



**Departamento de Química Orgánica
Facultad de Química
Universidad de la República**



DISEÑO DE ESTRATEGIAS BIO- Y ORGANOCATALÍTICAS PARA LA PREPARACIÓN DE ESTRUCTURAS DE ALTA OPORTUNIDAD

Trabajo presentado para aspirar al título de Magister en Química

I.Q. Mariela Risso

Tribunal:

Dra. Laura Scarone
Dr. David González
Dr. Williams Porcal

Directoras de Tesis:

Dra. Daniela Gamenara
Dra. Patricia Saenz Méndez

Diciembre 2014

A Papo, Mami y Tití

The true sign of intelligence is not knowledge but imagination
Albert Einstein

Agradecimientos

Uy, qué difícil..., sobre todo no olvidarme de nadie que de alguna forma transitó conmigo este largo, largo camino, no solo de esta Tesis, sino también de tantísimos años de trabajo dentro de Orgánica. Así que desde ya agradezco enormemente a todos los que me han tenido que bancar todos estos años dentro de Orgánica, del Departamento y de la Facultad y han tenido que soportar mi "particular" tono de voz. A todos: ¡Muchas Gracias!

A mis padres y mi tía (mi segunda mamá) que me alentaron a seguir cuando las ganas de largar todo eran grandes, que me dieron la oportunidad de poder estudiar y me enseñaron lo importante de formarse no sólo a "nivel académico" sino como ser humano.

A mis hermanos que me bancan desde que nací, en las buenas y en las malas. Al sobrinaje, que a pesar de que me hacen y me hicieron rezongar como loca, son parte de mi vida.

A Frodito, compañero inseparable, en todas está ahí.

A Daniela, una AMIGA, una vida juntas. Por todo lo que compartimos, desde el estudio al ocio. Muchas cosas hemos pasado y sigue siendo mi amiga, siempre dispuesta a dar una mano, un consejo. Por jugársela a guiarme en esta Tesis y a tirarme para delante para terminarla.

A Patricia, amiga y compinche de laboratorio, dimos nuestros primeros pasos en investigación (los míos no tan primeros) en el mismo grupo, con trabajos en común. Por todo lo que compartimos adentro y afuera del laboratorio. Por atreverse también a guiarme en esto y darme pa delante. Por dejarme ser la "niñera" de su manada.

A Gaby, la "secre namber guan", por amiga, por compartir varias pasiones, como la música y los bichos.

A mis amigos Beatriz, Silvia M., Julio, Cecilia, Adolfo, Laura A., por estar siempre ahí.

A la vieja guardia de Orgánica:

A Gustavo, por permitirme trabajar en su laboratorio y por estar siempre dispuesto a sentarse, con infinita paciencia, a explicar lo que no entendemos, un grande!

A Quique, con su humor tan particular, que siempre nos hace más llevadera la jornada.

A David, por su buena onda, por los actuales titulares de los lunes y por las viejas tertulias de los viernes, junto con el Lolo y el que se sumase. Por su tranquilidad a la hora de discutir de temas de actualidad o de lo que sea.

A Valeria, por ser la Reina del Coso, por todo lo que pasamos juntas, por la ayuda desinteresada en todo lo que pueda. Porque increíblemente todavía no nos matamos, jeje.

A la Onetto, compañera de tantas cosas... Por su buen humor y hacerme reír tanto. Por su magistrales salidas, por tener tan claro el pensamiento de los estudiantes y ayudarnos a entenderlos.

A Margarulis, por su amistad y por estar siempre dispuesta a dar una mano en lo que sea. Por su eterno despiste que tanto nos hace reír.

A Hugo y Mercedes que me dieron la oportunidad de empezar a dar mis primeros pasos en investigación. Por la pasión y el gusto que transmiten en lo que hacen.

A Gabriel C. por todo lo que pasamos juntos, por lo buen compañero y amigo, por hacerme reír tanto.

A todos los compañeros que siguen acá o andan por otros rumbos: GaSa, Williams, Vicky L., Anita S., Hoco, Vicky R., Eliana, Cecilia, Lolo, Magela, PaPa, por las jornadas de trabajo compartidas y de las otras siempre muy bien condimentadas...

A Ivana, compinche de la 103, siempre dispuesta a ayudar y dar una mano en lo que se le pida.

A la guardia media:

A Anita, por sus alaridos que tanto se extrañan, por su dulzura, siempre dispuesta a dar una mano, divina!!

A Nacho, tremendo, un grande, por su gran disposición a ayudar en todo lo que esté a la mano.

A Vicky, por todo lo que compartimos, directoras incluidas, por el intercambio de productos, por las salidas musicales a pesar de dejarme afuera en algunas, por estar ahí en todo lo que se necesite.

A Pipo, el eterno indignado, jeje.

A Maitia, por todos los Mamuchas, por hablar tanto y hacerme olvidar de los problemas.

A Viviana, por ser tan espontanea, por tener tan buena onda y por estar siempre de buen humor.

A Viro, Nía, Mari, Gonza, Ale, Florencia por meterle pa'delante en el lab, dando una mano, ayudando, apoyando.

A todos los compañeros y amigos que han pasado por el laboratorio: Paula, Jorge, Fernando, Leti, Chuck, Silvana, Fede, Pichón, Mel, Gabriel, Miguí, Sofía, Patricia, Lucía R., Valentina.

A la guardia nueva que le da un toque fresco al Lab.:

A Claudia, una dulce, pobrecita, me tiene que bancar directamente en el laburo.

A Eli, Natalia T., Natalia R., Gabriela, Bruno, Natalí, Paola, Agustina, Romina, Matías.

A Carolina por facilitarnos el trabajo administrativo.

A los compañeros y amigo de Farmacia, siempre dispuestos a ayudar y a