (m, 1H), 2.11 - 1.67 (m, 4H).

2-(aliltio)ciclopentan-1-ona (5l)



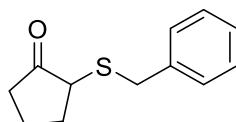
$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300,13 MHz): $\delta = 5.80$ (dddd, $J = 16.9, 9.9, 8.3, 6.1$ Hz, 1H), 5.21 (ddd, $J = 17.0, 2.6, 1.5$ Hz, 1H), 5.13 (d ancho, $J = 9.9$ Hz, 1H), 3.38 (dd, $J = 13.8, 8.3$ Hz, 1H), 3.13 (dd, $J = 13.8, 6.1$ Hz, 1H), 3.12 – 3.07 (m, 1H), 2.53 – 2.39 (m, 1H), 2.35 – 2.02 (m, 3H), 1.99 – 1.79 (m, 2H). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz): $\delta = 214.4$ (C), 133.4 (CH), 118.3 (CH_2), 45.8 (CH_2), 36.3 (CH_2), 33.7 (CH_2), 30.3 (CH_2), 20.7 (CH_2).

2-(prop-2-in-1-iltio)ciclopentan-1-ona (5n)



$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 400,16 MHz): $\delta = 3.57$ (dd, $J = 16.8, 2.5$ Hz, 1H), 3.39 (t ancho, 1H, $J = 5.9$ Hz, 1H), 3.23 (dd, $J = 16.8, 2.5$ Hz, 1H), 2.51 – 2.41 (m, 1H), 2.39 – 2.30 (m, 1H), 2.29 – 2.19 (m, 2H), 2.16 – 2.03 (m, 1H), 2.03 – 1.86 (m, 2H). $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 100.62 MHz): $\delta = 213.9$ (C), 79.5 (C), 71.4 (CH), 46.4 (CH_2), 36.2 (CH_2), 29.9 (CH_2), 20.7 (CH_2), 18.7 (CH_2).

2-(benciltio)ciclopentan-1-ona (5m)

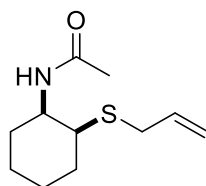


$^1\text{H-RMN}$ (CDCl_3 , 300,13 MHz): $\delta = 7.43 - 7.11$ (m, 5H), 3.85 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H), 3.65 (d, $J = 13.4$ Hz, 1H), 2.93 – 2.85 (m, 1H), 2.50 – 2.37 (m, 1H), 2.19 – 1.93 (m, 3H), 1.89 – 1.68 (m, 2H); $^{13}\text{C-RMN}$ (CDCl_3 , 75.5 MHz): $\delta = 214.0$ (C), 137.6 (C), 129.2 (CH), 128.5 (CH), 127.1 (CH), 45.7 (CH_2), 36.1 (CH_2), 34.9 (CH_2), 30.0 (CH_2), 20.6 (CH_2).

Procedimiento general para la síntesis de β -sulfanil amidas racémicas¹⁷¹

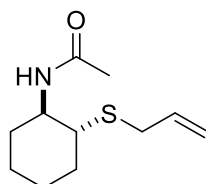
A una solución del respectivo β -cetosulfuro en MeOH seco (200 mM), se agregó formiato de amonio (10 equivalentes) y se dejó con agitación a temperatura ambiente. Luego de 1 hora de reacción, se agregó NaCNBH₃ (0,6 equivalentes) y se dejó con agitación por 3 horas adicionales. Posteriormente, a la reacción se le agregó una solución acuosa de HCl 0,04 M y se extrajo con AcOEt (3 veces). Luego se basificó la fase acuosa a pH ~14 y se extrajo nuevamente con AcOEt (3 veces). Se combinaron las fases orgánicas, se agregó 1,5 equivalentes de Ac₂O y 1 equivalente de K₂CO₃ anhidro y se dejó con agitación por 12 horas. Al terminar la reacción, se extrajo con AcOEt (3 veces), se lavó con agua (3 veces), se secó con sulfato de sodio y se evaporó a sequedad, donde se obtuvo la β -sulfanil amida correspondiente.

N-(*cis*-2-(aliltio)ciclohexil)acetamida (7f')



¹H-RMN (CDCl₃, 300,13 MHz): δ = 5.79 (ddt, J = 17.0, 9.9, 7.1 Hz, 1H), 5.12 (ddd, J = 17.4, 2.9, 1.5 Hz, 1H), 5.07 (bd, J = 9.8 Hz, 1H), 3.70 (tdd, J = 10.3, 7.9, 4.1 Hz, 1H), 3.16 (bd, J = 7.1 Hz, 2H), 2.44 (td, J = 10.6, 3.9 Hz, 1H), 2.23 – 2.14 (m, 1H), 2.12 – 2.04 (m, 1H), 1.98 (s, 3H), 1.77 – 1.61 (m, 2H), 1.77 – 1.61 (m, 4H); ¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ = 169.7 (C), 135.1 (CH), 117.1 (CH₂), 51.8 (CH), 47.7 (CH), 33.3 (CH₂), 33.2 (CH₂), 33.0 (CH₂), 25.8 (CH₂), 24.5 (CH₂), 23.6 (CH₃). HRMS (ESI+, m/z): calculado para (C₁₂H₂₃NOS)⁺ (M+H)⁺ 214.1260, encontrado 214.1265.

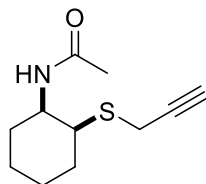
N-(*trans*-2-(aliltio)ciclohexil)acetamida (7f')



¹⁷¹ S. E. Payer, J. H. Schrittwieser, B. Grischek, R. C. Simon, W. Kroutil. *Adv. Synth. Catal.*, **2016**, 358, 444-451.

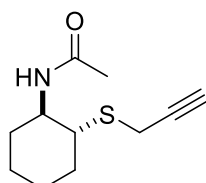
¹H-RMN (CDCl₃, 300,13 MHz): δ = 5.77 (ddt, *J* = 17.0, 9.9, 7.2 Hz, 1H), 5.15 – 5.02 (m, 2H), 4.15 – 3.96 (m, 1H), 3.15 (dd, *J* = 13.2, 6.4 Hz, 1H), 3.08 (dd, *J* = 13.2, 6.7 Hz, 1H), 3.00 (q, *J* = 3.9 Hz, 1H), 1.98 (s, 3H), 1.87 – 1.23 (m, 8H); **¹³C-RMN** (CDCl₃, 75.5 MHz): δ = 169.3 (C), 134.6 (CH), 117.5 (CH₂), 49.7 (CH), 47.9 (CH), 35.5 (CH₂), 31.6 (CH₂), 29.5 (CH₂), 24.2 (CH₂), 23.7 (CH₃), 21.3 (CH₂). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculado para (C₁₂H₂₃NOS)⁺(M+H)⁺ 214.1260, encontrado 214.1265.

***N*-(*cis*-2-(prop-2-in-1-iltio)ciclohexil)acetamida (7j')**



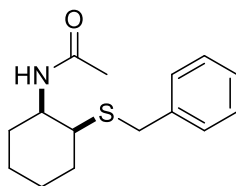
¹H-RMN (CDCl₃, 300,13 MHz): δ = 3.81 – 3.66 (m, 1H), 3.34 (dd, *J* = 16.9, 2.6 Hz, 1H), 3.24 (dd, *J* = 17.0, 2.6 Hz, 1H), 2.69 (td, *J* = 11.0, 3.9 Hz, 1H), 2.25 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 2.28 – 2.13 (m, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.83 – 1.66 (m, 2H), 1.63 – 1.48 (m, 1H), 1.41 – 1.27 (m, 2H); **¹³C-RMN** (CDCl₃, 75.5 MHz): δ = 169.8 (C), 71.2 (C), 52.1 (CH), 48.7 (CH), 33.8 (CH), 33.1 (CH₂), 29.8 (CH₂), 26.0 (CH₂), 24.6 (CH₂), 23.7 (CH₃), 17.8 (CH₂). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculado para (C₁₁H₁₈NOS)⁺(M+H)⁺ 212.1104, encontrado 212.1107.

***N*-(*trans*-2-(prop-2-in-1-iltio)ciclohexil)acetamida (7j')**



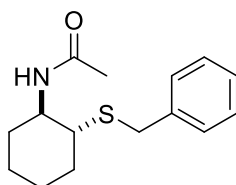
¹H-RMN (CDCl₃, 300,13 MHz): δ = 3.89 – 3.80 (m, 1H), 3.45 – 3.13 (m, 2H), 2.74 (td, *J* = 11.0, 3.9 Hz, 1H), 2.29 – 2.22 (m, 4H), 1.99 (s, 3H), 1.93 – 1.47 (m, 5H); **¹³C-RMN** (CDCl₃, 75.5 MHz): δ = 169.3 (C), 71.2 (C), 50.9 (CH), 48.2 (CH), 32.9 (CH), 31.2 (CH₂), 29.7 (CH₂), 25.7 (CH₂), 24.4 (CH₂), 23.9 (CH₂), 23.6 (CH₃), 17.6 (CH₂). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculado para (C₁₁H₁₈NOS)⁺(M+H)⁺ 212.1104, encontrado 212.1107.

***N*-(*cis*-2-(benciltio)ciclohexil)acetamida (7g')**



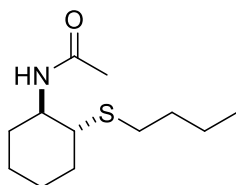
¹H-RMN (CDCl₃, 300,13 MHz): δ = 7.37 – 7.20 (m, 5H), 3.73 (q, *J* = 13.0 Hz, 2H), 3.79 – 3.63 (m, 1H), 2.35 (td, *J* = 10.8, 3.8 Hz, 1H), 2.22 – 2.11 (m, 1H), 2.06 – 1.97 (m, 1H), 1.92 (s, 3H), 1.82 – 1.00 (m, 6H); ¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ = 169.7 (C), 138.9 (C), 129.0 (CH), 128.7 (CH), 127.2 (CH), 51.7 (CH), 48.5 (CH), 34.2 (CH), 33.5 (CH₂), 33.4 (CH₂), 26.0 (CH₂), 24.5 (CH₂), 23.6 (CH₃). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculado para (C₁₅H₂₂NOS)⁺(M+H)⁺ 264.1417, encontrado 264.1417.

***N*-(*trans*-2-(benciltio)ciclohexil)acetamida (7g')**



No pudo obtenerse una fracción pura del correspondiente isómero. Mezcla de isómeros *cis* y *trans*. ¹H-RMN (CDCl₃, 300,13 MHz): δ = 7.34 – 7.21 (m, 5H), 3.96 (qd, *J* = 8.7, 3.6 Hz, 1H), 3.84 – 3.67 (m, 2H), 3.65 – 3.57 (m, 1H), 2.96 (q, *J* = 3.7 Hz, 1H), 2.96 (q, *J* = 3.7 Hz, 1H), 1.79 (s, *J* = 9.1 Hz, 3H), 1.79 – 1.09 (m, 6H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ = 169.2, 160.8, 138.9, 138.6, 129.1, 129.0, 128.9, 128.8, 128.7, 127.3, 127.2, 50.6, 49.6, 48.7, 48.1, 37.0, 36.0, 34.3, 33.3, 31.6, 31.0, 29.5, 25.8, 24.5, 24.2, 23.5, 21.3. HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculado para (C₁₅H₂₂NOS)⁺(M+H)⁺ 264.1417, encontrado 264.1417.

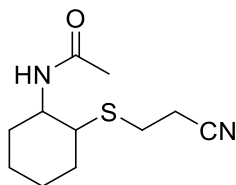
***N*-(*cis*-2-(butiltio)ciclohexil)acetamida (7o')**



No se pudo aislar completamente los diastereoisómeros. Mezcla compleja de isómeros.

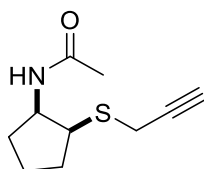
¹H-RMN (CDCl₃, 300,13 MHz): δ = 3.80 – 3.68 (m, 1H), 3.35 (dd, *J* = 16.9, 2.6 Hz, 1H), 3.24 (dd, *J* = 17.0, 2.6 Hz, 1H), 2.70 (td, *J* = 11.0, 3.8 Hz, 1H), 2.29 – 2.14 (m, 2H), 2.26 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 2.00 (s, 3H), 1.83 – 1.30 (m, 12H).

***N*-(2-((2-cianoetil)tio)ciclohexil)acetamida (7p')**



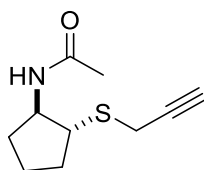
La mezcla de isómeros *cis/trans* no pudo separarse por columna cromatográfica. HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculado para (C₁₁H₁₉N₂OS)⁺(M+H)⁺ 227.1216, encontrado 227.1213.

***N*-(*cis*-2-(prop-2-ino-1-iltio)ciclopentil)acetamida (7n')**



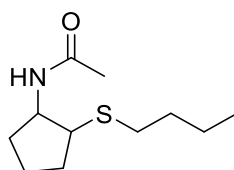
¹H-RMN (CDCl₃, 300,13 MHz): δ = 4.15 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H), 3.45 (dd, *J* = 16.9, 2.6 Hz, 1H), 3.31 (dd, *J* = 16.9, 2.6 Hz, 1H), 3.14 (dd, *J* = 14.5, 7.3 Hz, 1H), 2.30 – 2.10 (m, 3H), 1.97 (s, 3H), 1.83 – 1.54 (m, 3H), 1.46 (dt, *J* = 14.9, 7.2 Hz, 1H). ¹³C-RMN (CDCl₃, 75.5 MHz): δ = 169.9 (C), 80.7 (C), 71.1 (CH), 57.3 (CH), 49.4 (CH), 32.3 (CH₂), 31.6 (CH₂), 23.6 (CH₂), 22.7 (CH₂), 19.2 (CH₃). HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculado para (C₁₁H₁₉NOS)⁺(M+H)⁺ 227.1216, encontrado 227.1213.

***N*-(*trans*-2-(prop-2-ino-1-iltio)ciclopentil)acetamida (7n')**



Mezcla compleja de isómeros. HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculado para (C₁₀H₁₆NOS)⁺(M+H)⁺ 198.0947, encontrado 198.0952.

***N*-(2-(prop-2-in-1-iltio)ciclopentil)acetamida (7q')**



No pudo separarse por columna cromatográfica. HRMS (ESI⁺, *m/z*): calculado para (C₁₁H₂₂NOS)⁺(M+H)⁺ 216.1417, encontrado 216.1419.

Protocolos enzimáticos y muestreo de enzimas

Procedimiento general para la hidrólisis de Z-enol ésteres empleando CAL-B¹²³

CAL-B (2 mg) y 5% v.v⁻¹ DMSO (50 μL) fueron añadidos a un tubo Eppendorf conteniendo el enoléster (25 mM) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,5 (450 μL). La reacción fue agitada a 30°C y 250 rpm por 24 horas. Luego, la mezcla fue extraída con AcOEt (2 x 500 μL), las fases orgánicas fueron separadas por centrifugación (1 min, 13000 rpm), combinadas y finalmente secadas con Na₂SO₄. Las conversiones en los correspondientes β-cetosulfuros fueron determinados por CG-FID.

Procedimiento general para la aminación reductiva de β-cetosulfuros empleando ω-TA comerciales¹⁷²

ω-TA (2 mg) y 1mM de PLP (50 μL de una solución 10 mM) fueron añadidos a un tubo Eppendorf conteniendo el β-cetosulfuro (30 mM, 12,5 μL de una solución 1,2 M en DMSO) en buffer KPi 100 mM conteniendo *i*PrNH₂ 1 M pH 7,5 (437,5 μL). La reacción fue agitada a 30°C y 250 rpm por 24 horas. Luego, se basificó la solución a pH 12-14, y la mezcla se extrajo con AcOEt (2 x 500 μL), las fases orgánicas fueron separadas por centrifugación (1 min, 13000 rpm) y fueron combinadas. Después, se separó en dos alícuotas: una se empleó para evaluar las

¹⁷² A. Mourelle-Insúa, L. A. Zampieri, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández. *Adv. Synth. Catal.*, **2017**, *360*, 686-695.

conversiones en las correspondientes β -sulfanil aminas, que fueron determinadas por CG-FID. A la otra alícuota, se agregó 50 μ L de Ac_2O y K_2CO_3 . Al cabo de 2 horas, la mezcla fue extraída con AcOEt (2 x 500 μ L), las fases orgánicas fueron separadas por centrifugación (1 min, 13000 rpm), fueron combinadas y finalmente secadas con Na_2SO_4 . La determinación de los *ee* y *de* se realizó por CG-FID quiral para los derivados acetilados.

Procedimiento general para la aminación reductiva de β -cetosulfuros empleando ω -TA sobreexpresadas en E. coli. Chromobacterium violaceum (CV-TA), Arthrobacter sp. (ArR-TA, ArS-TA, y ArRmut11-TA)¹⁷²

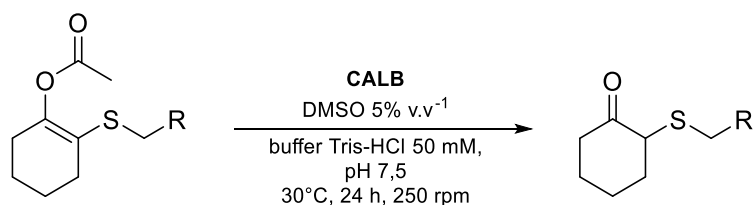
El preparado de células liofilizadas de *E.coli*/ ω -TA (10 mg) y 1mM de PLP (50 μ L de una solución 10 mM) fueron añadidos a un tubo Eppendorf conteniendo el β -cetosulfuro (30 mM, 12,5 μ L de una solución 1,2 M en DMSO) en buffer KPi 100 mM conteniendo *i*PrNH₂ 1 M pH 7,5 (437,5 μ L). La reacción fue agitada a 30°C y 250 rpm por 24 horas. Luego, se basificó la solución a pH 12-14 y la mezcla se extrajo con AcOEt (2 x 500 μ L), las fases orgánicas fueron separadas por centrifugación (1 min, 13000 rpm) y luego fueron combinadas. Después, se las separó en dos alícuotas: una se empleó para evaluar las conversiones en las correspondientes β -sulfanil aminas, que fueron determinadas por CG-FID. A la otra alícuota, se agregó 50 μ L de Ac_2O y K_2CO_3 . Al cabo de 2 horas, la mezcla fue extraída con AcOEt (2 x 500 μ L), las fases orgánicas fueron separadas por centrifugación (1 min, 13000 rpm), fueron combinadas y finalmente secadas con Na_2SO_4 . La determinación de los *ee* y *de* se realizó por CG-FID quiral para los derivados acetilados.

Procedimiento general para la cascada bienzimática sobre Z-enol ésteres cíclicos empleando CAL-B y ω -TA comerciales

CAL-B (2 mg), ω -TA (2 mg) y 1mM de PLP (50 μ L de una solución 10 mM) fueron añadidos a un tubo Eppendorf conteniendo el Z-enol éster (30 mM, 12,5 μ L de una solución 1,2 M en DMSO) en buffer KPi 100 mM conteniendo *i*PrNH₂ 1 M pH 7,5 (437,5 μ L). La reacción fue agitada a 30°C y 250 rpm por 24 horas. Luego, se basificó la solución a pH 12-14 y la mezcla se extrajo con AcOEt (2 x 500 μ L), las fases orgánicas fueron separadas por centrifugación (1 min, 13000 rpm) y luego fueron combinadas. Después, se las separó en dos alícuotas: una se empleó para evaluar las conversiones en las correspondientes β -sulfanil aminas, que fueron determinadas

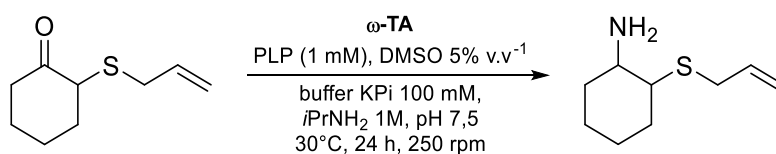
por CG-FID. A la otra alícuota, se agregó 50 μL de Ac_2O y K_2CO_3 . Al cabo de 2 horas, la mezcla fue extraída con AcOEt (2 x 500 μL), las fases orgánicas fueron separadas por centrifugación (1 min, 13000 rpm), fueron combinadas y finalmente secadas con Na_2SO_4 . La determinación de los *ee* y *de* se realizó por CG-FID quiral para los derivados acetilados.

Muestreo de *Z*-enol ésteres con CAL-B



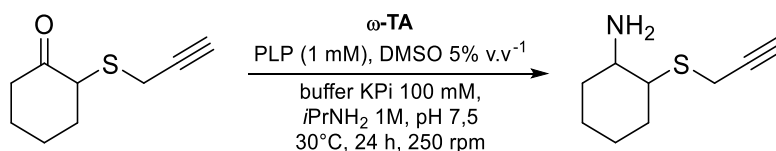
Entrada	Compuesto	Conversión
1	4f	>99
2	4g	>99
3	4j	>99
4	4l	>99
5	4m	>99
6	4n	>99
7	4o	>99
8	4p	>99
9	4q	>99
10	4r	>99

Muestreo enzimático de β -cetosulfuros



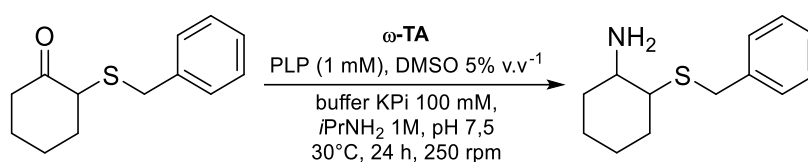
Entrada	Enzima	Conv	<i>ee cis</i> (%)	<i>ee trans</i> (%)	<i>dr cis trans</i> (%)
1	ATA-200	80	>99 (<i>S, R</i>)	62 (<i>S, S</i>)	89 11
2	ATA-237	95	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	37 63
3	ATA-238	86	90 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	29 71
4	ATA-251	95	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	53 47
5	ATA-254	91	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	58 42
6	ATA-256	>99	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	63 37
7	ATA-260	>99	95 (<i>S, R</i>)	89 (<i>S, S</i>)	54 46
8	ATA-303	>99	>99 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	33 67
9	ATA-412	>99	>99 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	85 15
10	ATA-415	>99	95 (<i>R, S</i>)	98 (<i>R, R</i>)	32 68

11	TA-P1-B04	97	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	53	47
12	TA-P2-A01	2	7 (<i>R, S</i>)	7 (<i>R, R</i>)	88	12
13	TA-P2-B01	-	-	-	-	-
14	ATA-007	-	-	-	-	-
15	ATA-013	90	>99 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	48	52
16	ATA-025	97	>99 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	39	61
17	ATA-113	85	>99 (<i>S, R</i>)	88 (<i>S, S</i>)	87	13
18	ATA-114	-	-	-	-	-
19	ATA-217	26	77 (<i>S, R</i>)	99 (<i>S, S</i>)	30	70
20	ATA-234	87	91 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	29	71
21	ATA-301	68	96 (<i>R, S</i>)	96 (<i>R, R</i>)	27	73
22	ATA-P1-F03	85	>99 (<i>S, R</i>)	99 (<i>S, S</i>)	39	61
23	ATA-P1-G05	92	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	31	69
24	ATA-P2-A07	4	>99 (<i>S, R</i>)	33 (<i>S, S</i>)	82	18
25	ATA-024	>99	98 (<i>R, S</i>)	99 (<i>R, R</i>)	39	61
26	ATA-033	>99	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	41	59
27	TA-P1-A06	62	>99 (<i>S, R</i>)	90 (<i>S, S</i>)	84	16
28	TA-P1-G05	45	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	88	12
29	CV-TA	50	98 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	82	18
30	ArS-TA	>99	>99 (<i>S, R</i>)	99 (<i>S, S</i>)	81	19
31	ArR-TA	3	>99 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	37	63
32	ArRmut11-TA	>99	97 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	38	62



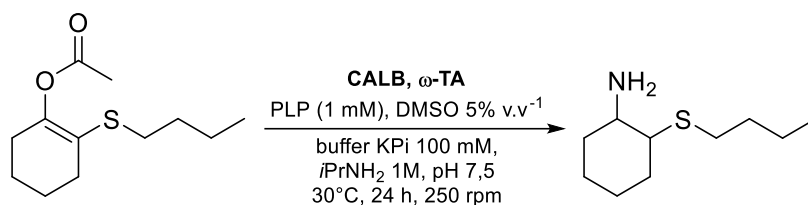
Entrada	Enzima	Conv	<i>ee cis</i> (%)	<i>ee trans</i> (%)	<i>dr_{cis trans}</i> (%)
1	ATA-200	97	>99 (<i>S, R</i>)	92 (<i>S, S</i>)	91 9
2	ATA-237	>99	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	37 63
3	ATA-238	>99	70 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	35 65
4	ATA-251	>99	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	60 41
5	ATA-254	>99	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	69 31
6	ATA-256	>99	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	65 35
7	ATA-260	>99	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	61 39
8	ATA-303	>99	94 (<i>R, S</i>)	96 (<i>R, R</i>)	45 55
9	ATA-412	98	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	80 20
10	ATA-415	>99	99 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	32 68
11	TA-P1-B04	>99	98 (<i>S, R</i>)	87 (<i>S, S</i>)	39 61
12	TA-P2-A01	9	78 (<i>R, S</i>)	20 (<i>S, S</i>)	76 24
13	TA-P2-B01	21	97 (<i>R, S</i>)	90 (<i>R, R</i>)	84 16
14	ATA-007	8	91 (<i>R, S</i>)	4 (<i>S, S</i>)	80 20
15	ATA-013	>99	>99 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	52 48
16	ATA-025	>99	>99 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	44 56

17	ATA-113	98	>99 (<i>S, R</i>)	91 (<i>S, S</i>)	85	15
18	ATA-114	5	7 (<i>R, S</i>)	10 (<i>R, R</i>)	71	29
19	ATA-217	46	41 (<i>S, R</i>)	97 (<i>S, S</i>)	37	63
20	ATA-234	98	72 (<i>S, R</i>)	91 (<i>S, S</i>)	30	70
21	ATA-301	89	>99 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	46	54
22	ATA-P1-F03	>99	90 (<i>S, R</i>)	83 (<i>S, S</i>)	35	65
23	ATA-P1-G05	8	90 (<i>R, S</i>)	1 (<i>R, R</i>)	84	16
24	ATA-P2-A07	7	96 (<i>R, S</i>)	47 (<i>R, R</i>)	90	10
25	ATA-024	>99	98 (<i>R, S</i>)	99 (<i>R, R</i>)	39	61
26	ATA-033	>99	99 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	48	52
27	TA-P1-A06	67	91 (<i>S, R</i>)	90 (<i>S, S</i>)	57	43
28	TA-P1-G05	82	94 (<i>S, R</i>)	92 (<i>S, S</i>)	59	41

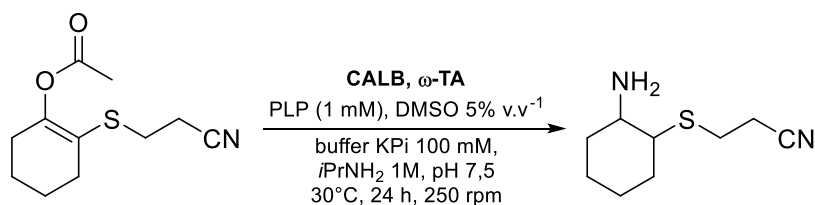


Entrada	Enzima	Conv	<i>ee cis</i> (%)	<i>ee trans</i> (%)	<i>dr_{cis trans}</i> (%)	
1	ATA-200	-	-	-	-	-
2	ATA-237	99	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	33	67
3	ATA-238	83	97 (<i>S, R</i>)	99 (<i>S, S</i>)	28	72
4	ATA-251	89	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	66	34
5	ATA-254	58	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	78	22
6	ATA-256	77	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	63	37
7	ATA-260	93	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	55	45
8	ATA-303	77	84 (<i>R, S</i>)	87 (<i>R, R</i>)	35	65
9	ATA-412	10	97 (<i>R, S</i>)	88 (<i>R, R</i>)	81	19
10	ATA-415	97	97 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	35	65
11	TA-P1-B04	95	97 (<i>S, R</i>)	87 (<i>S, S</i>)	58	42
12	TA-P2-A01	6	61 (<i>R, S</i>)	33 (<i>R, R</i>)	72	28
13	TA-P2-B01	9	91 (<i>R, S</i>)	40 (<i>R, R</i>)	92	8
14	ATA-007	9	90 (<i>R, S</i>)	88 (<i>R, R</i>)	45	55
15	ATA-013	61	>99 (<i>R, S</i>)	95 (<i>R, R</i>)	34	66
16	ATA-025	99	>99 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	31	69
17	ATA-113	86	90 (<i>S, R</i>)	30 (<i>S, S</i>)	76	25
18	ATA-114	-	-	-	-	-
19	ATA-217	89	32 (<i>S, R</i>)	97 (<i>S, S</i>)	38	62
20	ATA-234	95	90 (<i>S, R</i>)	98 (<i>S, S</i>)	29	71
21	ATA-301	86	92 (<i>R, S</i>)	57 (<i>R, R</i>)	55	45
22	ATA-P1-F03	99	96 (<i>S, R</i>)	98 (<i>S, S</i>)	30	70
23	ATA-P1-G05	99	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	30	71
24	ATA-P2-A07	17	84 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	72	28
25	ATA-024	99	98 (<i>R, S</i>)	95 (<i>R, R</i>)	31	69
26	ATA-033	99	>99 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	30	70

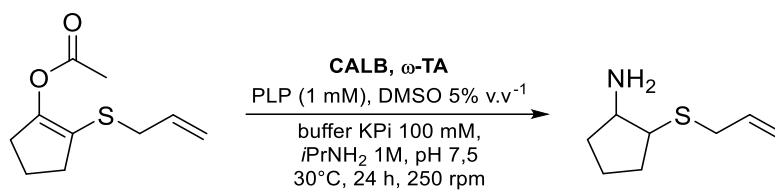
27	TA-P1-A06	71	78 (<i>S, R</i>)	32 (<i>S, S</i>)	41	60
28	TA-P1-G05	71	84 (<i>S, R</i>)	86 (<i>S, S</i>)	38	63
29	CV-TA	3	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	82	18
30	ArS-TA	95	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	40	60
31	ArR-TA	-	-	-	-	-
32	ArRmut11-TA	94	94 (<i>R, S</i>)	91 (<i>R, R</i>)	30	70



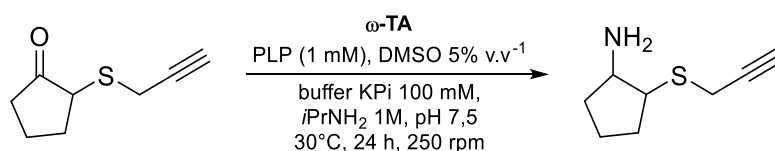
Entrada	Enzima	Conv	<i>ee cis</i> (%)	<i>ee trans</i> (%)	<i>dr_{cis trans}</i> (%)
1	ATA-200	17	91 (<i>S, R</i>)	92 (<i>S, S</i>)	19 81
2	ATA-238	89	90 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	28 72
3	ATA-254	80	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	70 30
4	ATA-412	86	94 (<i>R, S</i>)	90 (<i>R, R</i>)	70 31
5	ATA-415	97	98 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	28 72
6	ATA-113	85	98 (<i>S, R</i>)	63 (<i>S, S</i>)	88 12
7	ATA-234	95	95 (<i>S, R</i>)	98 (<i>S, S</i>)	36 64
8	ATA-P1-G05	97	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	35 65
9	ATA-033	>99	89 (<i>R, S</i>)	85 (<i>R, R</i>)	39 61



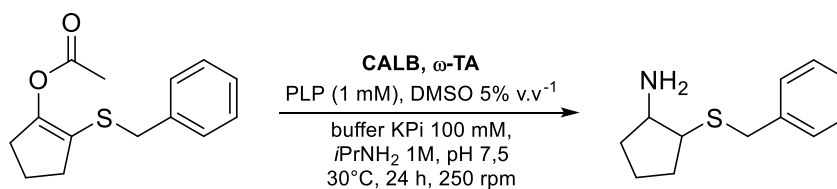
Entrada	Enzima	Conv	<i>ee cis</i> (%)	<i>ee trans</i> (%)	<i>dr_{cis trans}</i> (%)
1	ATA-200	27	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	85 15
2	ATA-238	>99	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	53 47
3	ATA-254	97	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	92 8
4	ATA-303	>99	95 (<i>R, S</i>)	93 (<i>R, R</i>)	68 32
5	ATA-412	>99	>99 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	98 2
6	ATA-415	>99	>99 (<i>R, S</i>)	>99 (<i>R, R</i>)	51 49
7	ATA-113	84	94 (<i>S, R</i>)	33 (<i>S, S</i>)	89 11
8	ATA-234	84	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	44 56
9	ATA-P1-F03	99	97 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	65 35
10	ATA-P1-G05	98	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	62 38
11	ATA-033	>99	93 (<i>R, S</i>)	87 (<i>R, R</i>)	66 34
12	TA-P1-G05	49	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	77 23



Entrada	Enzima	Conv	<i>ee cis</i> (%)	<i>ee trans</i> (%)	<i>dr cis trans</i> (%)	
1	ATA-200	51	98 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	69	31
2	ATA-238	74	1 (<i>R, S</i>)	99 (<i>S, S</i>)	47	53
3	ATA-254	70	99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	53	47
4	ATA-412	38	93 (<i>R, S</i>)	88 (<i>R, R</i>)	78	22
5	ATA-415	68	91 (<i>R, S</i>)	96 (<i>R, R</i>)	30	70
6	ATA-113	76	99 (<i>S, R</i>)	99 (<i>S, S</i>)	34	66
7	ATA-234	64	19 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	39	61
8	ATA-P1-G05	65	92 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	27	73
9	ATA-033	79	94 (<i>R, S</i>)	93 (<i>R, R</i>)	69	31

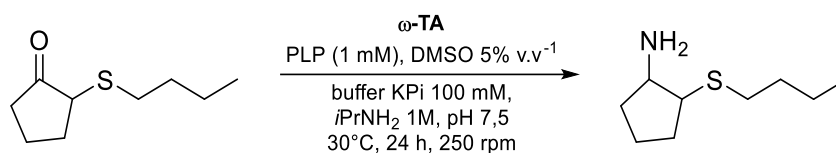


Entrada	Enzima	Conv	<i>ee cis</i> (%)	<i>ee trans</i> (%)	<i>dr cis trans</i> (%)	
1	ATA-200	79	20 (<i>S, R</i>)	99 (<i>S, S</i>)	44	56
2	ATA-238	90	95 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	35	65
3	ATA-254	91	94 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	30	70
4	ATA-412	68	98 (<i>R, S</i>)	89 (<i>R, R</i>)	60	40
5	ATA-415	76	>99 (<i>R, S</i>)	99 (<i>R, R</i>)	30	70
6	ATA-113	85	96 (<i>S, R</i>)	98 (<i>S, S</i>)	33	67
7	ATA-234	57	27 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	38	62
8	ATA-P1-G05	77	98 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	26	74
9	ATA-033	89	93 (<i>R, S</i>)	95 (<i>R, R</i>)	44	56

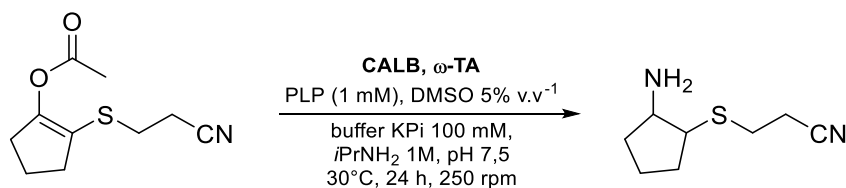


Entrada	Enzima	Conv	<i>ee cis</i> (%)	<i>ee trans</i> (%)	<i>dr cis trans</i> (%)	
1	ATA-200	-	-	-	-	-
2	ATA-238	21	77 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	38	62
3	ATA-254	34	>99 (<i>S, R</i>)	>99 (<i>S, S</i>)	80	20
4	ATA-412	53	66 (<i>R, S</i>)	93 (<i>R, R</i>)	41	59
5	ATA-415	50	89 (<i>R, S</i>)	97 (<i>R, R</i>)	32	68

6	ATA-113	76	88 (S, R)	83 (S, S)	44	56
7	ATA-234	24	41 (S, R)	91 (S, S)	39	61
8	ATA-P1-G05	60	>99 (S, R)	>99 (S, S)	28	72
9	ATA-033	56	83 (R, S)	82 (R, R)	34	67



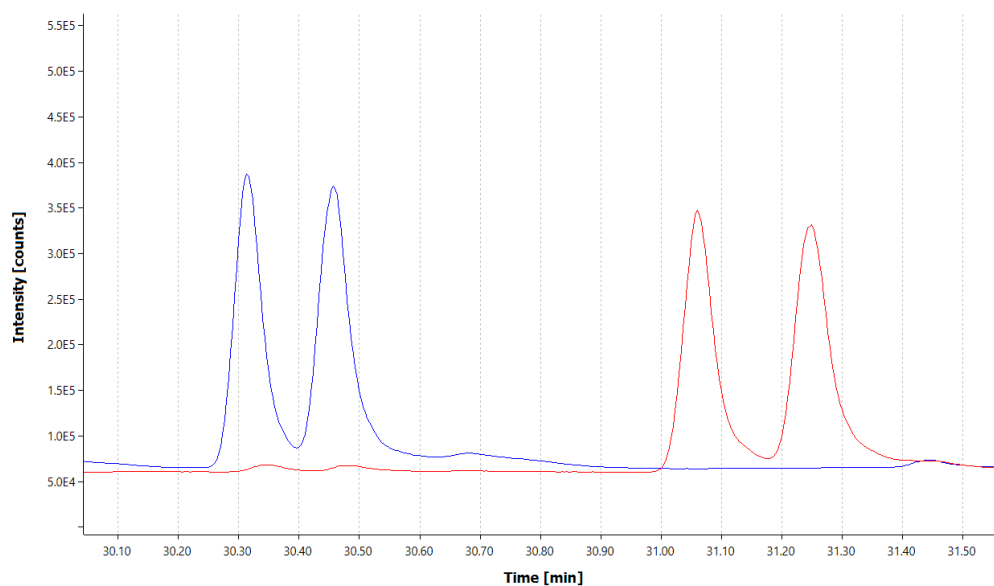
Entrada	Enzima	Conv	<i>ee cis</i> (%)	<i>ee trans</i> (%)	<i>dr cis trans</i> (%)	
1	ATA-200	25	>99(S, R)	>99(S, S)	35	65
2	ATA-238	36	34(S, R)	>99(S, S)	41	59
3	ATA-254	49	98(S, R)	>99(S, S)	78	22
4	ATA-412	26	>99(R, S)	>99(R, R)	62	38
5	ATA-415	33	65(R, S)	>99(R, R)	27	73
6	ATA-113	81	>99(S, R)	>99(S, S)	32	68
7	ATA-234	39	57(S, R)	>99(S, S)	34	67
8	ATA-P1-G05	66	>99(S, R)	>99(S, S)	29	71
9	ATA-033	45	79(R, S)	93(R, R)	27	73



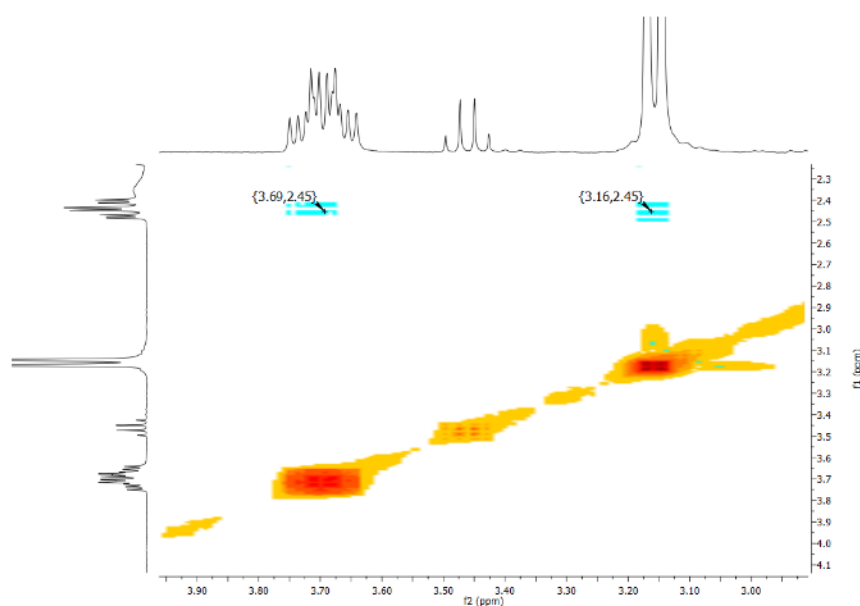
Entrada	Enzima	Conv	<i>ee cis</i> (%)	<i>ee trans</i> (%)	<i>dr cis trans</i> (%)	
1	ATA-200	10	-	-	-	-
2	ATA-238	63	>99(S, R)	>99(S, S)	82	18
3	ATA-254	81	>99(S, R)	>99(S, S)	74	26
4	ATA-412	36	>99(R, S)	-	100	0
5	ATA-415	63	>99(R, S)	>99	75	25
6	ATA-113	15	>99(S, R)	-	100	0
7	ATA-234	41	>99(S, R)	>99(S, S)	80	20
8	ATA-P1-G05	38	>99(S, R)	>99(S, S)	87	13
9	ATA-033	52	>99(R, S)	>99(R, R)	79	21

Asignación de la configuración relativa y absoluta

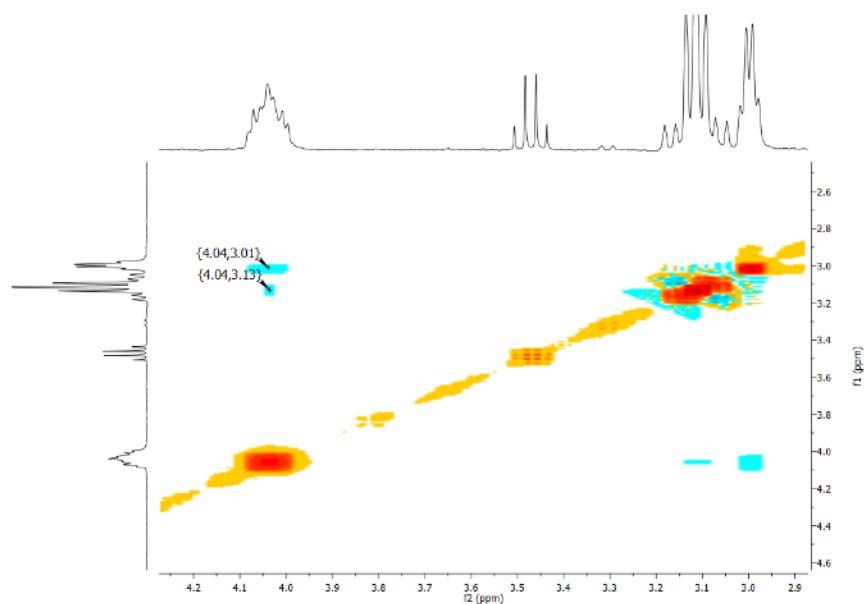
Para la asignación de la configuración relativa y absoluta se aislaron primero los diastereoisómeros de las acetamidas. Estos compuestos se analizaron por CG-FID y se constató que se encontraban de a pares de enantiómeros en el cromatograma. A continuación, se muestra el cromatograma correspondiente al derivado alílico (**7f**) a modo de ejemplo.



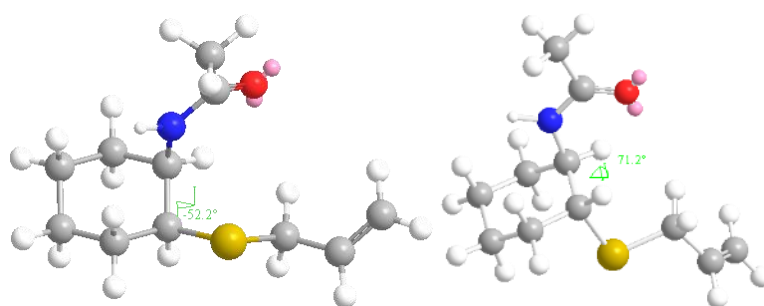
Cada diastereoisómero fue analizado por ^1H -RMN y su correspondiente efecto nuclear Overhauser 2D (NOESY). Los espectros siguientes corresponden al cromatograma en azul y en rojo respectivamente.



Espectro de NOESY para el compuesto aislado **7f** correspondiente al cromatograma azul.



Espectro de NOESY para el compuesto aislado **7f** correspondiente al cromatograma rojo.



Por un lado, en base a las estructuras minimizadas por MM2 de los isómeros *cis* y *trans* al analizar los espectros de NOESY, puede observarse que en uno de los diastereoisómeros no existente entre los H del metileno adyacentes al átomo de azufre con el H del metino unido a nitrógeno. Debido a la mayor cercanía de este metileno al H del metino en posición α al azufre por estar del mismo lado del plano, se asignó a este espectro como el correspondiente a los isómeros *trans*, correspondiendo a los últimos dos picos del cromatograma (rojo). El mismo procedimiento fue llevado a cabo para los compuestos **7j'**, **7g'** y **7o'**, observándose el mismo comportamiento.

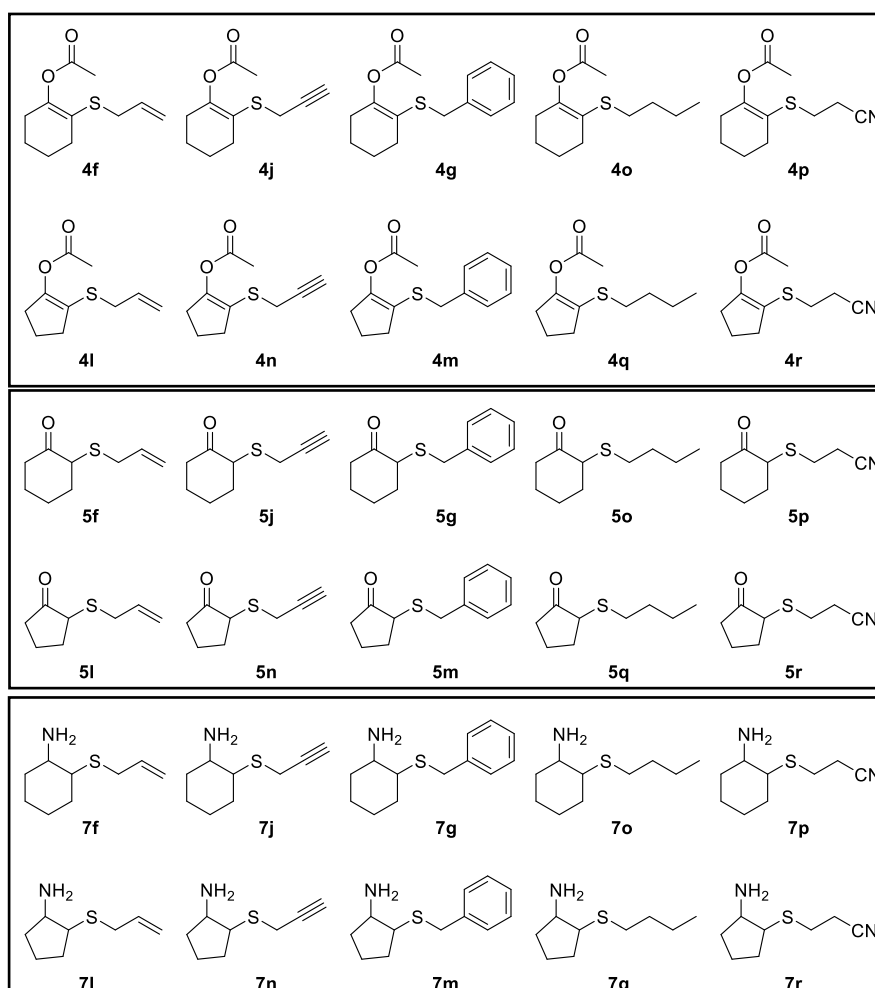
Una vez asignada la configuración relativa, la configuración absoluta se realizó teniendo en cuenta las estereopreferencias previamente establecidas de las transaminasas usadas en este trabajo. Considerando que todas las transaminasas de preferencia *R* mostraron mayores áreas relativas de un mismo pico de cada diastereoisómero, y a que lo mismo fue observado para las transaminasas de preferencia *S*, se asignó dentro del par de isómeros *cis* o *trans* la configuración absoluta del centro estereogénico donde se ubica el átomo de nitrógeno, y, por consiguiente, la estereoquímica del centro estereogénico vecino.

Analítica

Tiempos de retención por Cromatografía Gaseosa

Los análisis por CG fueron llevados a cabo en un equipo Agilent 7890A GC-FID. Para determinar la conversión se utilizó una columna de fase estacionara aquiral HP-5 (30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m, 12.2 psi N₂). Para la determinación de *ee* y *dr* se empleó la columna de fase estacionaria quiral ChiralsilDex CB (25 m x 0.25 mm x 0.25 μ m, 12.2 psi N₂).

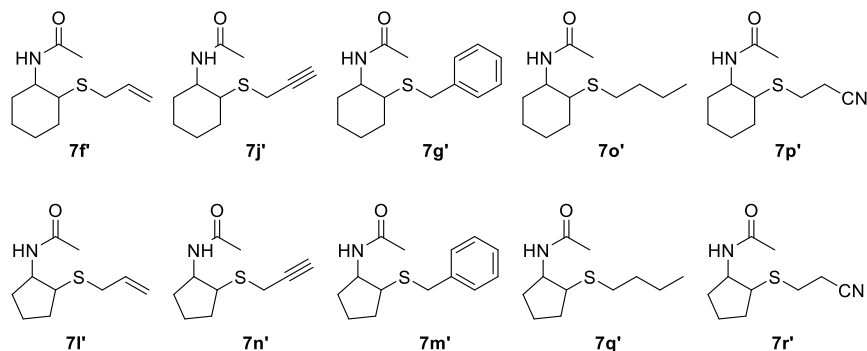
Tabla. Cromatografía Gaseosa para la determinación de la conversión de la hidrólisis de Z-enolésteres y de la aminación reductiva de β -cetosulfuros.



Compuesto	Programa de temperatura ^a	Tiempo (min)
4f	100/0/20/280/5	4.68
4g	100/0/5/210/0/20/280/2	19.46
4j	100/0/20/280/5	5.46
4l	100/0/20/280/5	4.09
4m	100/0/5/210/0/20/280/2	17.50
4n	100/0/20/280/5	4.82
4o	100/0/20/280/5	5.86
4p	100/0/5/210/0/20/280/2	15.52
4q	100/0/20/280/5	4.77
4r	100/0/5/210/0/20/280/2	15.21
5f	100/0/20/280/5	3.66
5g	100/0/5/210/0/20/280/2	16.85
5j	100/0/20/280/5	3.96
5l	100/0/20/280/5	3.07
5m	100/0/5/210/0/20/280/2	14.71
5n	100/0/20/280/5	3.32
5o	100/0/20/280/5	4.39
5p	100/0/5/210/0/20/280/2	12.69
5q	100/0/20/280/5	3.79
5r	100/0/5/210/0/20/280/2	9.66
7f	100/0/20/280/5	3.81 (<i>cis</i>), 3.89 (<i>trans</i>)
7g	100/0/5/210/0/20/280/2	17.07 (<i>cis</i>), 17.46 (<i>trans</i>)
7j	100/0/20/280/5	4.03 (<i>cis</i>), 4.12 (<i>trans</i>)
7l	100/0/20/280/5	3.18 (<i>cis</i>), 3.27 (<i>trans</i>)
7m	100/0/5/210/0/20/280/2	14.90 (<i>cis</i>), 15.35 (<i>trans</i>)
7n	100/0/20/280/5	3.37 (<i>cis</i>), 3.48 (<i>trans</i>)
7o	100/0/20/280/5	4.54 (<i>cis</i>), 4.63 (<i>trans</i>)
7p	100/0/5/210/0/20/280/2	13.15 (<i>cis</i>), 13.56 (<i>trans</i>)
7q	100/0/20/280/5	3.87 (<i>cis</i>), 3.98 (<i>trans</i>)
7r	100/0/5/210/0/20/280/2	13.33 (<i>cis</i>), 13.75 (<i>trans</i>)

^a Temperatura inicial (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ temperatura final (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ temperatura final (°C)/ tiempo (min)

Tabla. Cromatografía Gaseosa para la determinación de *ee* y *dr* en la aminación reductiva de β -cetosulfuros.

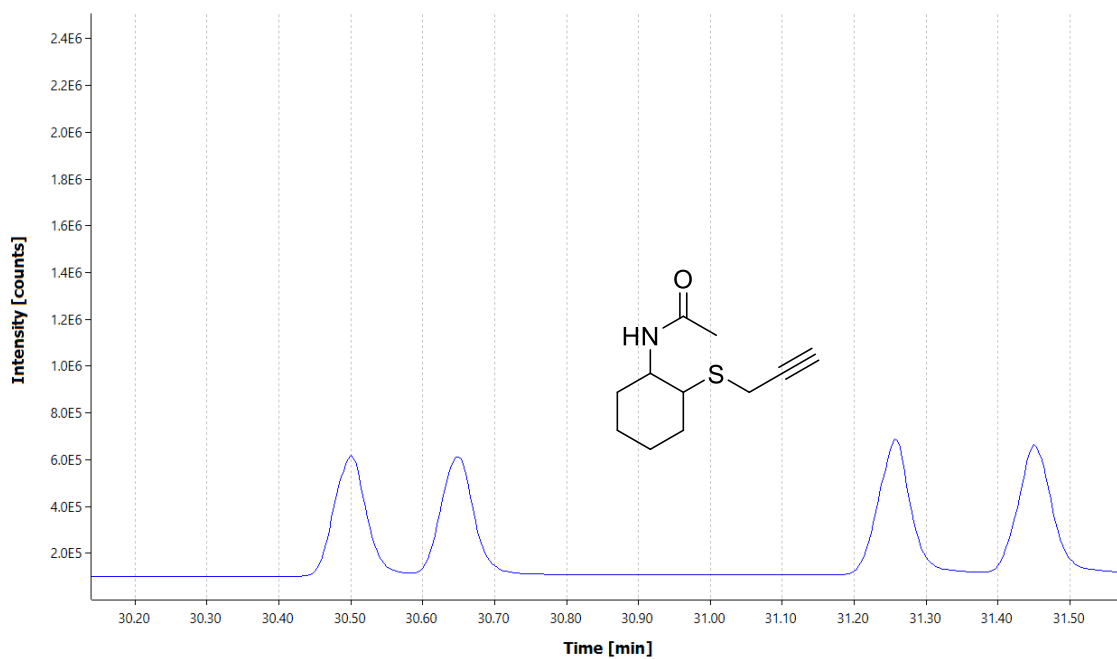


Compuesto	Programa de temperatura ^a	Tiempo (min)	
		<i>cis</i>	<i>trans</i>
7f'	90/0/2,5/150/0/10/200/7	28.91 (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>), 29.06 (1 <i>R</i> , 2 <i>S</i>)	29.66 (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>), 29.88 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)
7g'	120/0/2,5/180/45/40/200/5	57.56 (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>), 58.81 (1 <i>R</i> , 2 <i>S</i>)	62.96 (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>), 64.79 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)
7j'	90/0/2,5/150/0/10/200/7	30.50 (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>), 30.65 (1 <i>R</i> , 2 <i>S</i>)	31.26 (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>), 31.45 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)
7l'	90/0/2,5/150/0/10/170/10/40/200/2	27.73 (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>), 28.25 (1 <i>R</i> , 2 <i>S</i>)	30.25 (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>), 30.68 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)
7m'	120/0/2,5/180/40/20/200/2	45.80 (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>), 47.36 (1 <i>R</i> , 2 <i>S</i>)	53.70 (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>), 54.81 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)
7n'	90/0/2,5/150/0/4/170/8/40/200/2	31.71 (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>), 32.44 (1 <i>R</i> , 2 <i>S</i>)	34.43 (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>), 34.92 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)
7o'	90/0/2/160/0/10/200/5	39.18 (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>), 39.37 (1 <i>R</i> , 2 <i>S</i>)	40.04 (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>), 40.28 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)
7p'	120/0/2/175/45/40/200/5	54.69 (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>), 56.27 (1 <i>R</i> , 2 <i>S</i>)	63.25 (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>), 65.61 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)
3.i'	90/0/2,5/150/0/4/170/8/40/200/2	31.35 (1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>), 32.28 (1 <i>R</i> , 2 <i>S</i>)	34.50 (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>), 35.02 (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)
3.j'	120/0/2/175/45/40/200/5	(1 <i>S</i> , 2 <i>R</i>), (1 <i>R</i> , 2 <i>S</i>)	(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>), (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)

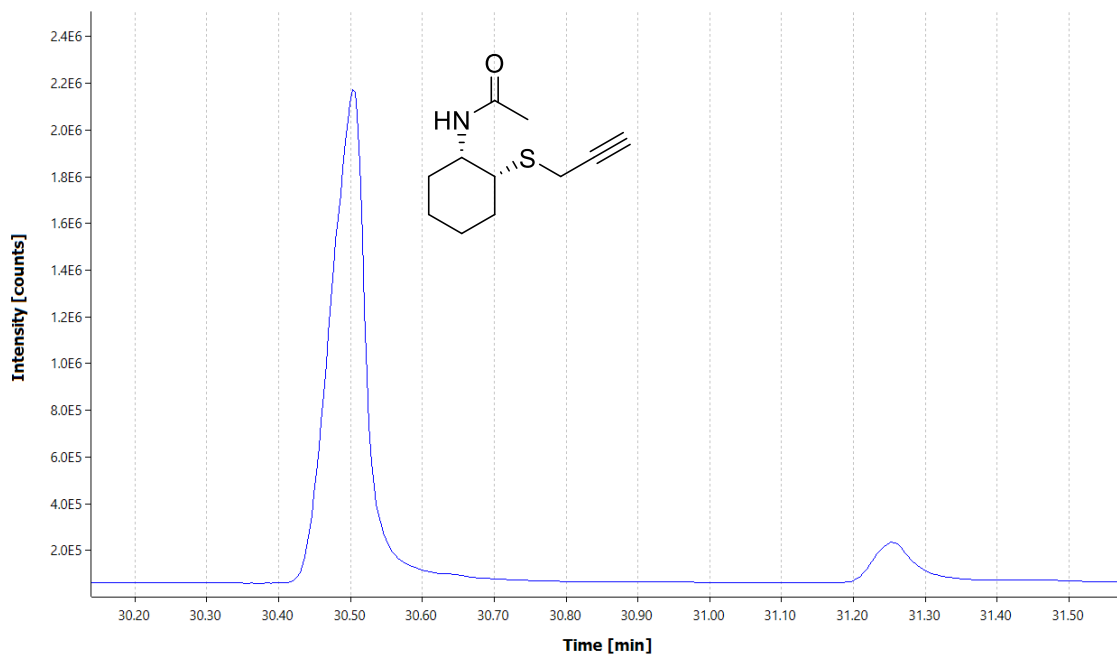
^a Temperatura inicial (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ temperatura final (°C)/ tiempo (min)/ rampa (°C/min)/ temperatura final (°C)/ tiempo (min).

Cromatogramas de las β -sulfanil amidas ópticamente activas

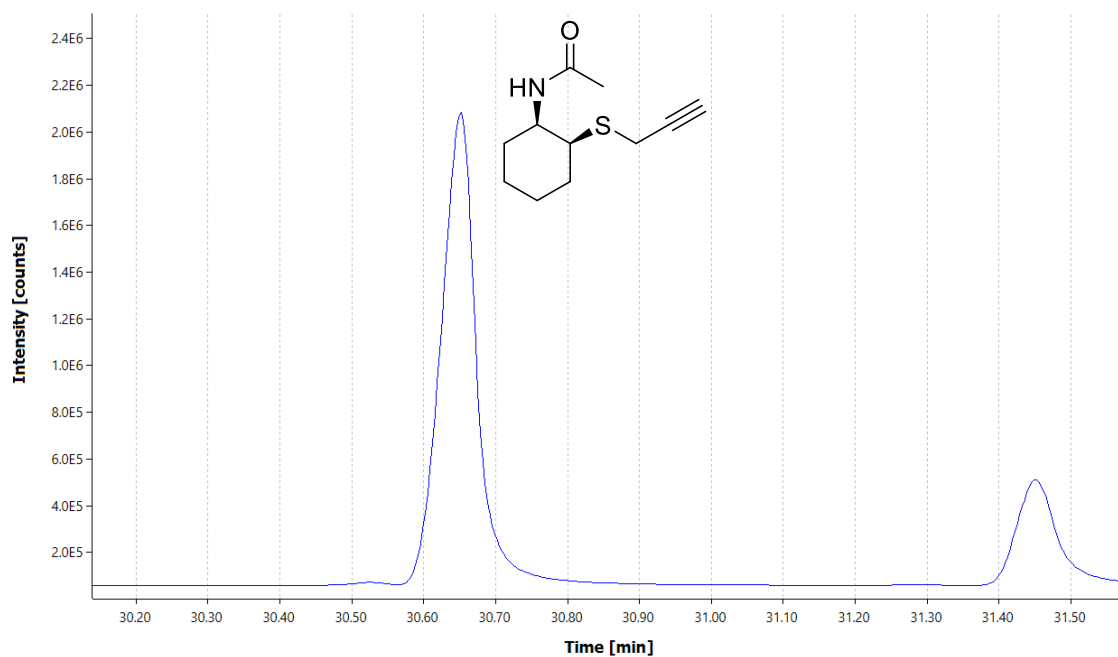
7j' obtenido por reducción química



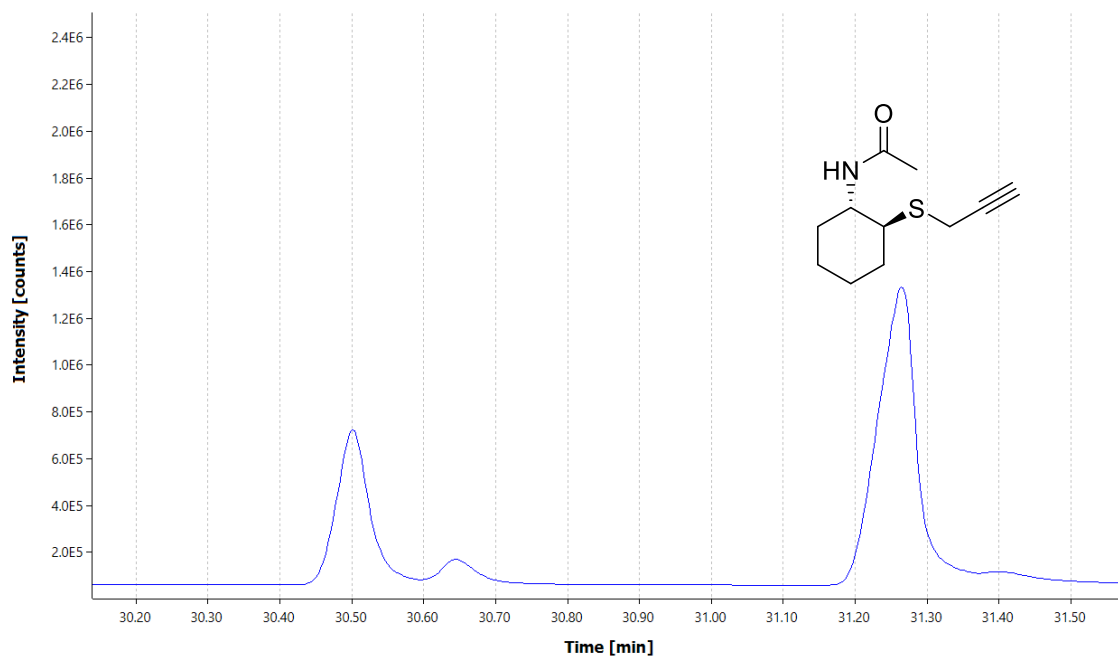
(1S, 2R)-7j' obtenido después de la transaminación con ATA-200.



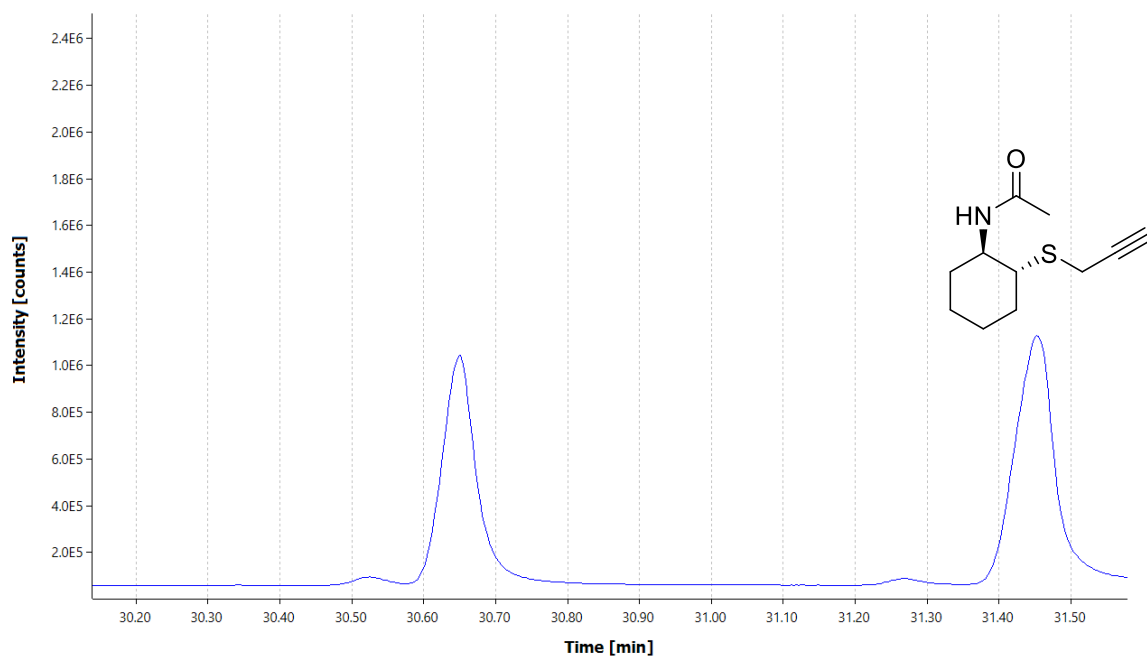
(1*S*, 2*S*)-7j' obtenido después de la transaminación con ATA-412.



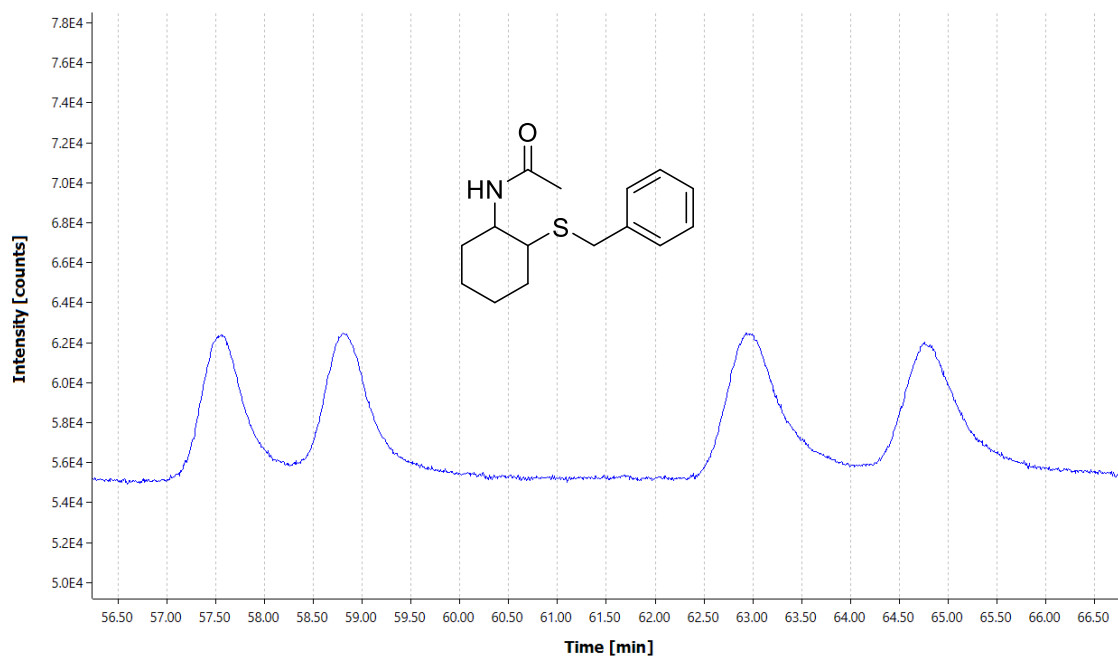
(1*R*, 2*S*)-7j' obtenido después de la transaminación con ATA-238.



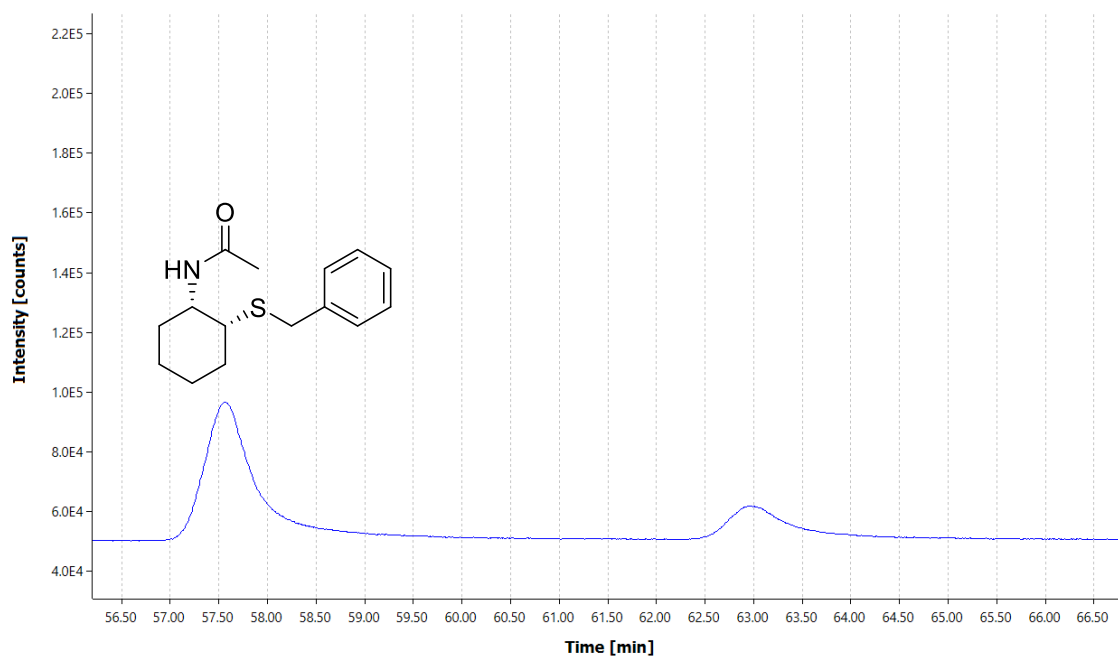
(1*R*, 2*R*)-7j' obtenido después de la transaminación con ATA-415.



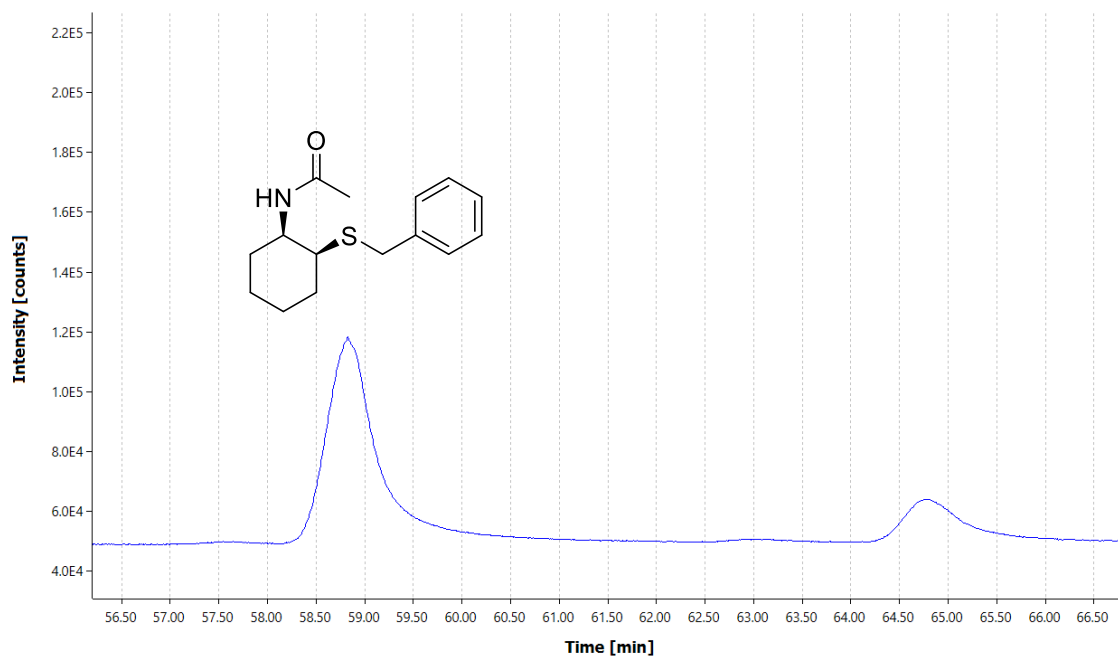
7g' obtenido por reducción química



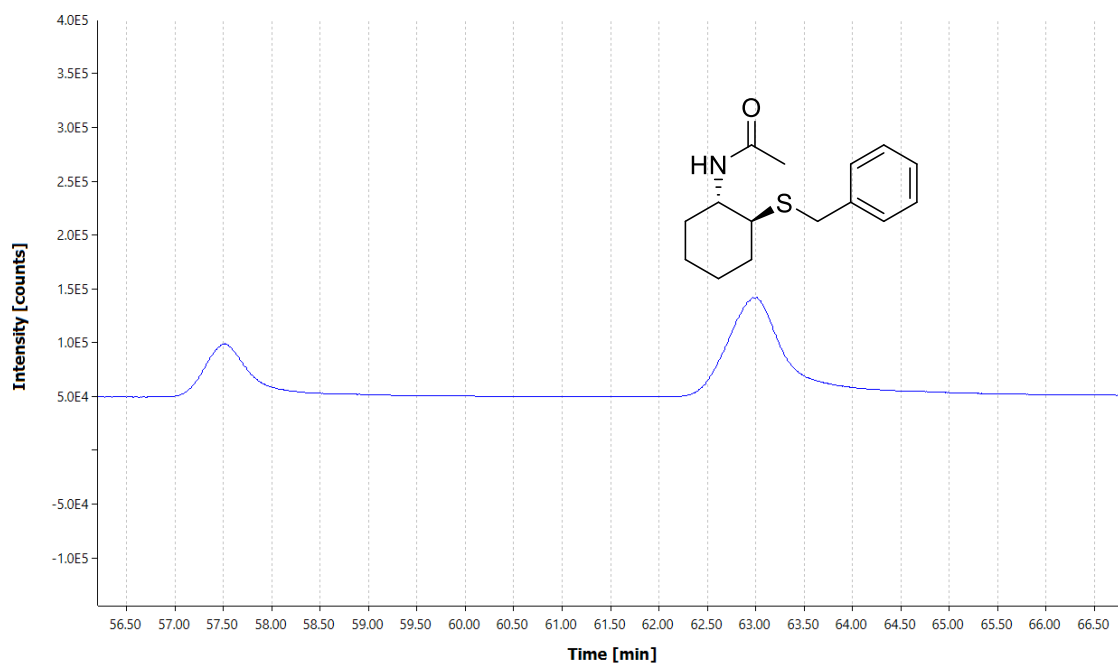
(1*S*, 2*R*)-7g' obtenido después de la transaminación con ATA-250.



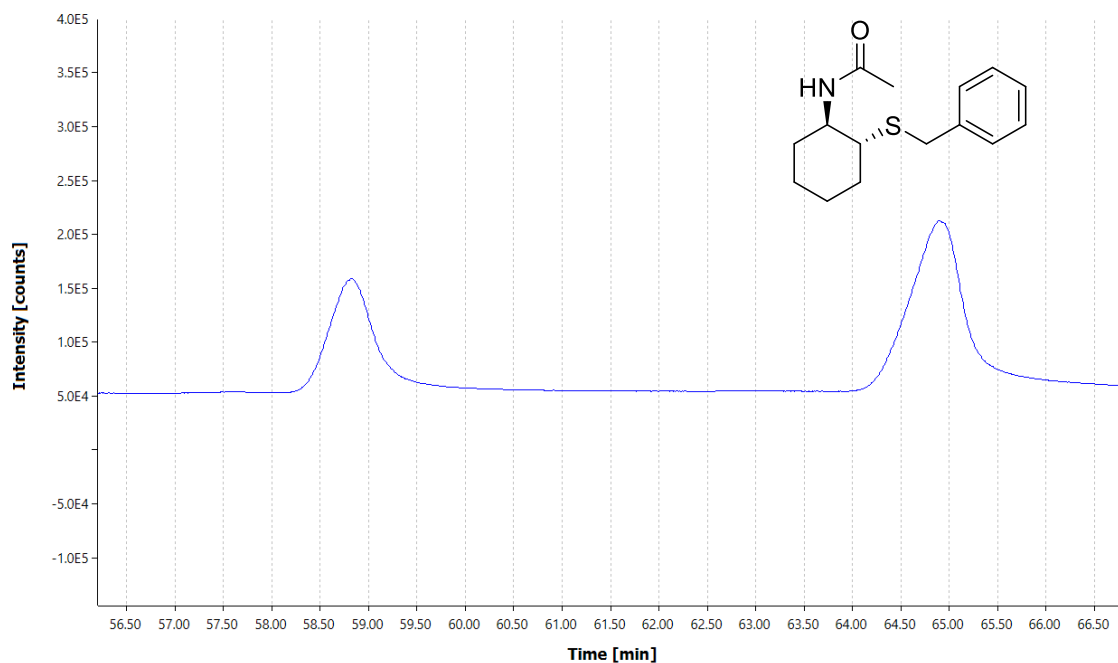
(1*S*, 2*S*)-7g' obtenido después de la transaminación con ATA-412.



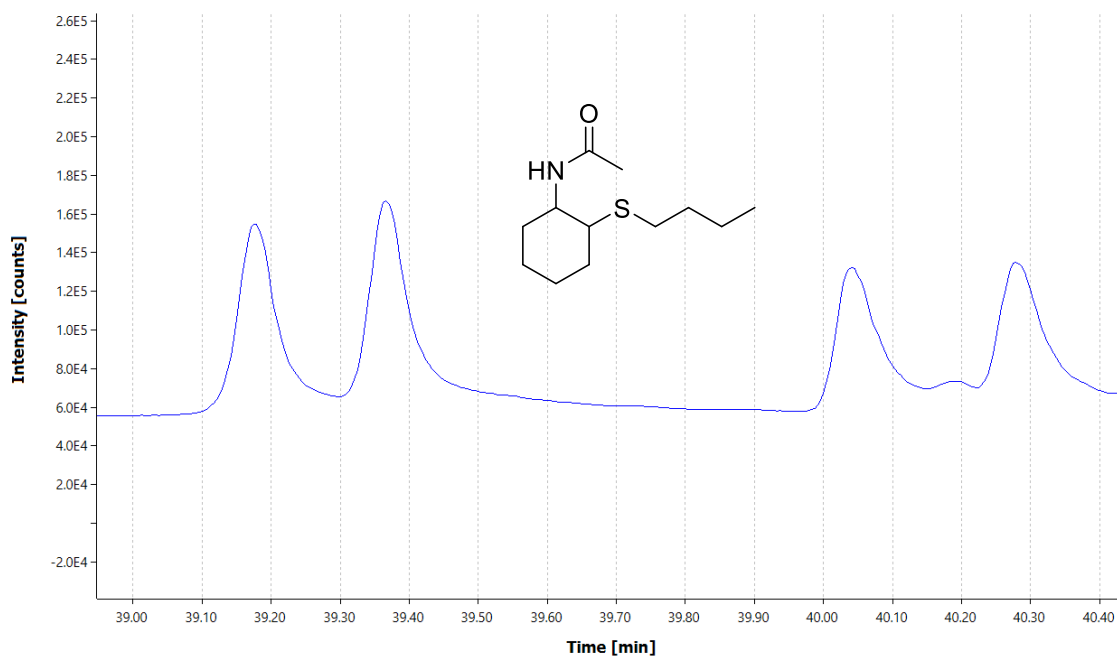
(1R, 2S)-7g' obtenido después de la transaminación con ATA-P1-G05.



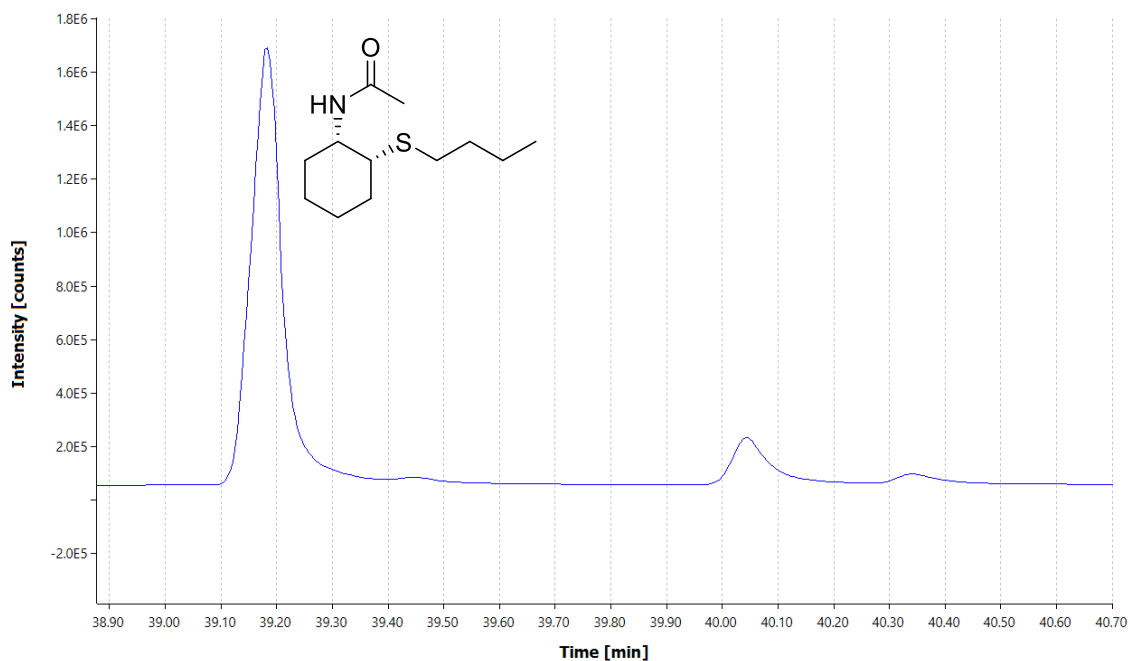
(1R, 2R)-7g' obtenido después de la transaminación con ATA-033.



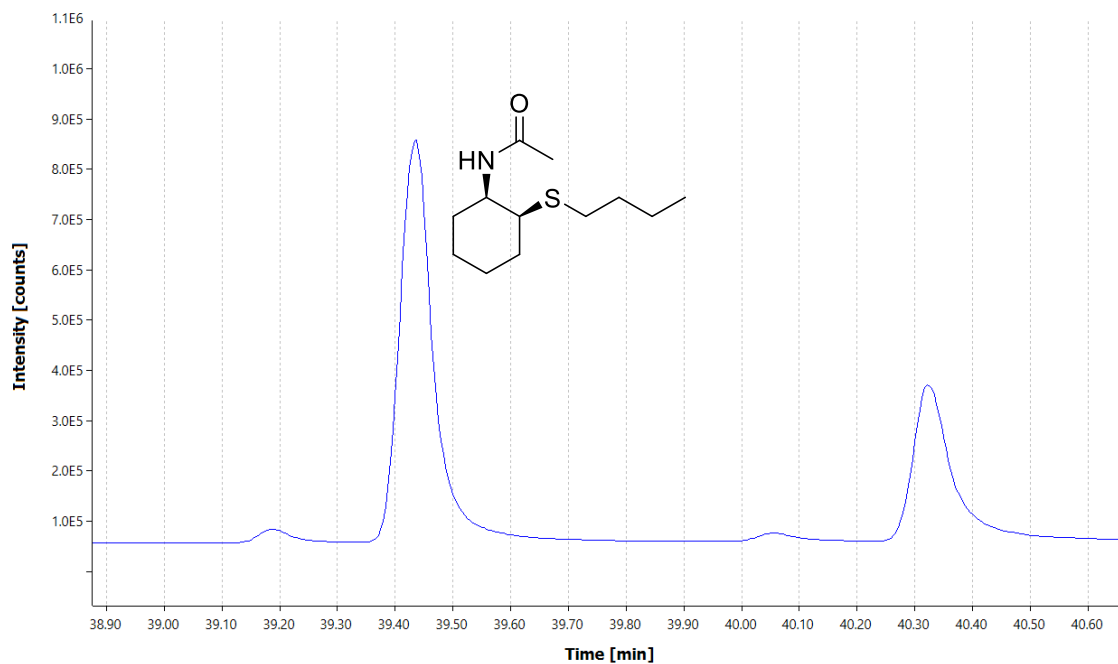
7o' obtenido por reducción química



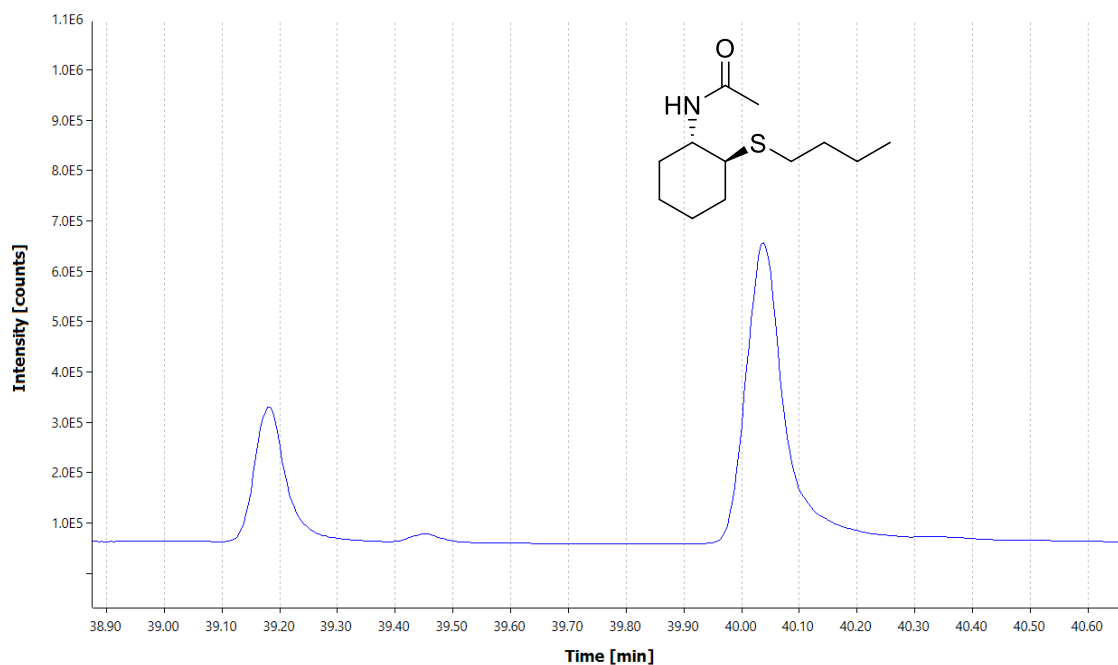
(1S, 2R)-7o' obtenido después de la transaminación con ATA-113.



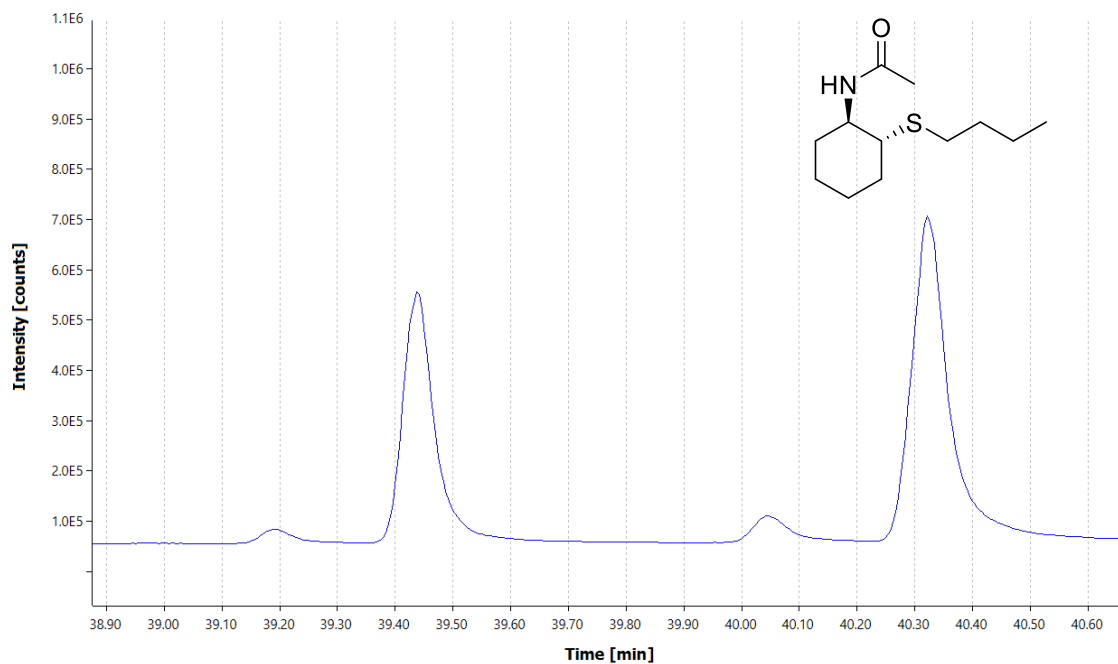
(1*S*, 2*S*)-7o' obtenido después de la transaminación con ATA-412.



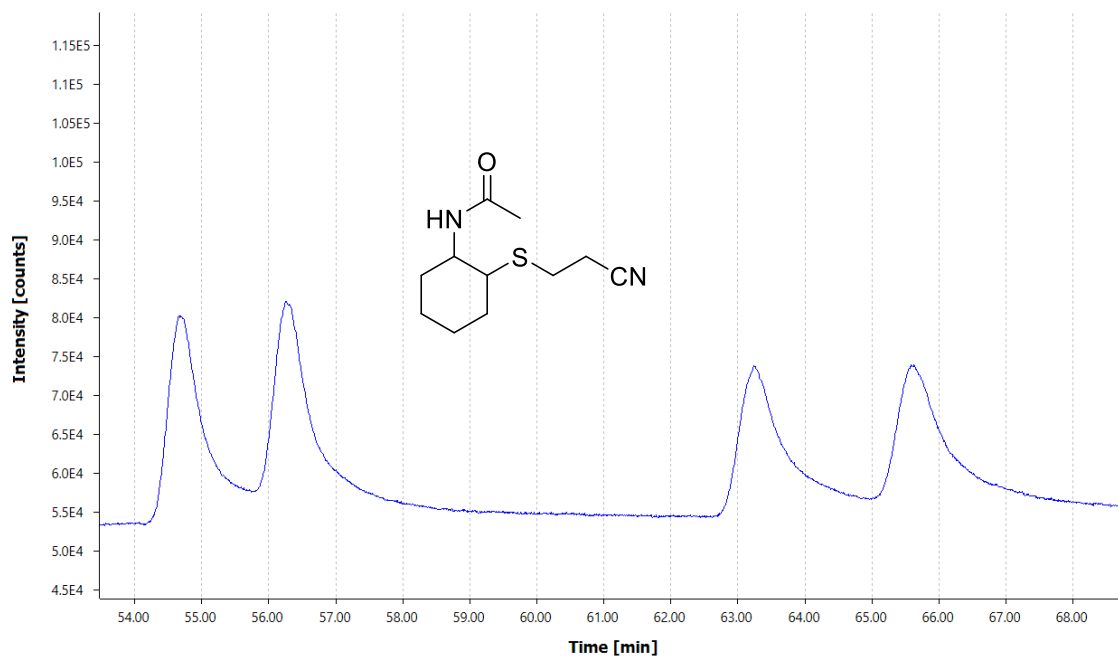
(1*R*, 2*S*)-7o' obtenido después de la transaminación con ATA-238.



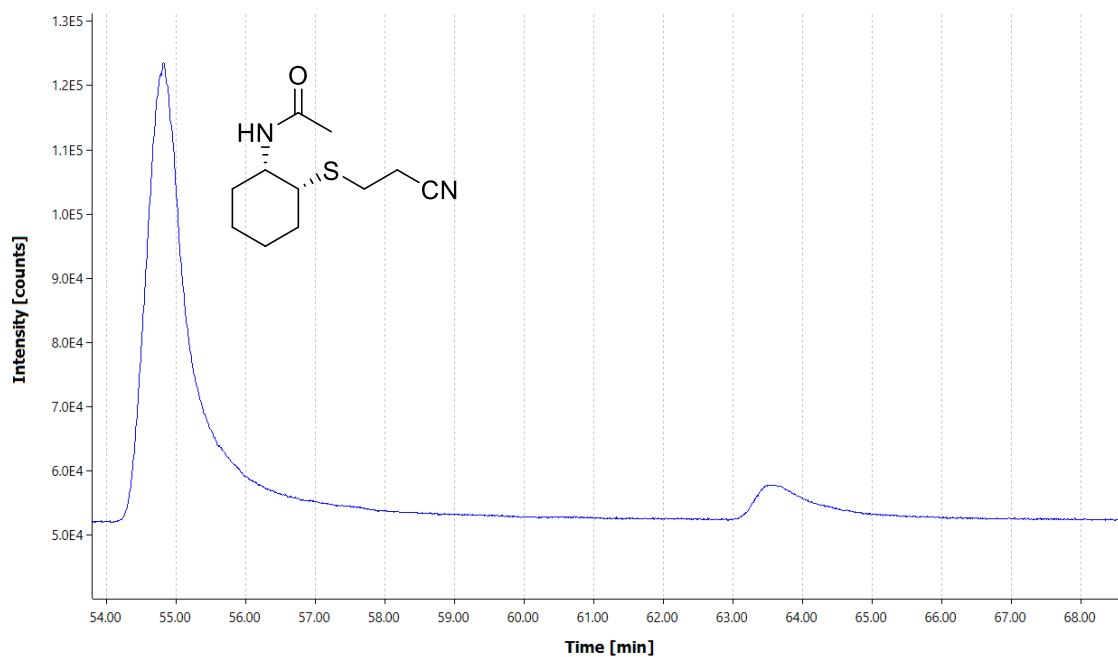
(1R, 2R)-7o' obtenido después de la transaminación con ATA-033.



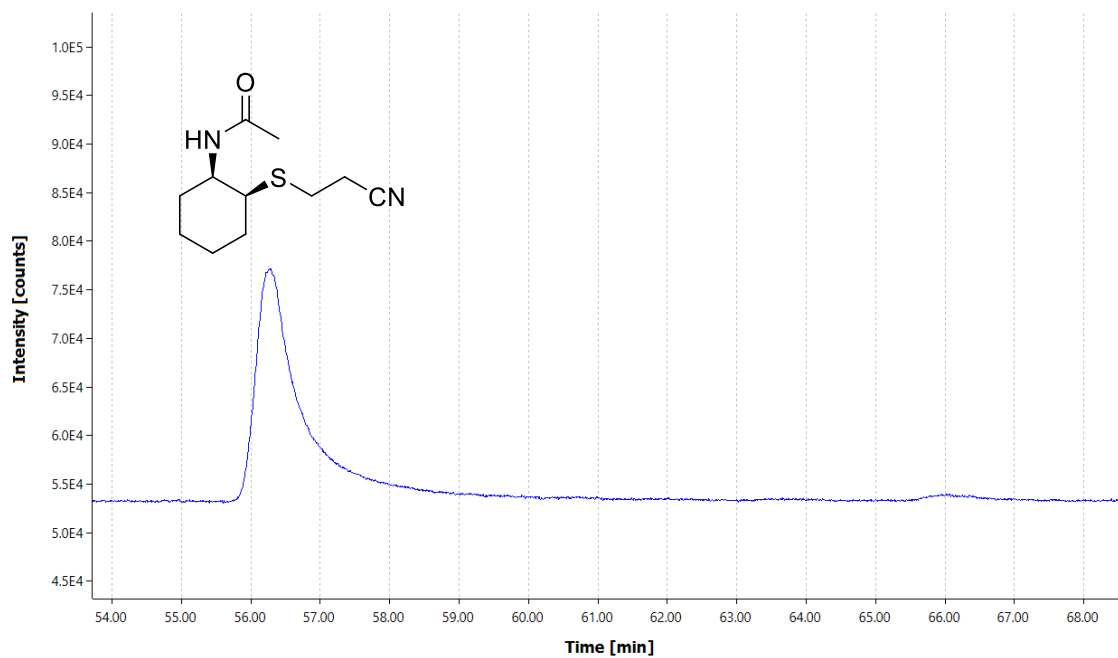
7p' obtenido por reducción química



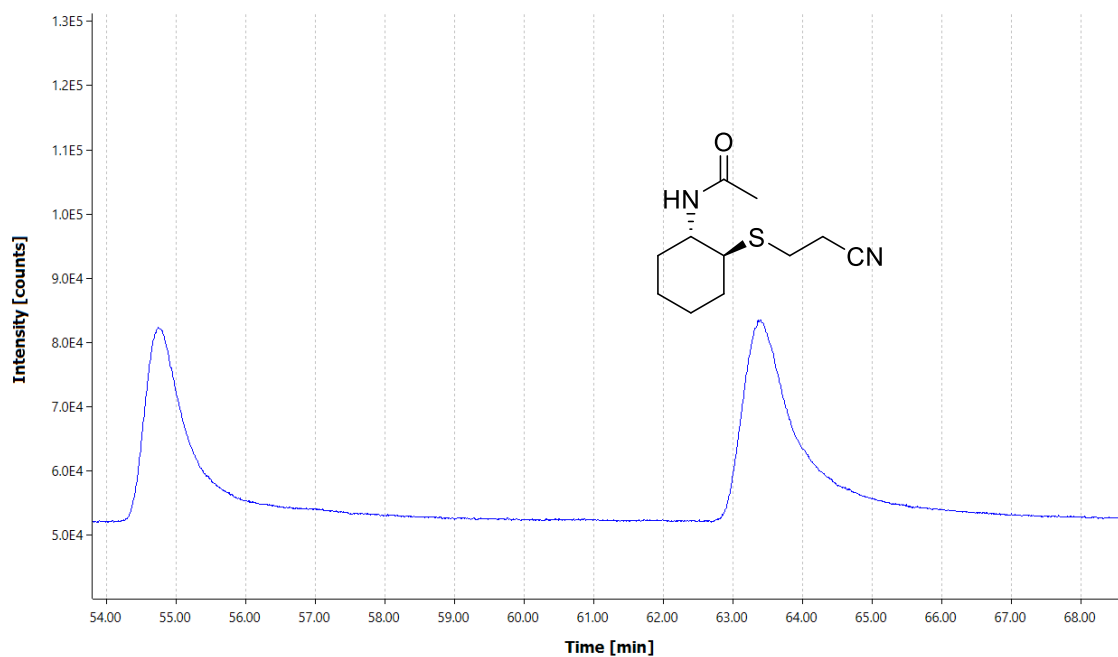
(1*S*, 2*R*)-7*p*' obtenido después de la transaminación con ATA-254.



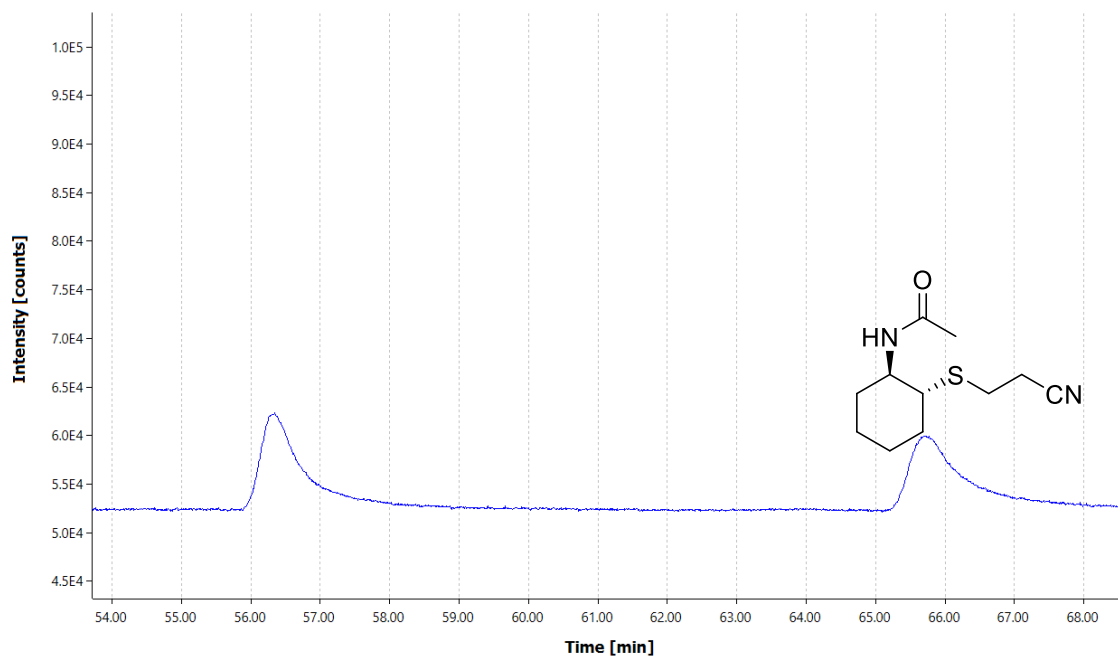
(1*R*, 2*S*)-7*p*' obtenido después de la transaminación con ATA-412.



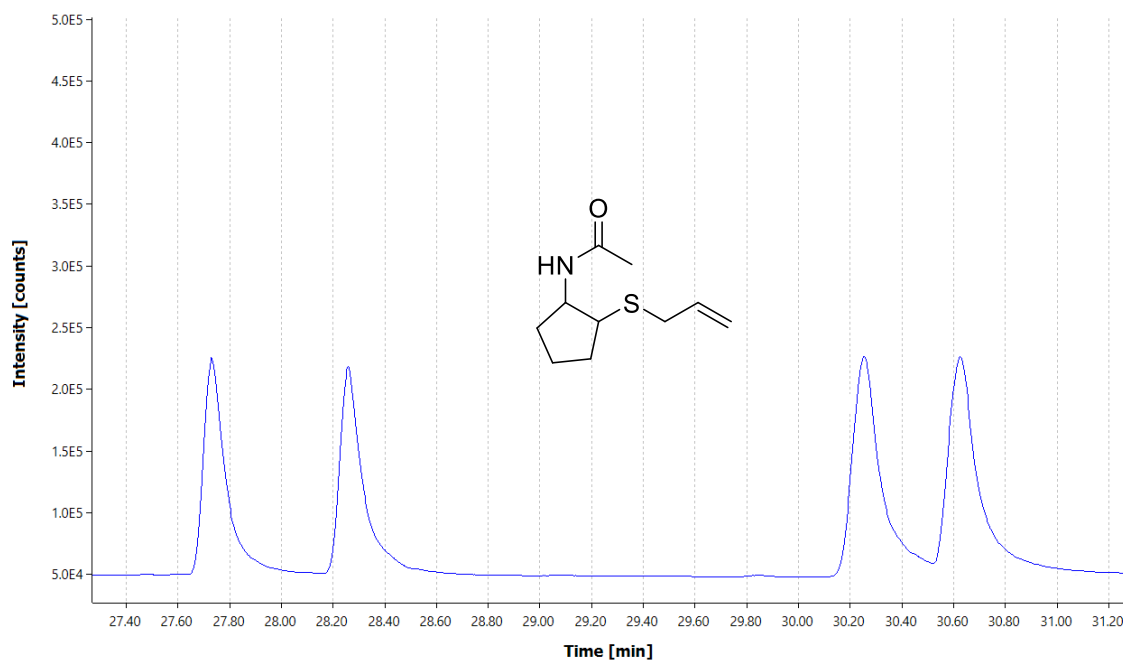
(1*S*, 2*S*)-7p' obtenido después de la transaminación con ATA-234.



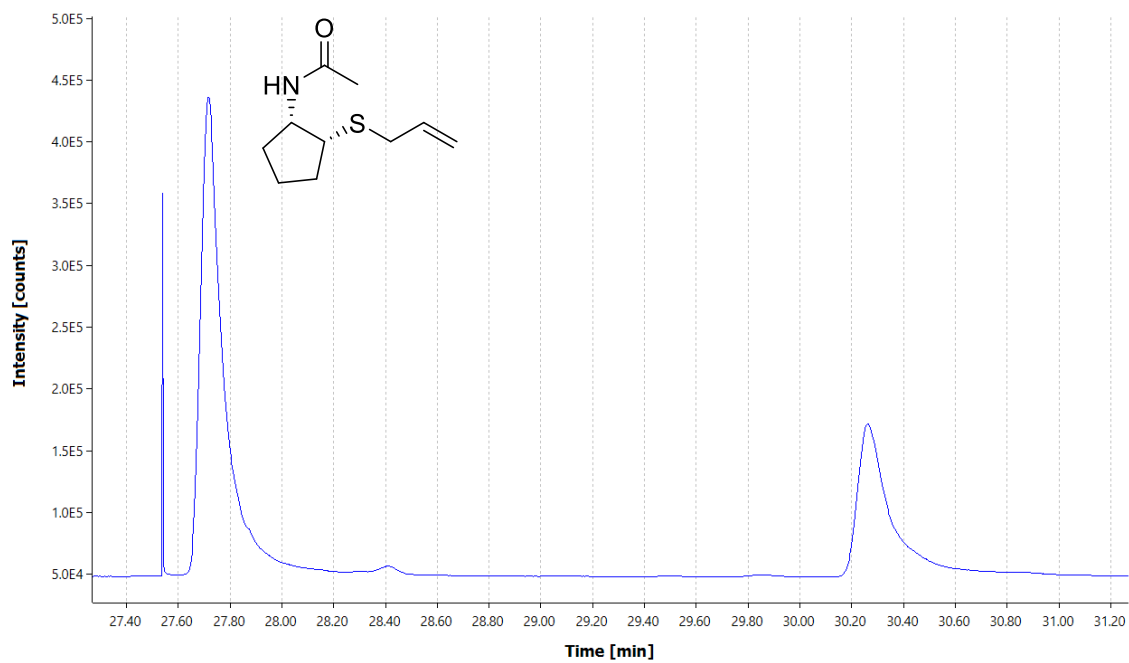
(1*R*, 2*R*)-7p' obtenido después de la transaminación con ATA-415.



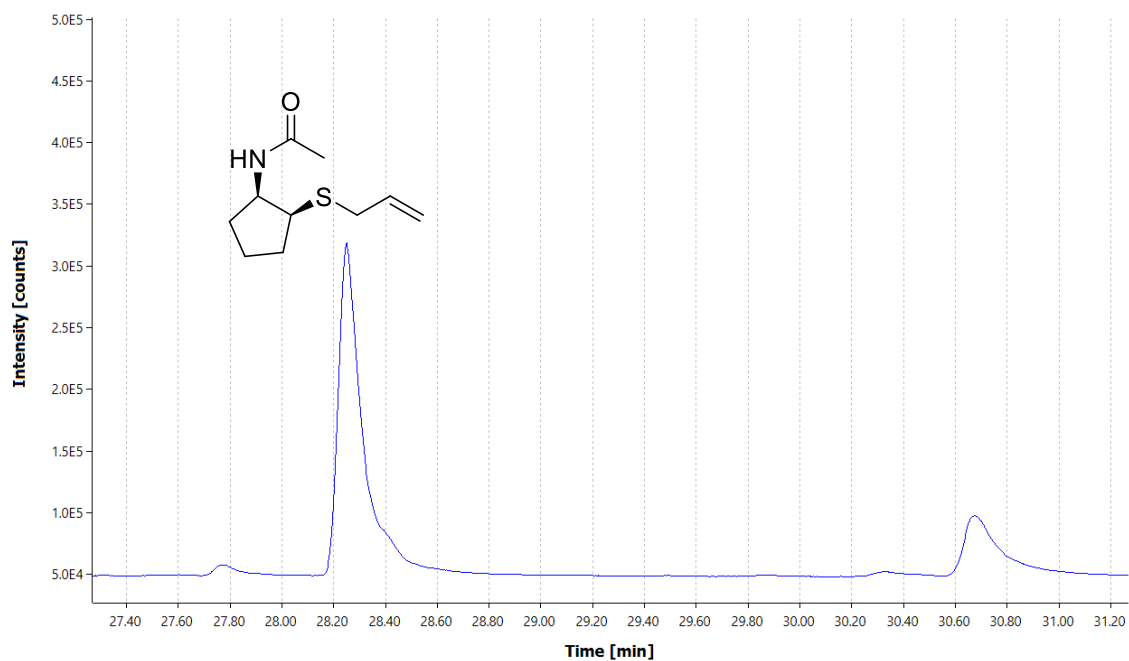
7I' obtenido por reducción química



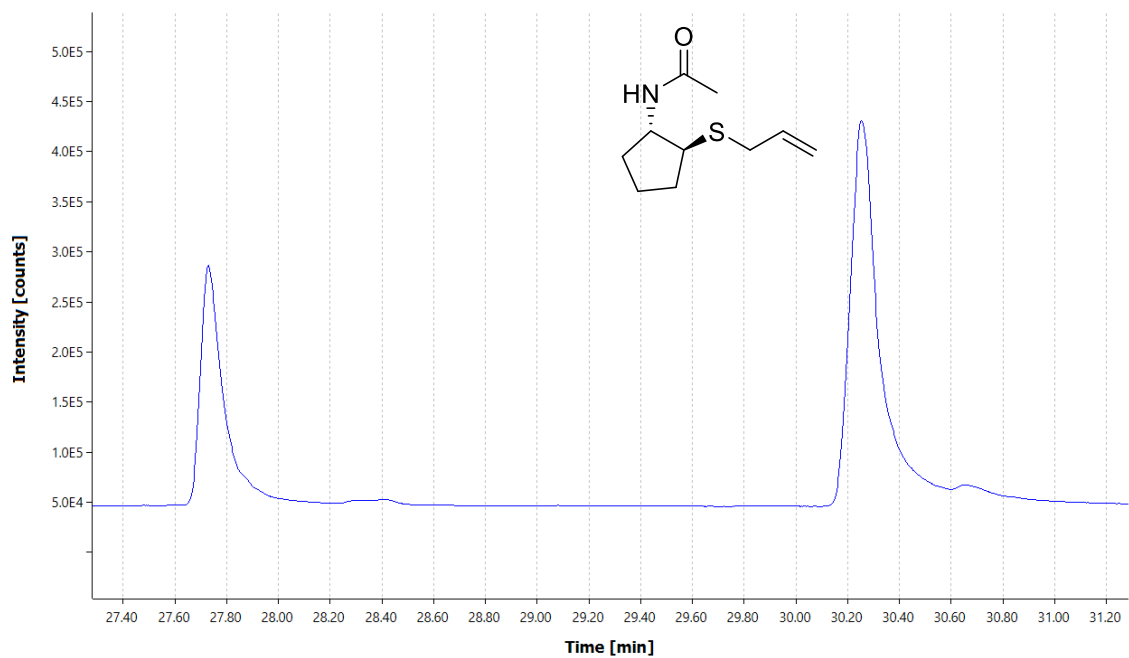
(1*S*, 2*R*)-7I' obtenido después de la transaminación con ATA-200.



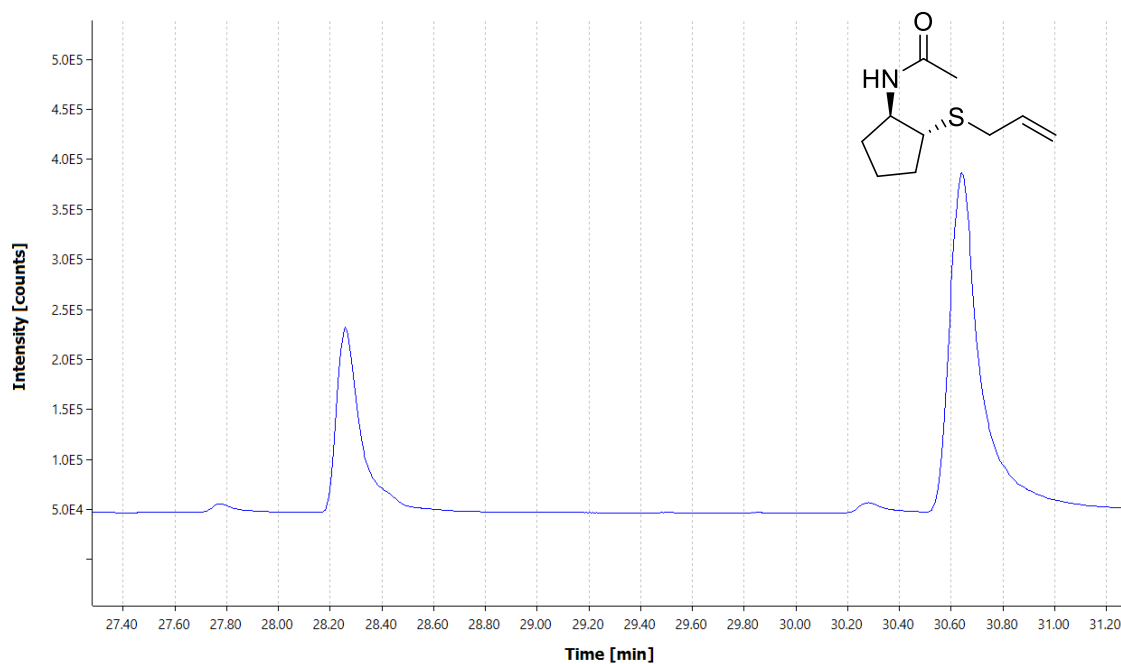
(1*R*, 2*S*)-7I' obtenido después de la transaminación con ATA-412.



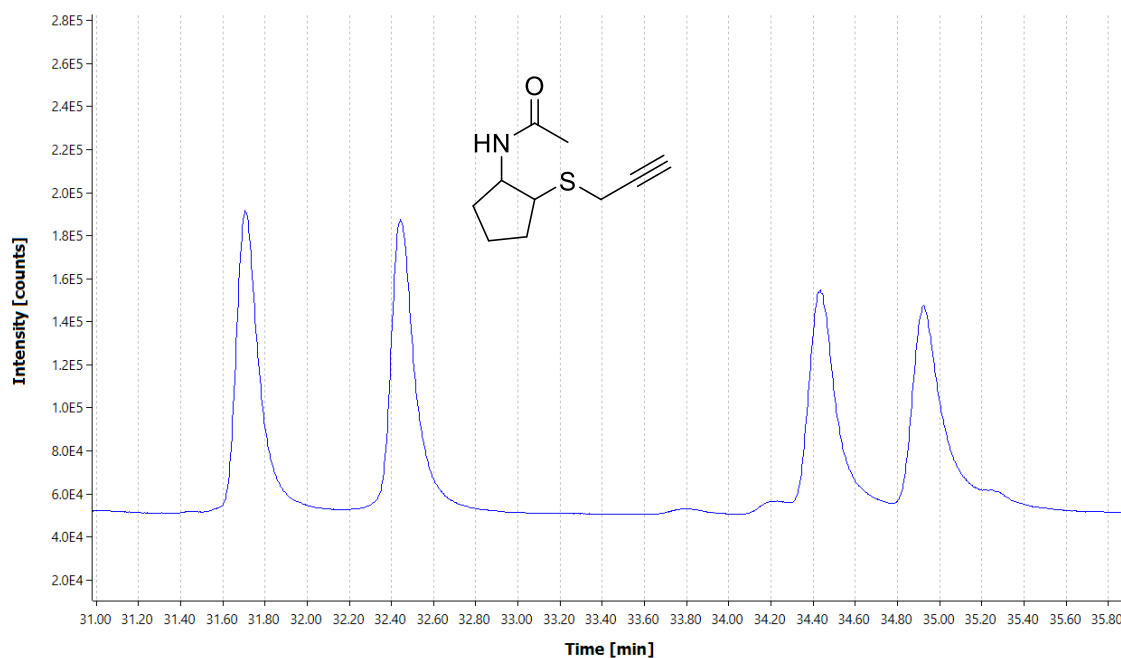
(1*S*, 2*S*)-7I' obtenido después de la transaminación con ATA-113.



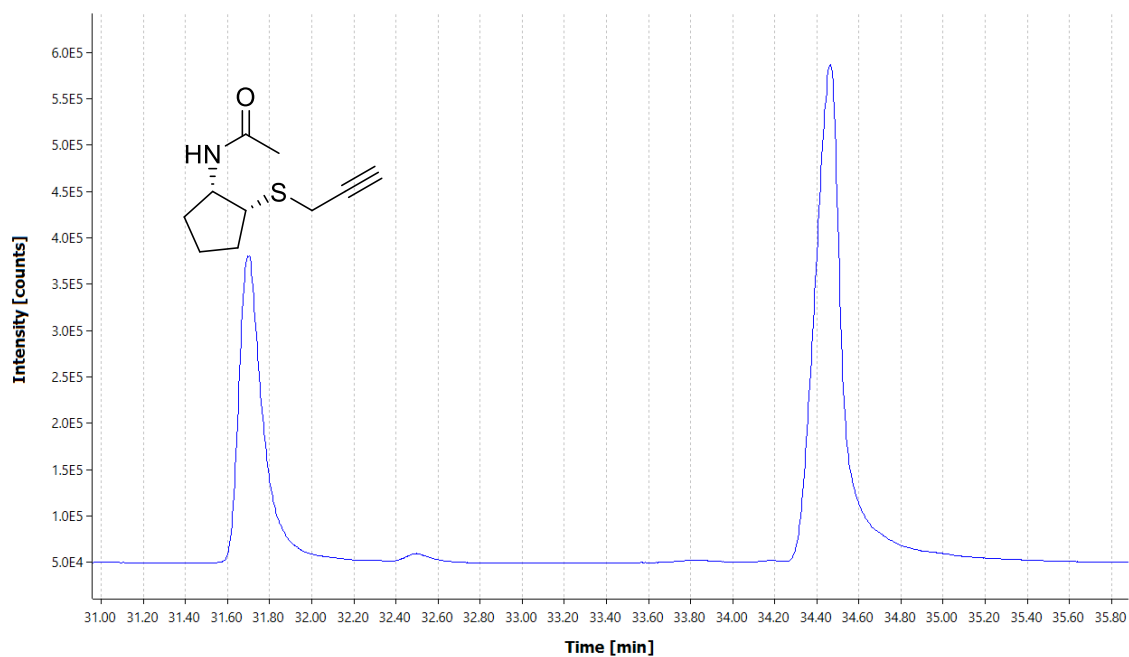
(1R, 2R)-7l' obtenido después de la transaminación con ATA-415.



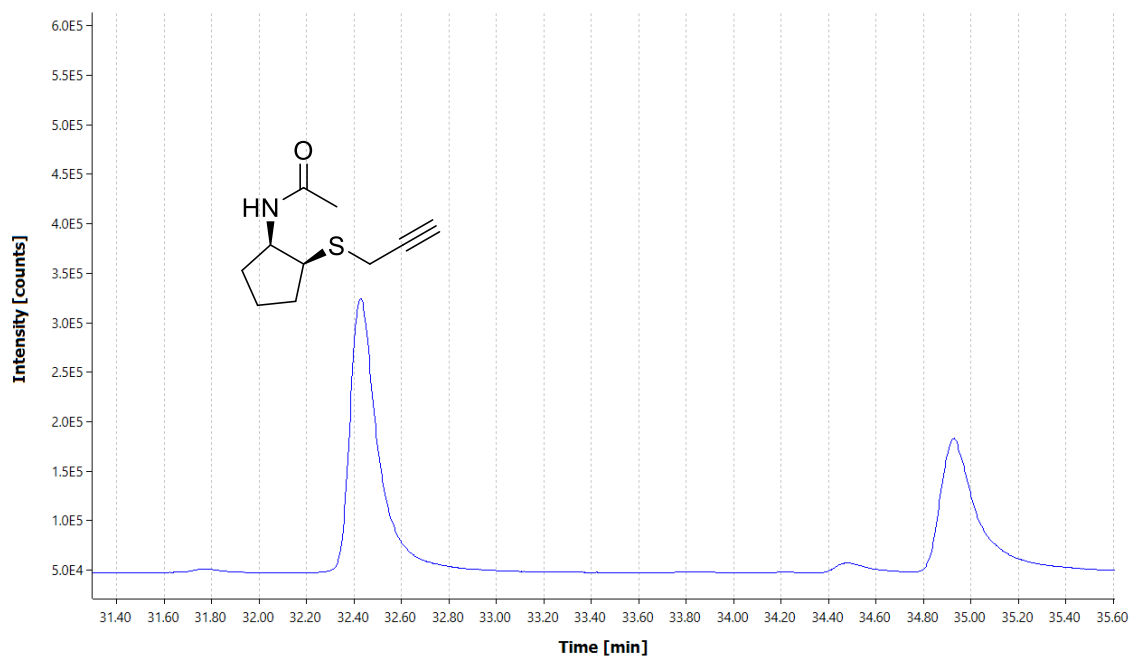
7n' obtenido por reducción química



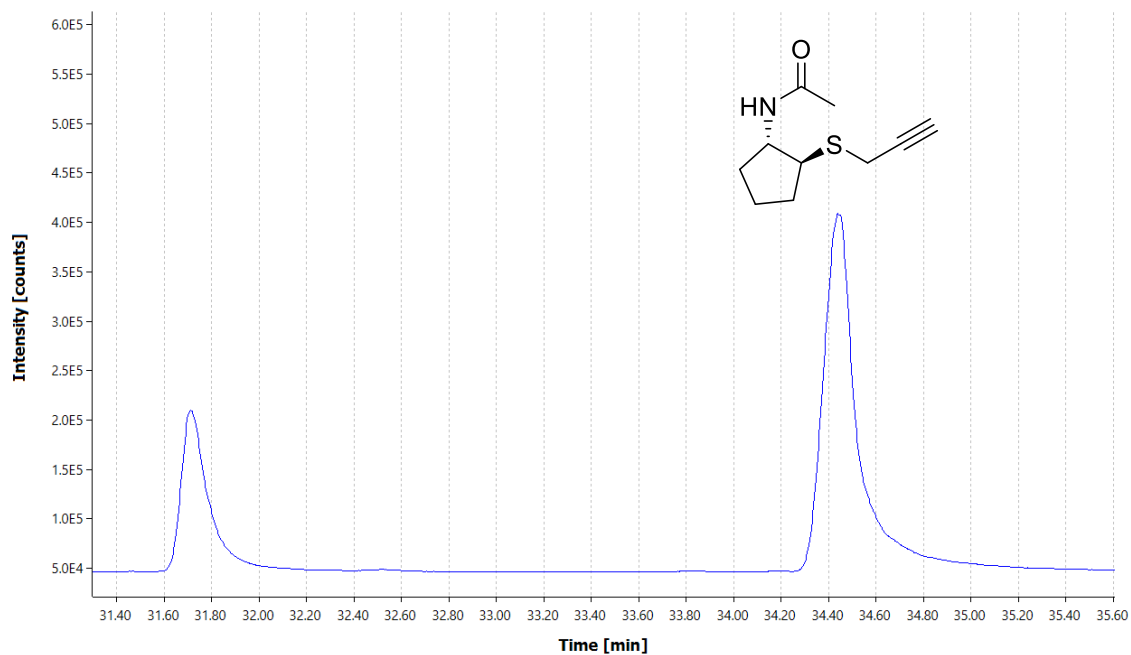
(1*S*, 2*R*)-7n' obtenido después de la transaminación con ATA-238.



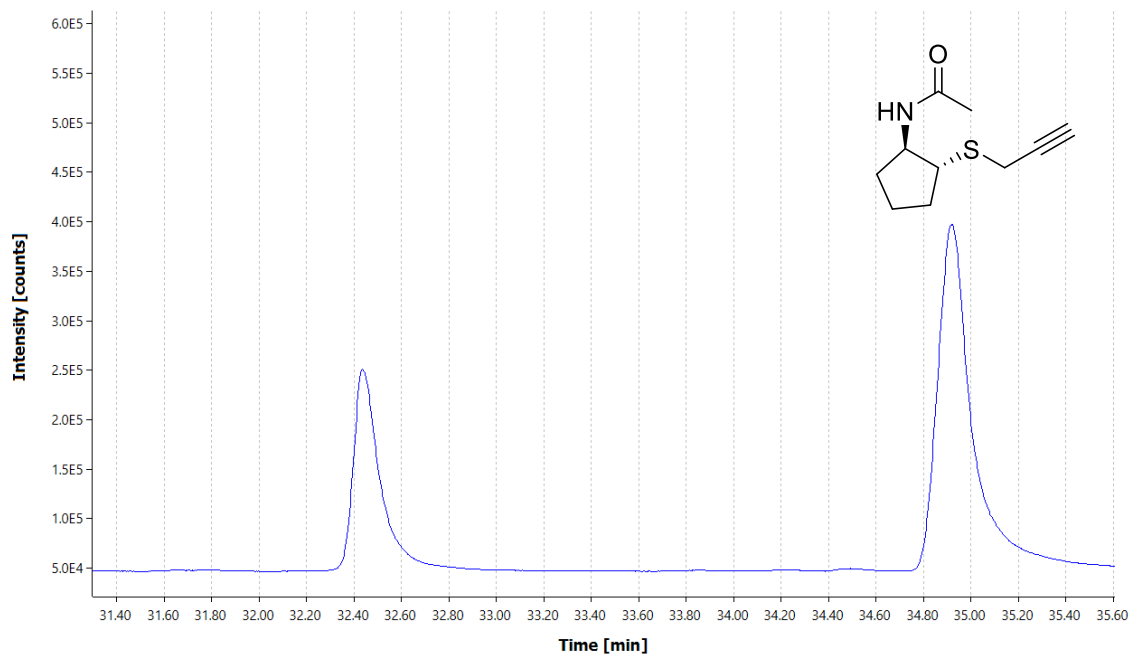
(1*R*, 2*S*)-7n' obtenido después de la transaminación con ATA-412.



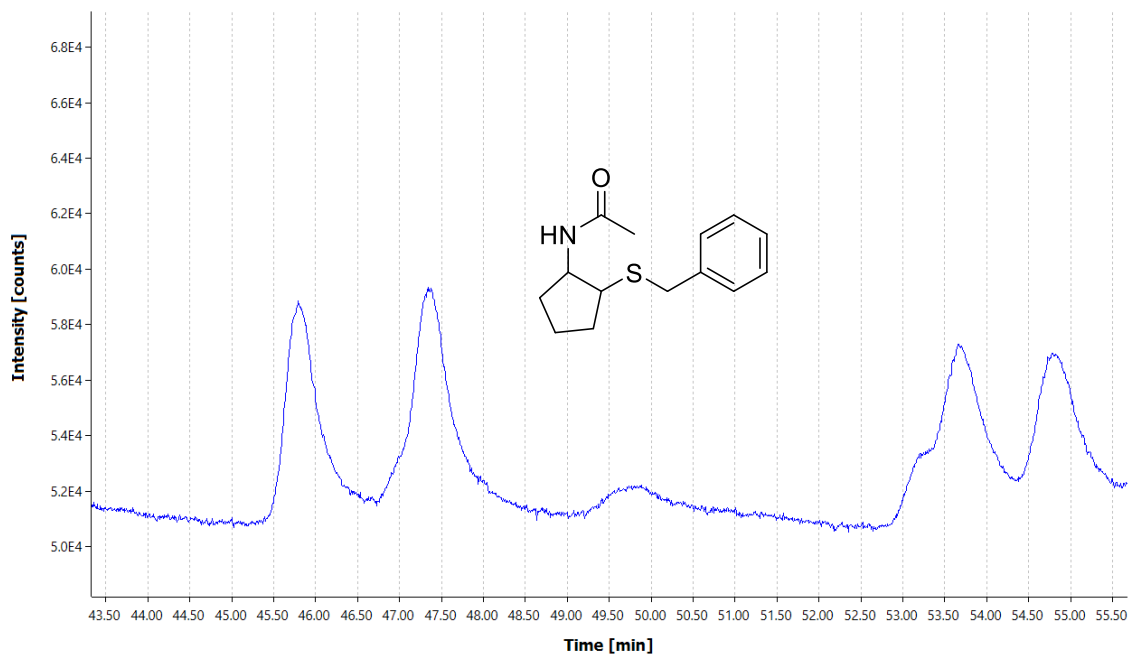
(1*S*, 2*S*)-7n' obtenido después de la transaminación con ATA-P1-G05.



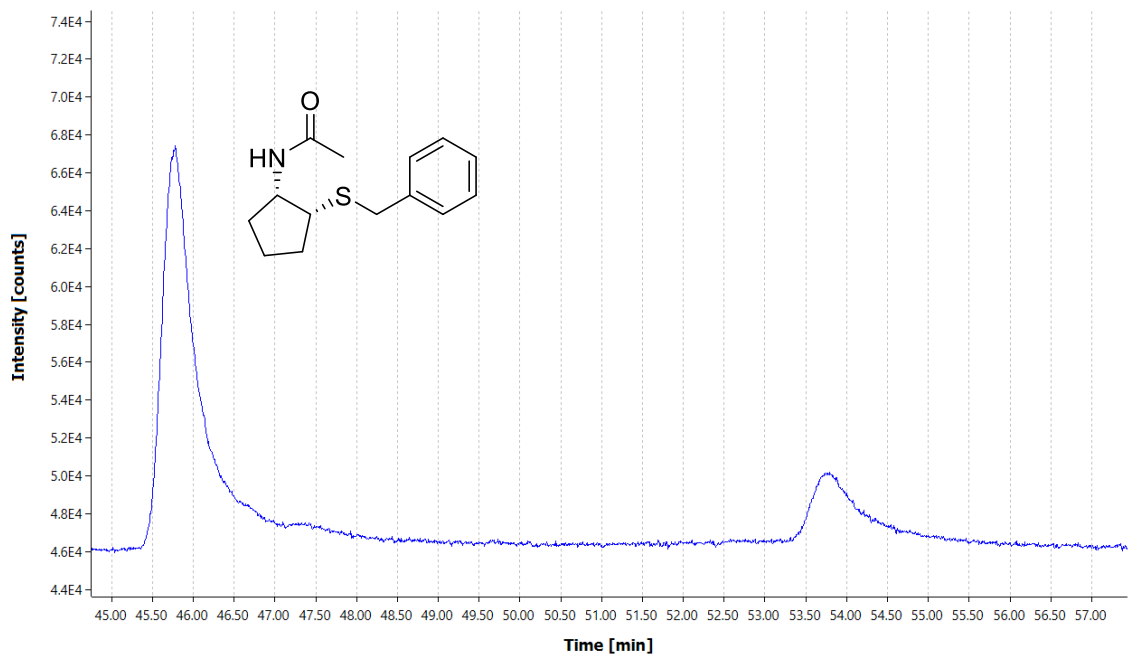
(1*R*, 2*R*)-7n' obtenido después de la transaminación con ATA-415.



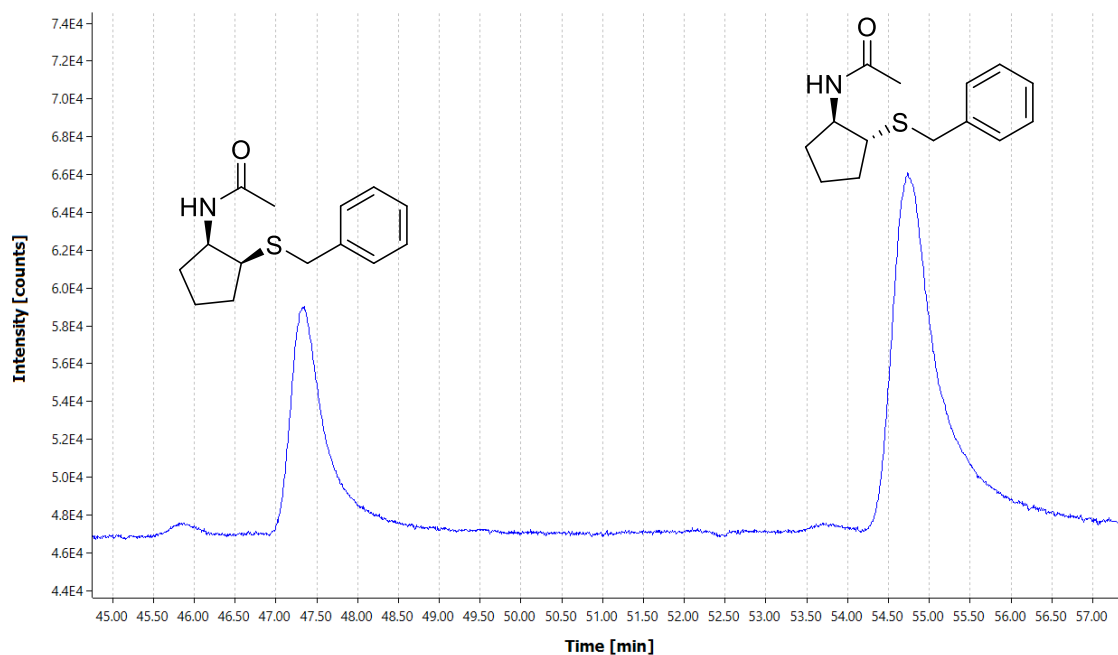
7m' obtenido por reducción química



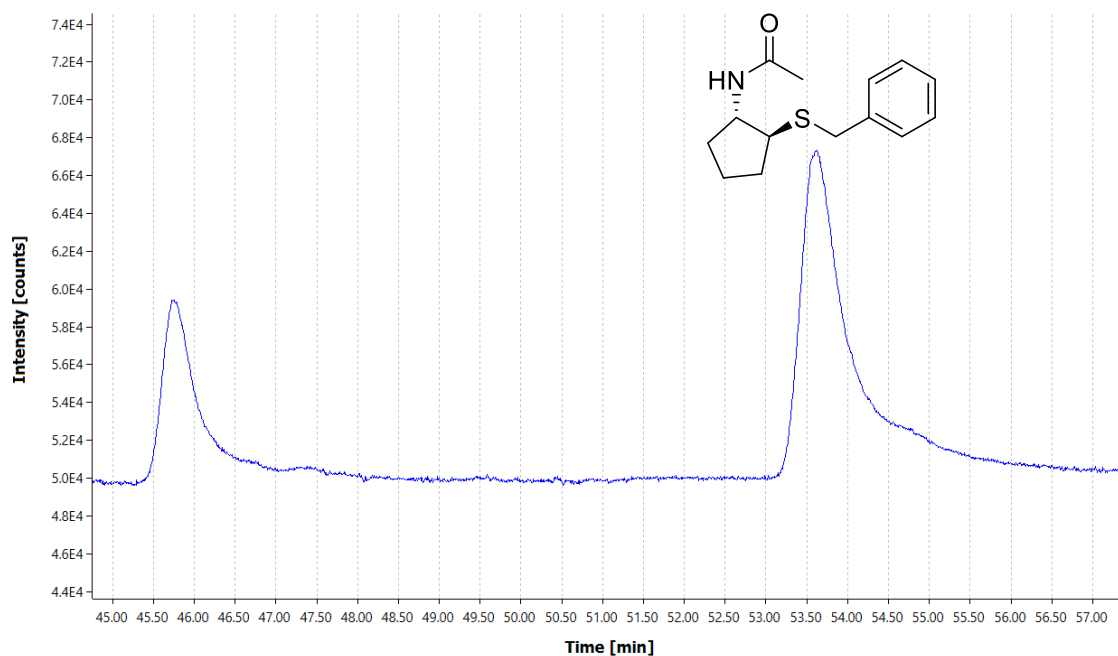
(1S, 2R)-7m' obtenido después de la transaminación con ATA-254.



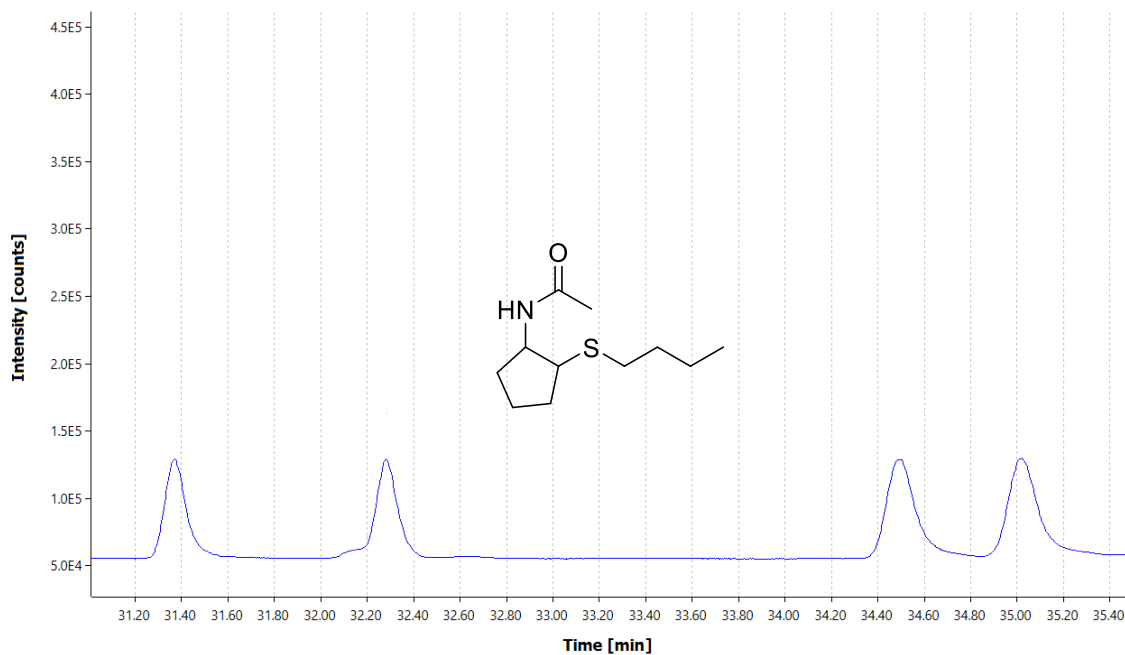
(1R, 2S)-7m' y (1R, 2R)-7m' obtenido después de la transaminación con ATA-415.



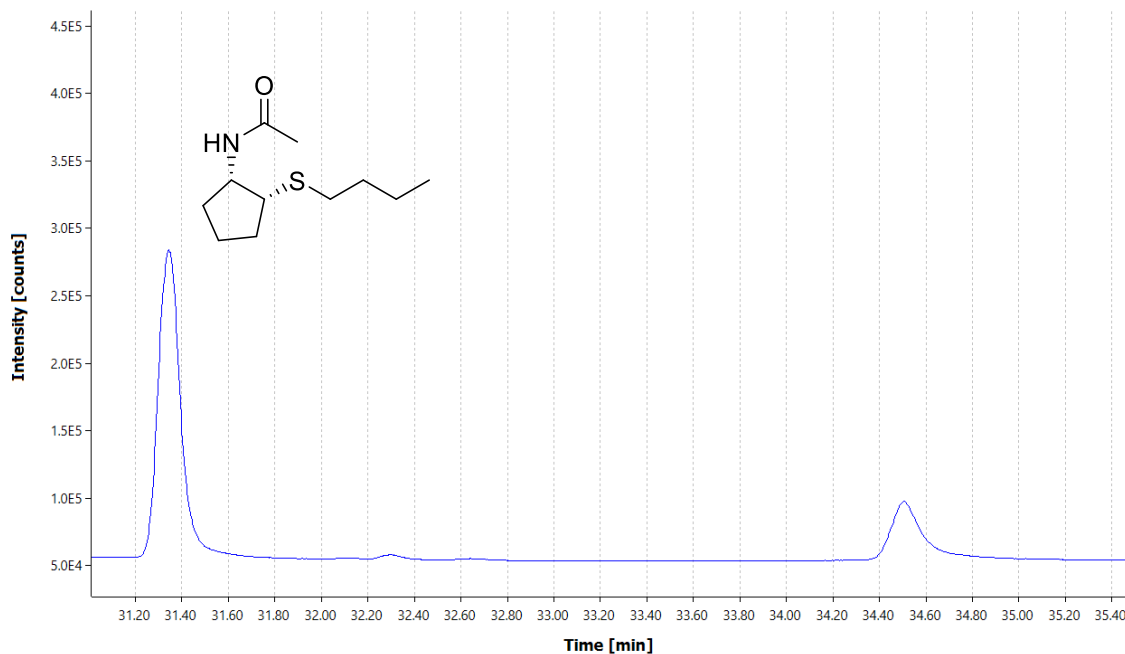
(1S, 2S)-7m' obtenido después de la transaminación con ATA-P1-G05.



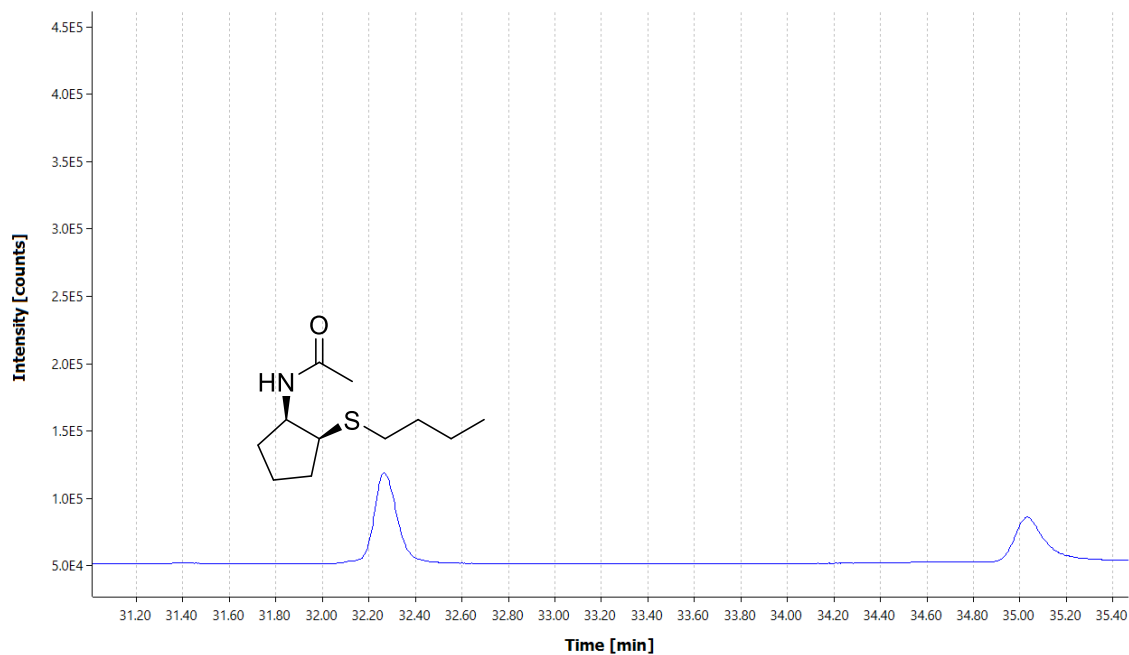
7q' obtenido por reducción química



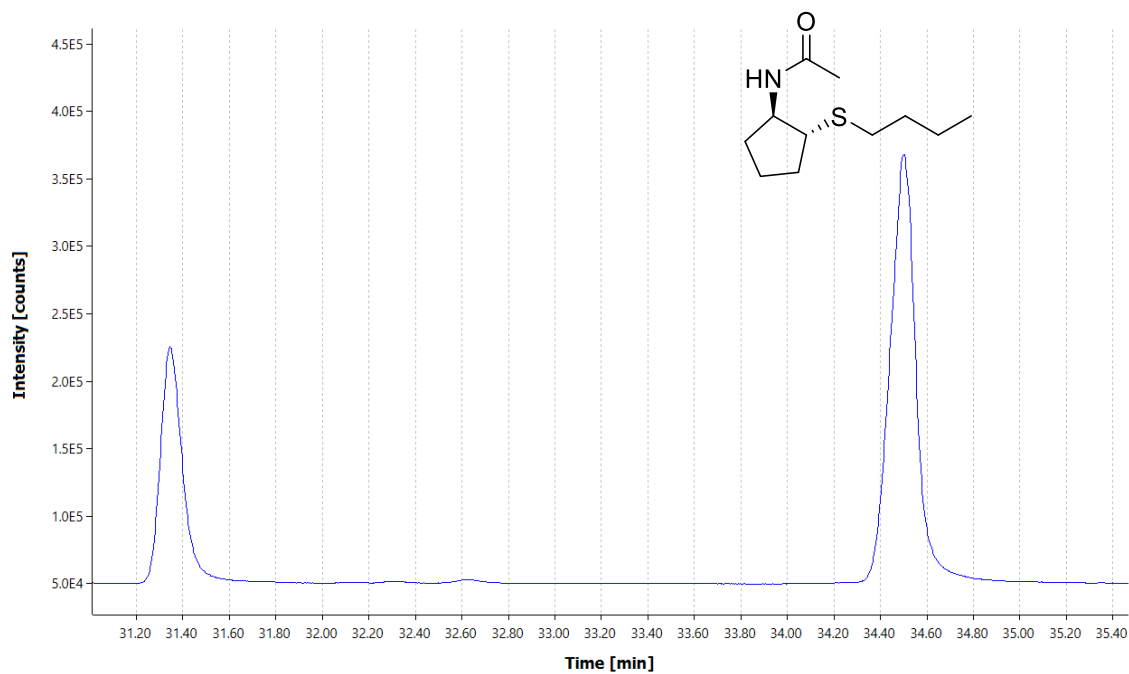
(1*S*, 2*R*)-7q' obtenido después de la transaminación con ATA-254.



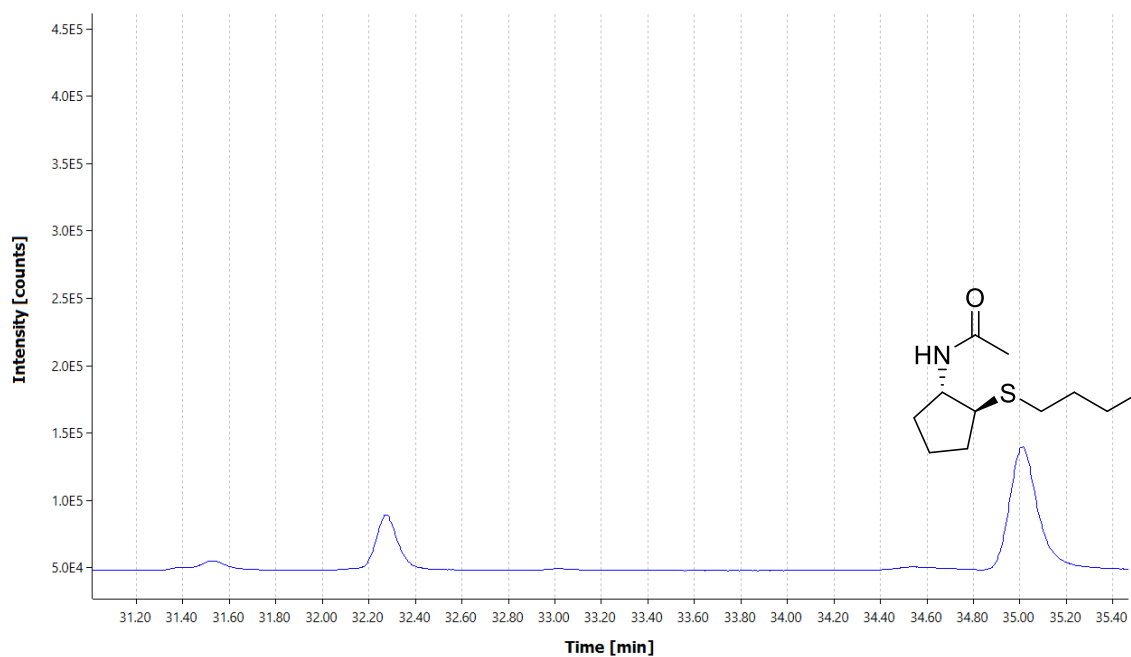
(1*R*, 2*S*)-7q' obtenido después de la transaminación con ATA-412.



(1*S*, 2*S*)-7q' obtenido después de la transaminación con ATA-113.



(1R, 2R)-7q' obtenido después de la transaminación con ATA-033.



CAPÍTULO 4

Modulación de la estereoselectividad en la síntesis quimioenzimática de β -hidroxisulfuros quirales cíclicos: estudio de la expresión heteróloga de ADHs en *E. coli*.

Las enzimas naturales han estado en constante evolución por millones de años para ser activas y específicas hacia sus sustratos naturales, en condiciones de un ambiente en medio acuoso. La vasta diversidad biocatalítica que se conoce actualmente, es producto de la evolución de enzimas ancestrales. Esta evolución evidentemente continúa, ya que puede observarse la aparición de nuevas enzimas como respuesta a la supervivencia en ambientes influenciados por la humanidad, como lo es la resistencia a antibióticos o como en la adaptación y ocupación de nuevos nichos al catabolizar compuestos sintéticos.¹⁷³

La primera ola de la biocatálisis empezó hace más de un siglo cuando los científicos comprendieron que ciertos componentes de las células enteras pueden llevar a cabo transformaciones químicas de interés. Entre otras, estas aproximaciones involucraban el empleo de biocatalizadores derivados de plantas para la producción de (*R*)-mandelonitrilo, el uso de levadura de panadería para la síntesis de un precursor de L-efedrina o la hidroxilación de ésteres dentro de células microbianas.¹⁷⁴

A medida que la ciencia iba aprovechando los recursos naturales disponibles, el potencial de la biocatálisis fue aumentando, aunque su aplicación en procesos industriales se vio acotada. En general, la síntesis de intermediarios farmacéuticos involucra la transformación de sustratos no naturales bajo condiciones drásticas, como lo son las altas temperaturas, altas concentraciones de sustrato o la presencia de solventes orgánicos. Bajo estas condiciones algunas veces extremas, muchas enzimas naturales no son efectivas, lo que va en detrimento en la selectividad, actividad y genera un bajo rendimiento del proceso. Con el objeto de ser catalizadores industrialmente adecuados, la necesidad de alcanzar rendimientos espacio-temporales aceptables con concentraciones altas de los sustratos y baja carga del catalizador, llevó a la exploración de la modificación de las enzimas.¹⁷⁵ Durante la segunda ola de la biocatálisis, en el último cuarto del siglo XX, los avances en los estudios de sustratos, medio de reacción y nuevas enzimas, sumado a los primeros pasos en la modificación química y mutación sitio-dirigida de enzimas, permitió ampliar el rango de trabajo de las transformaciones biocatalíticas a sustratos no naturales. Durante este período y a medida que se fueron conocidas las estructuras tridimensionales de estos catalizadores, el estudio y elucidación de mecanismos enzimáticos, se avanzó en técnicas aplicadas al diseño racional de enzimas. A finales de 1970, Smith y colaboradores introdujeron la valiosa herramienta para el diseño racional de nuevas

¹⁷³ H. Renata, Z. J. Wang, F. H. Arnold. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 3351–3367.

¹⁷⁴ L. Poppe, B. G. Vértessy. *ChemBioChem*, **2018**, *19*, 284 – 287

¹⁷⁵ R. A. Sheldon, J. M. Woodly, *Chem. Rev.*, **2018**, *118*, 801–838.

enzimas: la mutagénesis sitio-dirigida (SDM, por sus siglas en inglés).¹⁷⁶ Esta técnica abrió la puerta a la posibilidad de reemplazar aminoácidos puntuales ubicados en una posición específica por uno de los 19 aminoácidos naturales restantes y de esa manera, evaluar posibles cambios en la actividad, selectividad o tolerancia a diferentes condiciones de reacción de las enzimas, como ser la tolerancia a mayores concentraciones de sustrato.

La limitación de esta metodología radica en la necesidad de conocer la estructura tridimensional de la enzima y los aminoácidos importantes en el mecanismo catalítico. Debido a esto, y teniendo en cuenta el limitado conocimiento acerca de la modulación de las propiedades de las enzimas, contrastado ampliamente por la capacidad de la naturaleza de innovar, se tomó a favor el proceso evolutivo para la producción de nuevas enzimas.

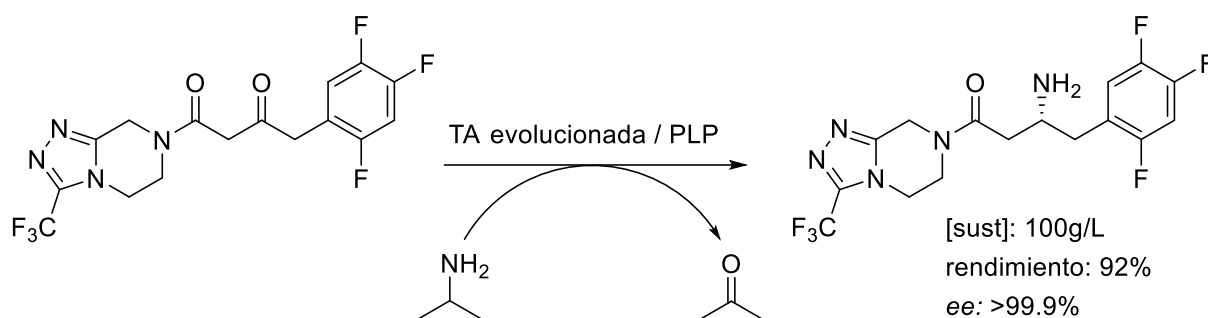
Hacia finales de los 90s, empieza la tercera ola de la biocatálisis,¹⁷⁷ promovida principalmente por Chen y Arnold en 1993, quienes desarrollan el uso de una polimerasa propensa a errores en varios ciclos secuenciales de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y un subsiguiente muestreo de la librería de mutantes obtenida para la evolución de subtilisina-E.¹⁷⁸ La enzima obtenida es cientos de veces más activa que la natural en 60% de DMF en agua. Este proceso de mutación al azar no requiere el conocimiento de la estructura tridimensional ni los aminoácidos implicados, lo que permitió que el estudio se ampliara a un mayor número de proteínas. Aunque este proceso, luego llamado “evolución dirigida”, permite la incorporación efectiva de mutaciones benéficas de una manera evolutiva Darwiniana, se le adicionó un proceso que pudo ampliar el nuevo repertorio enzimático aún más: en 1994, Stemmer introduce el barajado de ADN (*DNA shuffling*).¹⁷⁹ La recombinación homóloga de una serie de genes mutantes seleccionados por fragmentación al azar y reensamblado por PCR. Estas metodologías poderosas han permitido alterar las propiedades de las enzimas con el fin de mejorar su eficiencia (actividad y selectividad), sobre sustratos no naturales y en condiciones drásticas de reacción.¹⁷⁵ Un ejemplo de esto, es la mutación de una transaminasa para la síntesis de siptagliptina a nivel industrial, un esfuerzo conjunto entre Merck y Codexis. En este contexto, mediante un proceso de varias rondas de evolución dirigida se logró obtener una mutante (11 mutaciones) capaz de aceptar un sustrato mucho más voluminoso y en concentraciones significativamente mayores (Esquema 4.1).

¹⁷⁶ C. A. Hutchison, S. Phillips, M. H. Edgell, S. Gillam, P. Jahnke, M. Smith. *J. Biol. Chem.*, **1978**, *253*, 6551–6560.

¹⁷⁷ U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins. *Nature*, **2012**, *485*, 185–194.

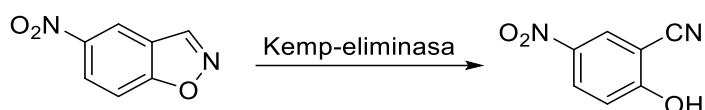
¹⁷⁸ K. Chen, F. H. Arnold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1993**, *90*, 5618–5622.

¹⁷⁹ W. P. C. Stemmer, *Nature*, **1994**, *370*, 389–391.



Esquema 4.1. Síntesis de sitagliptina a nivel industrial mediante una TA evolucionada.

Actualmente, algunos científicos sostienen que la cuarta ola de la biocatálisis está comenzando. Los avances en genética molecular, metagenómica y herramientas bioinformáticas, han colaborado para el descubrimiento e incluso la creación de nuevas funciones enzimáticas que no están presentes en la naturaleza. Los químicos emplean muchas reacciones que no tienen una contraparte biocatalítica, ya sea porque no es necesaria en la naturaleza o porque requiere grupos funcionales específicos que no se encuentran en los sistemas biológicos. Estos avances en biología molecular, sumado a los aportes de la química computacional, permitieron la obtención de enzimas capaces de catalizar reacciones que no existen en el metabolismo de los sistemas vivos. Se destaca por ejemplo, la producción de una “Kemp-eliminasa”, capaz de catalizar una reacción completamente novedosa para una enzima, como es la eliminación de Kemp (Esquema 4.2).¹⁸⁰



Esquema 4.2. Producción de una enzima nueva capaz de catalizar una reacción novedosa para la naturaleza.

El claro desarrollo de esta área de estudio ha llevado a otorgársele el Premio Nobel de Química en 2018 a Frances Arnold por la evolución dirigida de enzimas.¹⁸¹

Además de la modulación de factores genéticos a la hora de optimizar la eficiencia de un proceso enzimático, los factores asociados a una correcta actividad que respetan principalmente a la estructura terciaria y cuaternaria, son de vital importancia. A diferencia de los efectos relacionados a la secuencia de aminoácidos, la modificación y el control de los parámetros que afectan a un plegamiento correcto y la formación de estructuras oligoméricas

¹⁸⁰ D. Röthlisberger, O.Khersonsky, A. M. Wollacott, L. Jiang, J.DeChancie, J.Betker, J. L. Gallaher, E. A. Althoff, A.Zanghellini, O.Dym, S.Albeck, K. N. Houk, D. S. Tawfik, D. Baker. *Nature*, **2008**,453, 190–195.

¹⁸¹ <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/summary/>

tienen menor potencial para producir cambios radicales en la selectividad o en el descubrimiento de nuevas actividades catalíticas.¹⁸² Sin embargo, encontrar las condiciones adecuadas para cada proteína es indispensable para maximizar rendimientos en términos de unidades de actividad enzimática, ya sea aumentando la producción de proteína o mejorando la actividad específica de la proteína obtenida. Esto resulta muy relevante a la hora de evaluar la eficiencia catalítica y la selectividad de los procesos, e incluso poder estudiar las mutaciones producidas por un diseño racional, semi racional o evolución dirigida.

Desde una perspectiva biotecnológica, la elección del sistema de expresión para la producción de enzimas recombinantes es fundamental, y depende de varios factores: estos incluyen el crecimiento celular, los niveles de expresión, la expresión intracelular o extracelular, modificaciones post-traduccionales y la actividad biológica de la proteína de interés, entre otros.¹⁸³ Además, los costos relacionados al proceso y al diseño, son consideraciones económicas que influyen en la elección del sistema de expresión.

El control de la expresión heteróloga usualmente es regulado por clústeres de genes co-regulados, u operones. Basado en el principio de que la expresión de estos genes está regulada por la cantidad de un inductor particular en el medio, la regulación en la expresión de los genes de una proteína puede ser regulada por la presencia de este inductor: de esta forma puede controlarse en qué momento se expresa esta proteína de interés, minimizando los efectos deletéreos que pueden ocurrir por una expresión basal en el caso de ser una proteína tóxica para el organismo que la expresa. En este contexto, el estudio del operón *lac* por Jacob y Monod¹⁸⁴ permitió el diseño de sistemas de expresión bajo un promotor que regula la expresión de los genes que se encuentran *downstream*. Debido a que las concentraciones del inductor muchas veces son reguladas por el mismo microorganismo (en el caso de la lactosa, la presencia de galactosidasas controla los niveles de este azúcar), los químicos han diseñado análogos no hidrolizables capaces de inducir la expresión constante mientras estén en el medio. El isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) actúa de manera análoga a lactosa, sin embargo, por ser un tioglicósido, no es hidrolizable por las glicosidasas y con sólo cantidades muy pequeñas es posible inducir la expresión.¹⁸⁵ Sin embargo, el empleo de este compuesto muchas veces supone un gasto económico considerable a la hora de diseñar el proceso de expresión.

Con el fin de estudiar la modulación de la actividad y selectividad de las enzimas mediante la modificación de algunos parámetros en los sistemas de expresión para enzimas de

¹⁸²L. Liu, H. Yang, H. Shin, R. R. Chen, J. Li, G. Du, J. Chen. *Bioengineered*, **2013**, 4, 212-223.

¹⁸³S. C. Makrides. *Microbiol Rev.*, **1996**, 60, 512-538.

¹⁸⁴F. Jacob, J. Monod. *J. Mol. Biol.*, **1961**, 3, 318-356.

¹⁸⁵L. H. Hansen, S. Knudsen, S. J. Sørensen. *Curr Microbiol.*, **1998**, 36, 341-347.

interés en síntesis orgánica, se llevó a cabo el estudio del impacto de diferentes variables a lo largo del proceso de producción de distintas ADHs de diferentes familias:

ADH-A de Rhodococcus ruber

La ADH-A de *Rhodococcus ruber* es una enzima perteneciente a la familia de las alcohol deshidrogenasas de cadena media, NADH-dependiente. Es una proteína homotetramérica, cuyo monómero tiene un peso molecular de 38 kDa. Cada subunidad contiene un átomo de zinc estructural que se encuentra coordinado por cuatro cisteínas, y un átomo de zinc adicional en el sitio activo como ha sido descrito en la introducción. Una característica de esta proteína es su particular robustez, ya que soporta considerables concentraciones de solventes orgánicos, específicamente isopropanol (compuesto utilizado como co-sustrato) y es termoestable a 60°C.¹⁸⁶

TesADH de Thermoanaerobacter ethanolicus

Por otro lado, la enzima TesADH proviene de la bacteria anaerobia y termoestable *Thermoanaerobacter ethanolicus*. Es NADPH dependiente, termoestable hasta temperaturas cercanas a los 70°C, forma parte de la familia de las ADHs de cadena media y es homotetramérica, cuyas subunidades contienen átomos de zinc.¹⁸⁷

RasADH de Ralstonia sp.

RasADH es una enzima proveniente del microorganismo *Ralstonia sp.* Tiene un peso molecular de 27 kDa, NADPH-dependiente y es una ADH de cadena corta. Esta enzima se caracteriza por su capacidad de aceptar cetonas con dos sustituyentes voluminosos.¹⁸⁸

¹⁸⁶ M. Karabec, A. Łyskowski, K. C. Tauber, G. Steinkellner, W. Kroutil, G. Grogan, K. Gruber. *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 6314-6316.

¹⁸⁷ F. O. Bryant, J. Wiegel, L. G. Ljungdahl, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1998**, 54, 460-465.

¹⁸⁸ H. Man, K. Kędziora, J. Kulig, A. Frank, I. Lavandera, V. Gotor-Fernández, D. Rother, S. Hart, J. P. Turkenburg, G. Grogan, *Top. Catal.*, **2014**, 57, 356-365.

SyADH de Sphingobium yanoikuyae

SyADH de *Sphingobium yanoikuyae* es también una enzima NADPH-dependiente, tiene un peso molecular de 29 kDa y es una ADH de cadena corta. Al igual que *RasADH*, esta enzima es capaz de aceptar cetonas con ambos sustituyentes voluminosos.¹⁸⁸

Objetivos particulares

Con el fin de modular la eficiencia de la sobreexpresión de estas enzimas y la selectividad en el proceso enzimático, se planteó la expresión de todas las enzimas en cepas de *Escherichia coli* BL21(DE3), bajo distintas condiciones de crecimiento e inducción. Las variables a estudiar fueron el medio de cultivo utilizado, protocolo de expresión e inductor. Además, se analizó el efecto de la temperatura y pH en la reacción enzimática.

Los objetivos planteados en este capítulo fueron los siguientes:

- Alterar la estereoselectividad de oxidorreductasas para la síntesis de compuestos organoazufrados quirales mediante cambios en las condiciones de expresión de las enzimas y de la reacción enzimática.
- Análisis del efecto que tiene el cambio de las variables como el medio de cultivo, temperatura y tiempo durante la expresión de las enzimas.
- Evaluación del efecto que producen estas modificaciones en la estereoquímica de la reacción de los productos obtenidos de la reacción quimioenzimática.

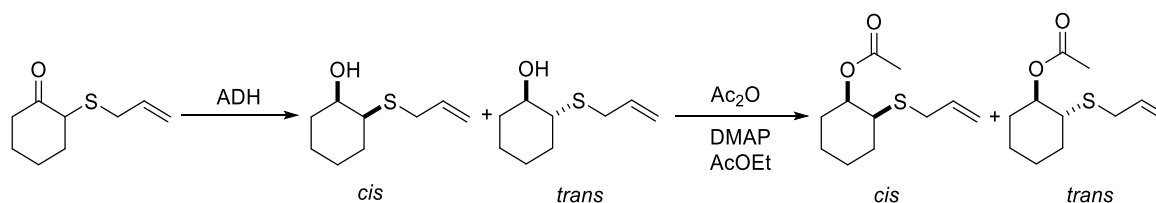
Es importante mencionar que este trabajo fue realizado en colaboración con la Lic. Tatiana Guendulain en el marco de su Practicanato Profesional de la Licenciatura en Química.

En base a lo expuesto anteriormente, se expresaron las ADHs ADH-A, TesADH, RasADH y SyADH en *E.coli* BL21(DE3). La elección de esa cepa se basó en el reporte previo de la expresión exitosa de estas enzimas en esta cepa. Además, la regulación por el promotor de lactosa permitió evaluar al inductor natural como a su análogo IPTG.

Las ADHs fueron expresadas modificando tres variables: medio de cultivo, protocolo de expresión e inductor. Todas ellas fueron expresadas en los siguientes medios de cultivo: Luria Bertani bajo en NaCl, Luria Bertani (LB), Terrific Broth (TB), un medio nutricionalmente más rico, y un medio de autoinducción. Se intentó evaluar la influencia del crecimiento bacteriano en la expresión y actividad de la proteína, sumado también a la cantidad de bacteria obtenida luego del tiempo del protocolo de inducción.

Por otro lado, se utilizaron dos protocolos de expresión distintos cuya diferencia entre ambos reside en la temperatura y el tiempo en las fases de cultivo e inducción: un protocolo corto y un protocolo largo. A su vez, se utilizaron dos inductores distintos: lactosa y su análogo sintético IPTG.

Con el fin de evaluar la influencia de los diferentes parámetros, se emplearon estas enzimas en el proceso descrito en el capítulo 2, la reducción enzimática de β -cetosulfuros cíclicos, particularmente el compuesto **4f** con el sustituyente alilo (Esquema 4.1). Al igual que en el capítulo 2, se realizó el mismo procedimiento de acetilación para el análisis cromatográfico.



Esquema 4.1. Reacción modelo para la evaluación de parámetros en la producción de ADHs

Además de los parámetros relacionados a la reacción enzimática (conversión y excesos diastereo- y enantioméricos), se evaluó la masa de *pellet* celular obtenida. A continuación, se describe las condiciones de expresión para las distintas preparaciones enzimáticas (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Condiciones para la sobreexpresión de las preparaciones enzimáticas.

entrada	medio de cultivo	temperatura de inducción (°C)	tiempo de inducción (h)	inductor
1	LB (bajo en NaCl)	20	24	IPTG
2	LB (bajo en NaCl)	20	24	Lactosa
3	LB	20	24	IPTG
4	LB	20	24	Lactosa
5	TB	20	24	IPTG

6	TB	20	24	Lactosa
7	LB (bajo en NaCl)	37	3	IPTG
8	LB (bajo en NaCl)	37	3	Lactosa
9	LB	37	3	IPTG
10	LB	37	3	Lactosa
11	TB	37	3	IPTG
12	TB	37	3	Lactosa
13	Autoinducción	20	48 ^a	-
14	Autoinducción	37	6 ^a	-

^a El tiempo se definió desde el agregado del precultivo al medio de autoinducción

Con estas diferentes preparaciones, se estudió inicialmente a ADH-A, donde se evaluó la reacción modelo descripta, la reducción enzimática de β -cetosulfuros cíclicos empleando como sustrato **4f**, cuyos resultados se resumen en la Tabla 4.2. El número de entrada en cada tabla coincide con las condiciones de expresión y resultados obtenidos.

Tabla 4.2. Resultados obtenidos en la reacción enzimática con las diferentes preparaciones conteniendo ADH-A.

entrada	masa de pellet (mg)	conversión ^a (%)	ee cis (%)	ee trans (%)	dr(cis:trans)
1	50,2	90,3	> 99	-	> 99/1
2	34,1	90,9	> 99	-	> 99/1
3	70,8	93,9	> 99	-	> 99/1
4	58,9	94,1	> 99	-	> 99/1
5	108,1	84,3	> 99	-	> 99/1
6	116,0	88,3	> 99	-	> 99/1
7	18,2	8,2	> 99	-	> 99/1
8	20,2	12,8	> 99	-	> 99/1
9	21,2	31,5	> 99	-	> 99/1
10	21,9	41,2	> 99	-	> 99/1
11	34,1	21,8	> 99	-	> 99/1
12	36,3	35,2	> 99	-	> 99/1
13	45,6	26,6	> 99	-	> 99/1
14	40,3	21,2	> 99	-	> 99/1

^a Las cantidades de catalizador empleadas fueron las mismas en todos los casos.

Los resultados obtenidos utilizando preparaciones enzimáticas de la enzima ADH-A expresada en protocolos de expresión largos, presentados en la Tabla 4.2, muestran un claro incremento en la masa de *pellet* cuando se utiliza el medio de cultivo TB (entradas 5 y 6), siendo estas entre 1,5 y 3 veces mayores a las recuperadas en los otros medios de cultivo. En cambio, el

medio LB bajo en NaCl presenta el menor rendimiento de *pellet* (entradas 1 y 2). Comparado con los resultados obtenidos para la preparación enzimática realizada en medio LB bajo en NaCl, el medio LB permitió obtener mayor masa de *pellet* y mayores conversiones, siendo la diferencia entre estos medios simplemente la concentración de sal (entradas 3 y 4). En cuanto a la conversión, los mejores resultados se alcanzaron con las preparaciones enzimáticas realizadas en medio LB. En este último medio, se observó una mayor eficiencia cuando el inductor usado fue IPTG (entrada 3), mientras que para el medio TB la lactosa se presenta como un mejor inductor (entrada 6). En todos los casos se obtuvo un único isómero, de conformación *cis*, manteniéndose la selectividad del proceso en comparación con el preparado enzimático empleado normalmente. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto y el hecho de que el ensayo en *medio LB inducido con IPTG tiene un costo menor que el mismo en medio TB e inducción con lactosa, particularmente por el costo del medio de cultivo, se presenta como una mejor opción el ensayo en LB con IPTG (~4 veces más económico).*

En cuanto al protocolo corto, la masa de *pellet* obtenida fue en todos los casos menor a la obtenida mediante protocolo largo. En LB bajo en NaCl, tanto la masa de *pellet* recuperada como la conversión fueron mayores cuando la inducción se realizó con lactosa (entrada 8). Sin embargo, se obtuvieron mejores resultados con las preparaciones enzimáticas realizadas en medio LB (entradas 9 y 10). En este último, la masa de *pellet* obtenida fue la misma con ambos inductores, pero la actividad fue mayor cuando la inducción se realizó con lactosa (entrada 10). En medio TB se obtuvo mayor cantidad de *pellet* (entradas 11 y 12), la actividad fue similar a la alcanzada con las preparaciones enzimáticas obtenidas en LB y mayor cuando el inductor es lactosa (entrada 12); sin embargo, considerando que el medio LB es casi 4 veces más barato que el TB, este medio sigue siendo la opción de preferencia. *Por lo tanto, el mejor cultivo de esta serie es el realizado en medio LB con lactosa como inductor.*

Por último, para la enzima ADH-A en medio de autoinducción los resultados obtenidos utilizando las preparaciones enzimáticas obtenidas en protocolo largo son ligeramente mejores que los correspondientes al protocolo de expresión corto. *Sin embargo, la diferencia en el tiempo del proceso, el gasto energético y la diferencia relativamente pequeña que presentan, se prefiere el protocolo corto.*

En comparación de todas las condiciones estudiadas, la expresión de ADH-A presentó los mejores resultados cuando se realizó con LB como medio de cultivo, IPTG como inductor, empleando el protocolo largo de expresión descripto.

Luego, se continuó el estudio con las demás ADHs de la misma manera. A continuación, se exponen los resultados obtenidos para TesADH, RasADH y SyADH.

Tabla 4.3. Resultados obtenidos en la reacción enzimática con las diferentes preparaciones conteniendo TesADH.

entrada	masa de pellet (mg)	conversión (%)	ee cis (%)	ee trans (%)	dr(cis/trans)
1	43,2	63,71	>99	61	70,7/29,3
2	50,6	81,71	>99	76,2	59/41,0
3	66,2	21,71	>99	84,5	69,1/30,9
4	30,0	62,25	>99	76,8	65,9/34,1
5	88,1	5,92	>99	> 99	74,1/25,9
6	104,9	29,05	>99	90,4	63,5/36,5
7	10,5	3,03	>99	> 99	61,8/38,9
8	17,0	4,23	>99	> 99	66,8/33,2
9	26,2	6,67	>99	> 99	64,2/35,8
10	22,9	9,02	>99	> 99	81,3/18,7
11	18,0	3,48	>99	> 99	68,4/31,7
12	29,5	2,37	>99	> 99	67,1/32,9
13	88,4	11,33	>99	> 99	60,5/39,6
14	35,6	24,62	>99	58,1	65,9/34,1

En relación a los resultados obtenidos para la enzima TesADH presentados en la Tabla 4.3, es notable la variación en la selectividad y actividad respecto al cambio de medio de cultivo e inductor en comparación con la ADH-A (Tabla 4.2), particularmente notorio en el protocolo de inducción largo. La constancia en los valores mostrados por ADH-A no sorprende, ya que es conocida la robustez de esta enzima, pero los cambios observados para TesADH mostraron la posibilidad de poder modular el resultado de la expresión, y a la larga de la reacción a catalizar, con el control de los parámetros estudiados. En este caso, se obtuvo siempre un único isómero *cis* y el par de enantiómeros *trans*. Con la enzima ADH-A se observaba que, a mayor contenido de sal en el medio, mayores eran las masas de *pellet* obtenidas y mayores las conversiones. En cambio, para la enzima TesADH, un aumento en la cantidad de sal en el medio condujo a una mayor cantidad de *pellet* obtenida, pero las conversiones observadas fueron menores. Para las preparaciones enzimáticas realizadas en medio LB bajo en NaCl, la masa de *pellet* obtenida fue similar a la conseguida en medio LB, y la mitad de la lograda en medio TB. Entre estos medios de cultivo, se observaron conversiones más altas cuando el inductor fue lactosa en LB bajo en NaCl (entrada 2). En medio LB, también se observaron conversiones más altas cuando la inducción de la expresión se realizó con lactosa (entrada 4). En cambio, con IPTG la conversión fue significativamente menor, aunque se obtuvieron buenos valores de *ee* (para un isómero del par de isómeros *trans*) y *de* (entrada 3). De manera similar a lo que se venía observando, en medio TB se obtuvo una gran cantidad de *pellet*, pero la conversión fue menor: esto puede indicar que

la cantidad de enzima presente en el *pellet* es baja o que la enzima expresada no presenta buena actividad catalítica (entradas 5 y 6). Cuando la inducción se realizó con lactosa (entrada 6), la conversión fue más elevada que cuando se utilizó IPTG (entrada 5), y el *ee* obtenido (para el isómero *trans* mayoritario) fue excelente. Ésta última opción permitiría obtener uno de los isómeros *cis* puro y uno de los *trans* con más de un 90% de pureza óptica. El hecho más destacable en la expresión de TesADH con estas preparaciones enzimáticas es que el medio de cultivo tiene una clara incidencia en la estereoselectividad.

Cuando se analizaron los resultados correspondientes a la inducción corta (entradas 7-12), puede verse con claridad que se obtiene un único isómero de cada par de enantiómeros, pero las conversiones son extremadamente bajas. Este hecho hace que los resultados de *ee* y *de* no sean confiables, ya que el error presente durante la integración de los picos cromatográficos es muy grande. Evidentemente, estas condiciones de expresión no son adecuadas para TesADH.

Comparando las temperaturas en los medios de autoinducción, la masa de *pellet* recuperada fue mayor cuando la enzima se expresó mediante el protocolo largo de expresión (entrada 13) y la selectividad también fue mayor en ese caso. Sin embargo, la conversión lograda con dicha preparación enzimática fue aproximadamente la mitad de la lograda con el *pellet* obtenido en protocolo corto (entrada 14). No obstante, ninguna de estas preparaciones enzimáticas superó los resultados obtenidos con las enzimas expresadas con el protocolo largo en los otros tres medios. Por lo tanto, *la mejor opción para expresar esta enzima es el protocolo de inducción largo. Si se quieren obtener mejores rendimientos, lo ideal sería utilizar las condiciones de la entrada 2 (LB bajo en NaCl empleando lactosa), mientras que si lo que interesa es la obtención de los isómeros con alta pureza, se debería utilizar las condiciones de la entrada 6 (TB empleando lactosa).*

Tabla 4.4. Resultados obtenidos en la reacción enzimática con las diferentes preparaciones conteniendo RasADH.

entrada	masa de pellet (mg)	conversión (%)	<i>ee cis</i> (%)	<i>ee trans</i> (%)	<i>dr(cis/trans)</i>
1	62,8	92,4	54,4	57,9	51,5/48,5
2	71,5	85,8	49,9	59,5	50,2/49,8
3	93,5	94,2	47,7	41,9	38,5/61,5
4	102,5	87,6	40,3	45,1	46,6/53,4
5	112,4	31,4	76,0	75,5	47,7/52,3
6	121,3	81,9	57,4	64,0	47,8/52,9
7	20,9	81,6	46,7	51,4	43,8/56,2
8	23,0	75,7	39,5	60,8	51,6/48,4
9	19,2	66,7	37,3	42,7	46,1/53,9
10	23,4	82,1	35,0	54,5	48,4/51,6

11	22,7	64,6	69,0	77,8	49,4/50,6
12	30,4	84,8	49,6	46,8	55,4/44,6
13	92,5	77,1	55,1	61,3	56,2/43,8
14	28,8	84,0	44,5	19,8	46,9/53,1

Para la enzima RasADH, como puede verse en la Tabla 4.4, siempre se obtuvieron los cuatro estereoisómeros. Cuando esta enzima fue expresada con el protocolo largo, puede verse que la mayor cantidad de *pellet* fue obtenida en el medio TB siguiendo la tendencia general. Los resultados obtenidos con la preparación enzimática realizada en medio LB (bajo en NaCl) son similares, independientemente del inductor utilizado (entradas 1 y 2). Para los *pellets* obtenidos en medio LB, la conversión es mayor cuando la inducción se realiza con IPTG (entrada 3) y a diferencia del resto de las preparaciones, con esta se obtiene un *dr* que favorece al isómero trans. La preparación obtenida en medio de cultivo TB y con IPTG como inductor presenta relativamente buenos *ee*, tanto para los isómeros *cis* como para los *trans*, sin embargo, la conversión alcanzada no fue buena (entrada 5). Por lo tanto, *la preparación enzimática más eficiente fue la obtenida en medio LB con IPTG como inductor, ya que permite alcanzar buenas conversiones, favoreciendo a los isómeros trans, algo que no puede lograrse con ninguna de las otras preparaciones enzimáticas de la serie* (entrada 3).

En cuanto al protocolo corto, la masa de *pellet* obtenida fue aproximadamente cuatro veces menor que las alcanzadas en protocolo largo de expresión (entradas 7-12), donde también las conversiones obtenidas fueron inferiores. Para las preparaciones enzimáticas producidas en medio LB bajo en NaCl, puede verse que el *dr* se invierte cuando se cambia el inductor: cuando la expresión se indujo con IPTG, los isómeros *trans* prevalecieron por sobre los *cis* (entrada 7), mientras que cuando la expresión fue inducida con lactosa, se observó lo contrario (entrada 8). En el medio LB, los resultados obtenidos son similares, no observándose afectados por el inductor utilizado (entradas 9 y 10). En medio TB, la conversión alcanzada es mayor cuando la inducción se realiza con lactosa (entrada 12), pero cuando la preparación es inducida con IPTG se logran *ee* elevados, tanto para los isómeros *cis* como para los *trans*, lo cual resulta interesante desde el punto de vista de la estereoselectividad ya que dos de los cuatro productos podrían ser obtenidos con una pureza relativamente elevada (entrada 11). Al igual que para el protocolo largo, la enzima expresada presenta alta sensibilidad al cambio de medio de cultivo y al inductor. A su vez, los resultados obtenidos en ambos protocolos de expresión son distintos por lo que puede decirse entonces que la enzima RasADH es considerablemente sensible a las tres variables modificadas en los ensayos realizados.

Cuando se utilizó el medio de autoinducción, la masa de *pellet* obtenida fue unas tres veces mayor para el protocolo largo (entrada 13). Por otro lado, cuando se comparan la preparación enzimática obtenida mediante protocolo largo y corto, la primera permitió lograr un buen *ee_{trans}*: éste es del 61,3% en comparación con 19,8% obtenido con la preparación enzimática de protocolo corto (entrada 14). Por lo tanto, puede decirse que, en este medio, el protocolo de inducción largo permite obtener mejores resultados.

Tabla 4.5. Resultados obtenidos en la reacción enzimática con las diferentes preparaciones conteniendo SyADH.

entrada	masa de pellet (mg)	conversión (%)	<i>ee cis</i> (%)	<i>ee trans</i> (%)	<i>dr(cis/trans)</i>
1	53,0	89,0	>99	70,4	48,1/51,9
2	49,4	92,5	>99	76,5	52,8/47,5
3	73,7	86,7	>99	59,6	45,9/54,1
4	82,0	82,3	>99	90,7	49,3/50,7
5	93,6	82,9	>99	85,5	53,9/46,1
6	87,4	71,4	>99	86,2	47,1/ 52,9
7	14,6	88,7	>99	72,8	42,1/ 57,9
8	20,1	90,2	>99	22,2	39,9/60,1
9	17,4	93,7	>99	81,3	54,4/45,6
10	18,0	89,1	>99	70,9	40,3/59,7
11	15,9	90,4	>99	80,5	56/ 44
12	21,4	73,8	>99	76,2	48,8/51,2
13	92,6	66,4	>99	91,5	49,8/50,2
14	32,6	85,1	>99	72,7	45,6/54,4

Al analizar los resultados informados en la Tabla 4.5, correspondientes a la enzima SyADH, puede notarse que siempre se obtiene un único isómero *cis* y el par de enantiómeros *trans*. Al igual que para las otras enzimas, las preparaciones enzimáticas obtenidas mediante protocolo largo de expresión mostraron un aumento de la masa de *pellet* recuperada, especialmente cuando el medio de cultivo utilizado fue TB. Sin embargo, este aumento no es tan marcado en comparación con los observados para las otras tres enzimas. Los mejores rendimientos fueron alcanzados en las reacciones catalizadas por las enzimas expresadas en medio LB bajo en NaCl, siendo mayor la conversión cuando se usa la preparación inducida con lactosa (entrada 2). En medio LB no se observan grandes diferencias en la masa de *pellet* obtenido ni en la conversión, independientemente del inductor usado, sin embargo, en el caso de inducción con lactosa se observa un valor de *ee trans* de importancia (entrada 4). Mediante el uso de la enzima expresada en dichas condiciones, se logra obtener uno de los isómeros *cis* de

manera pura, y uno de los isómeros *trans* con una pureza del 90,7%. Las preparaciones enzimáticas realizadas en medio TB (entradas 5 y 6) permitieron obtener buenas conversiones, y la masa de *pellet* obtenida fue elevada. Además, se obtuvo mayoritariamente uno de los isómeros *trans*, siendo el *ee* mayor al 85% en ambas condiciones empleando el medio TB. En general, las expresiones inducidas con lactosa muestran mejores *ee trans*, independientemente del medio utilizado. Por lo tanto, los resultados obtenidos con los *pellets* producidos en LB y TB e inducidos con lactosa son los mejores de la serie en cuanto a estereoselectividad, pero *considerando el precio de cada uno de los medios, se destaca la preparación enzimática en LB e inducida con lactosa como la más eficiente con respecto a esta enzima* (entrada 4).

Cuando la enzima SyADH fue expresada con el protocolo corto, la masa de los *pellets* obtenidos fue menor a las obtenidas mediante protocolo largo. En medio LB bajo en NaCl (entradas 7 y 8), las conversiones fueron buenas, siendo mejor cuando el inductor es lactosa (entrada 8). En el caso de las preparaciones enzimáticas realizadas en medio LB (entradas 9 y 10), la conversión fue mayor cuando el inductor usado fue IPTG (entrada 9). Para ambos medios, se observó una dependencia del *dr* con el inductor utilizado: cuando el inductor fue lactosa, la proporción de compuesto en configuración *trans* se vio aumentada (entrada 8 y 10). En general, se observó que el cambio de inductor tiene un mayor efecto que el cambio de medio de cultivo. Los resultados obtenidos cuando se empleó TB como medio de cultivo fueron similares a los obtenidos en medio LB, pero *considerando la diferencia de precio entre estos medios, se destaca el uso de medio LB. Sin embargo, las condiciones de la entrada 4 siguen siendo de elección ya que los resultados son similares a los obtenidos en la entrada 10, pero en la primera se obtienen cuatro veces más de pellet.*

Al usar medio de autoinducción, la conversión fue mejor en el caso de la preparación enzimática obtenida con el protocolo corto (entrada 14), sin embargo, la masa de *pellet* fue mayor cuando la proteína se expresó con el protocolo largo (entrada 13). En ambos casos, se obtuvieron 3 productos de reacción: un isómero *cis* y la mezcla de productos *trans*. En el caso de la reacción catalizada por el protocolo largo (entrada 13), el *ee trans* alcanzado fue muy bueno, obteniéndose un 95,8% de uno de los isómeros. Por lo tanto, el protocolo largo sería en este caso de mayor relevancia. Sin embargo, los resultados obtenidos fueron similares a los correspondientes a la enzima expresada en LB en protocolo largo. Teniendo en cuenta que el gasto energético es el mismo pero que el medio LB es menos costoso que el de autoinducción, se *resalta la expresión en LB con lactosa como inductor y en protocolo de expresión largo* (entrada 4).

Una vez obtenidos estos resultados, se evaluó también la temperatura de reacción y el pH en la reacción de bioreducción de la cetona cíclica α -sustituida (reacción modelo) para la modulación de la estereoselectividad del proceso biocatalítico. Para ello, se decidió trabajar con

los preparados enzimáticos que mostraron buenos resultados para el caso de la ADH-A y TesADH (entradas 4 y 1 de las respectivas tablas).

Tabla 4.6. Resultados obtenidos en la reacción enzimática al modificar la temperatura de reacción.

Muestra	Temperatura de reacción (°C)	conversión (%)	ee cis (%)	ee trans (%)	dr (cis:trans)
ADH-A	30	94,2	> 99	-	>99:1
	40	88,1	> 99	-	>99:1
TesADH	30	63,1	>99	61	63,7:36,3
	40	6,39	> 99	72,3	62,8:37,2

Como puede observarse en los resultados presentados en la Tabla 4.6, para la enzima ADH-A la actividad disminuyó cuando se aumentó la temperatura, mientras que para la enzima TesADH la conversión alcanzada fue mayor a 40°C que a 30°C. Aunque ambas proteínas sean termoestables, la variación en la actividad producida por el aumento de la temperatura en ADH-A es mayor a TesADH. Notablemente, TesADH presenta una mayor actividad y se obtienen mejores *ee trans*.

Tabla 4.7. Resultados obtenidos en la reacción enzimática al pH del medio de reacción.

Muestra	pH de reacción	conversión (%)	ee cis (%)	ee trans (%)	dr (cis/trans)
ADH-A	6.4	92	>99	-	>99/1
	7.4	94	>99	-	>99/1
	8.4	73	>99	-	>99/1
TesADH	6.4	91	> 99	76.4	65,4/34,6
	7.4	64	> 99	61.0	63,7/36,6
	8.4	98	> 99	70.8	64,0/36,0

A medida que el pH cambia, la ionización de los grupos presentes tanto en el sitio activo de la enzima como en el sustrato se ve alterada, influenciando la velocidad de unión del sustrato al sitio activo de la enzima.

En el caso de la ADH-A, puede verse que el pH más adecuado para llevar a cabo las reacciones enzimáticas es 7,4. Trabajando a dicho pH, se obtuvo la mejor conversión. Por otro lado, la selectividad de la enzima no se vio afectada por el pH, demostrando una vez más ser una enzima muy robusta.

Por su lado, TesADH mostró mejores resultados a pH 6,4 y 8,4 que a pH 7,4. Cuando se usó buffer pH 6,4, la conversión fue mayor que cuando se usó buffer pH 7,4. Además, el *ee trans* se vio incrementado y se aumentó la proporción de isómeros *cis*. Por otro lado, cuando la reacción se llevó a cabo a pH 8,4, se obtuvo el mejor porcentaje de conversión, a expensas de un

menor *ee trans* y un menor *dr* respecto de lo obtenido de la reacción realizada a pH 6,4. Por lo tanto, el pH del buffer de reacción cuando se emplea TesADH puede influenciar tanto en la conversión como en los excesos, permitiendo una posible modulación de estos parámetros. El estado de protonación a pH 7.4 resulta desfavorable para la actividad de la proteína, por lo que a pHs distintos de 7.4, es una condición más adecuada para la conversión de este sustrato con TesADH.

Conclusiones parciales

Modulando variables en la expresión heteróloga de ADHs en *E. coli*, ya sea de medio de cultivo, de protocolo de expresión de la bacteria, temperatura o del inductor empleado, fue posible alterar y mejorar la actividad y/o selectividad de las enzimas utilizadas.

A su vez, la modificación de la temperatura y pH es una alternativa para la variación de la actividad y selectividad de las enzimas. Notablemente, no es posible predecir un comportamiento en la expresión de las proteínas según la modificación de variables en la expresión y en las condiciones de reacción; cada parámetro afecta de manera distinta a cada enzima, por lo que la optimización debe realizarse individualmente.

En sistemas de expresión de ADHs cuya regulación transcripcional depende de lactosa (o sus análogos como IPTG), es posible encontrar condiciones para la expresión de la proteína de interés empleando lactosa como inductor, obteniéndose resultados similares o incluso mejores a los obtenidos con IPTG. En esta misma línea, el desarrollo de protocolos de expresión con lactosa como inductor llevan a una considerable disminución de costos y, por ende, a ser una alternativa muy interesante desde el punto de vista tecnológico.

Protocolos de inducción

Protocolo de inducción largo empleando IPTG o lactosa como inductor para ADH-A y TesADH.

Se realizó un precultivo de 5 mL tomando bacterias con un palillo estéril desde el stock en glicerol de *E. coli* BL21(DE3)/pET22b(+)-ADH-A o *E. coli* BL21 DE3/pET22b+-TesADH y colocándolas en medio LB suplementado con 25 µL de ZnCl₂ 0,1M y 2,5 µL de ampicilina 100 mg/mL. El precultivo se dejó en agitación a 120 rpm por 24 horas y a 30°C.

Se tomaron 200 µL del precultivo y se inoculó en 40 mL del medio correspondiente (LB bajo en NaCl, LB o TB), suplementado con 300 µL de ZnCl₂ 0,1 M y 40 µL de ampicilina 100 mg/mL. El cultivo permaneció en agitación a 120 rpm, a 30°C durante 24 horas. Por último, se adicionó al cultivo 20 µL de ampicilina 100 mg/mL y se indujo la expresión de las proteínas con 0,18 mg de IPTG disueltos en 500 µL del medio correspondiente, o 690 µL de lactosa 10% p/v, según corresponda. El tiempo de inducción fue de 24 horas y la temperatura de 20°C.

Una vez finalizada la inducción de la expresión de las proteínas, se procedió a centrifugar los cultivos a 5000 rpm por 5 minutos y luego se retiró el sobrenadante. El pellet obtenido fue lavado con 4 mL de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet así obtenido fue sometido a un proceso de *shock freezing*: el pellet fue congelado utilizando nitrógeno líquido y se lo liofilizó durante 24 horas.

Protocolo de inducción corto empleando IPTG o lactosa como inductor para ADH-A y TesADH.

Se realizó un precultivo de 5 mL tomando bacterias con un palillo estéril desde el stock en glicerol de *E. coli* BL21 DE3/pET22b(+)-ADH-A o *E. coli* BL21 DE3/pET22b+-TesADH y colocándolas en medio LB suplementado con 25 µL de ZnCl₂ 0,1M y 2,5 µL de ampicilina 100 mg/mL. El precultivo se dejó en agitación a 120 rpm por 24 horas y a 30°C.

Se tomaron 200 µL del precultivo y se inoculó en 40 mL del medio correspondiente (LB bajo en NaCl, LB o TB), suplementado con 300 µL de ZnCl₂ 0,1 M y 40 µL de ampicilina 100 mg/mL. El cultivo permaneció en agitación a 120 rpm, a 37°C durante 3 horas. Por último, se adicionó al cultivo 20 µL de ampicilina 100 mg/mL y se indujo la expresión de las

proteínas con 0,18 mg de IPTG disueltos en 500 μ L del medio correspondiente, o 690 μ L de lactosa 10% p/v según corresponda. El tiempo de inducción fue de 3 horas y la temperatura de 37°C.

Una vez finalizada la inducción de la expresión de las proteínas, se procedió a centrifugar los cultivos a 5000 rpm por 5 minutos y luego se retiró el sobrenadante. El pellet obtenido fue lavado con 4 mL de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet así obtenido fue sometido a un proceso de *shock freezing*: el pellet fue congelado utilizando nitrógeno líquido y se lo liofilizó durante 24 horas.

Protocolo de inducción largo empleando IPTG o lactosa como inductor para RasADH y SyADH.

Se realizó un precultivo de 5 mL tomando bacterias con un palillo estéril desde el *stock* en glicerol de *E. coli* BL21 DE3/pET28a-RasADH o *E. coli* BL21 DE3/pET28a-SyADH y colocándolas en medio LB suplementado 2,5 μ L de kanamicina 100 mg/mL. El precultivo se dejó en agitación a 120 rpm por 24 horas y a 30°C.

Se tomaron 200 μ L del precultivo y se inoculó en 40 mL del medio correspondiente (LB bajo en NaCl, LB o TB), suplementado con 40 μ L de kanamicina 100 mg/mL. El cultivo permaneció en agitación a 120 rpm, a 30°C durante 24. horas Por último, se adicionó al cultivo 40 μ L de kanamicina 100 mg/mL y se indujo la expresión de las proteínas con 0,18 mg de IPTG disueltos en 500 μ L del medio correspondiente, o 690 μ L de lactosa 10% p/v según corresponda. El tiempo de inducción fue de 24 horas y la temperatura de 20°C.

Una vez finalizada la inducción de la expresión de las proteínas, se procedió a centrifugar los cultivos a 5000 rpm por 5 minutos y luego se retiró el sobrenadante. El pellet obtenido fue lavado con 4 mL de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet así obtenido fue sometido a un proceso de *shock freezing*: el pellet fue congelado utilizando nitrógeno líquido y se lo liofilizó durante 24 horas.

Protocolo de inducción corto empleando IPTG o lactosa como inductor para RasADH y SyADH.

Se realizó un precultivo de 5 mL tomando bacterias con un palillo estéril desde el stock en glicerol de *E. coli* BL21 DE3/pET28a-RasADH o *E. coli* BL21 DE3/pET28a-SyADH y colocándolas en medio LB suplementado con 25 µL de ZnCl₂ 0,1M y 2,5 µL de kanamicina 100 mg/mL. El precultivo se dejó en agitación a 120 rpm por 24 horas y a 30°C.

Se tomaron 200 µL del precultivo y se inoculó en 40 mL del medio correspondiente (LB bajo en NaCl, LB o TB), suplementado con 40 µL de kanamicina 100 mg/mL. El cultivo permaneció en agitación a 120 rpm, a 37°C durante 3 horas. Por último, se adicionó al cultivo 40 µL de kanamicina 100 mg/mL y se indujo la expresión de las proteínas con 0,18 mg de IPTG disueltos en 500 µL del medio correspondiente, o 690 µL de lactosa 10% p/v según corresponda. El tiempo de inducción fue de 3 horas y la temperatura de 37°C.

Una vez finalizada la inducción de la expresión de las proteínas, se procedió a centrifugar los cultivos a 5000 rpm por 5 minutos y luego se retiró el sobrenadante. El pellet obtenido fue lavado con 4 mL de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet así obtenido fue sometido a un proceso de *shock freezing*: el pellet fue congelado utilizando nitrógeno líquido y se lo liofilizó durante 24 horas.

Protocolo de autoinducción largo para ADH-A y TesADH

Para el cultivo en medio de autoinducción, el precultivo se realizó de la misma manera que se detalló con anterioridad. Para la fase de cultivo, se tomaron 4 mL de precultivo y se adicionaron a 40 mL del medio correspondiente. El cultivo fue suplementado con 300 µL de ZnCl₂ 0,1M y 40 µL de ampicilina 100 mg/mL y luego fue dejado en agitación a 120 rpm, por 24 horas a 30°C. Luego, para la fase de inducción, el cultivo de protocolo largo se colocó a 20°C por 24 horas.

Una vez finalizada la inducción de la expresión de las proteínas, se procedió a centrifugar los cultivos a 5000 rpm por 5 minutos y luego se retiró el sobrenadante. El pellet obtenido fue lavado con 4 mL de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet así obtenido fue sometido a un proceso de *shock freezing*: el pellet fue congelado utilizando nitrógeno líquido y se lo liofilizó durante 24 horas.

Protocolo de autoinducción corto para ADH-A y TesADH

Para el cultivo en medio de autoinducción, el precultivo se realizó de la misma manera que se detalló con anterioridad. Para la fase de cultivo, se tomaron 4 mL de precultivo y se adicionaron a 40 mL del medio correspondiente. El cultivo fue suplementado con 300 μ L de $ZnCl_2$ 0,1M y 40 μ L de ampicilina 100 mg/mL y luego fue dejado en agitación a 120 rpm, por 3 horas a 37°C. Luego, para la fase de inducción, el cultivo se dejó otras 3 horas a 37°C.

Una vez finalizada la inducción de la expresión de las proteínas, se procedió a centrifugar los cultivos a 5000 rpm por 5 minutos y luego se retiró el sobrenadante. El pellet obtenido fue lavado con 4 mL de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet así obtenido fue sometido a un proceso de *shock freezing*: el pellet fue congelado utilizando nitrógeno líquido y se lo liofilizó durante 24 horas.

Protocolo de autoinducción largo para RasADH y SyADH

Para el cultivo en medio de autoinducción, el precultivo se realizó de la misma manera que se detalló con anterioridad. Para la fase de cultivo, se tomaron 4 mL de precultivo y se adicionaron a 40 mL del medio correspondiente. El cultivo fue suplementado con 40 μ L de kanamicina 100 mg/mL y luego fue dejado en agitación a 120 rpm, por 24 horas a 30°C. Luego, para la fase de inducción, el cultivo de protocolo largo se colocó a 20°C por 24 horas.

Una vez finalizada la inducción de la expresión de las proteínas, se procedió a centrifugar los cultivos a 5000 rpm por 5 minutos y luego se retiró el sobrenadante. El pellet obtenido fue lavado con 4 mL de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet así obtenido fue sometido a un proceso de *shock freezing*: el pellet fue congelado utilizando nitrógeno líquido y se lo liofilizó durante 24 horas.

Protocolo de autoinducción corto para RasADH y SyADH

Para el cultivo en medio de autoinducción, el precultivo se realizó de la misma manera que se detalló con anterioridad. Para la fase de cultivo, se tomaron 4 mL de

precultivo y se adicionaron a 40 mL del medio correspondiente. El cultivo fue suplementado 40 µL de kanamicina 100 mg/mL y luego fue dejado en agitación a 120 rpm, por 3 horas a 37°C. Luego, para la fase de inducción, el cultivo se dejó otras 3 horas a 37°C.

Una vez finalizada la inducción de la expresión de las proteínas, se procedió a centrifugar los cultivos a 5000 rpm por 5 minutos y luego se retiró el sobrenadante. El pellet obtenido fue lavado con 4 mL de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet así obtenido fue sometido a un proceso de *shock freezing*: el pellet fue congelado utilizando nitrógeno líquido y se liofilizó durante 24 horas.

Composición de los medios de cultivo empleados

MEDIO LB	
Tripteína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua	1000 mL

MEDIO LB BAJO EN NaCl	
Tripteína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5g
Agua	1000 mL

MEDIO TB	
Agua Milli-Q	900 mL
Tripteína	12 g
Extracto de levadura	24 g
Glicerol	4 mL
K fosfato estéril	100 mL

MEDIO DE AUTOINDUCCIÓN	
ZY	928 mL
MgSO₄ 1M	1 mL
50x5052	20 mL
20xNPS	50 mL

ZY	
Tripteína	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agua	925 mL

50x5052	
Glicerol	250 g
Agua	730 mL
Glucosa	25 g
Lactosa	100 g

20xNPS	
Agua	900 mL
(NH₄)₂SO₄	66 g
KH₂PO₄	136 g
Na₂HPO₄	142 g

Procedimiento general para la bioreducción del sustrato modelo con los preparados enzimáticos liofilizados obtenidos

En un tubo Eppendorf de 1.5 mL se colocaron 10 mg de pellet bacteriano y se agregaron 450 μ L de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4. Posteriormente, se adicionaron 0,75 mg de la cetona disueltos en 30 μ L de isopropanol (concentración final 5 % v/v). Luego, se colocaron 60 μ L de ZnCl₂ en los tubos con ADH-A y TesADH y 60 μ L de MgCl₂ a los tubos con RasADH o SyADH. Por último, se incorporaron 60 μ L de NADH a los tubos con ADH-A y 60 μ L de NADPH (5 mM) a los restantes. Los tubos se agitaron en un agitador orbital a 250 rpm, por 24 horas y a una temperatura de 30°C o temperatura indicada. Luego, se extrajo con AcOEt (3 x 1 mL) y los extractos orgánicos se lavaron con H₂O (3 x 1 mL). Las fracciones orgánicas se combinaron y se secaron con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó a presión reducida y el crudo obtenido fue analizado por CG convenientemente derivatizado.

Procedimiento general para el estudio del pH en la reacción

Se aplicó el mismo procedimiento que la reacción modelo, cambiando el buffer por Tris-HCl 50 mM pH 6,4 o Tris-HCl 50 mM pH 8,4.

Conclusiones Generales y Proyecciones

En el transcurso de esta Tesis, se ha puesto en manifiesto la importancia de la Biocatálisis para definir centros estereogénicos de moléculas orgánicas azufradas de interés, con potencial en Síntesis Orgánica. Notablemente, los procesos multienzimáticos en cascada, resultaron exitosos para la obtención selectiva de productos azufrados quirales, con altos rendimientos aislados. Esto se debe a la optimización y compatibilidad de las condiciones de reacción, lo que lleva a una alta eficiencia de cada uno de los biocatalizadores, evitando la acumulación de intermediarios, y, en consecuencia, la generación de subproductos.

Un aspecto no menor se relaciona con la combinación de enzimas (hidrolasas, transferasas, oxidorreductasas) en procesos secuenciales o en cascada, que dio acceso a un control estricto de las estereoquímicas absolutas y relativas de los productos obtenidos. Esto demuestra la versatilidad de los procesos biocatalíticos para definir la quiralidad del compuesto objetivo. Algunos de los procesos enzimáticos detallados aquí pudieron ser llevados a cabo a escala gramo, y los biocatalizadores inmovilizados pudieron ser reutilizados al menos tres veces sin pérdidas significativas de la actividad.

Desde el punto de vista tecnológico, fue posible mejorar la obtención de biocatalizadores en términos de costos, tiempo y rendimiento, modificando el sistema de expresión y otros parámetros como el medio de cultivo, tiempo y temperatura.

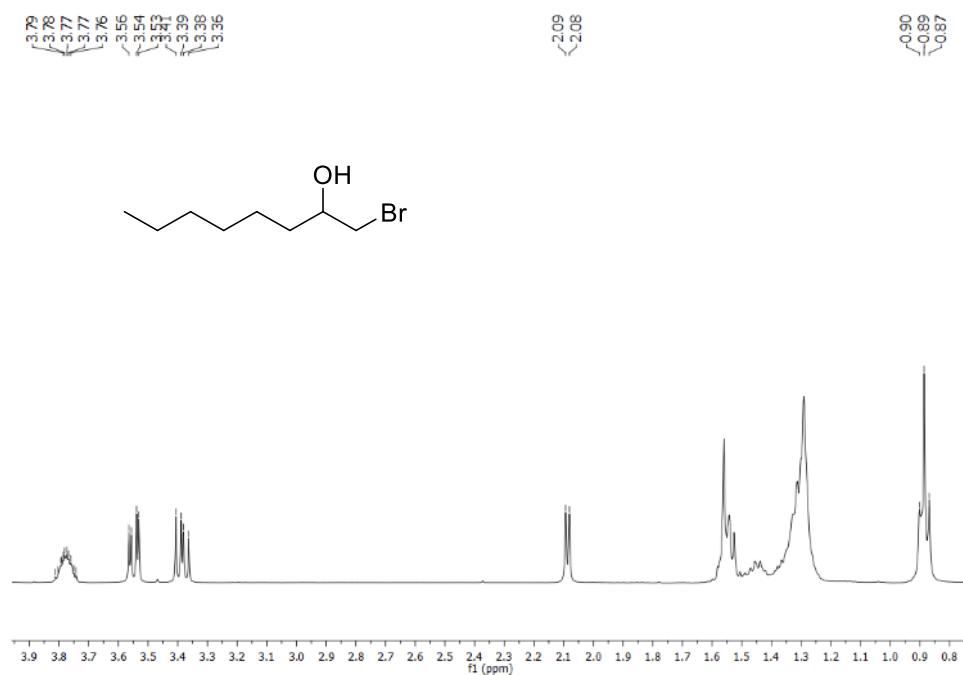
Por otro lado, gran parte de este trabajo se tomó ventaja de estrategias multicomponente, que permitieron tener dominio del espacio químico de los compuestos quirales azufrados. La combinación de metodologías multicomponente acopladas a procesos biocatalíticos permitió la obtención de productos enantioenriquecidos en pocos pasos de reacción y alta economía atómica. Esto abre el camino para la producción de librerías de compuestos con potencial utilidad en Química Medicinal.

Como proyecciones de esta Tesis, se planea:

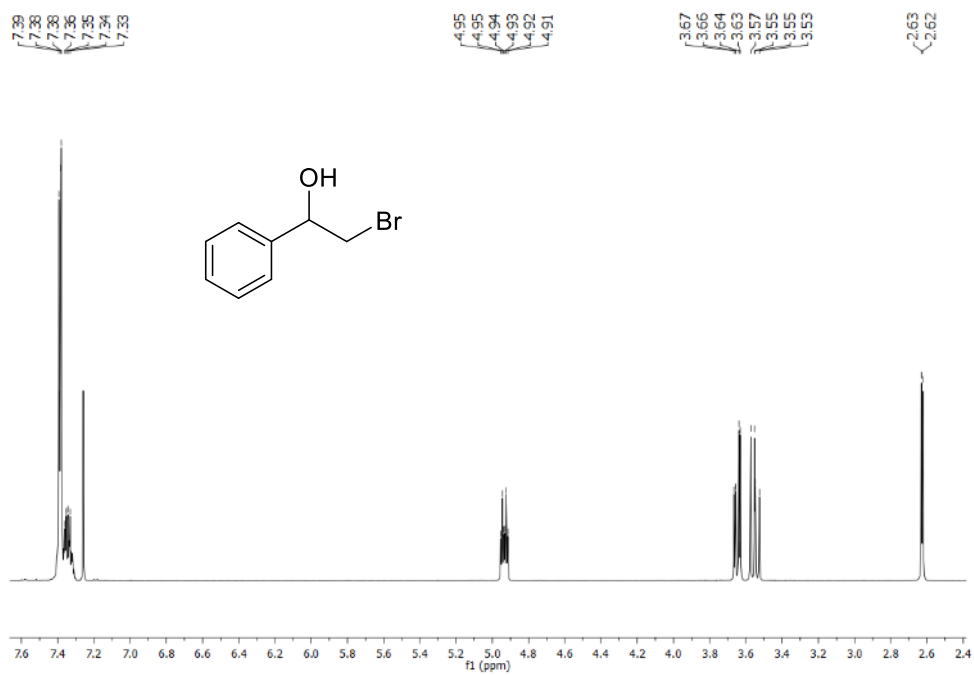
- Desarrollar algunos de estos procesos quimioenzimáticos en dispositivos de flujo continuo para lograr mayor productividad global de los procesos.
- Desarrollar sistemas fotobiocatalíticos en los que coexistan reacciones fotorrédox con reacciones enzimáticas, para el diseño de nuevas metodologías.

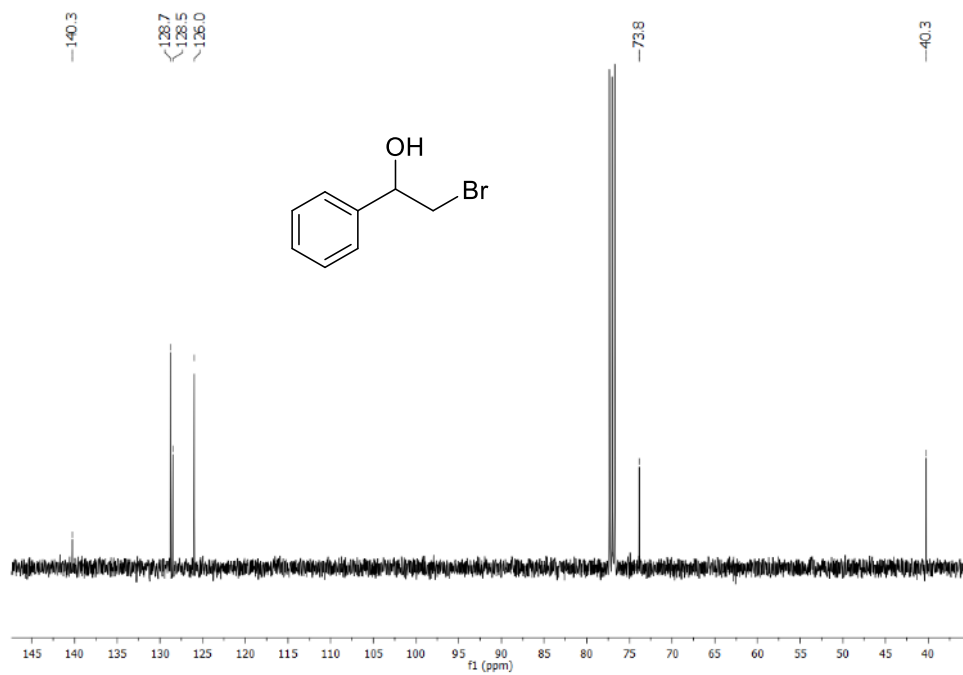
Apéndice

1-bromooctan-2-ol (2a)

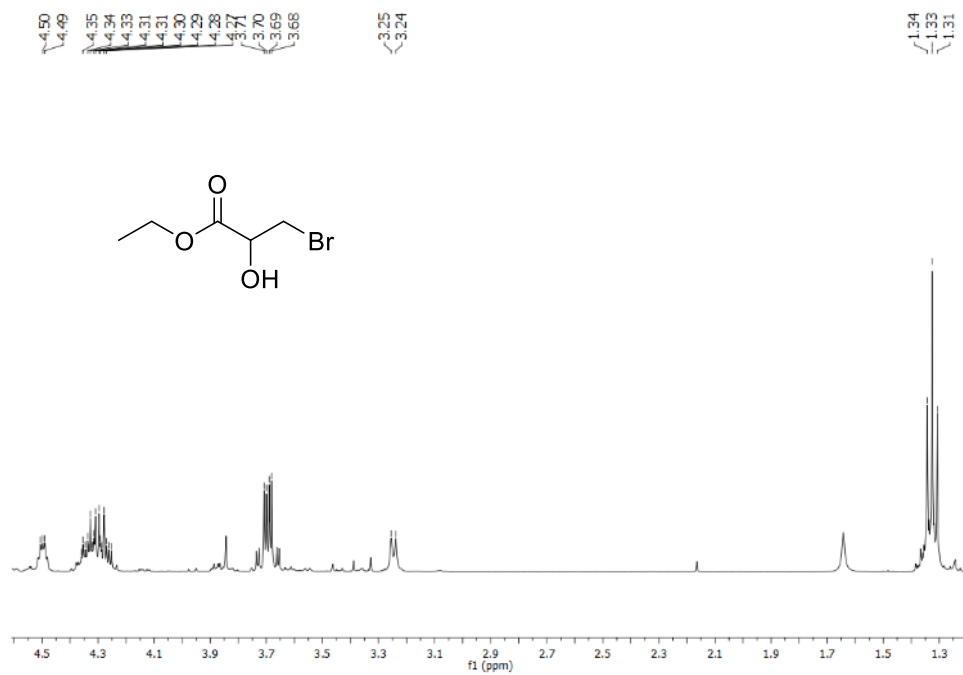


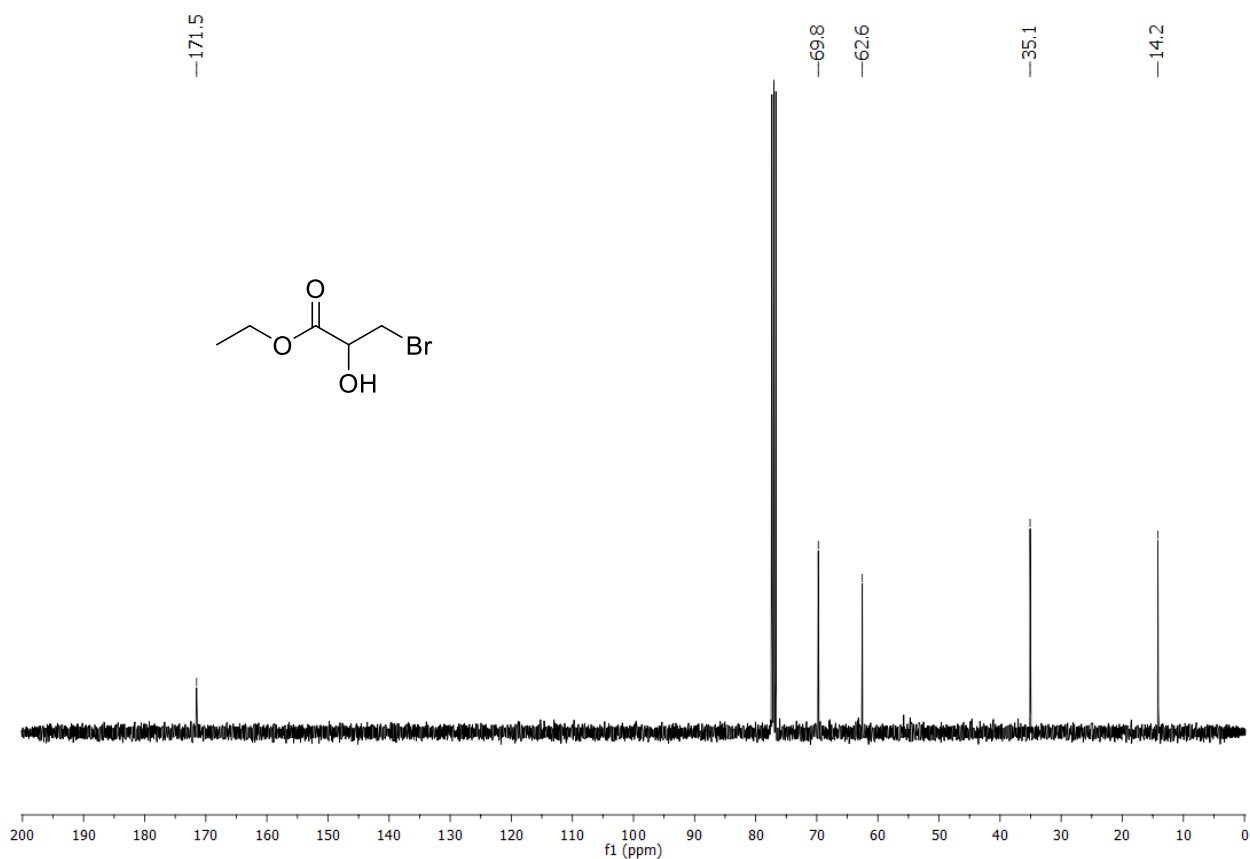
2-bromo-1-phenyletan-1-ol (2b)



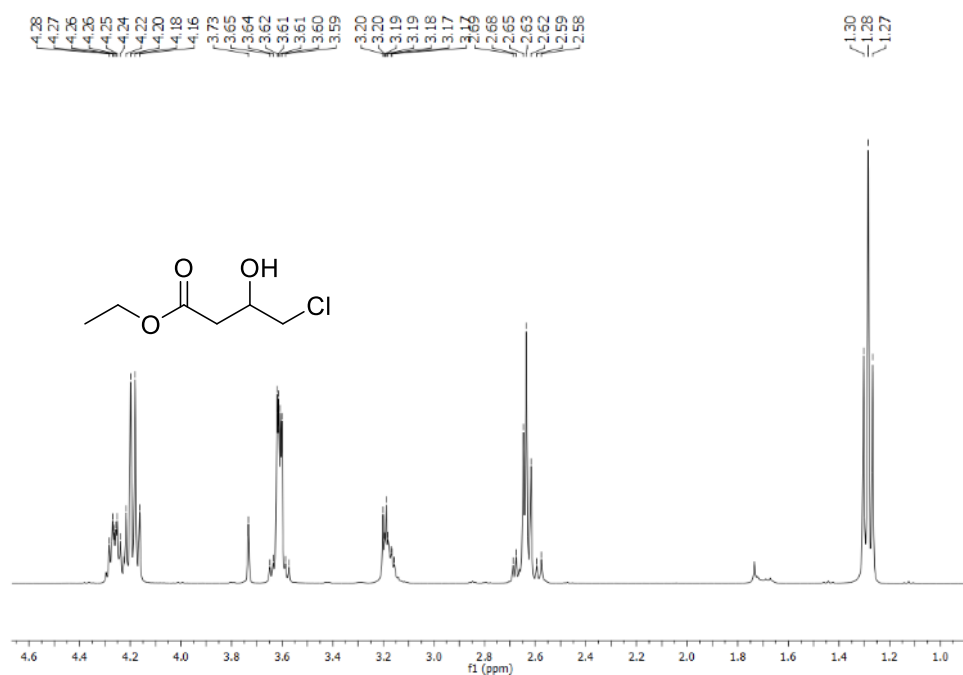


3-bromo-2-hidroxipropanoato de etilo (2e)

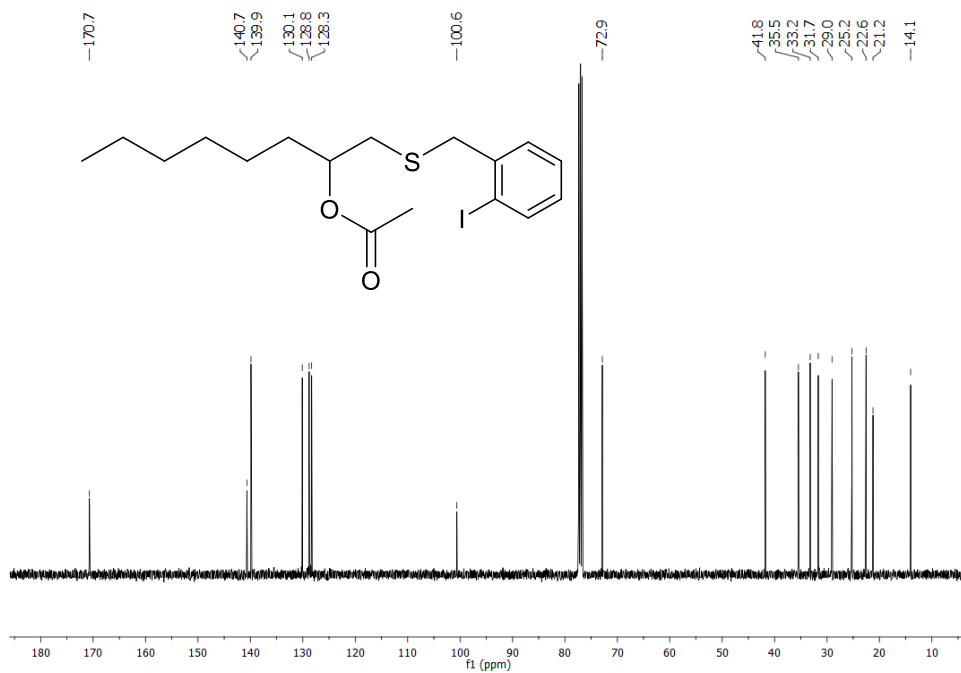
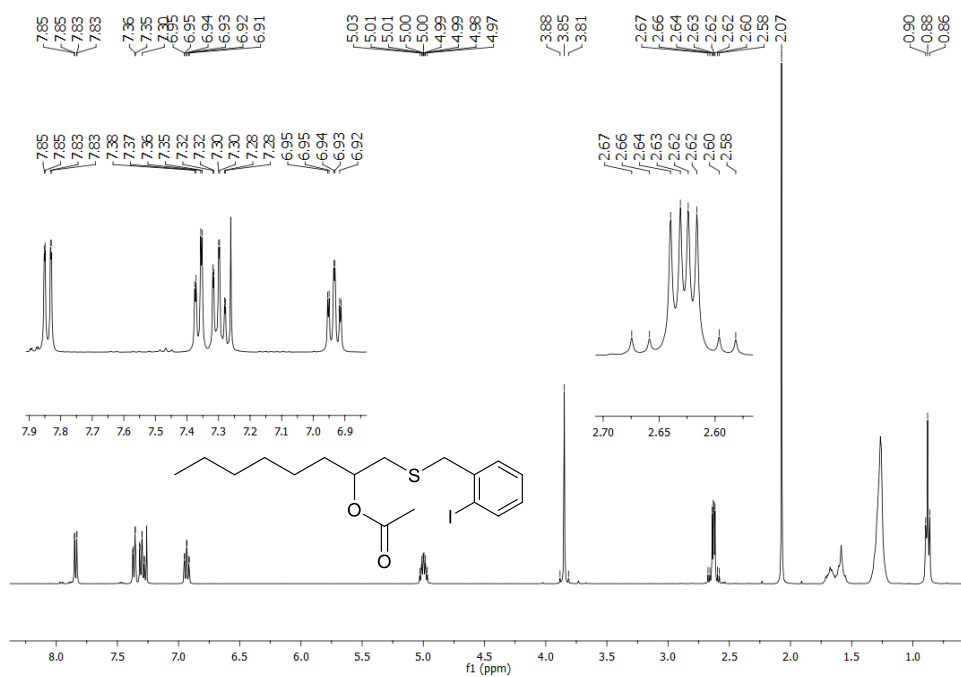




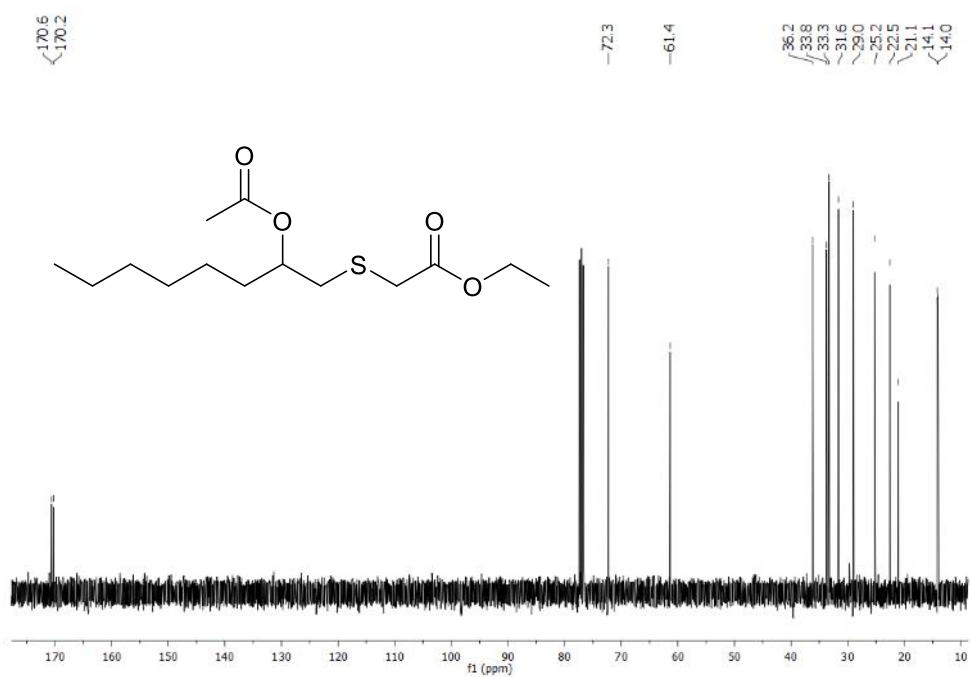
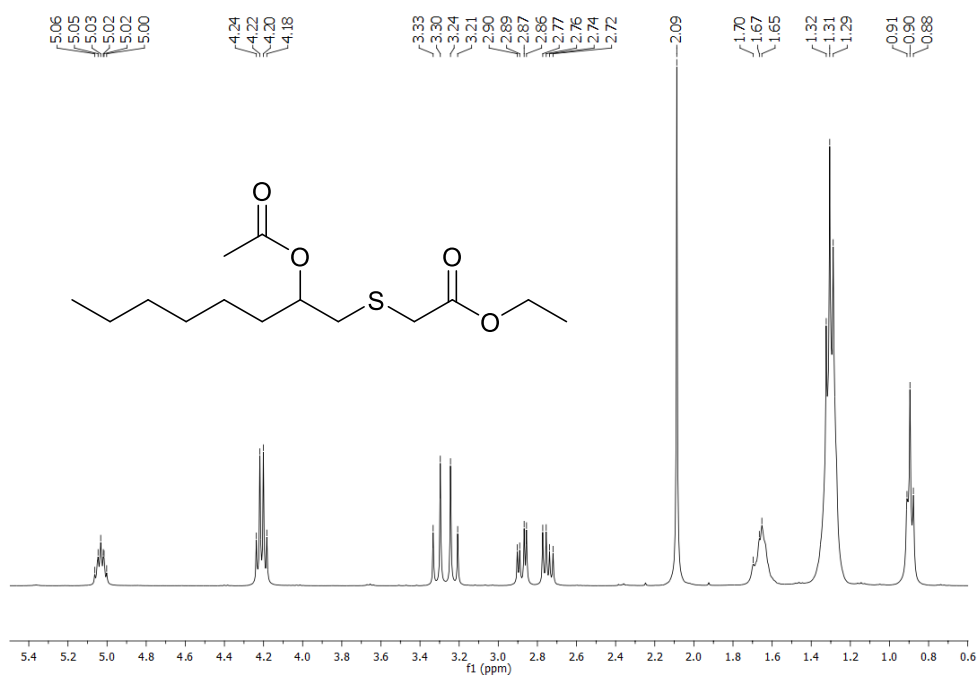
4-cloro-3-hidroxi-butanoato de etilo (2f)



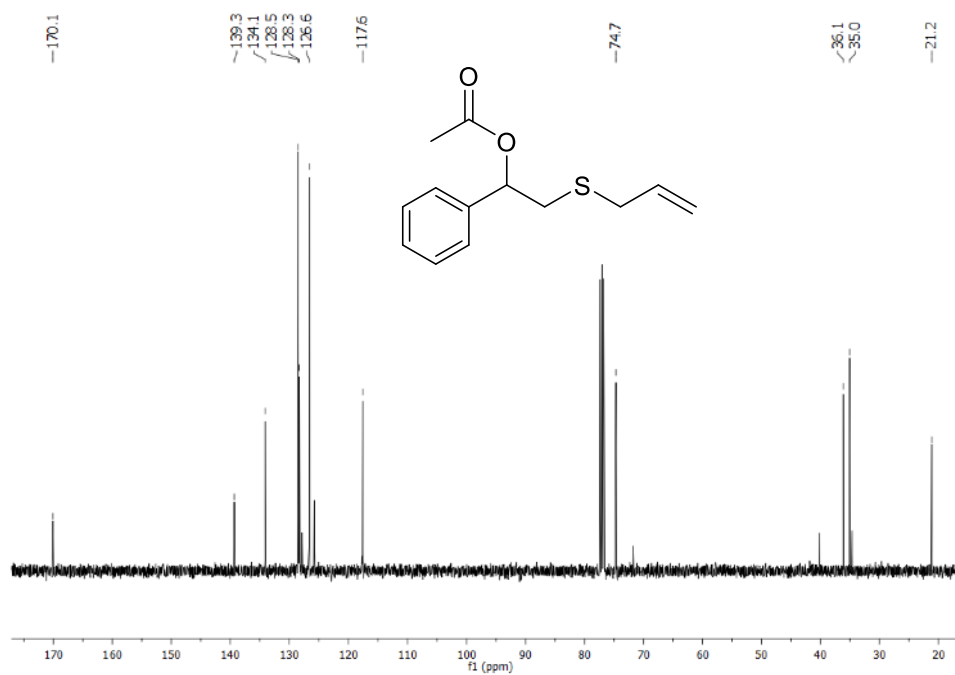
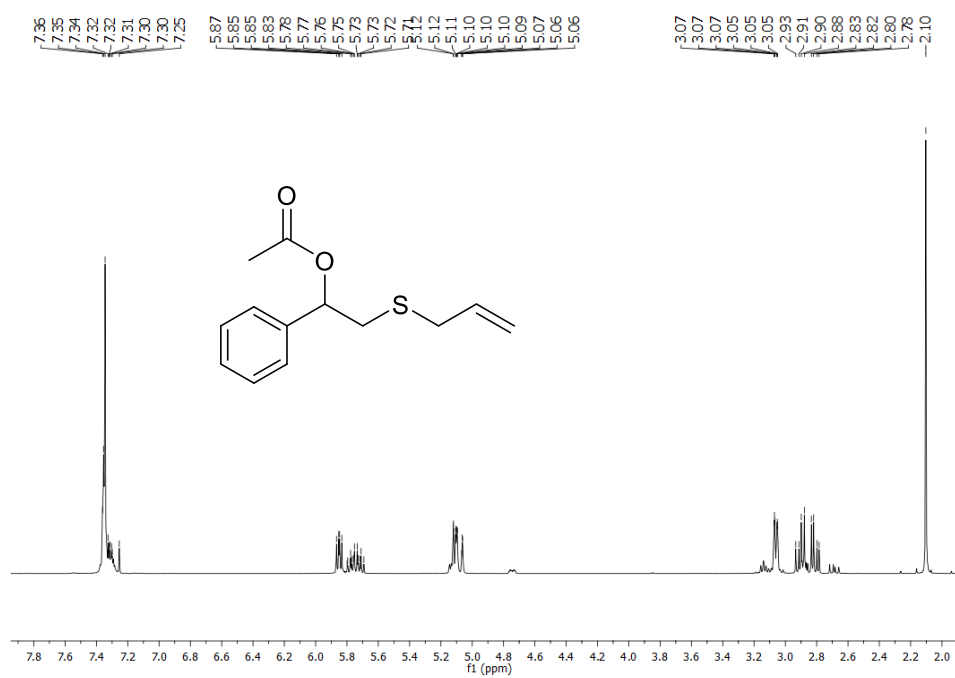
1-((2-iodobencil)tio)octan-2-il acetato (3aa)



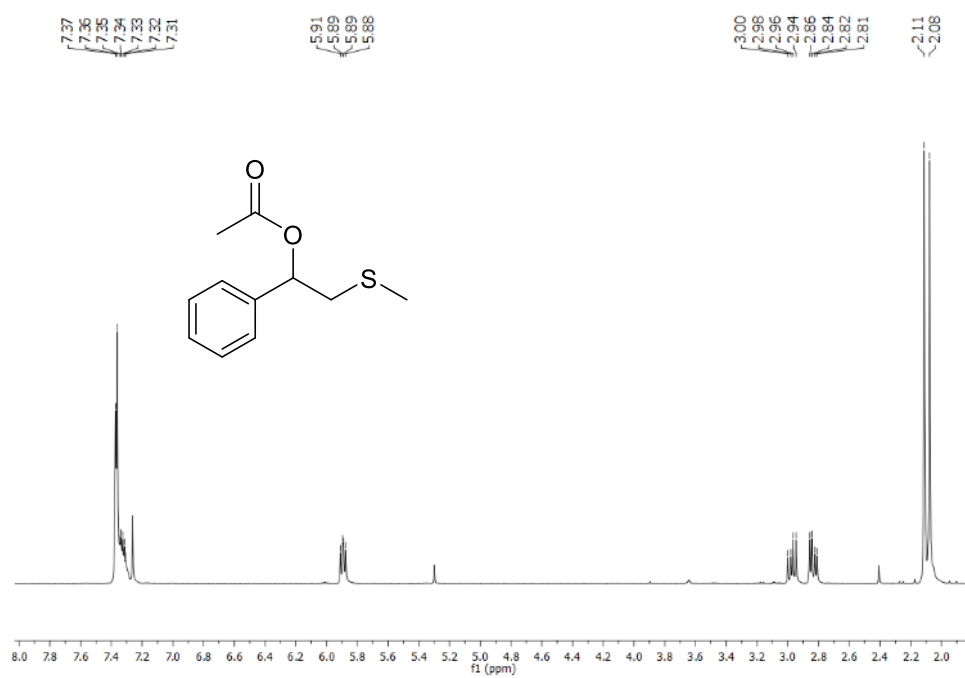
2-((2-acetoxioctil)tio)acetato de etilo (3ab)



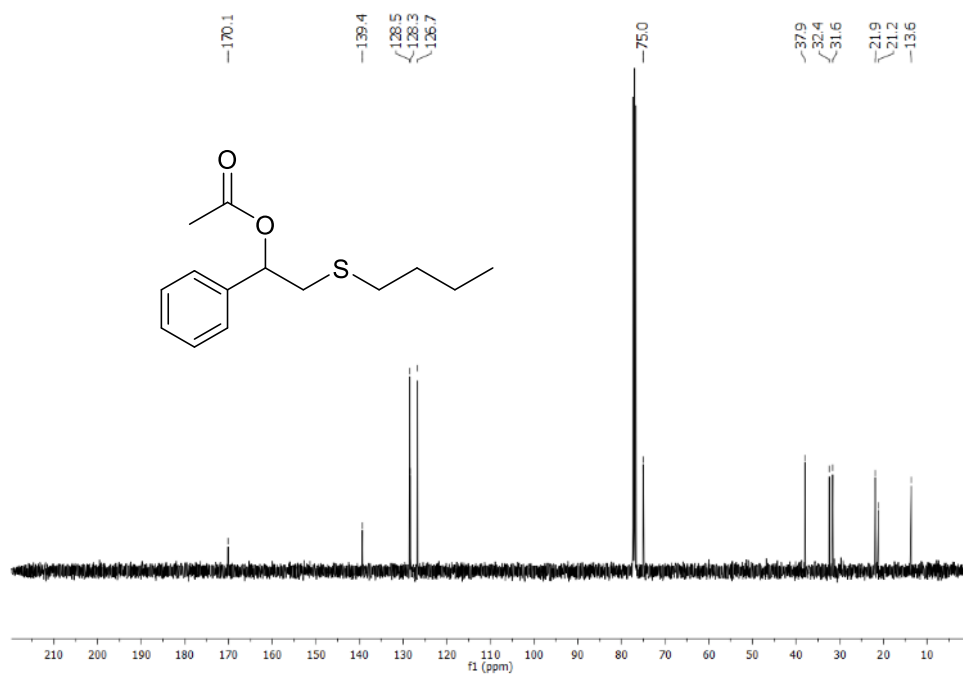
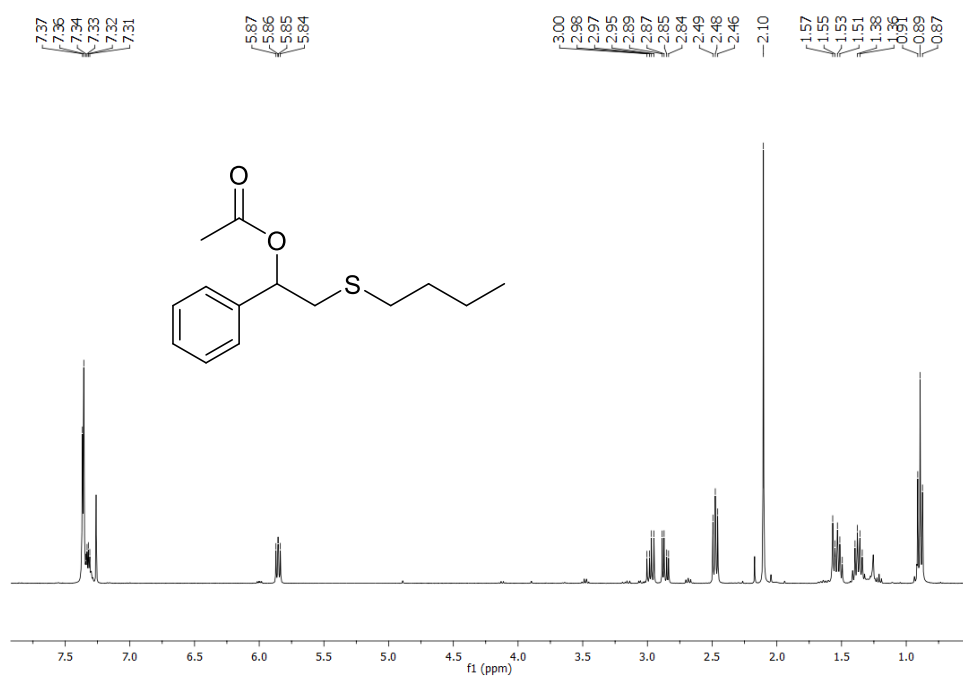
2-(aliltio)-1-feniletil acetato (3ba)



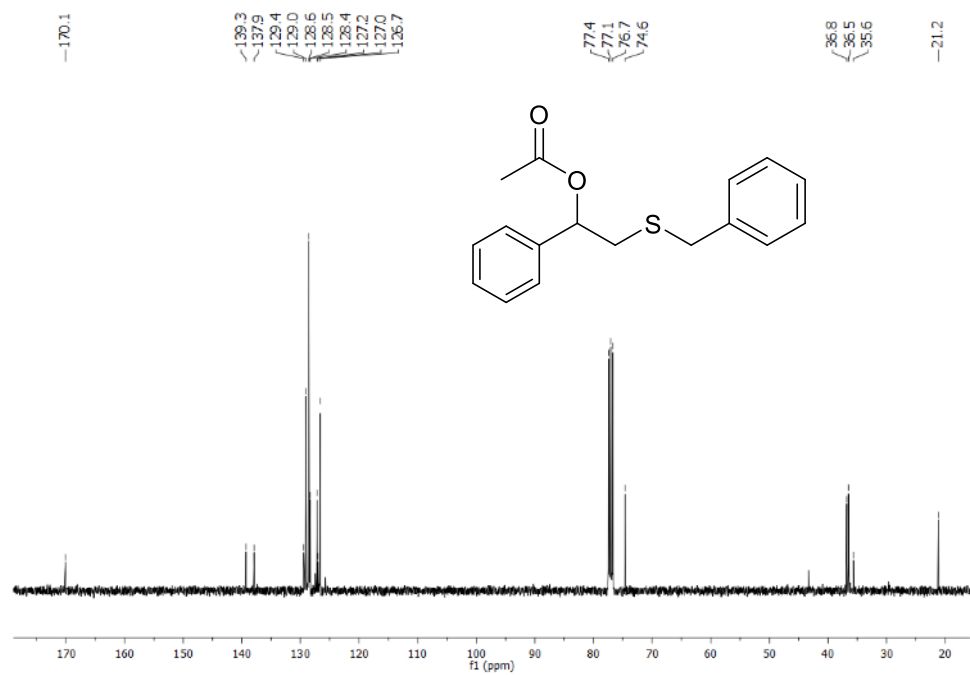
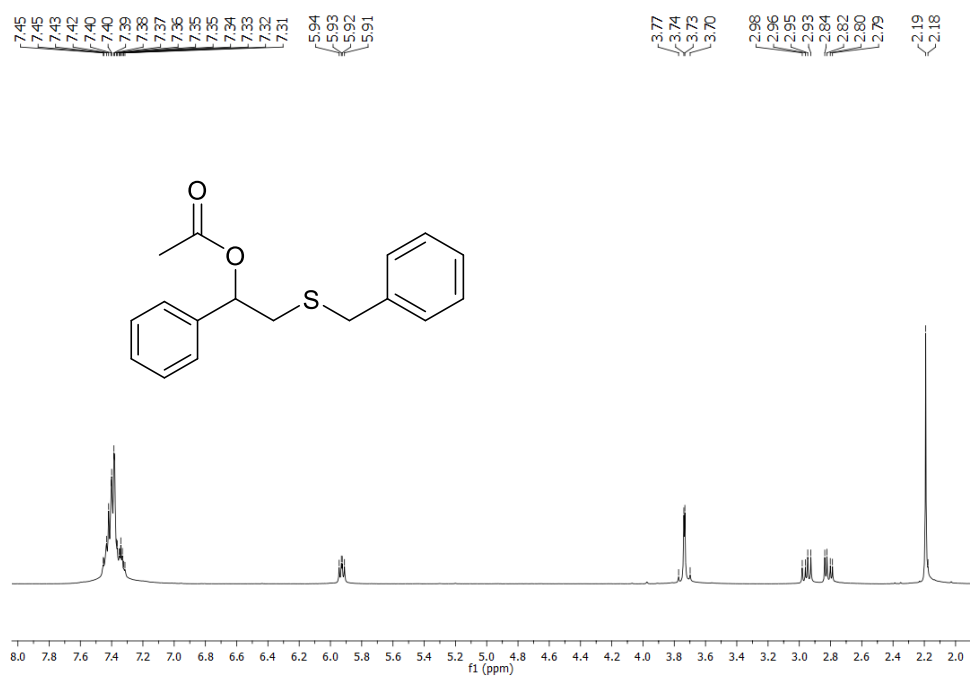
2-(metiltio)-1-feniletil acetato (3bb)



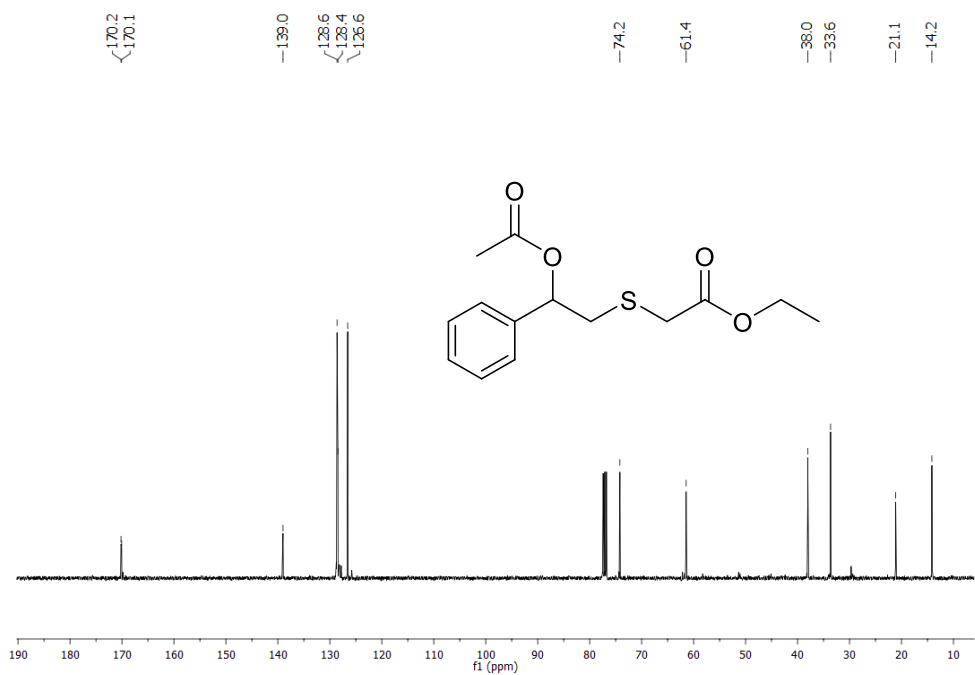
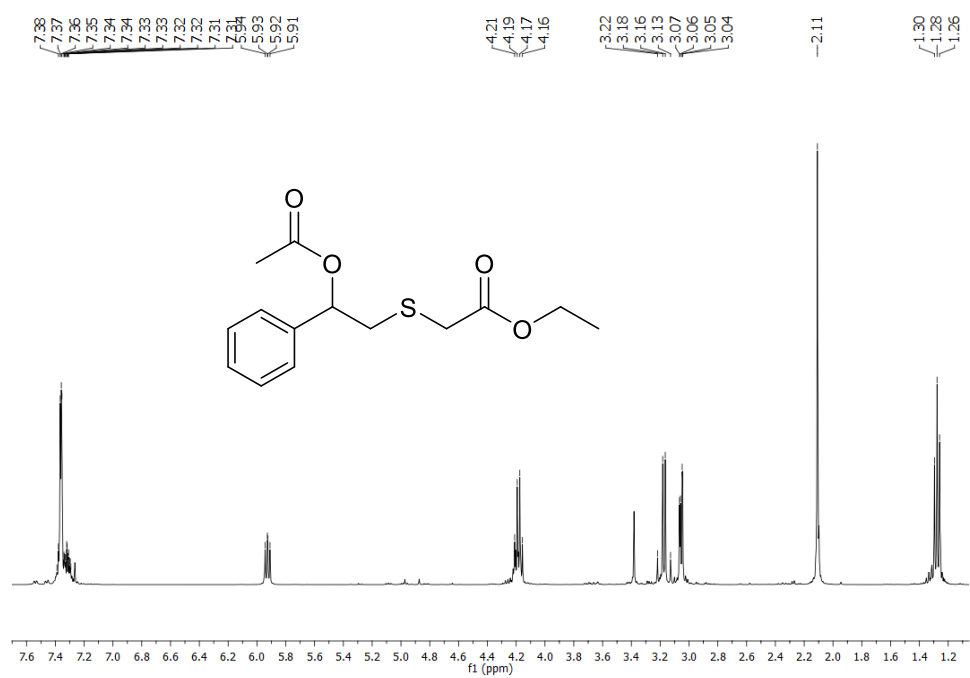
2-(butiltio)-1-feniletil acetato (3bc)



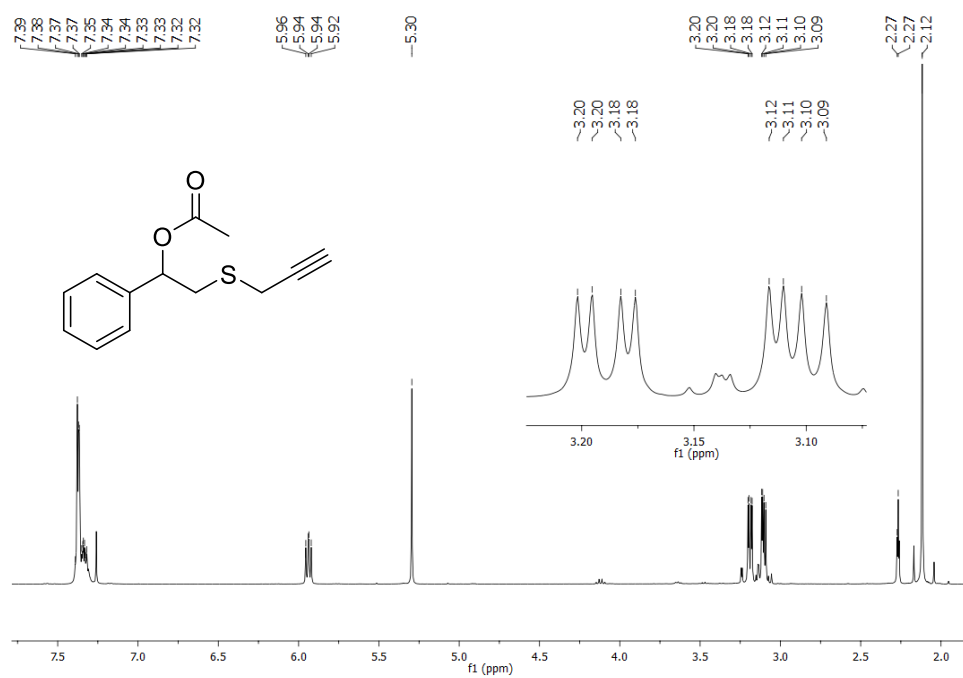
2-(benciltio)-1-feniletil acetato (3bd)



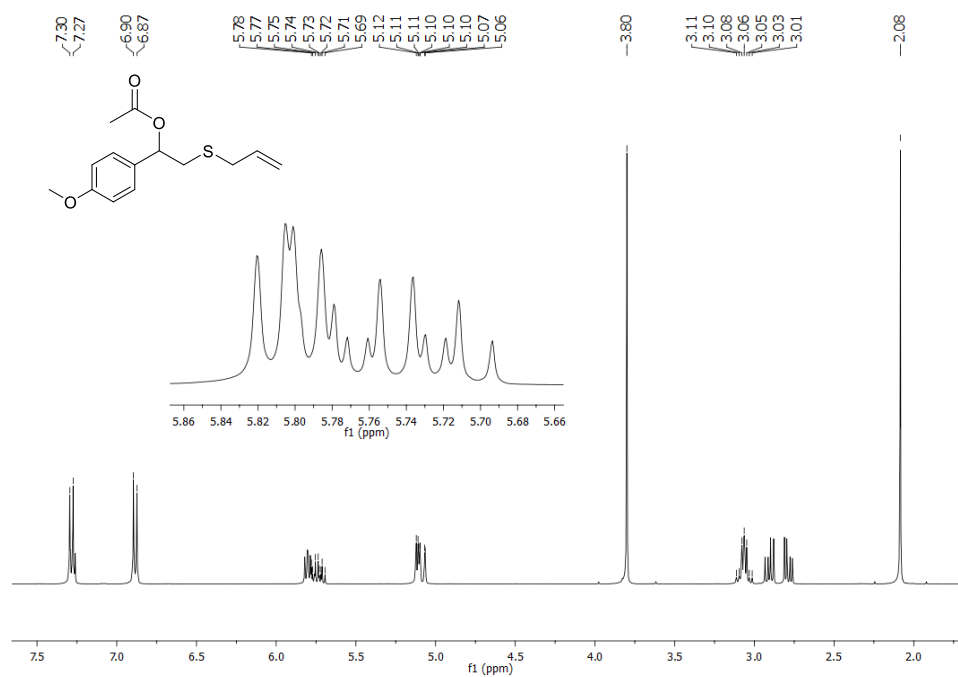
2-((2-acetoxi-2-feniletil)tio)acetato de etilo (3be)



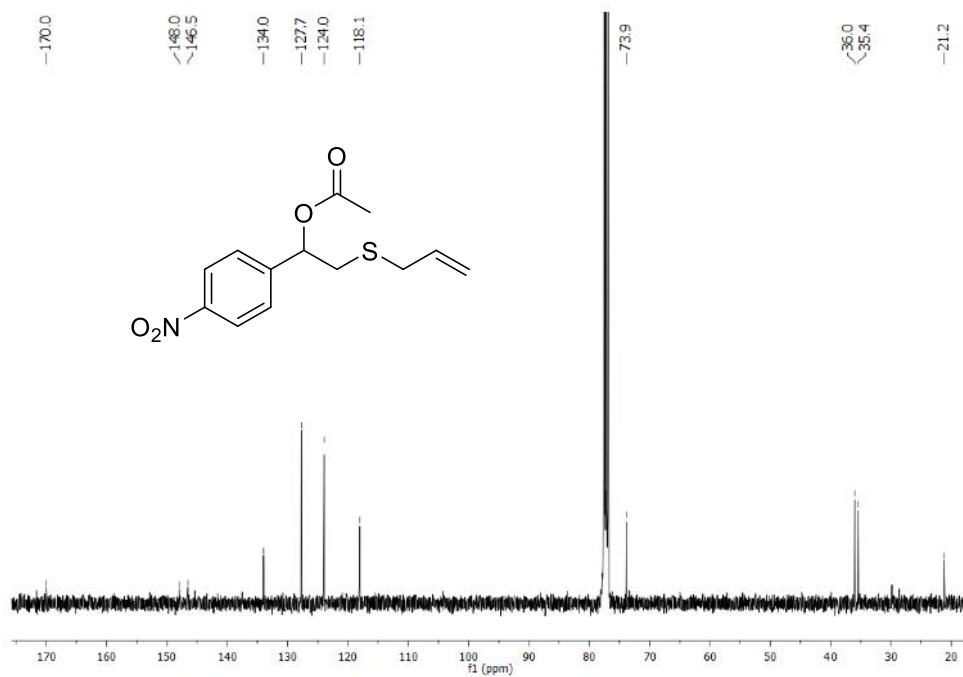
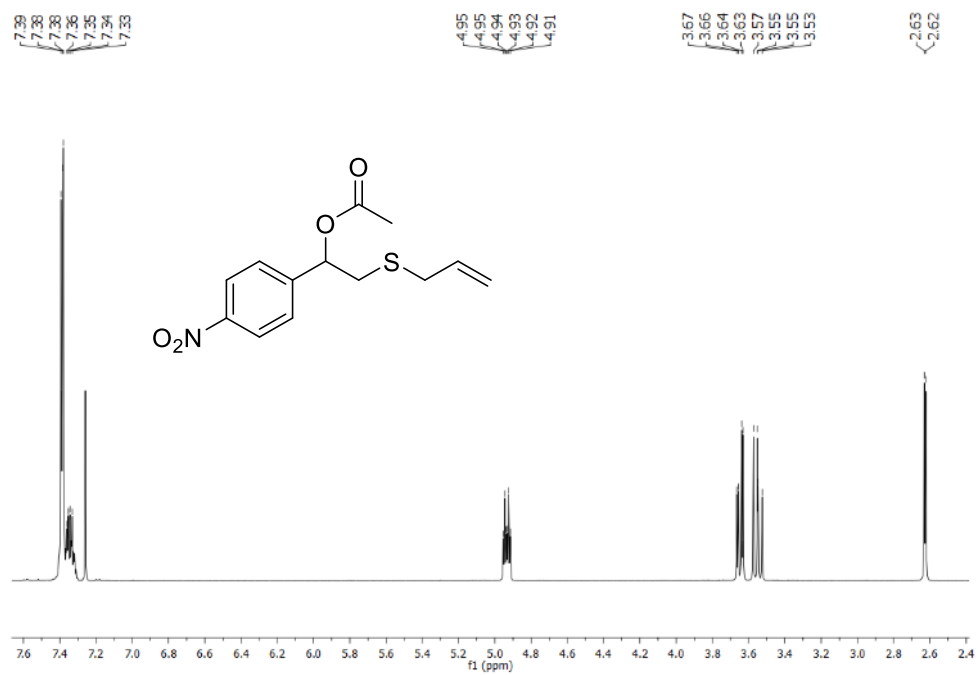
1-fenil-2-(prop-2-in-1-iltio)etilacetato (3bf)

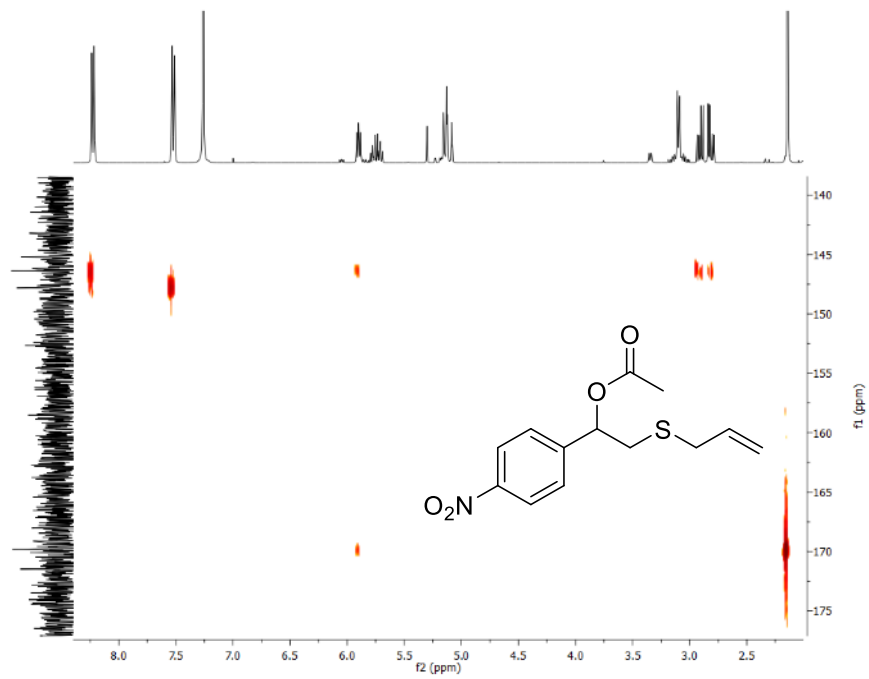


2-(alilitio)-1-(4-metoxifenil)etil acetato (3ca)

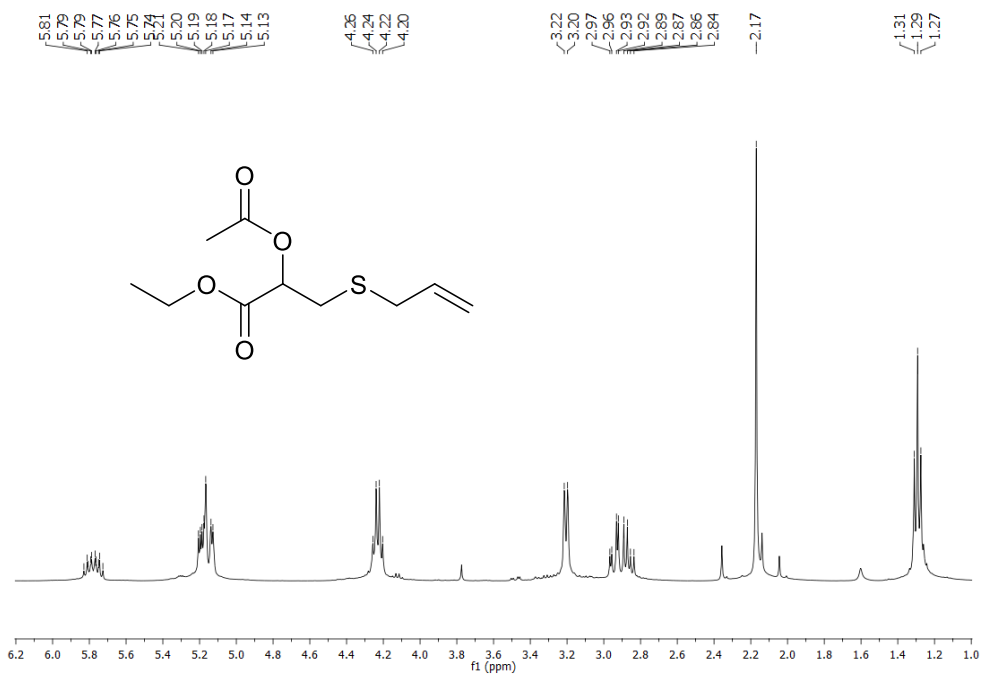


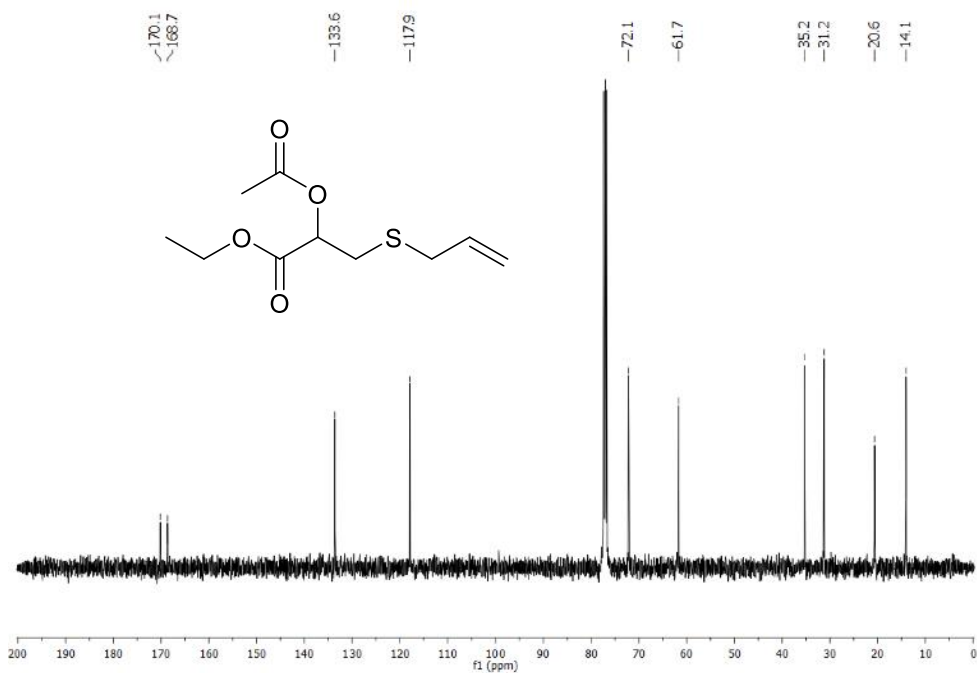
2-(alilltio)-1-(4-nitrofenil)etil acetato (3da)



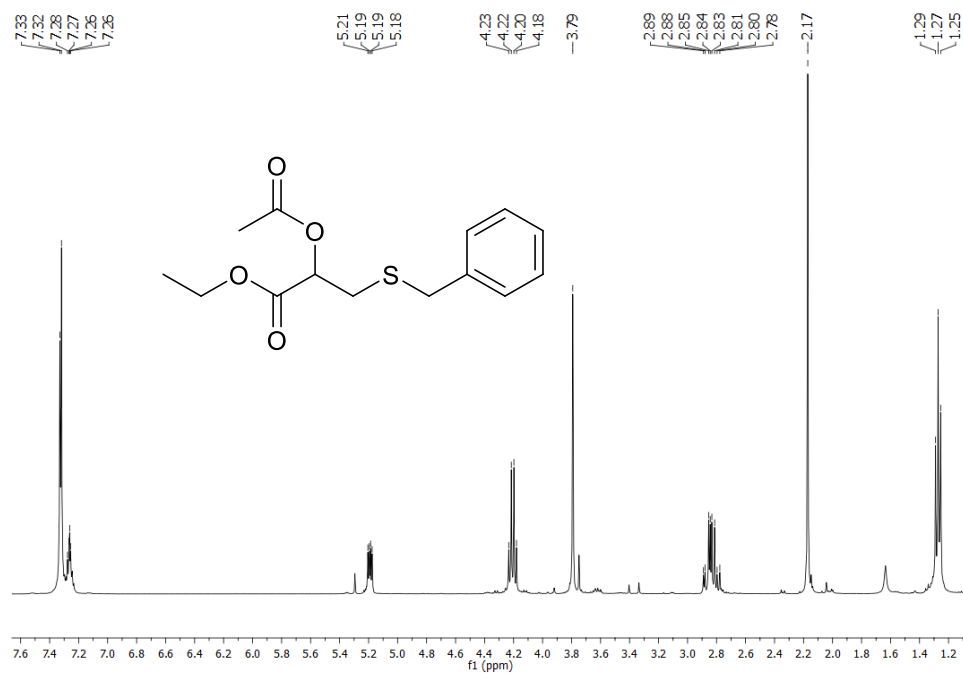


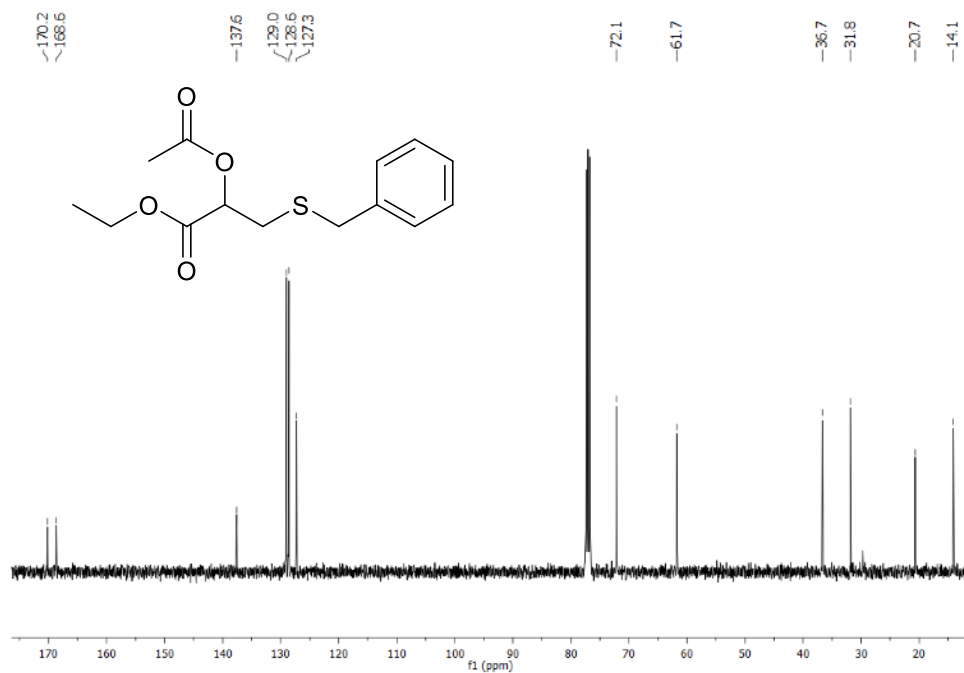
2-acetoxi-3-(alilitio)propanoato de etilo (3ea)



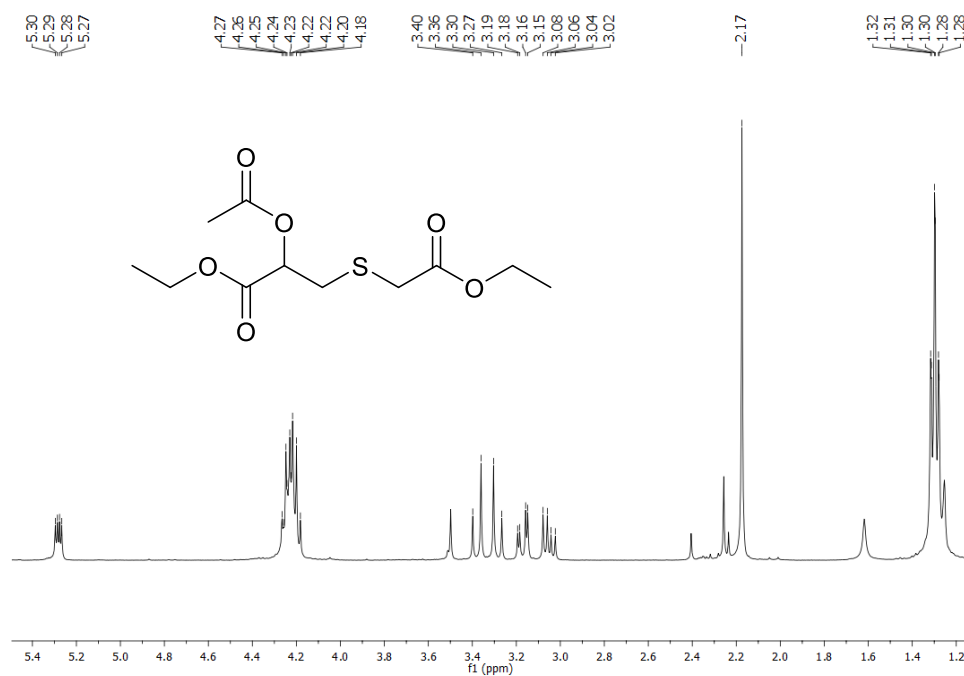


2-acetoxy-3-(benzyltio)propanoato de etilo (3eb)



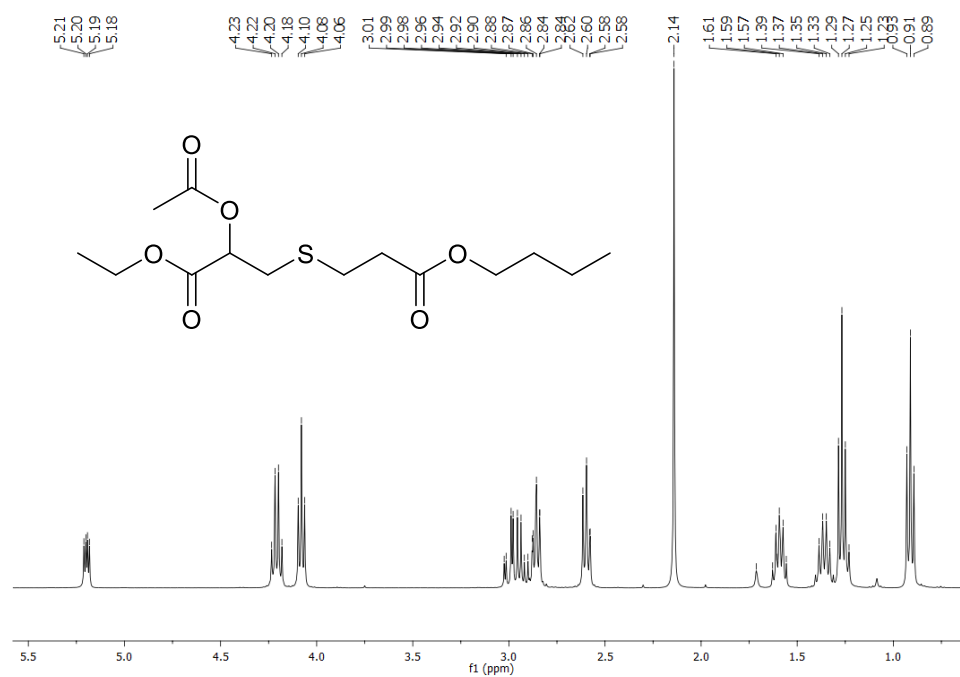


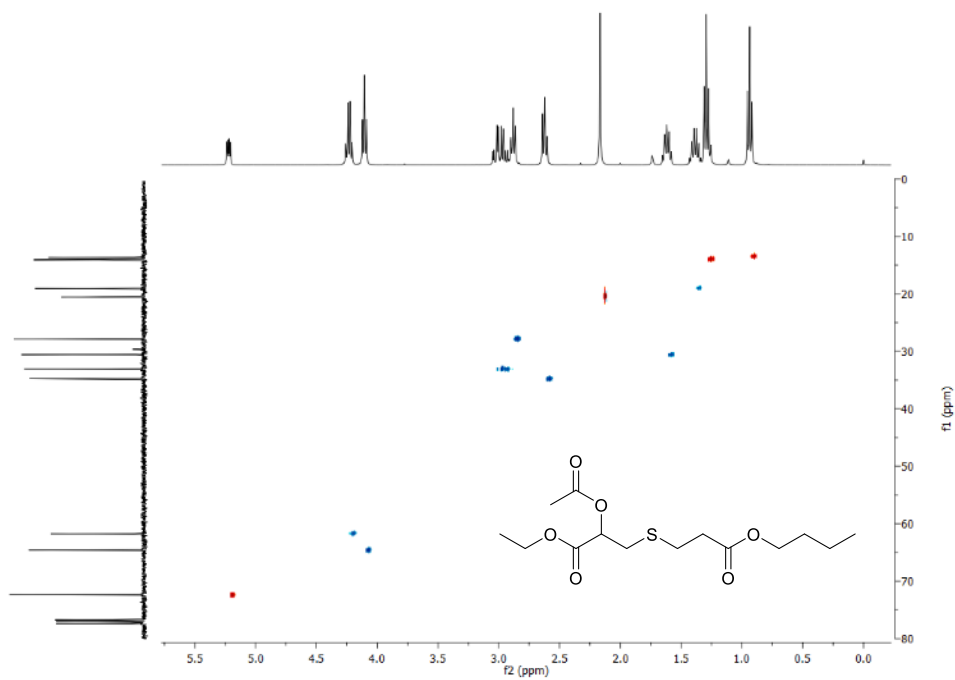
2-acetoxy-3-((2-etoxi-2-oxoetil)tio)propanoato de etilo (3ec)



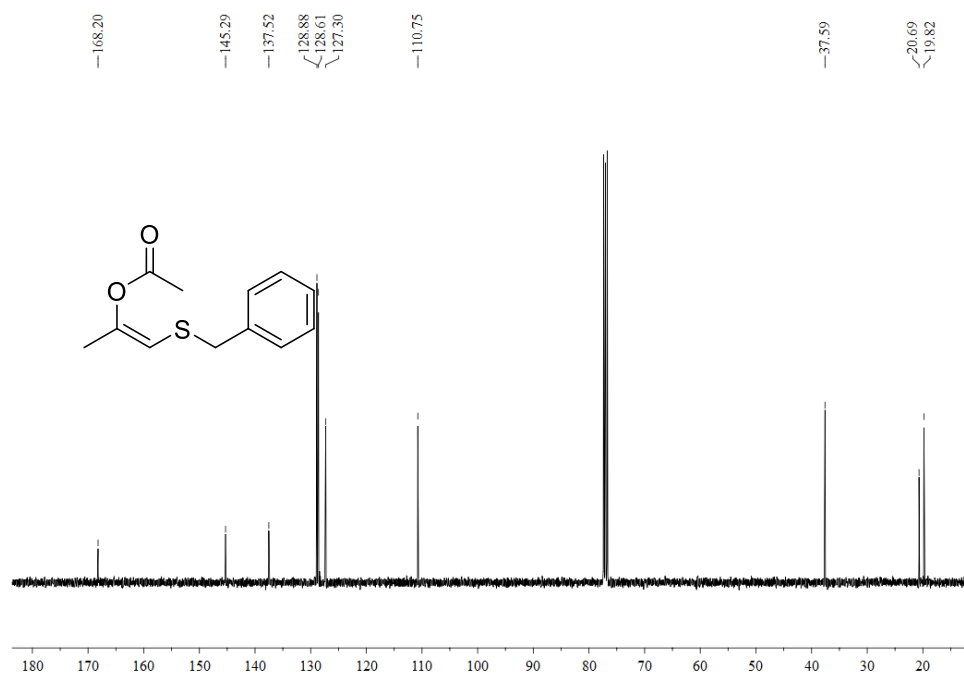
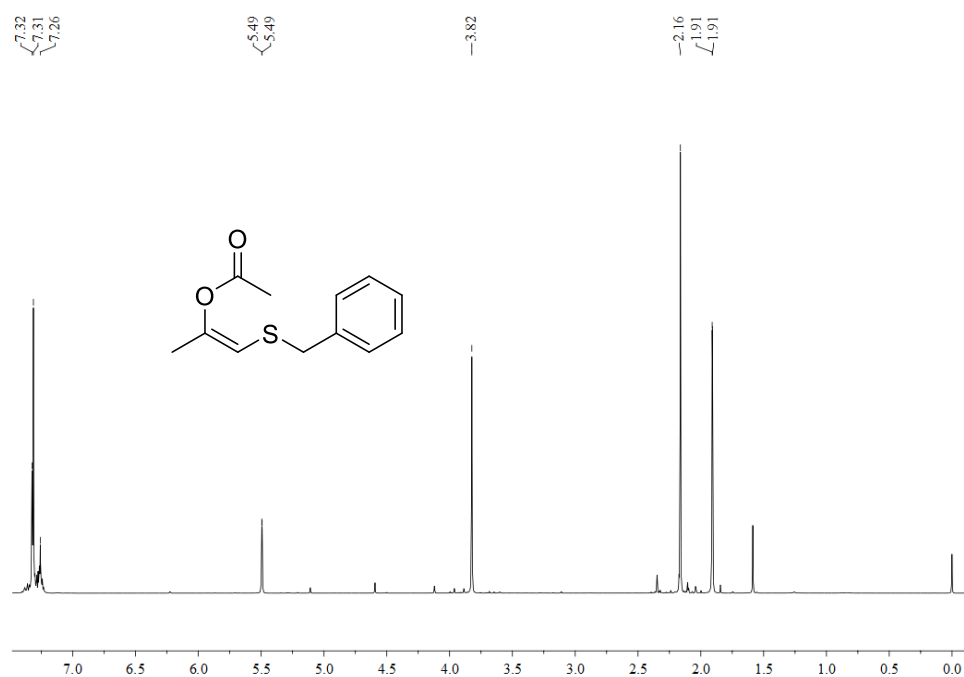


2-acetoxi-3-((3-butoxi-3-oxopropil)tio)propanoato de etilo (3ed)

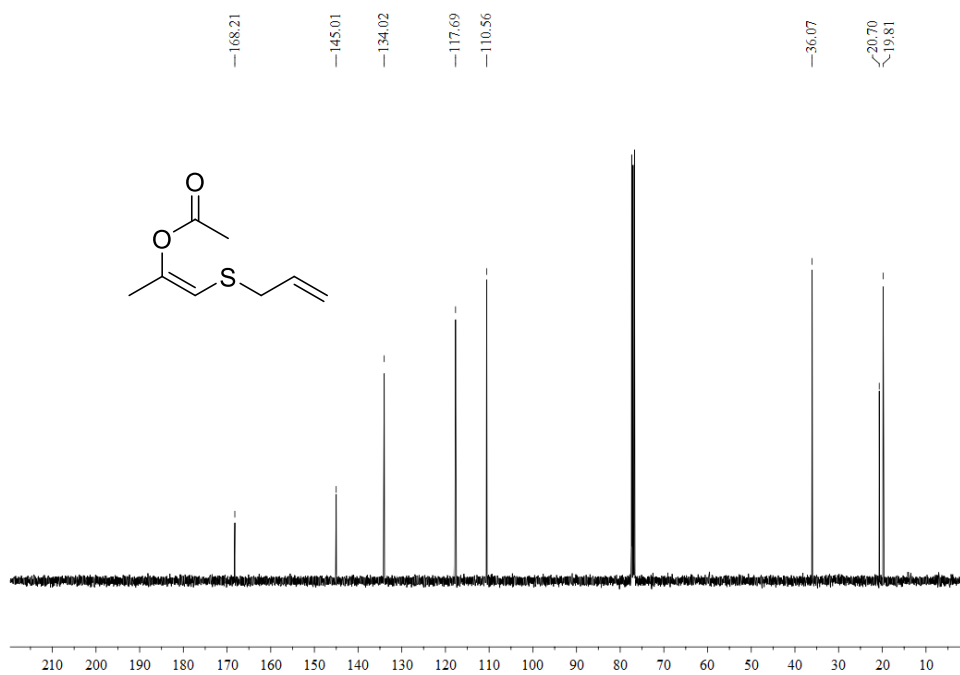
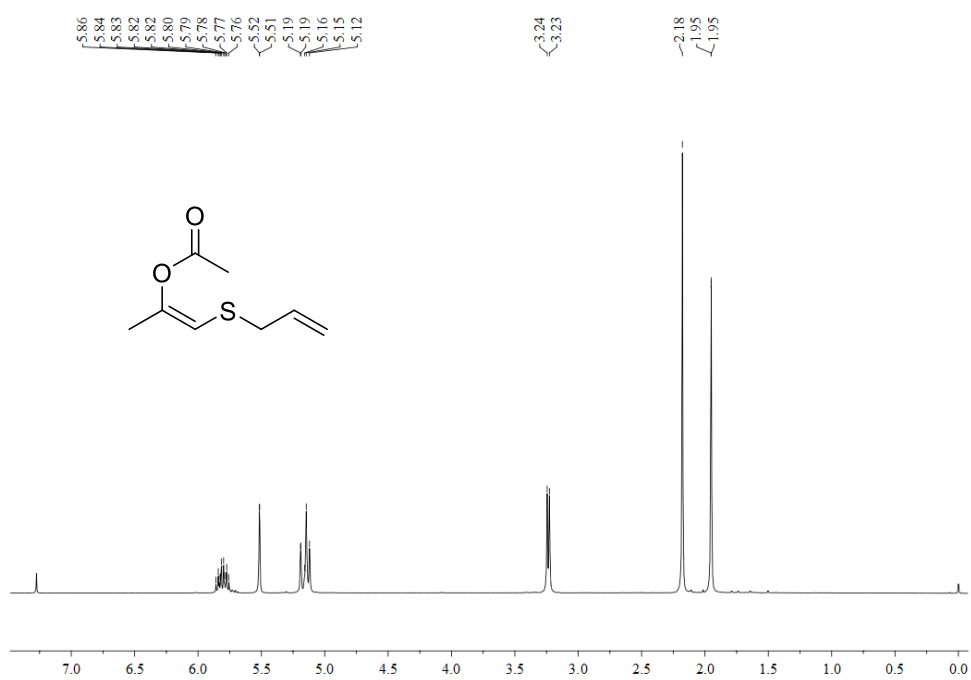




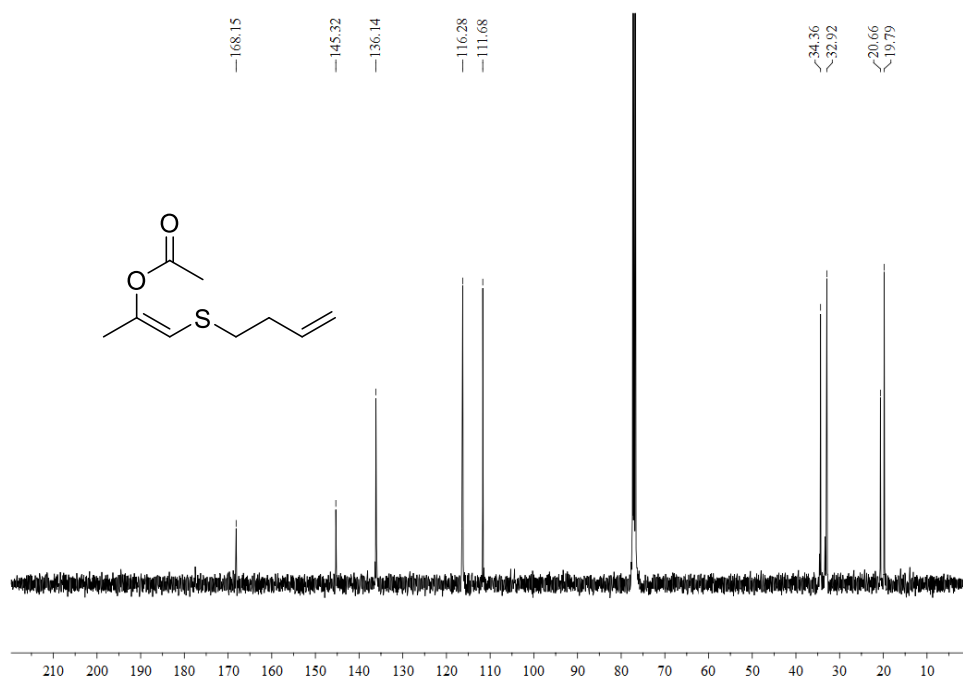
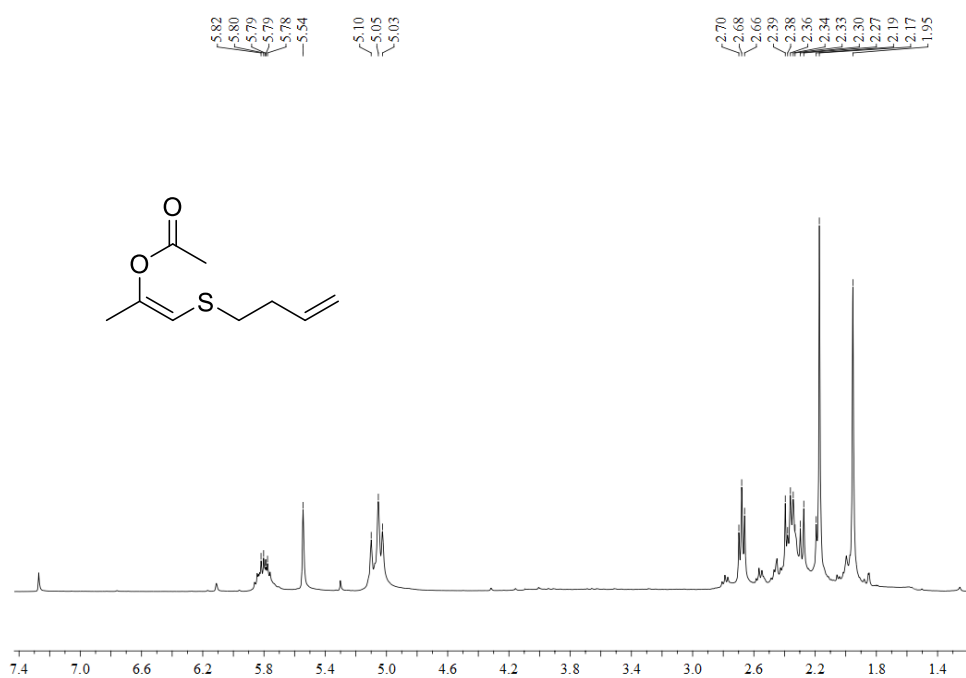
(Z)-1-(benciltio)prop-1-en-2-il acetato (4a)



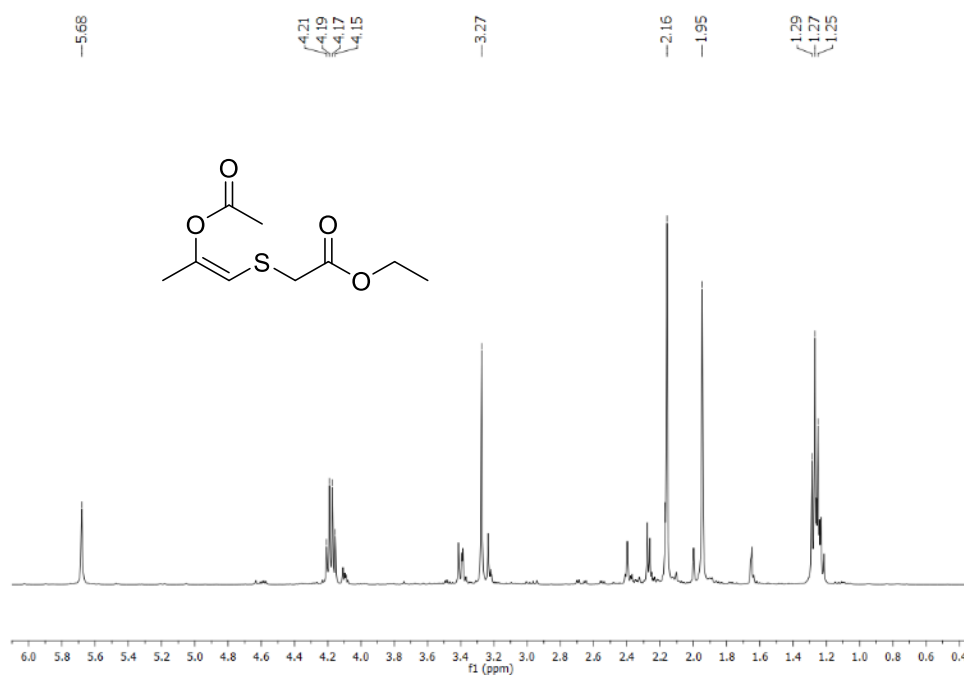
(Z)-1-(aliltio)prop-1-en-2-il acetato (4b)



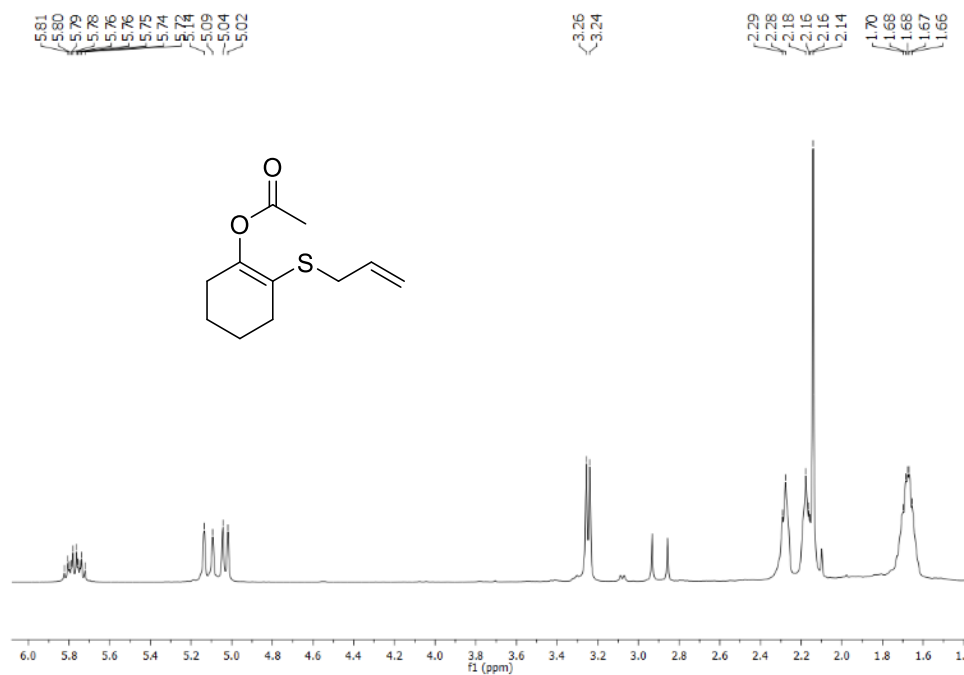
(Z)-1-(but-3-en-1-iltio)prop-1-en-2-il acetato (4c)

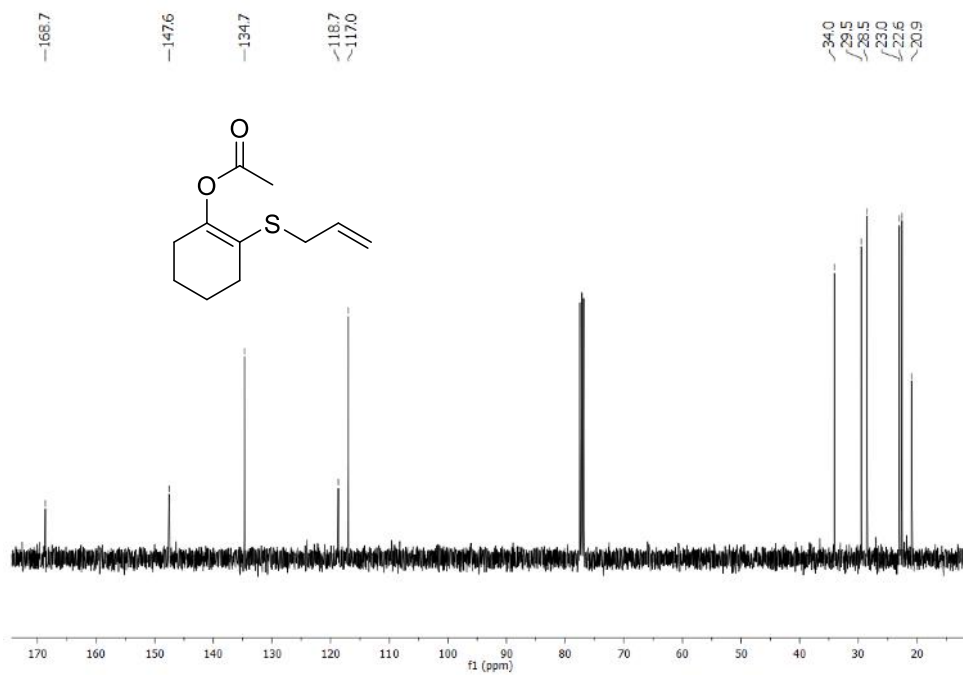


(Z)-2-((2-acetoxiprop-1-en-1-il)tio)acetato de etilo (4d)

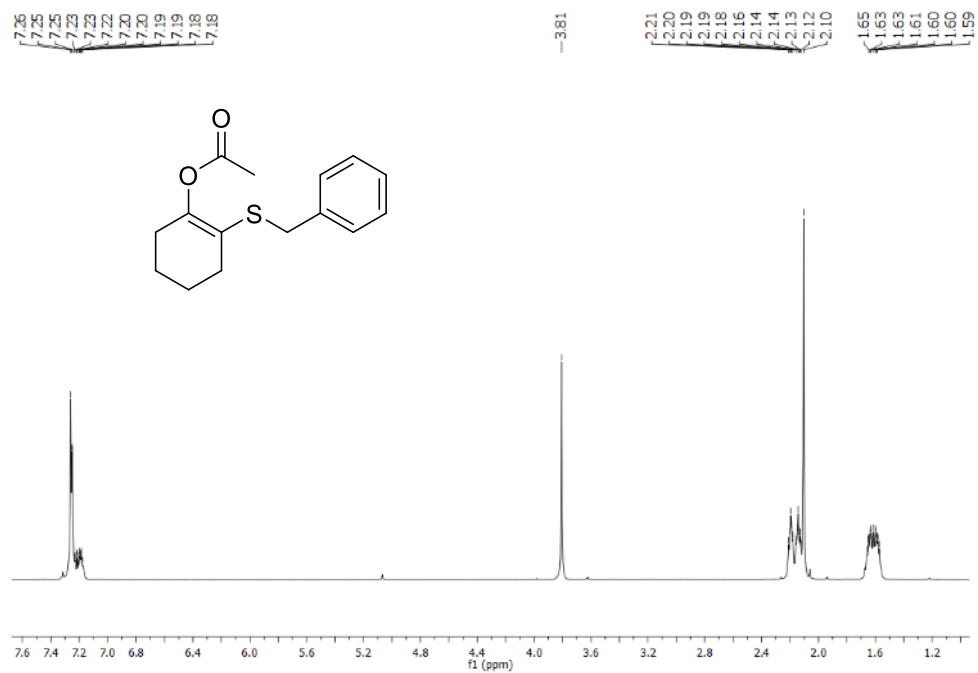


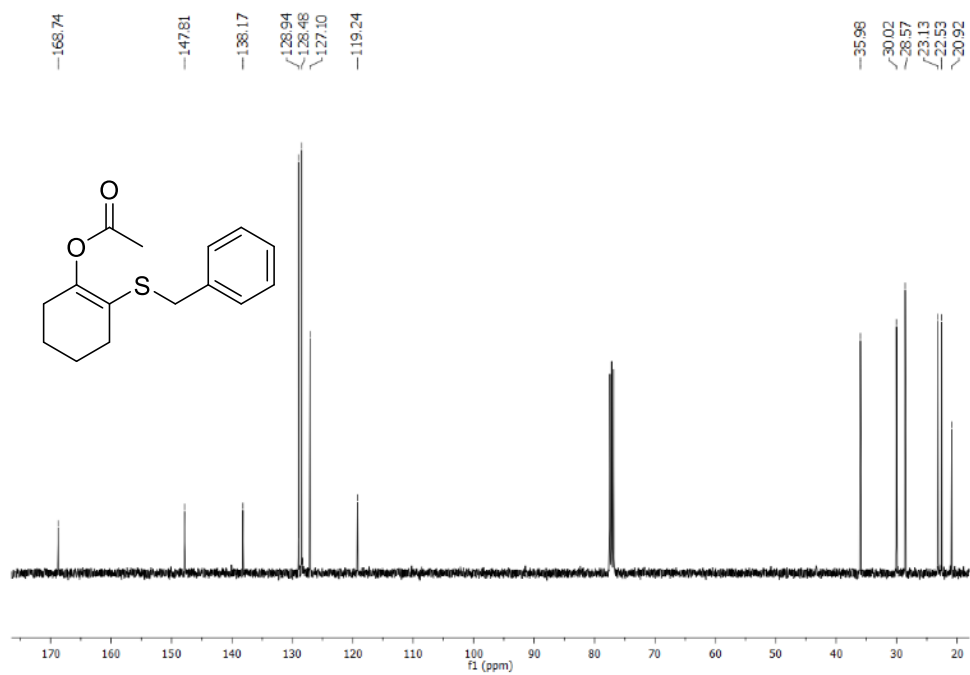
2-(alilltio)ciclohex-1-en-1-il acetato (4f)



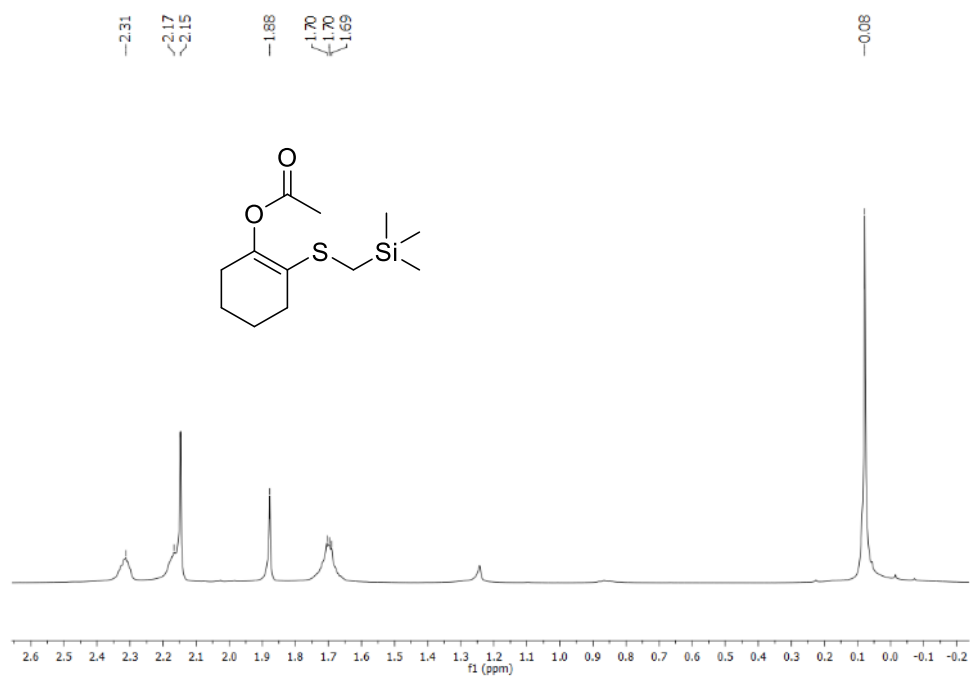


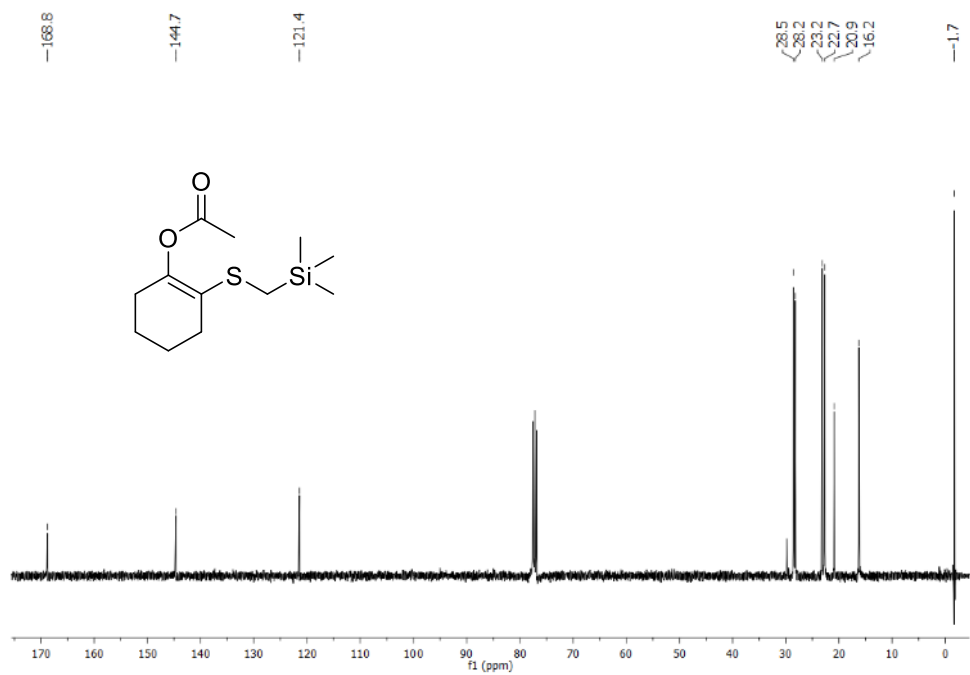
2-(benciltio)ciclohex-1-en-1-il acetato (4g)



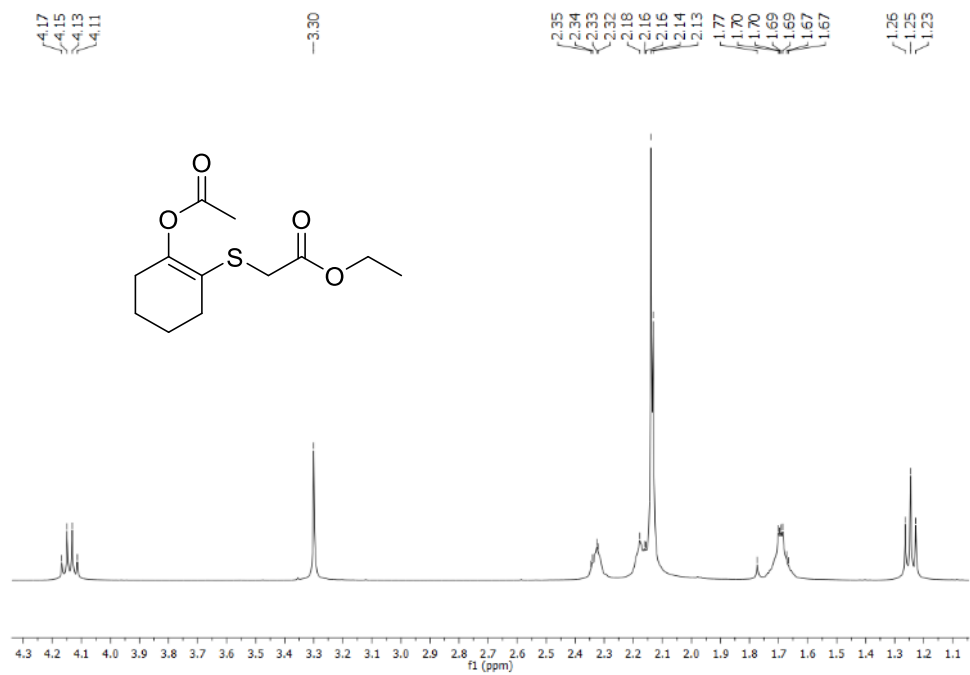


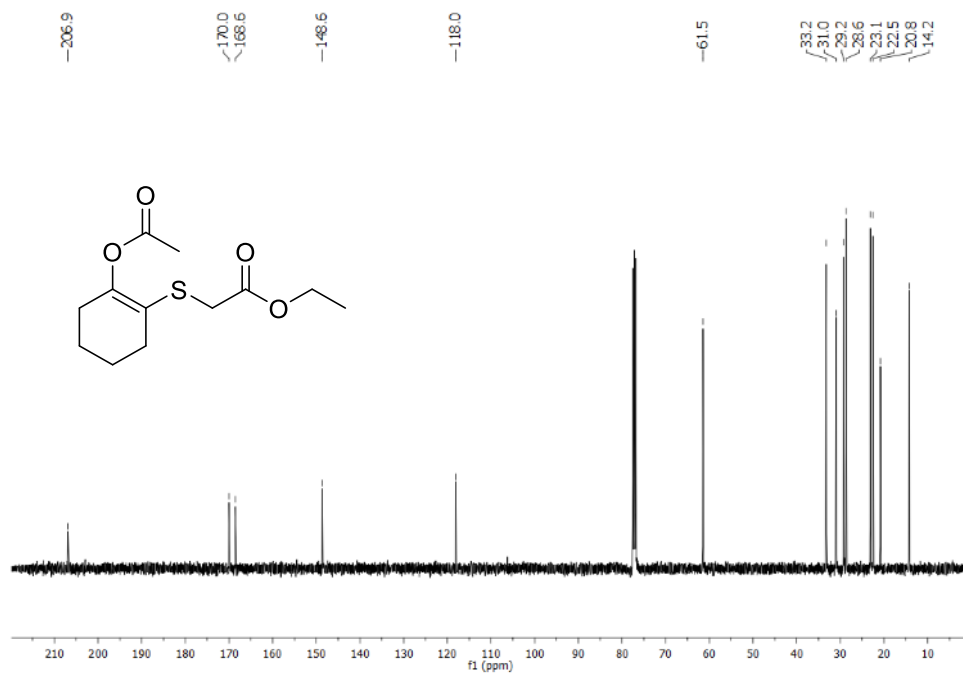
2-(((trimetilsilil)metil)tio)ciclohex-1-en-1-il acetato (4h)



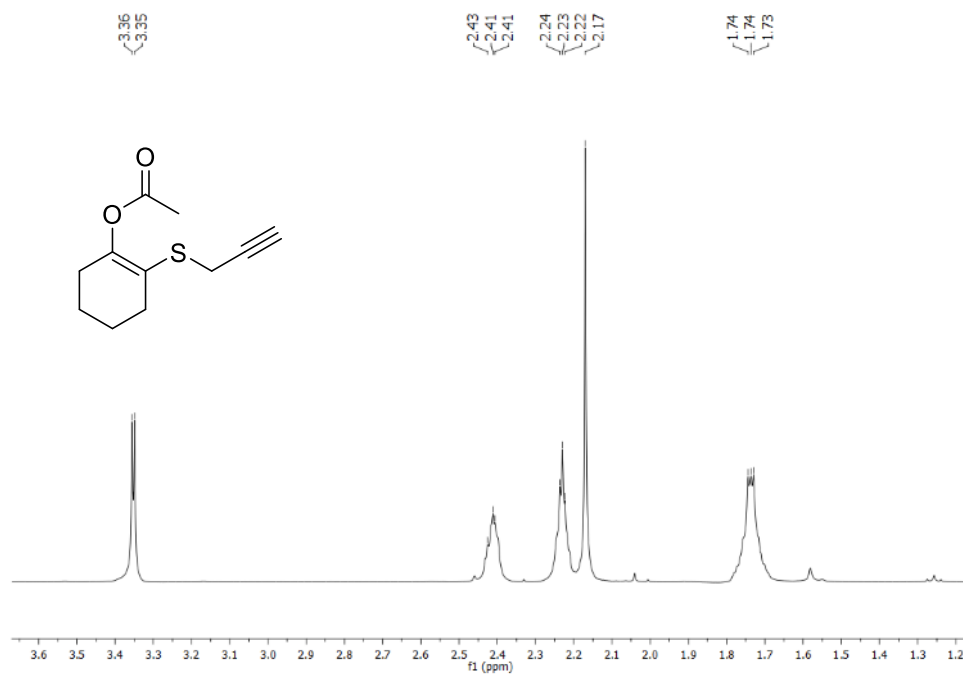


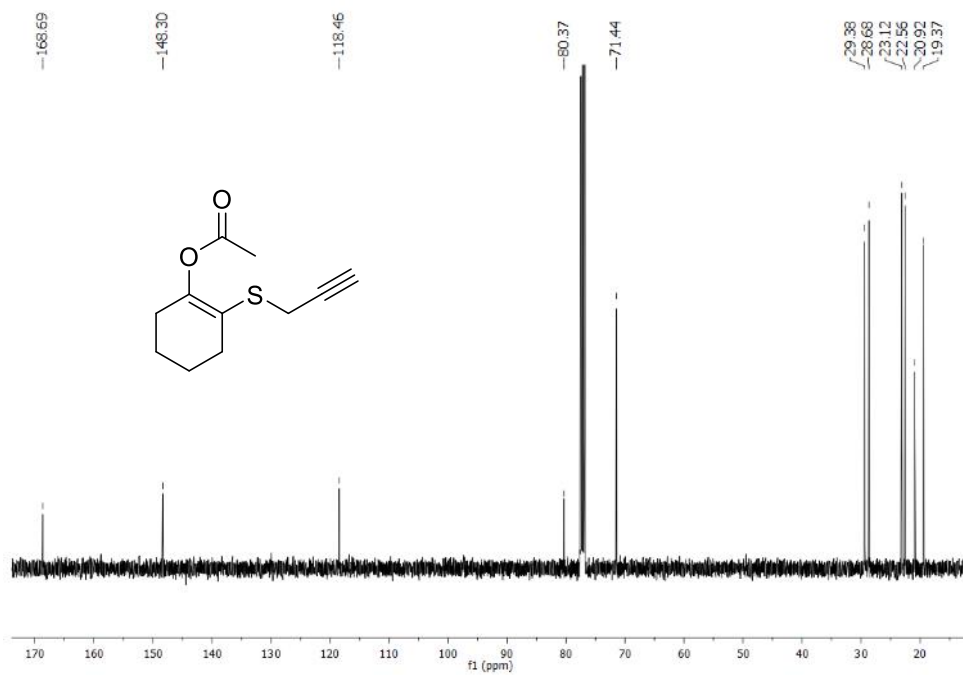
2-((2-acetoxycyclohex-1-en-1-yl)thio)acetato de etilo (4i)



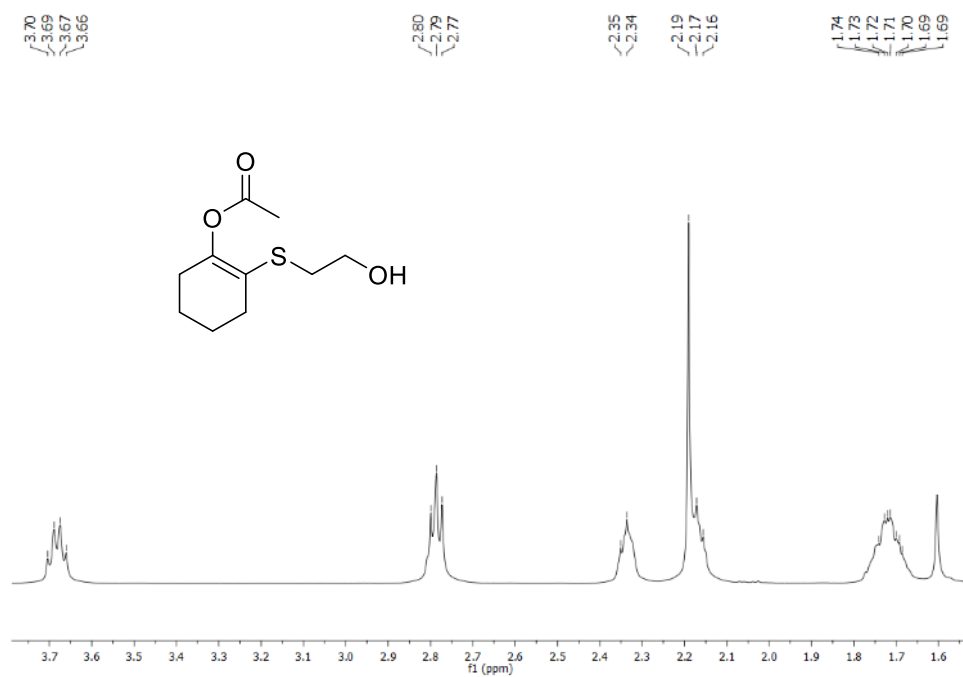


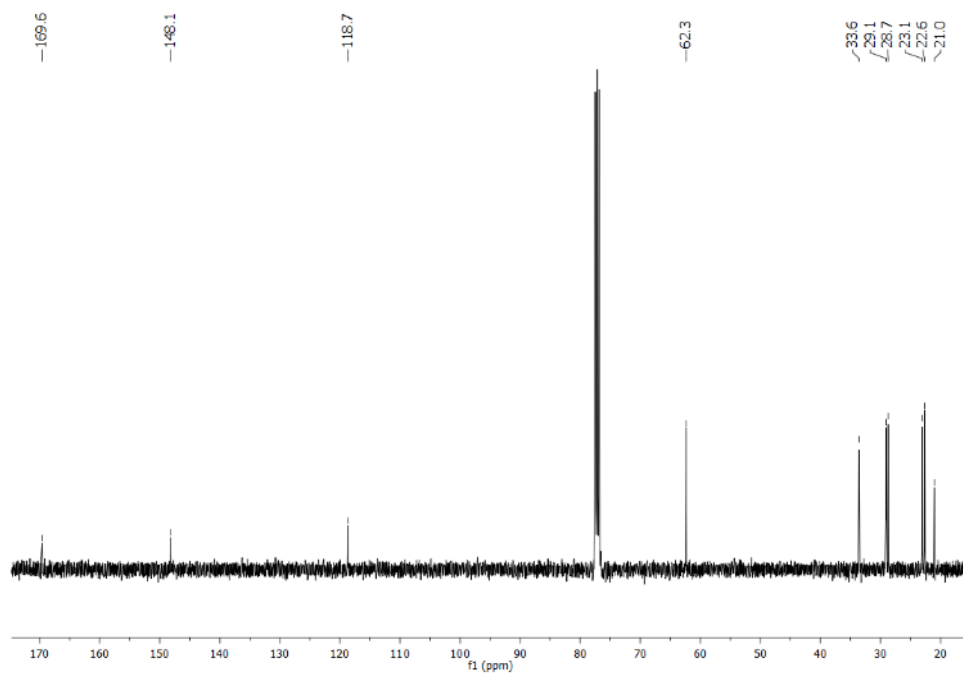
2-(prop-2-in-1-iltio)ciclohex-1-en-1-il acetato (4j)



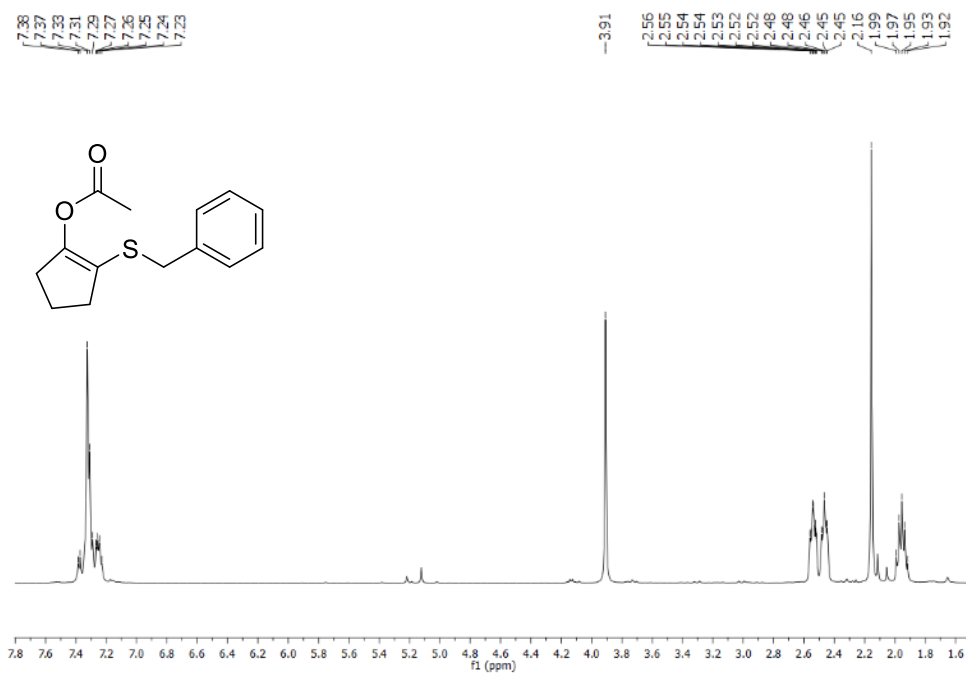


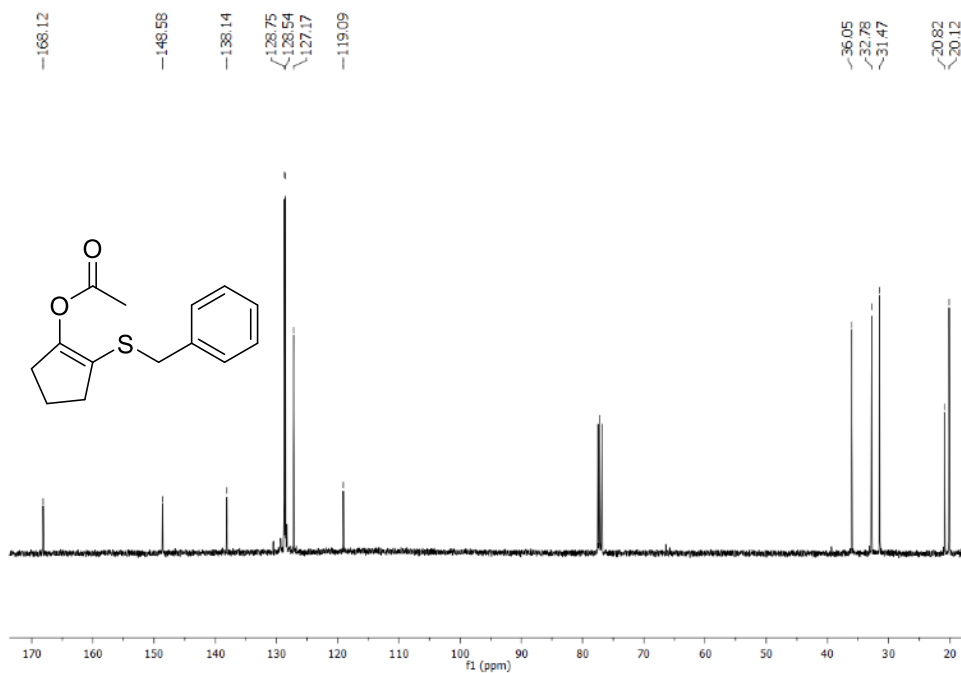
2-((2-hidroxietil)tio)ciclohex-1-en-1-il acetato (4k)



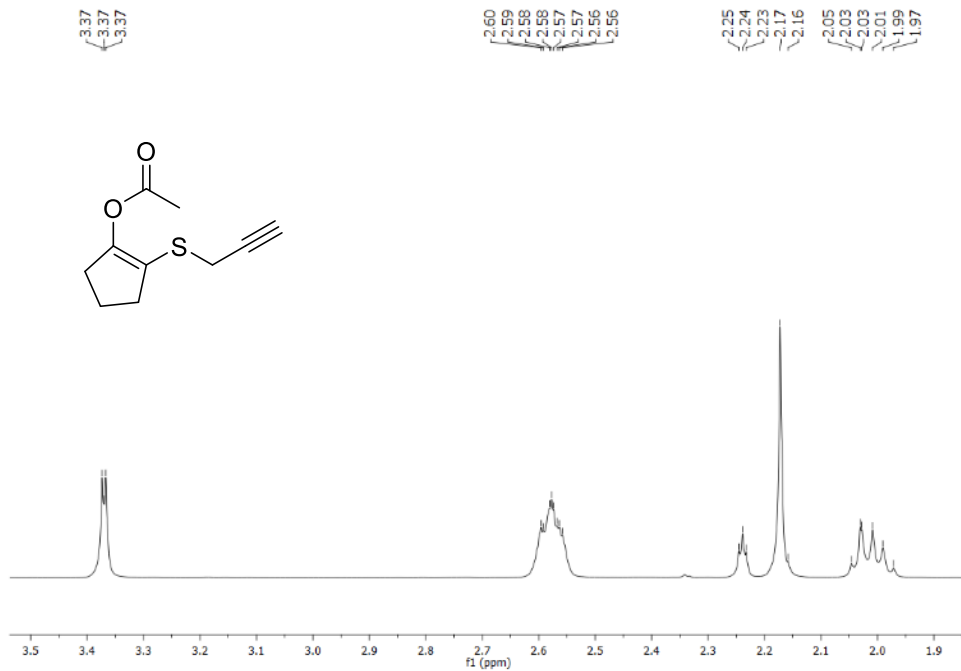


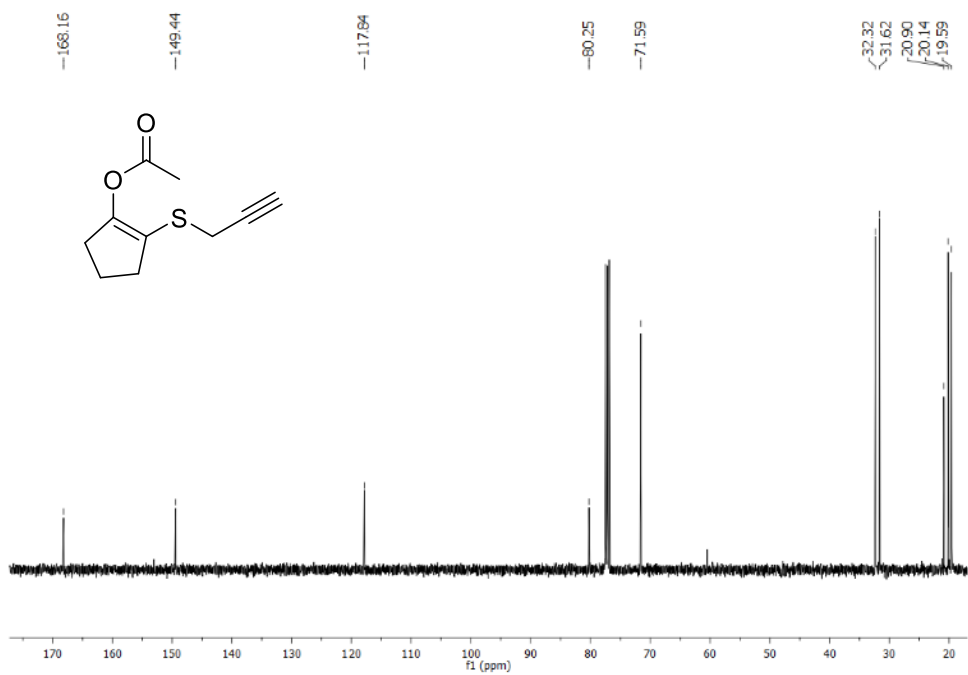
2-(bencilthio)ciclopent-1-en-1-il acetato (4m)



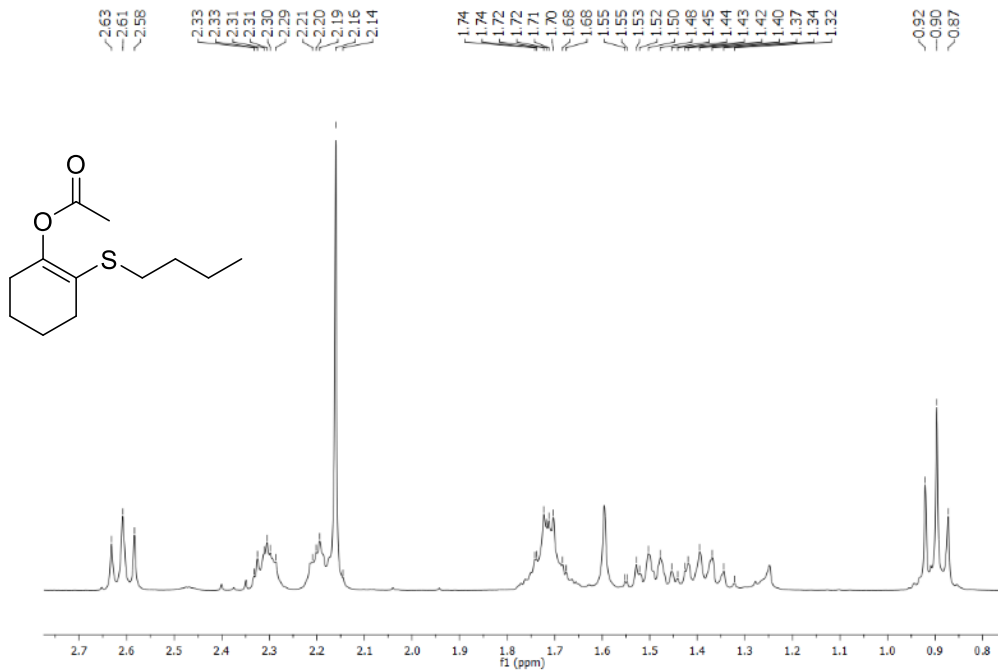


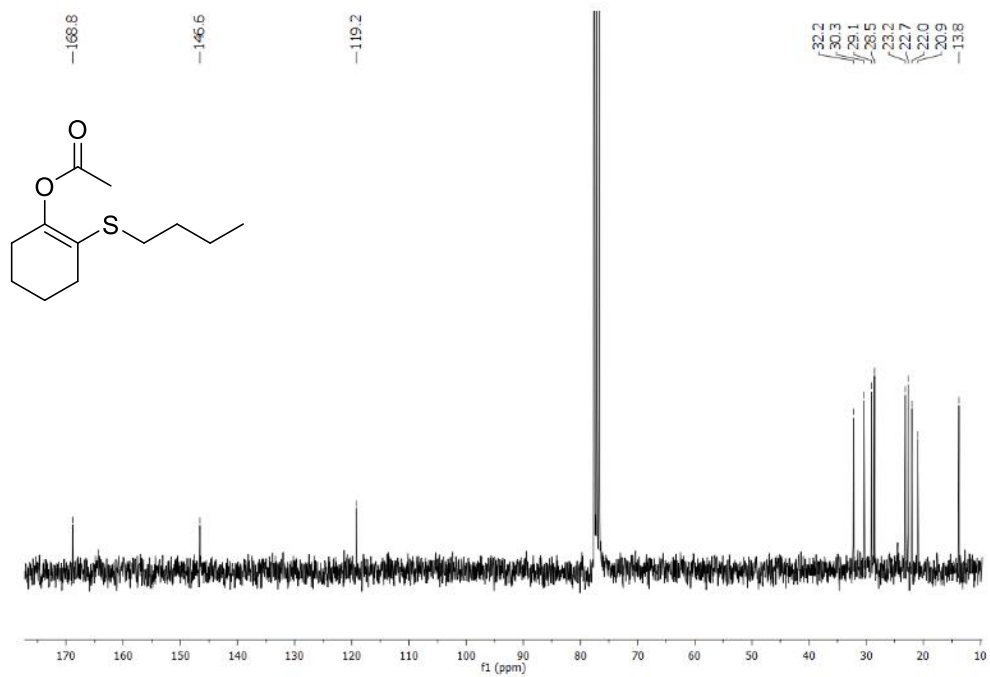
2-(prop-2-in-1-iltio)ciclopent-1-en-1-il acetato (4n)



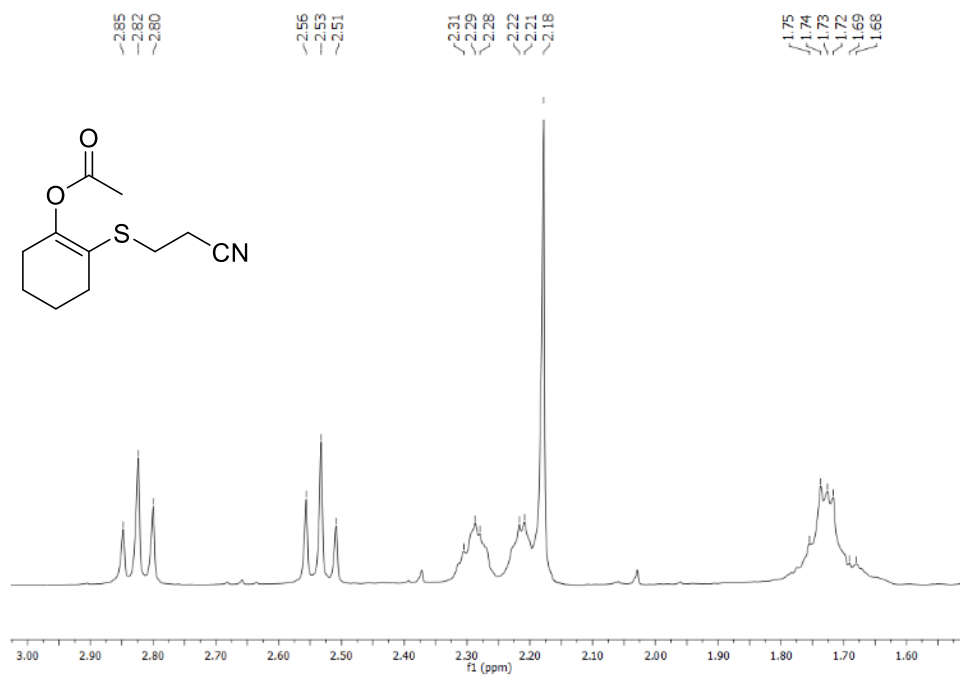


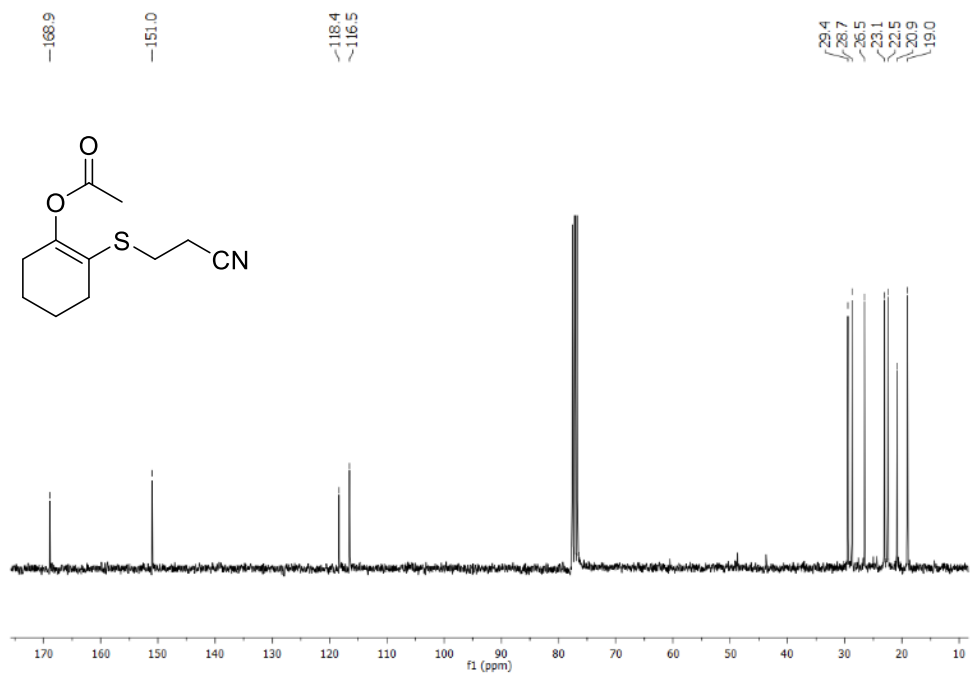
2-(butiltio)ciclohex-1-en-1-il acetato (4o)



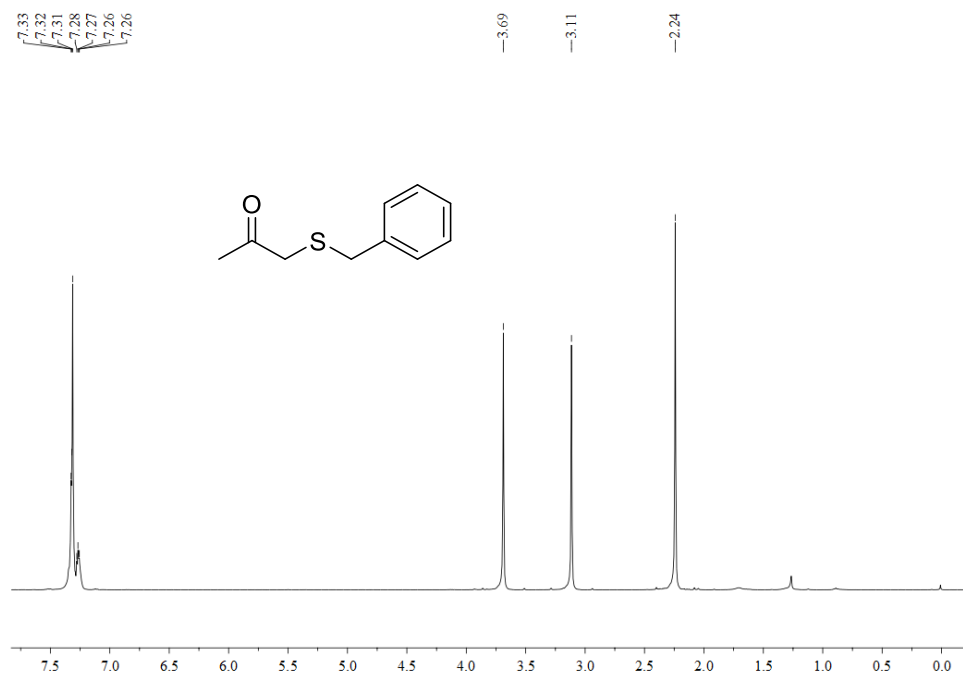


2-((2-cianoetil)tio)ciclohex-1-en-1-il acetato (4p)



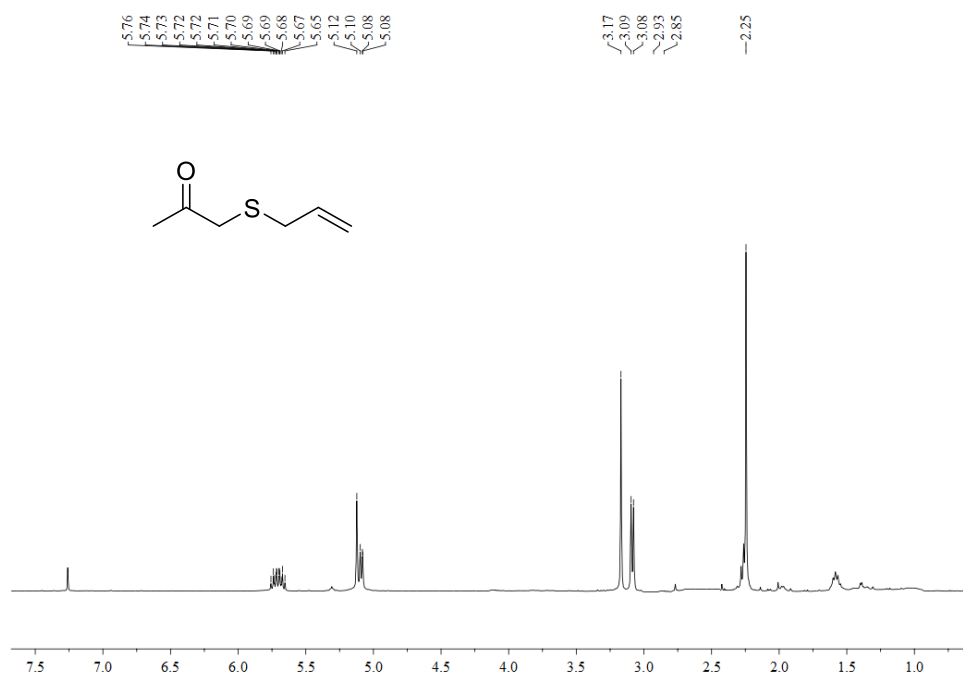


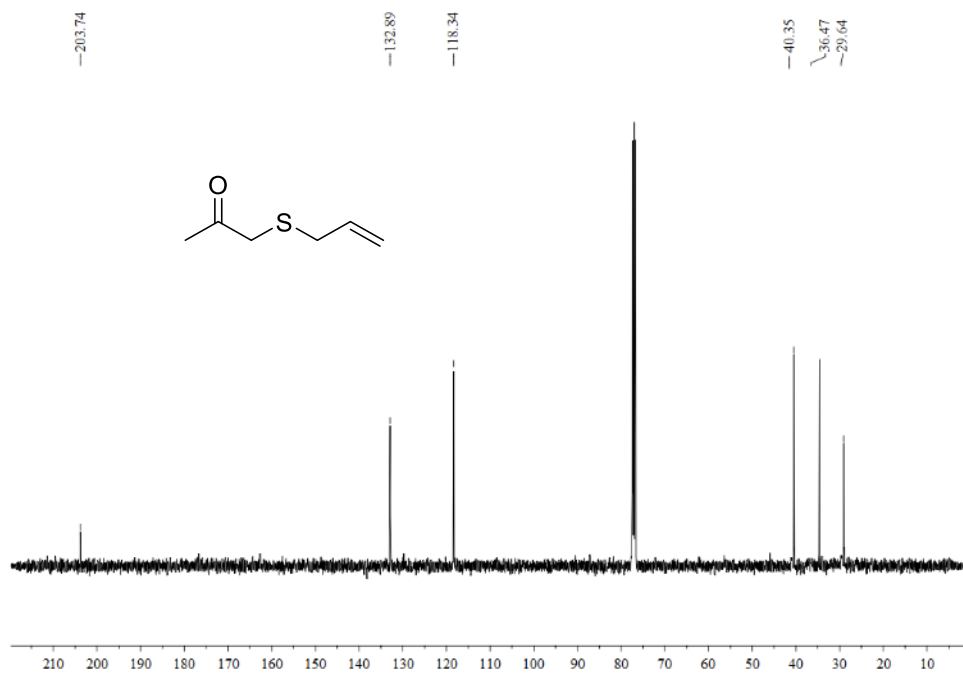
1-(benzylthio)propan-2-one (5a)



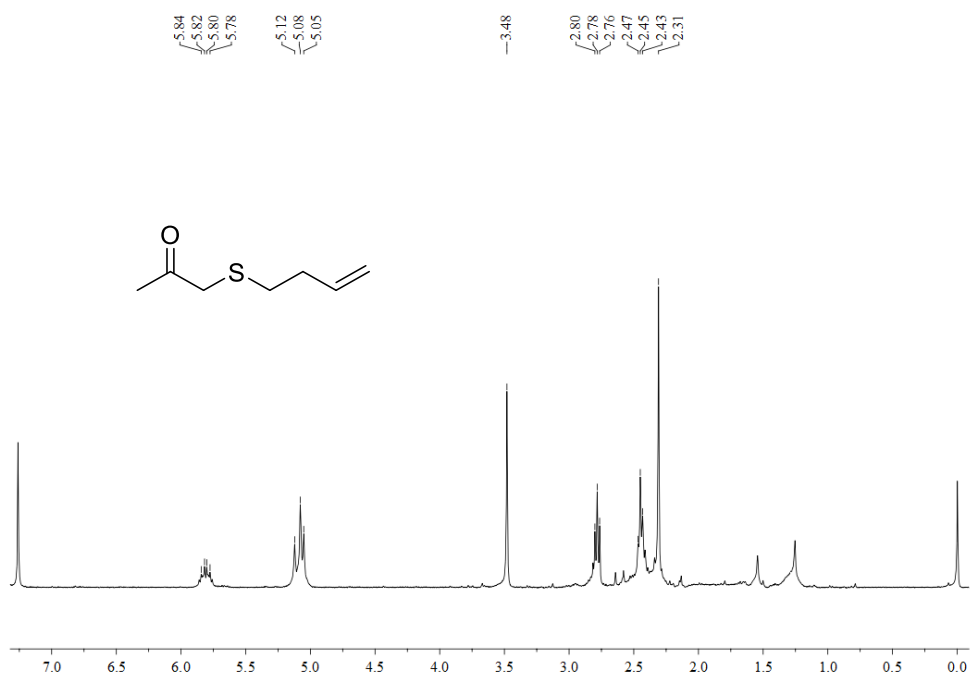


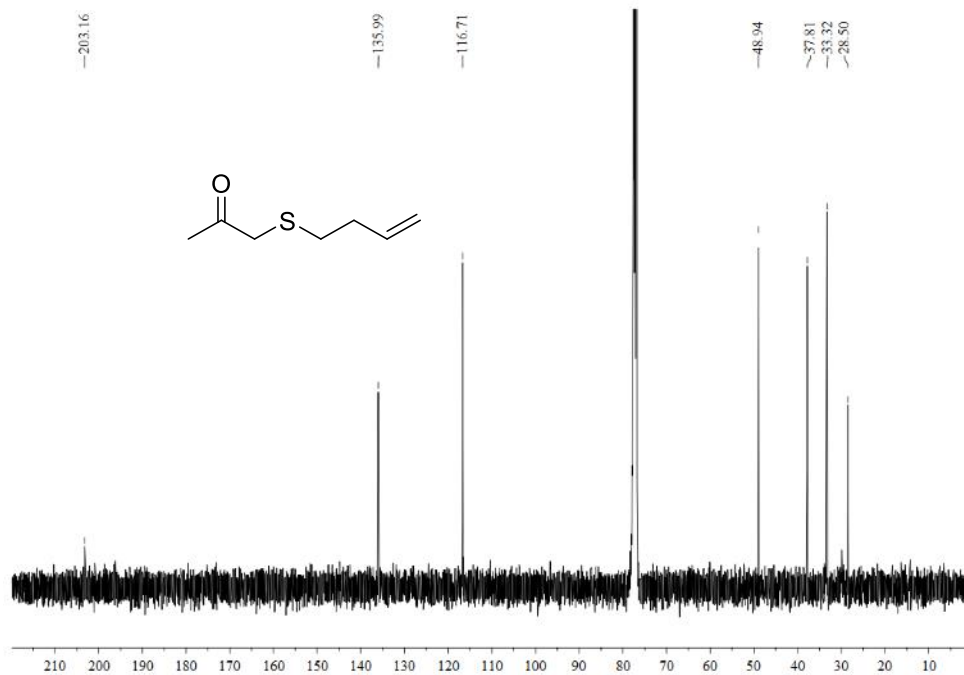
1-(allylthio)propan-2-one (5b)



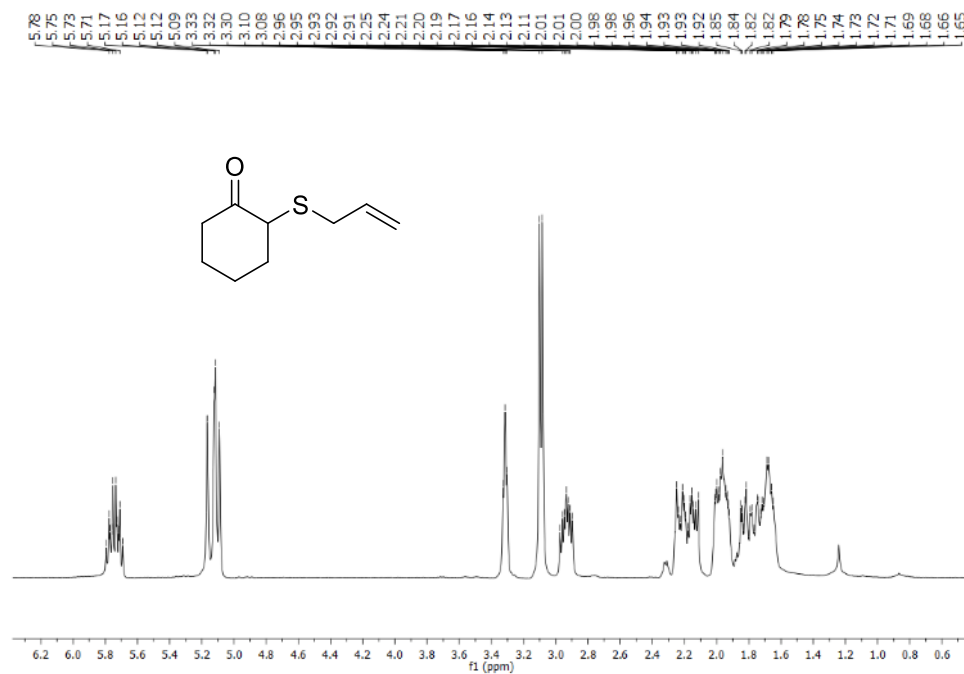


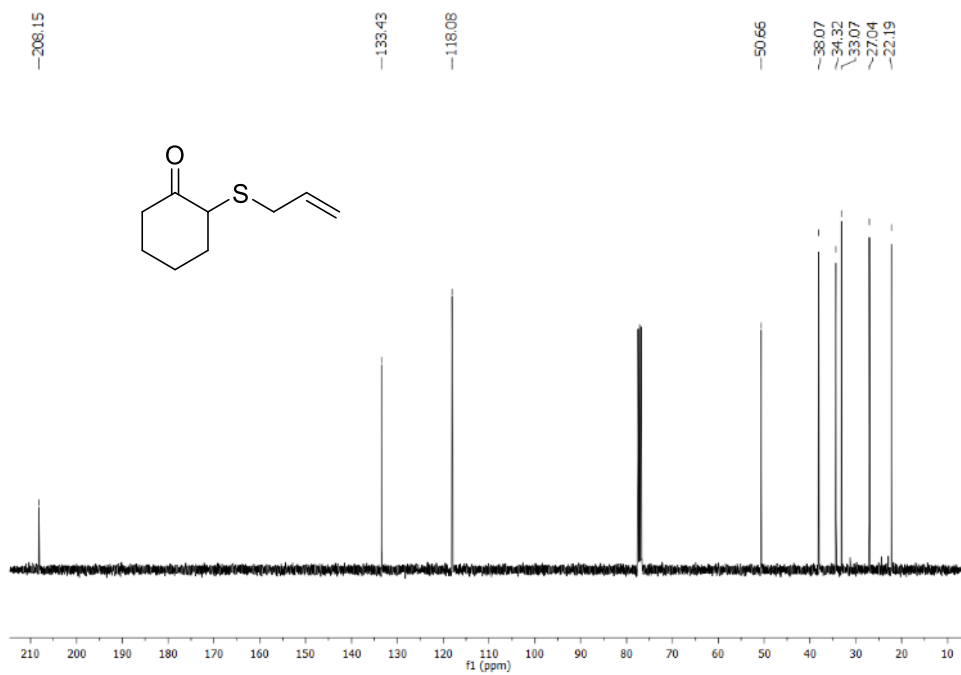
1-(but-3-en-1-ylthio)propan-2-one (5c)



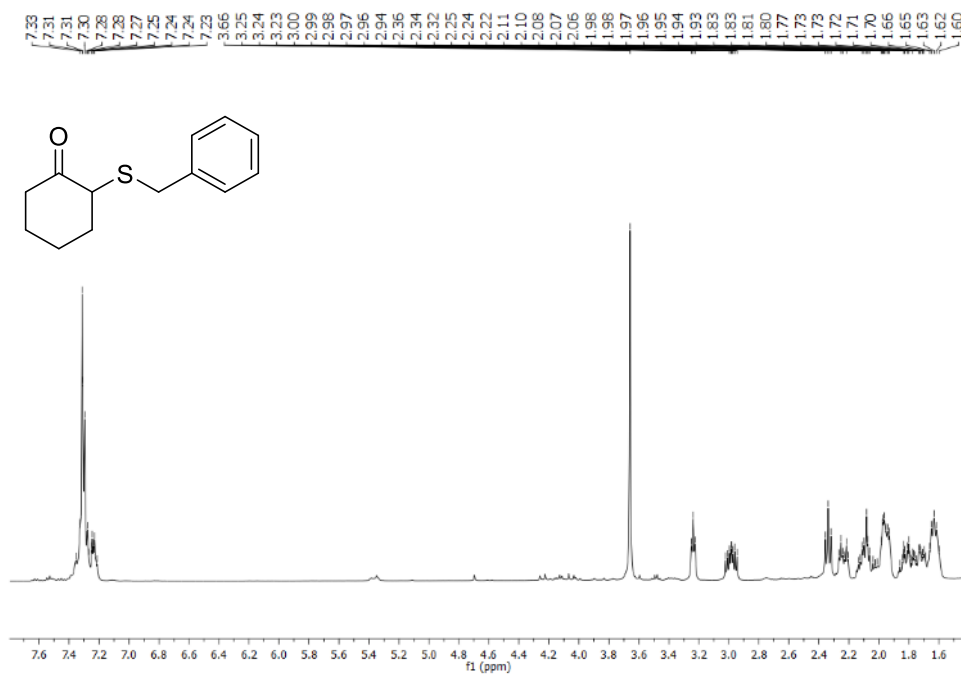


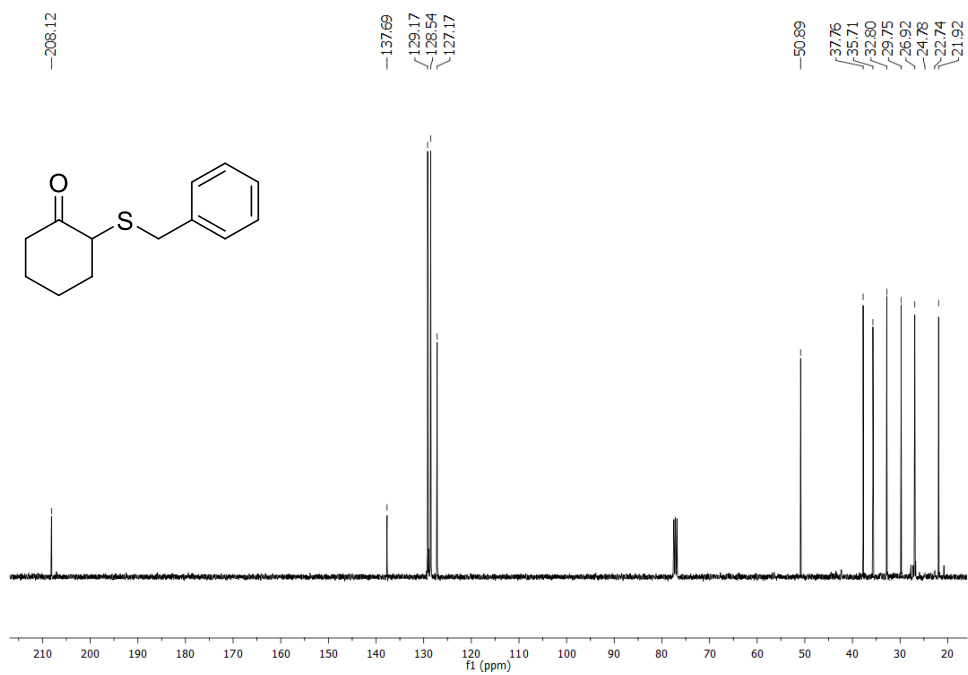
2-(allylthio)cyclohexan-1-one (5f)



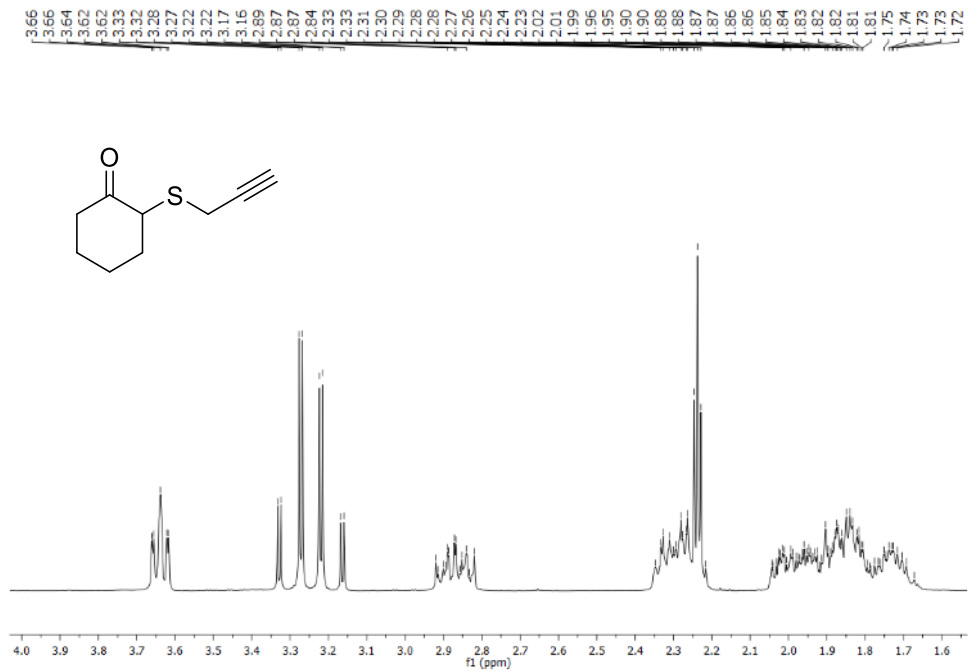


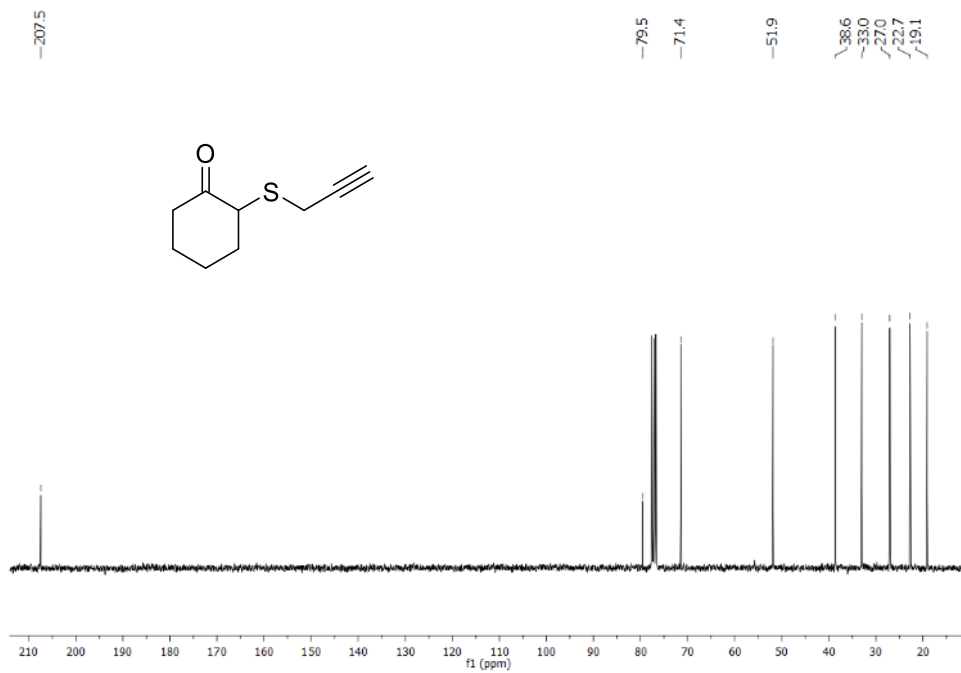
2-(benziltio)ciclohexan-1-ona (5g)



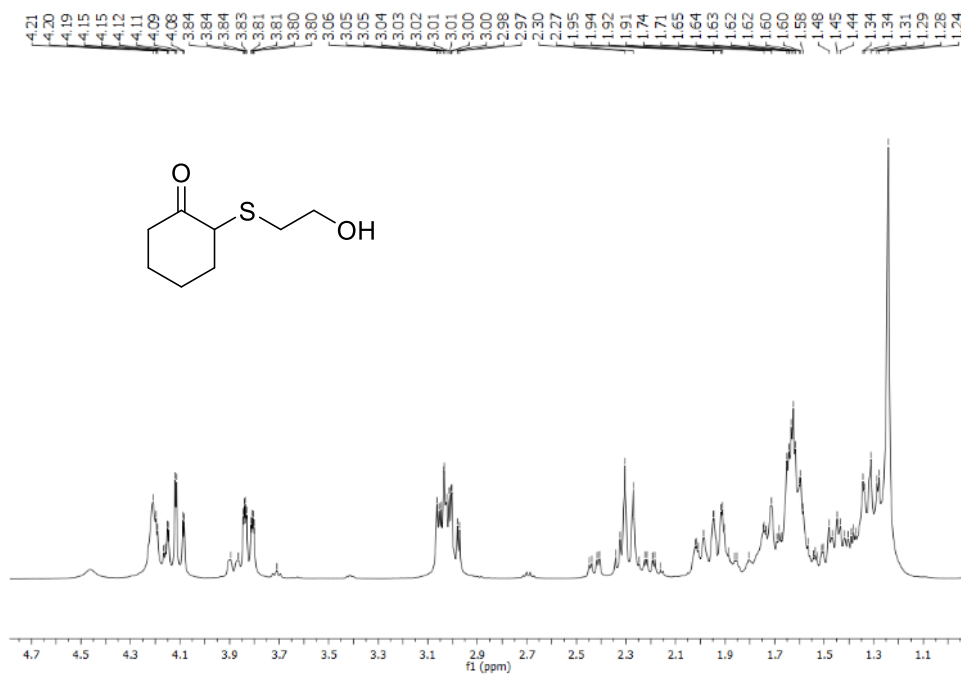


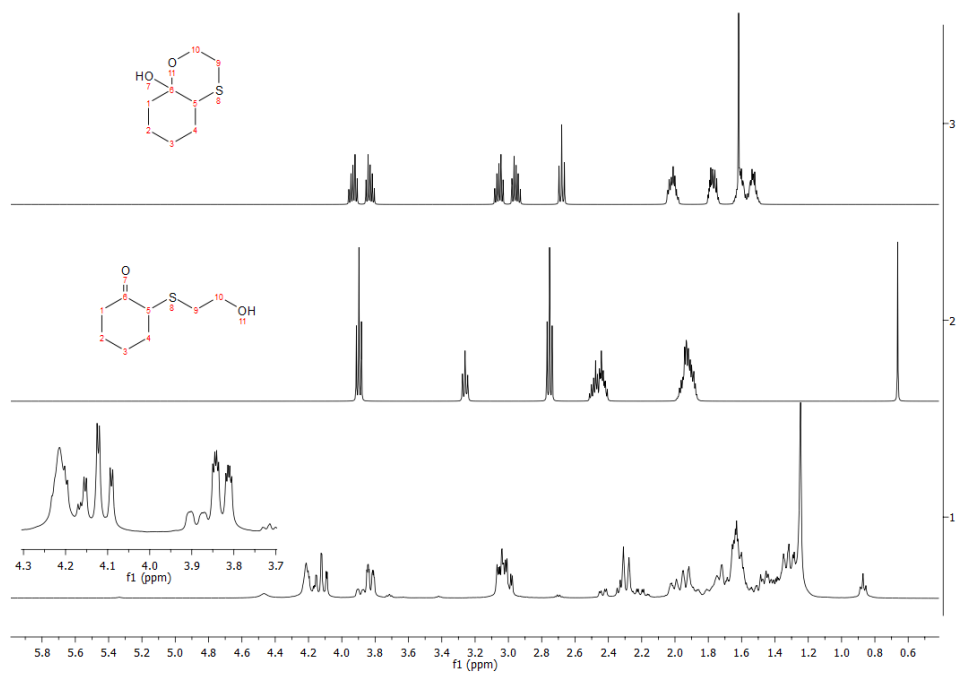
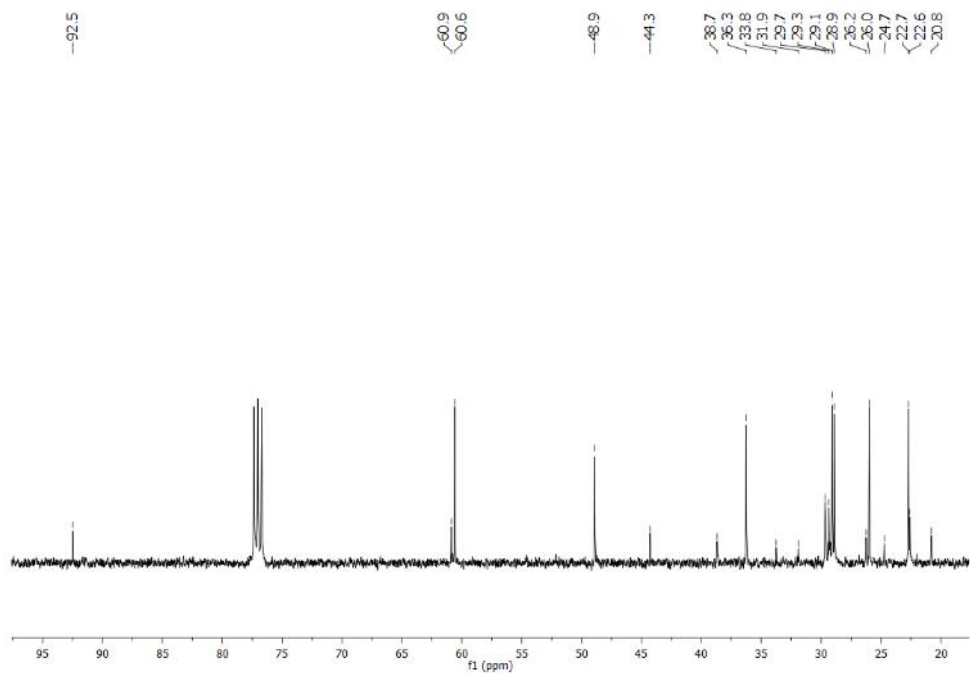
2-(prop-2-yn-1-ylthio)cyclohexan-1-one (5j)

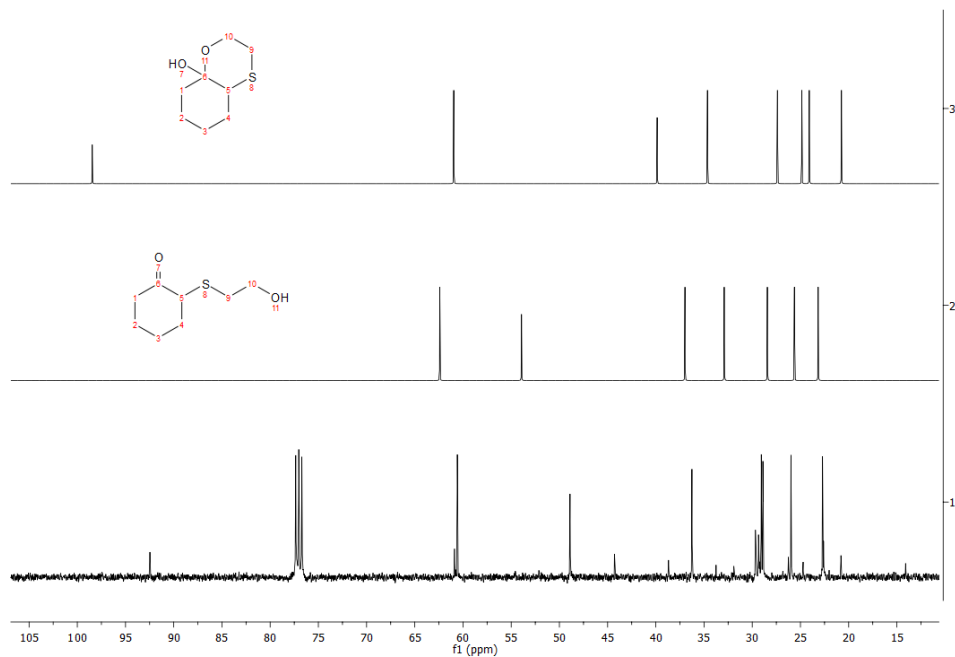




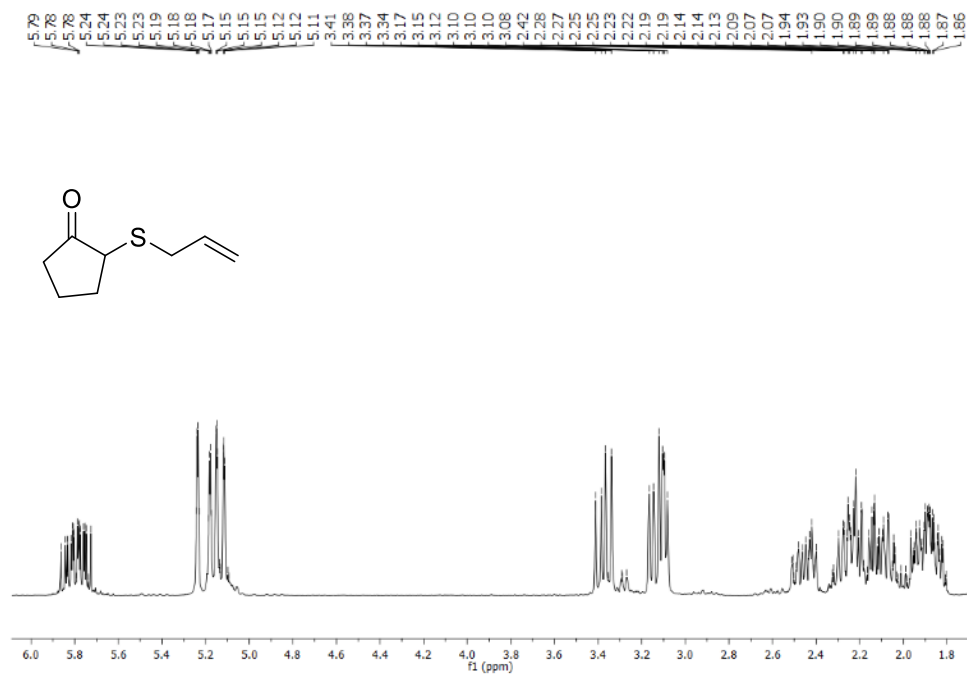
2-((2-hidroxietil)tio)ciclohexan-1-ona (5k)

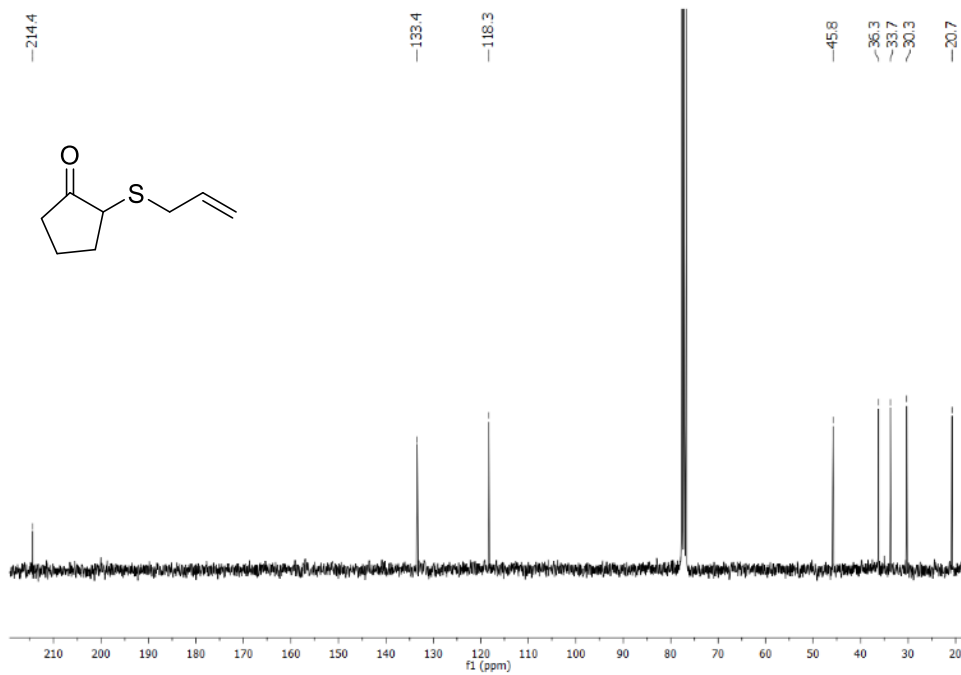




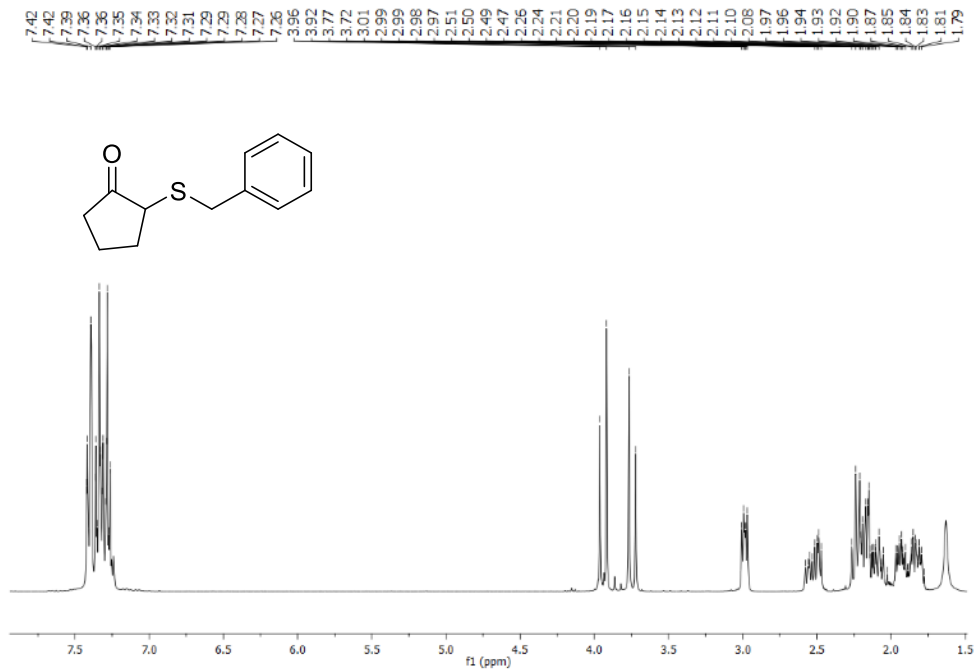


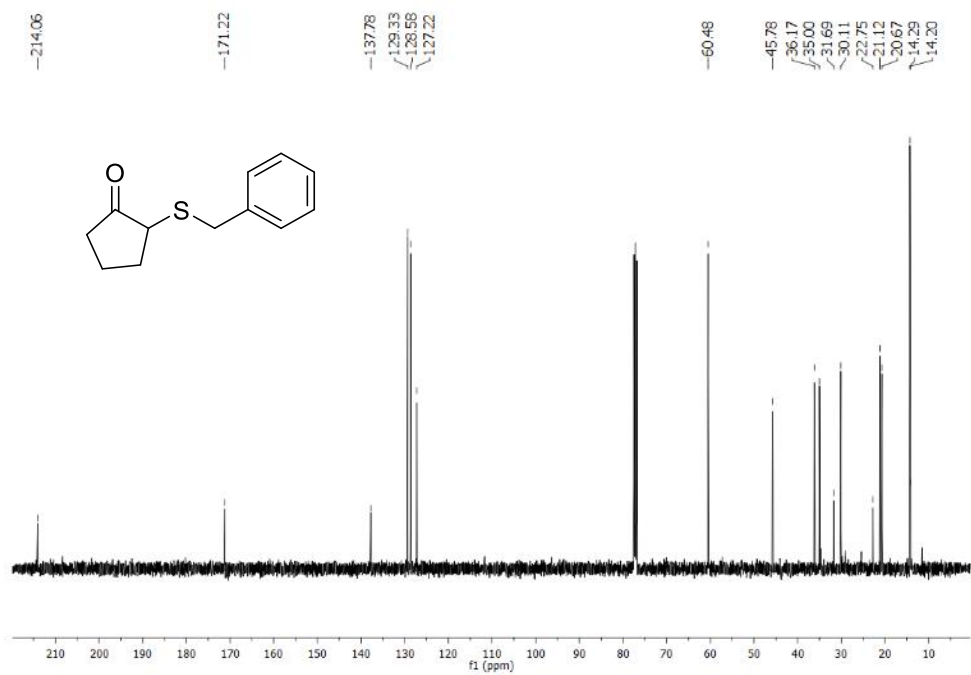
2-(alilito)ciclopentan-1-ona (51)



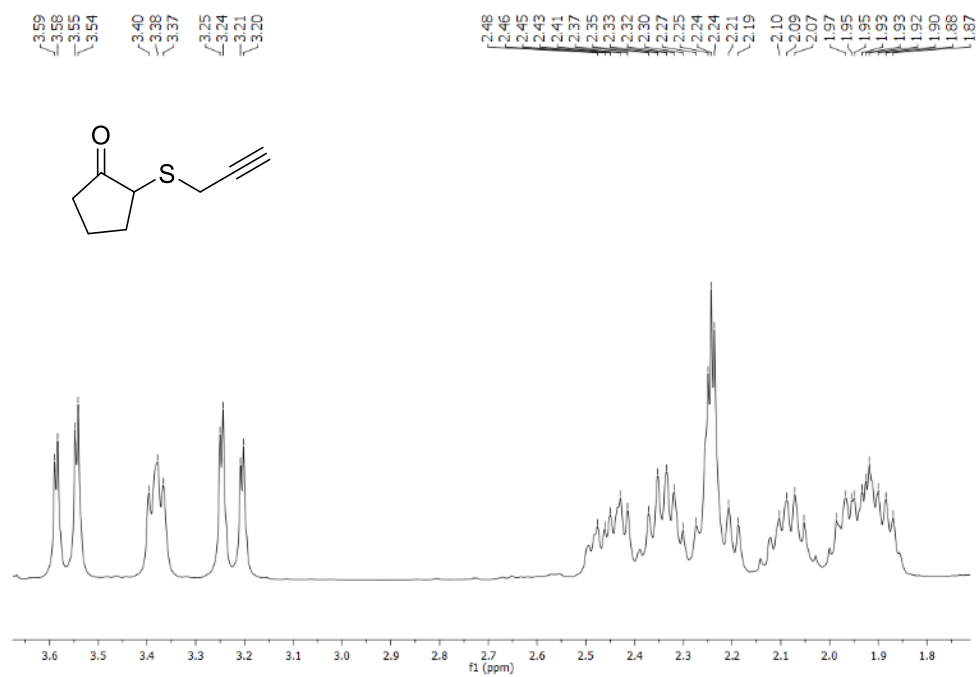


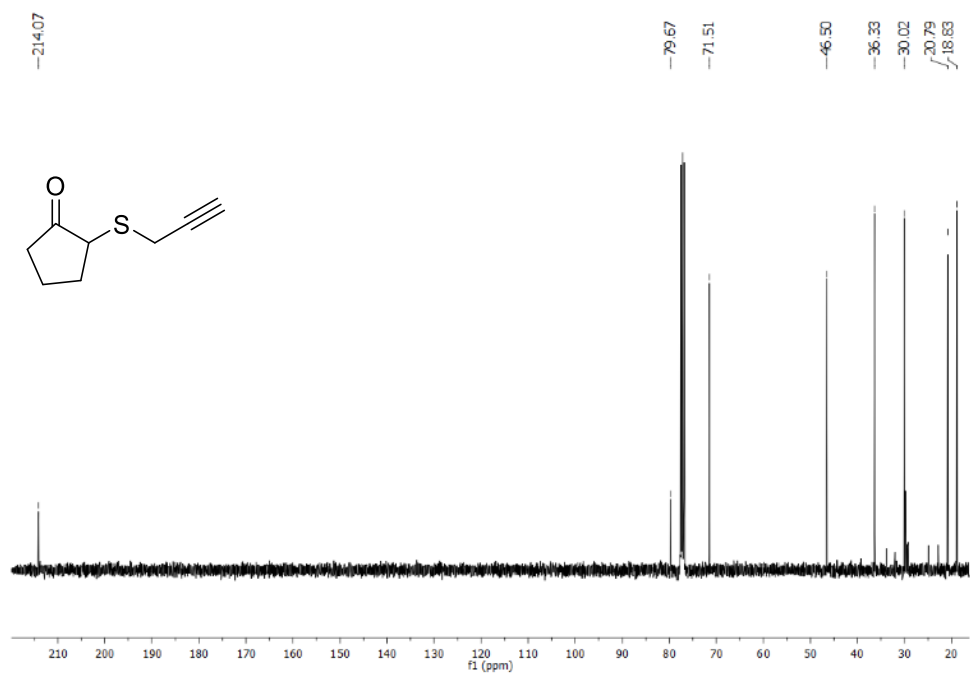
2-(benciltio)ciclopentan-1-ona (5m)



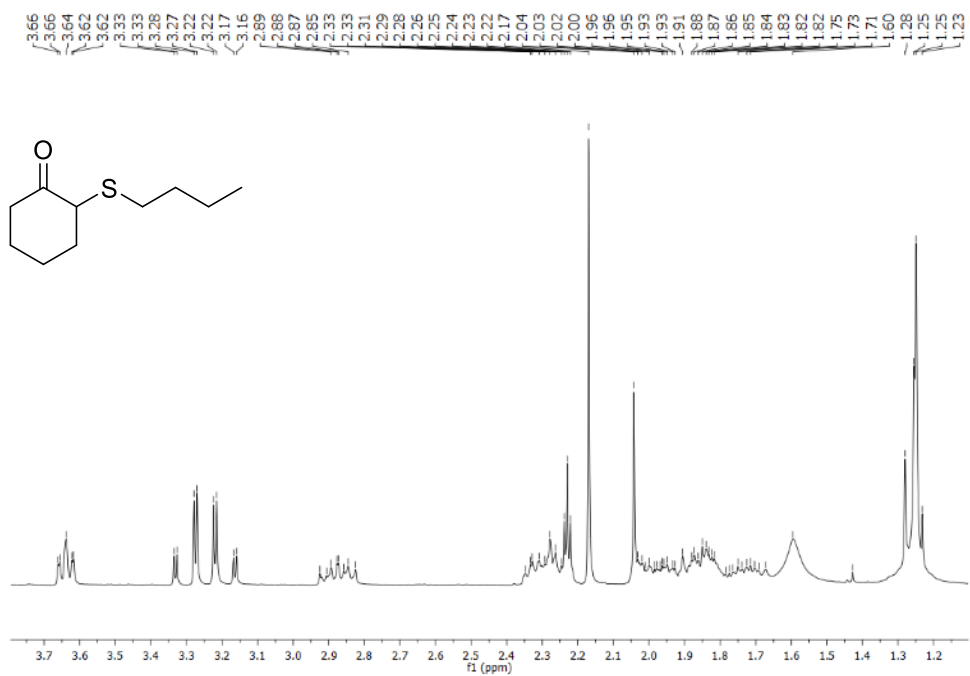


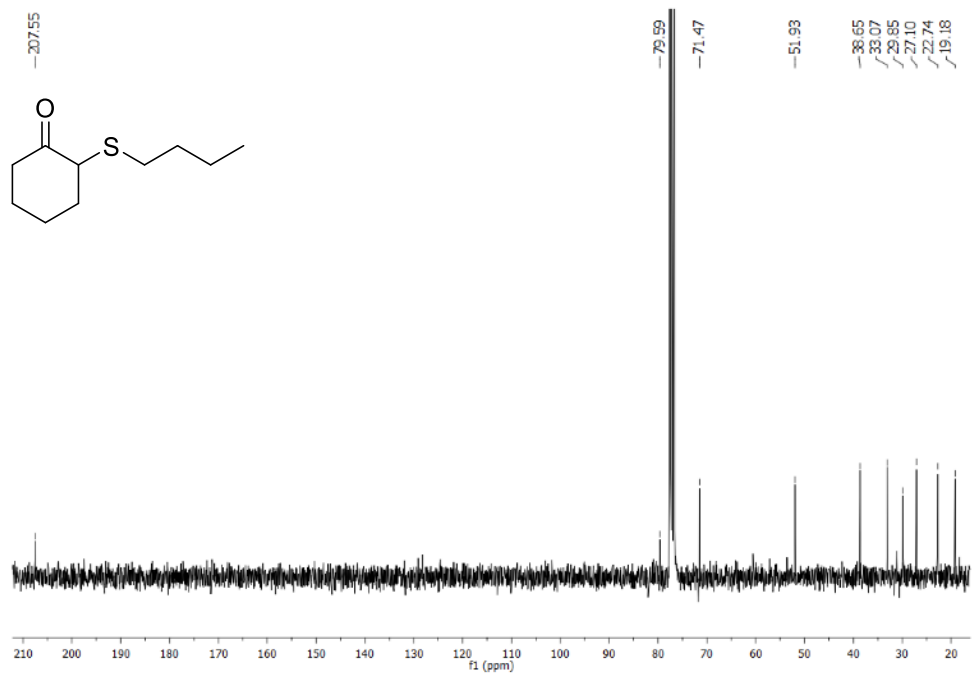
2-(prop-2-yn-1-ylthio)cyclopentan-1-one (5n)



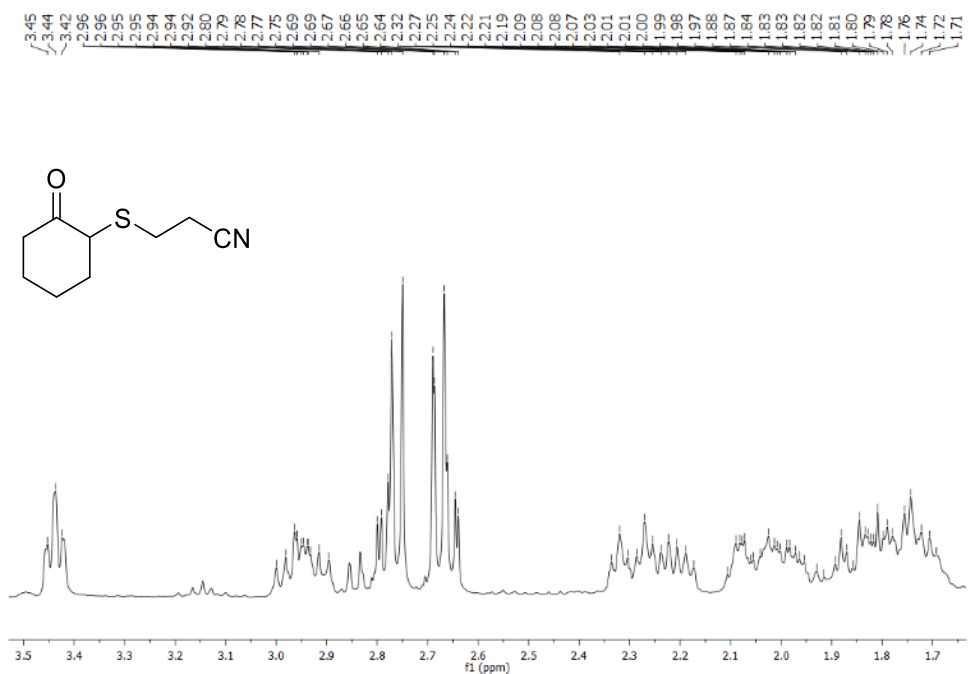


2-(butilto)ciclohexan-1-ona (5o)

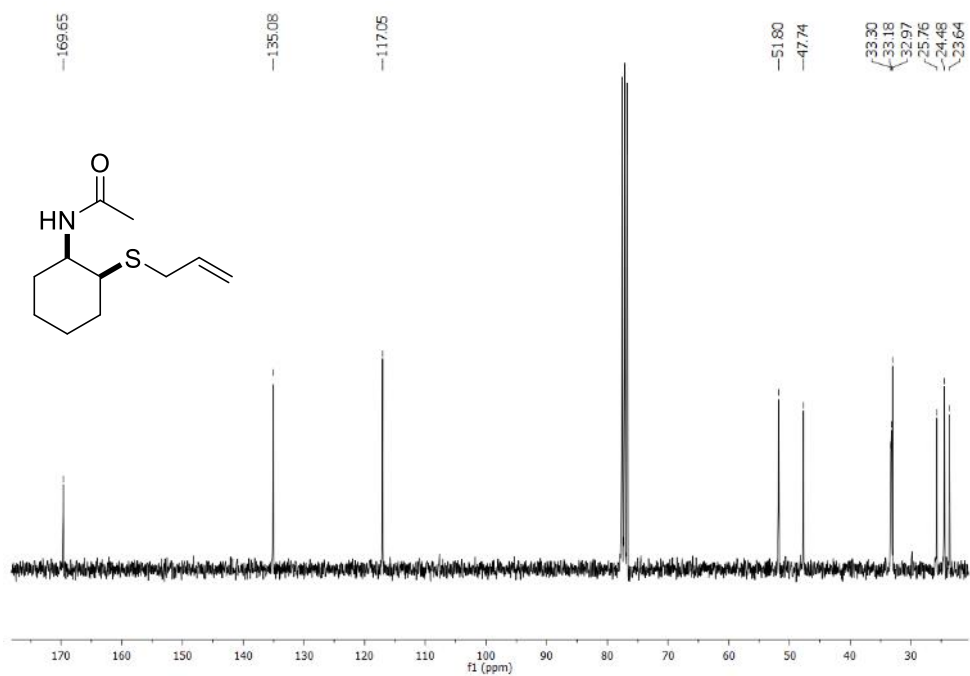
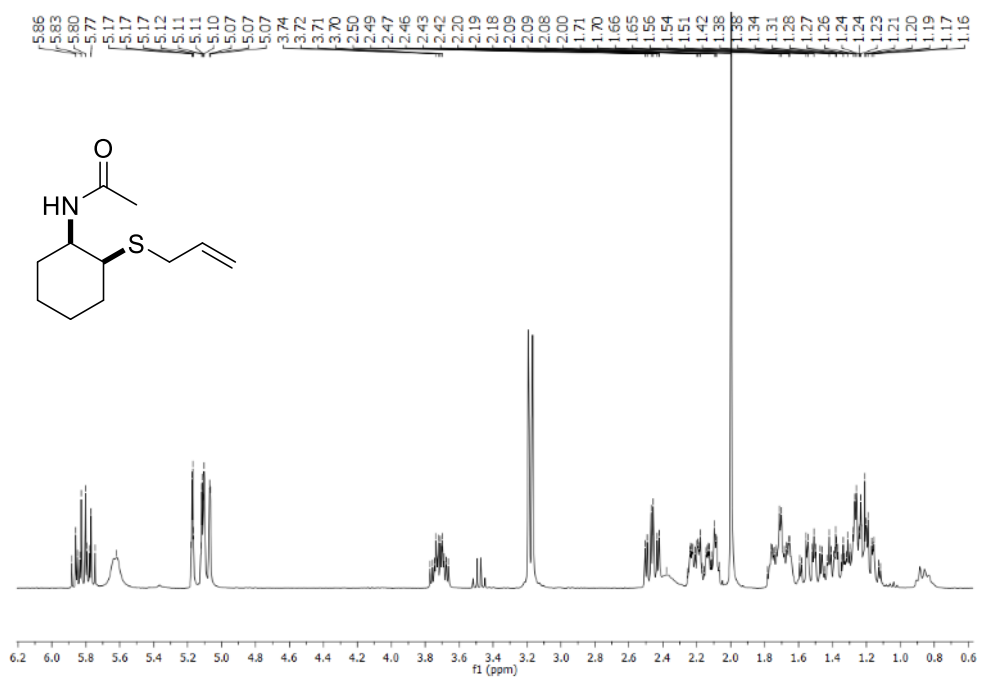




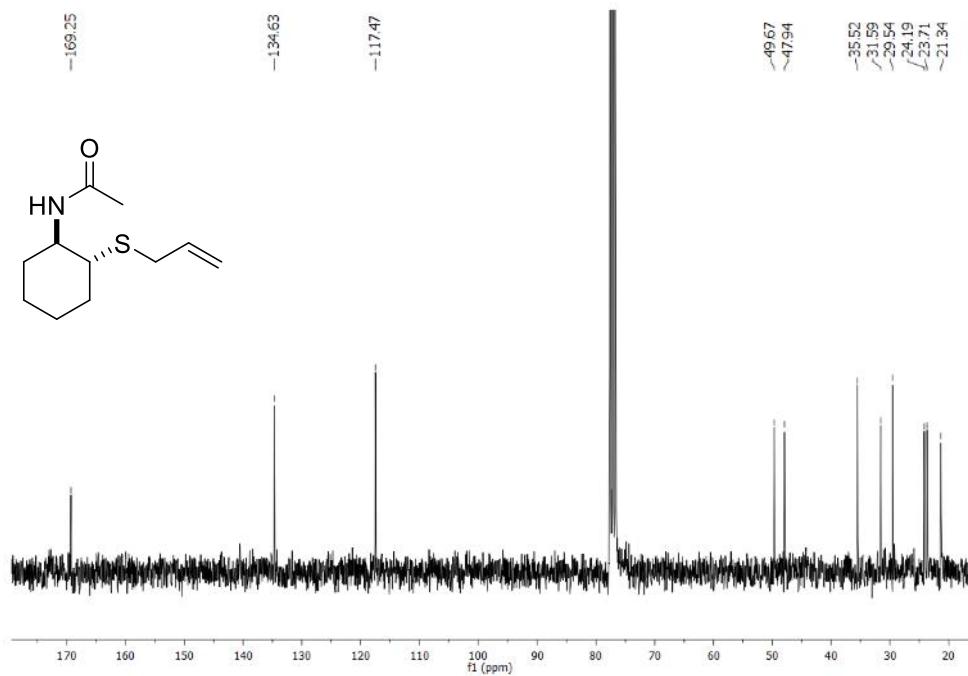
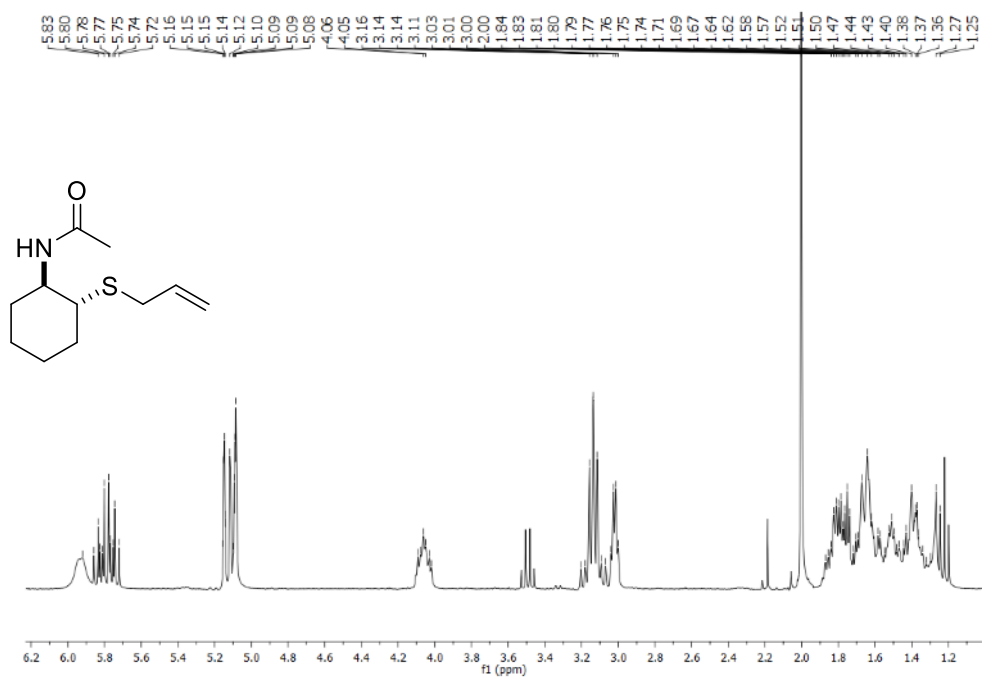
3-((2-oxociclohexil)tio)propanonitrilo (5p)



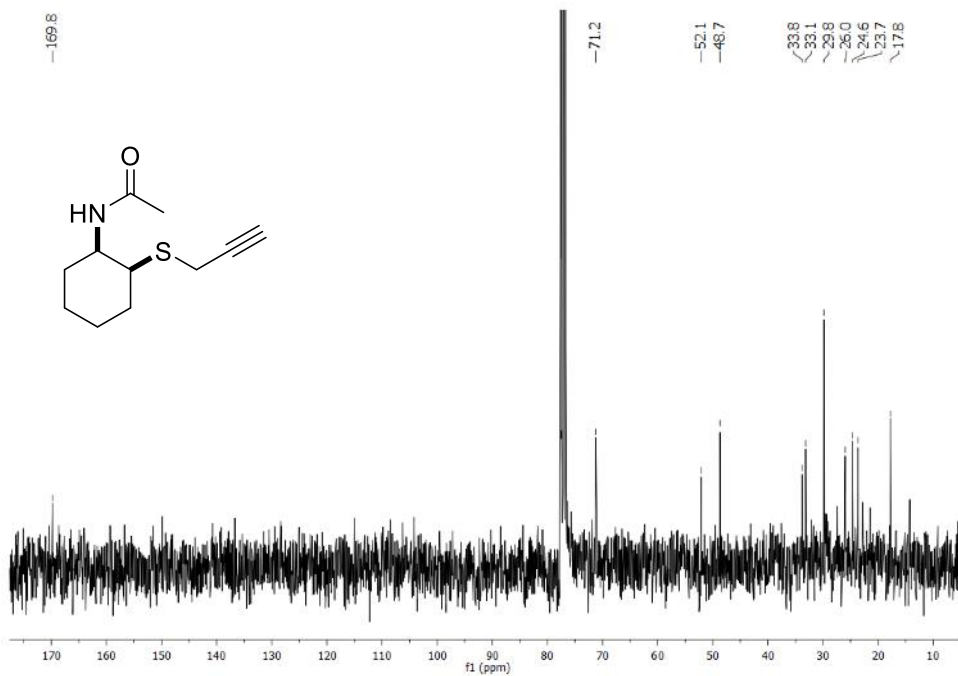
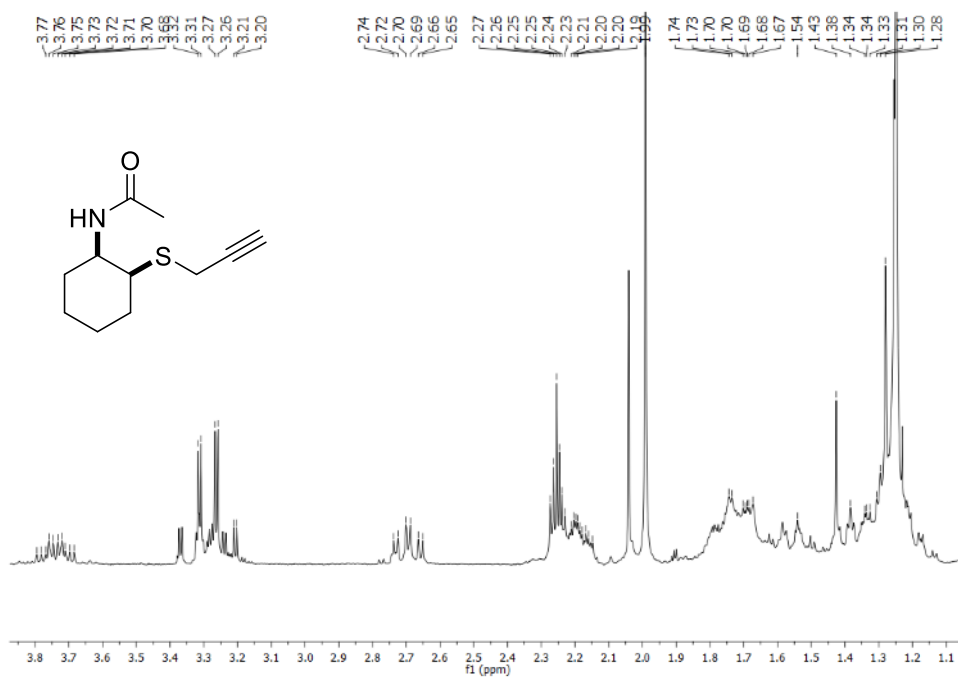
N-(*cis*-2-(aliltio)ciclohexil)acetamida (7f)



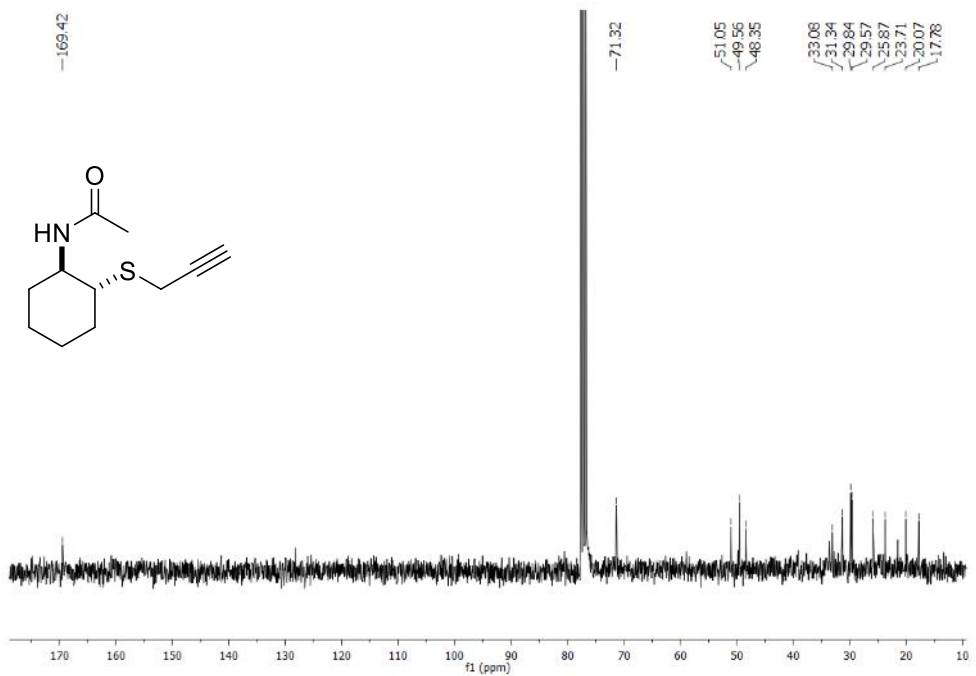
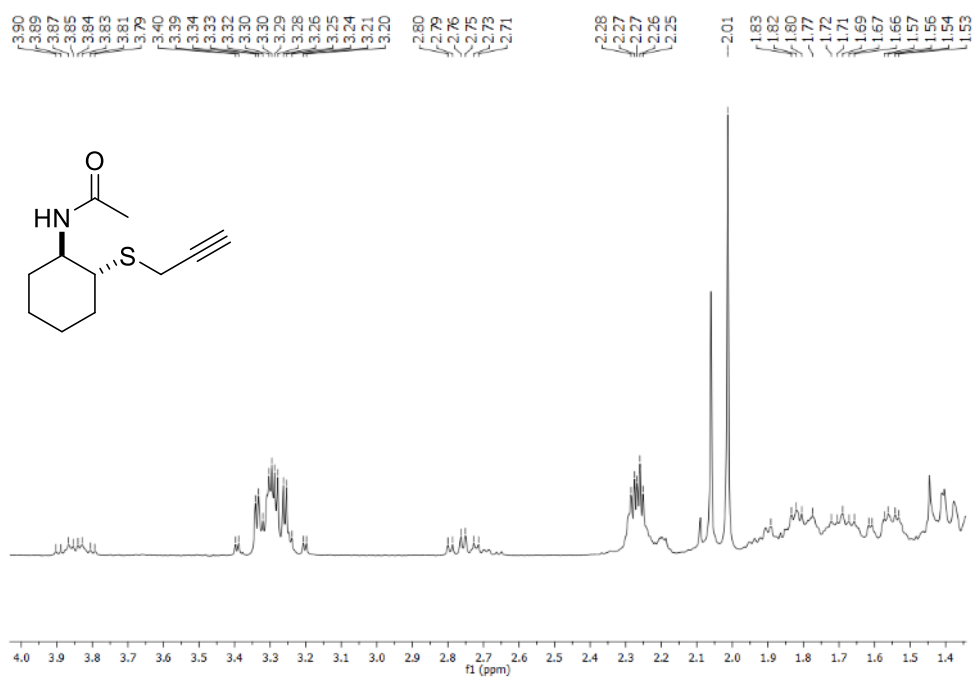
***N*-(*trans*-2-(allylthio)ciclohexil)acetamida (7f)**



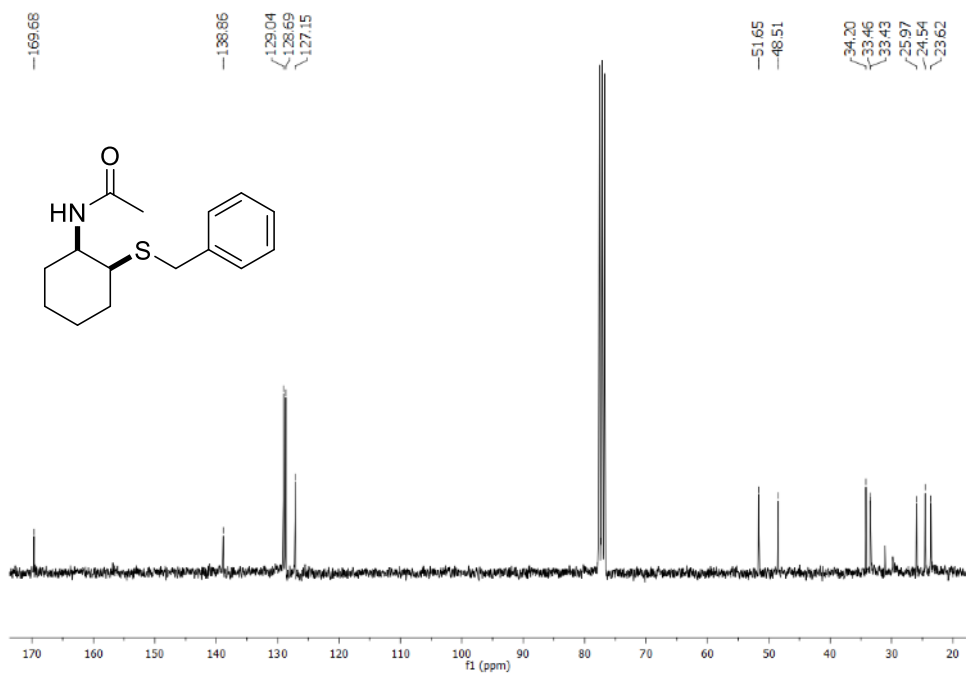
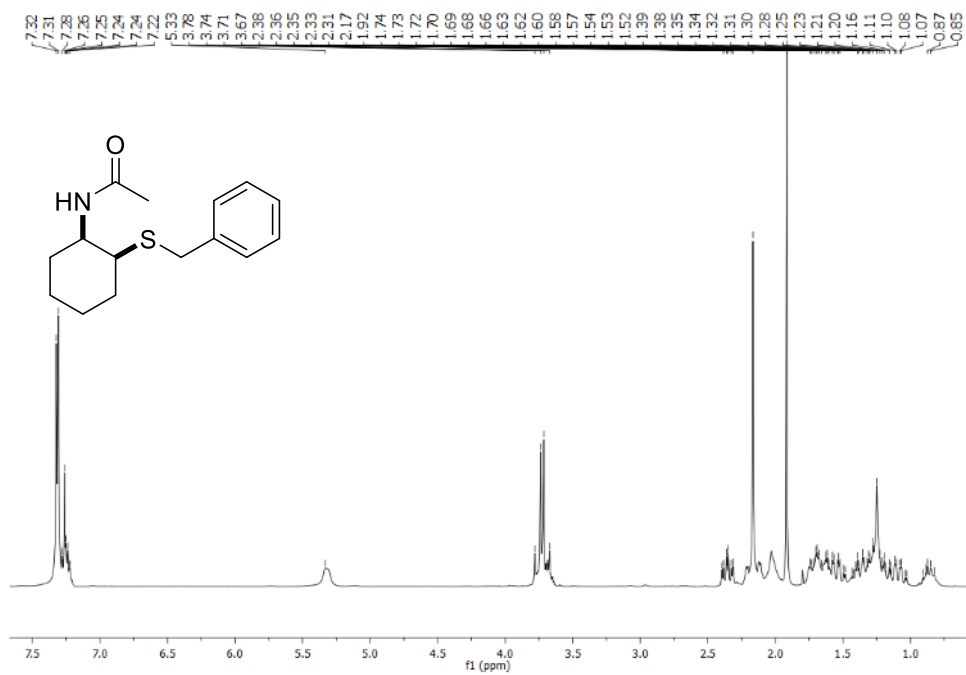
***N*-(*cis*-2-(prop-2-yn-1-ylthio)cyclohexil)acetamida (7j')**



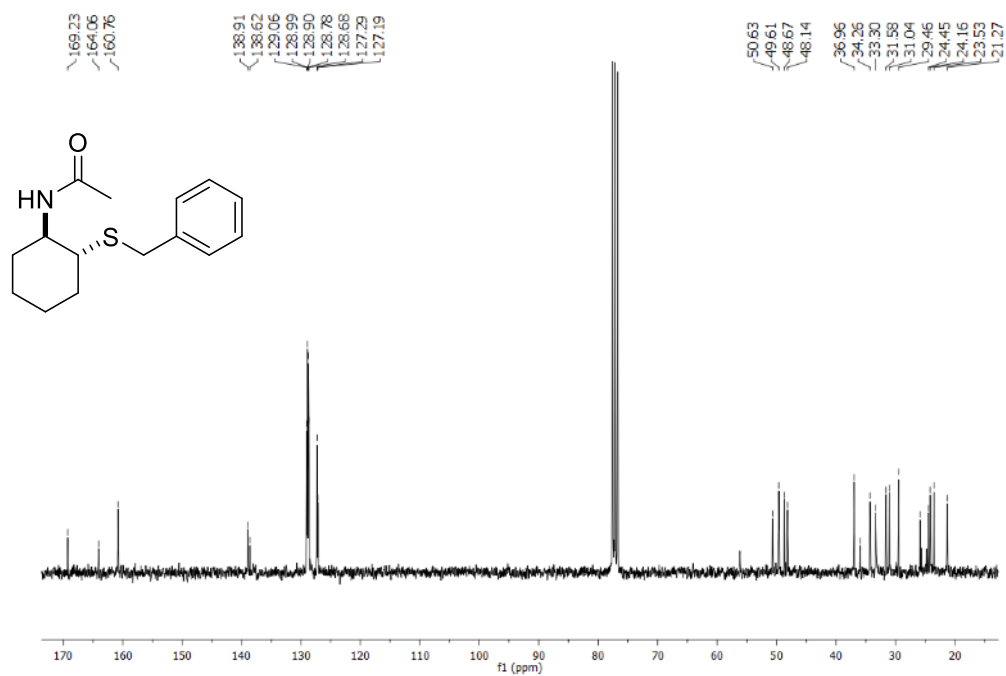
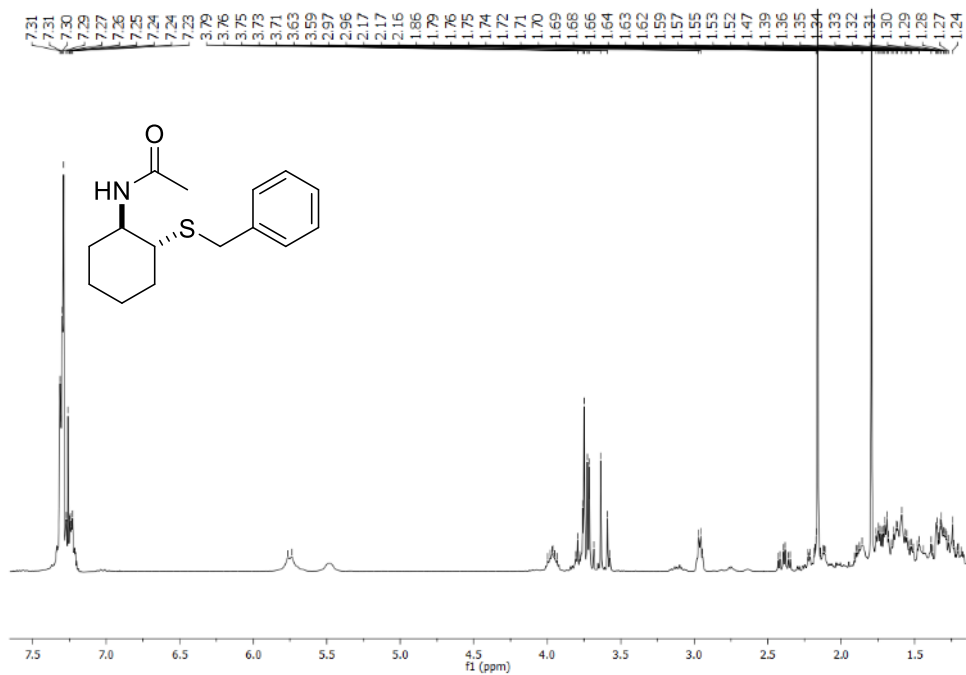
***N*-(*trans*-2-(prop-2-yn-1-ylthio)ciclohexil)acetamida (7j')**



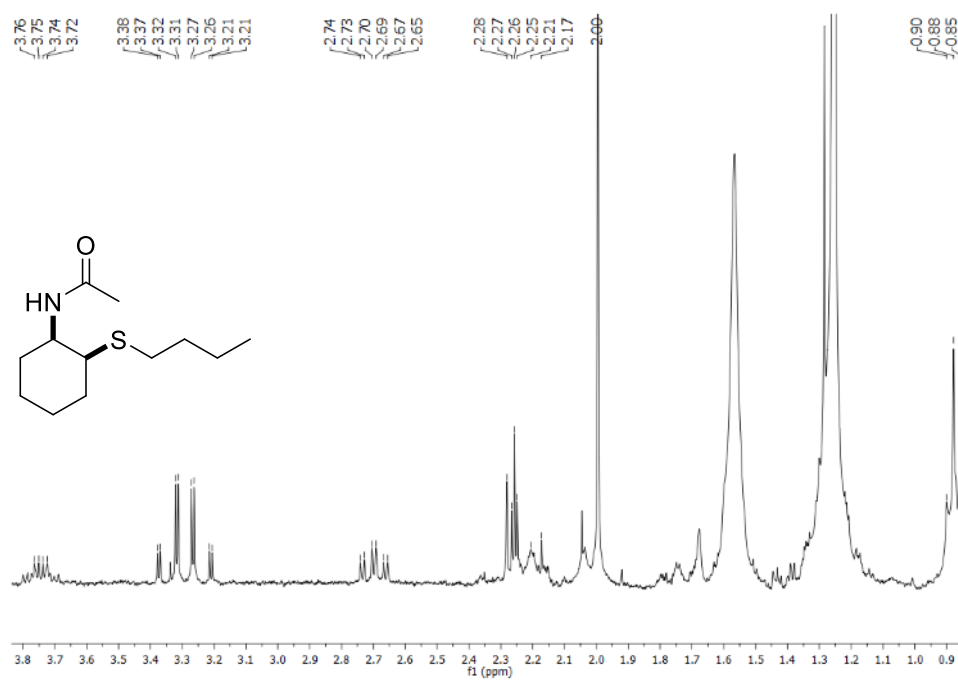
***N*-(*cis*-2-(benciltio)ciclohexil)acetamida (7g')**



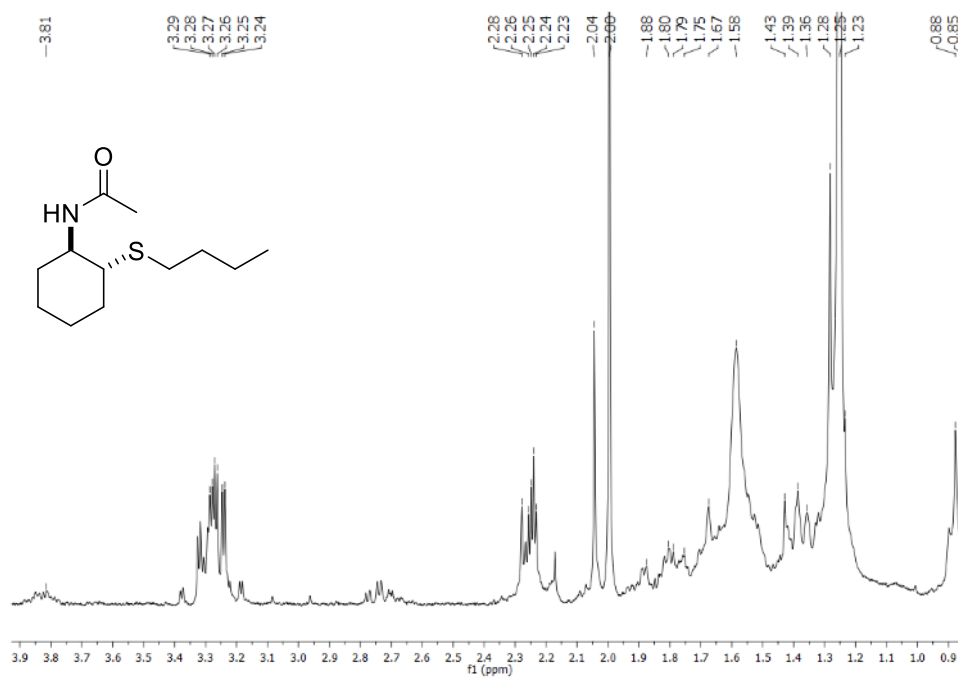
***N*-(*trans*-2-(benziltio)ciclohexil)acetamida (mezcla) (7g')**



***N*-((*cis*)-2-(butiltio)ciclohexil)acetamida (7o')**

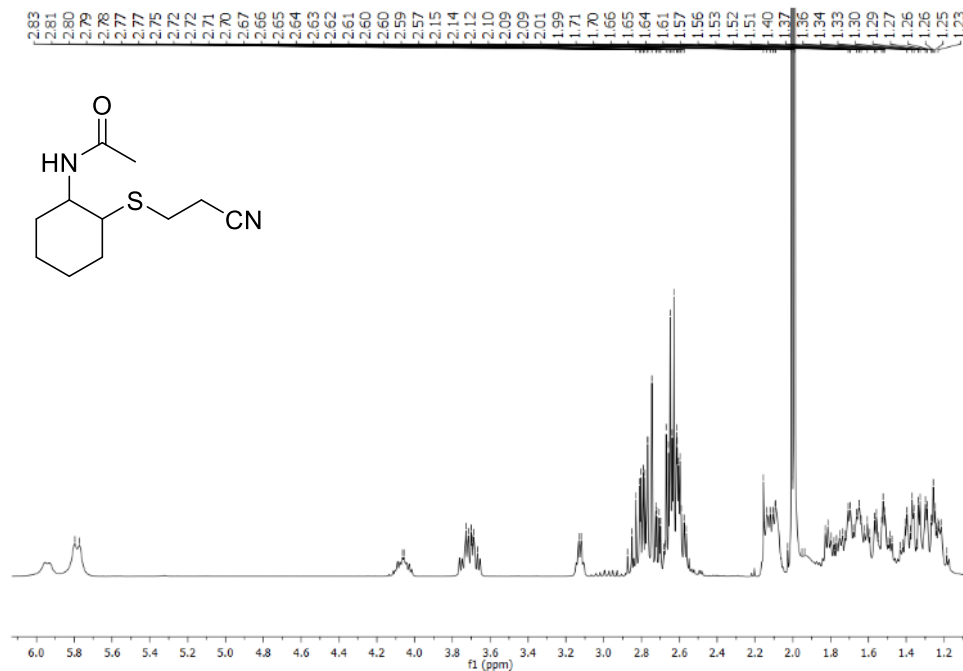


***N*-((*cis*)-2-(butiltio)ciclohexil)acetamida (7o')**

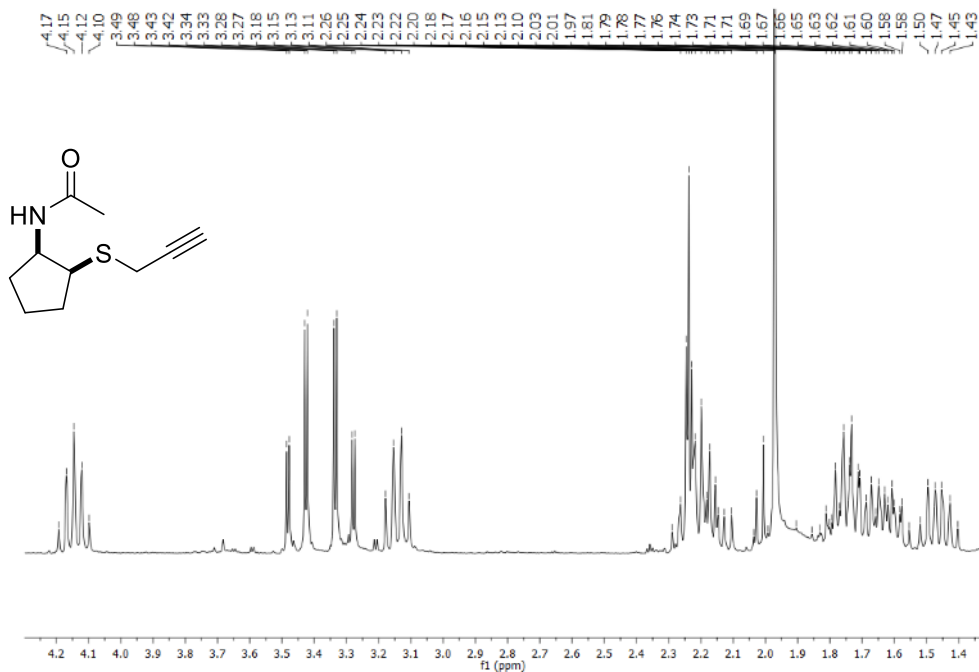


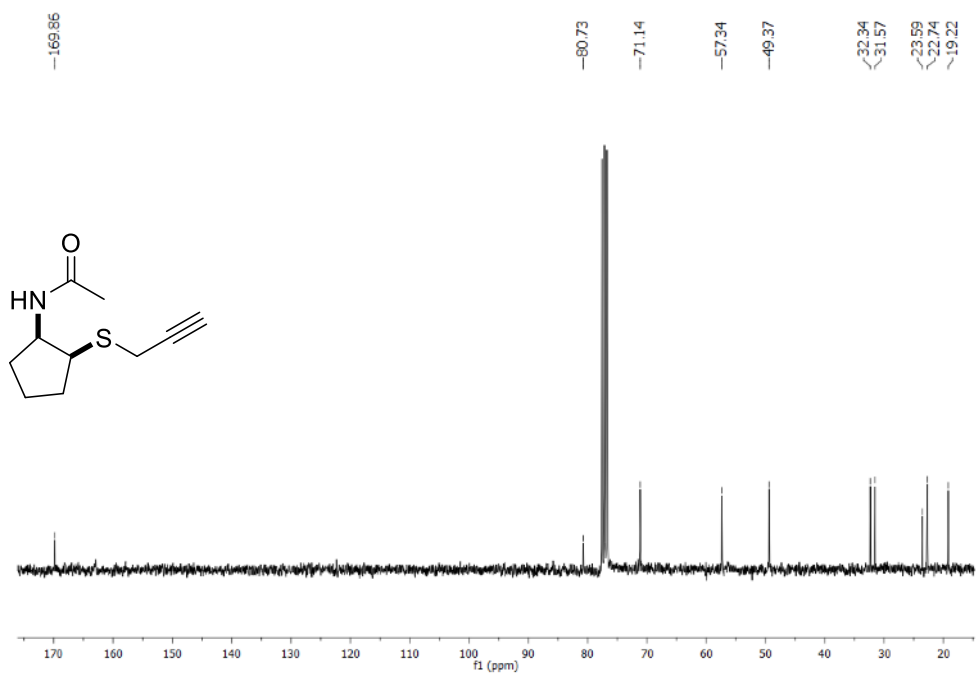
***N*-2-((2-cianoetil)tio)ciclohexil)acetamida(7q')**

La mezcla de isómeros *cis/trans* no pudo separarse por columna cromatográfica.



***N*-(*cis*-2-(prop-2-in-1-iltio)ciclopentil)acetamida(7n')**





***N*-(*trans*-2-(prop-2-in-1-iltio)ciclopentil)acetamida (7n')**

Mezcla de isómeros, no se pudo obtener una fracción pura

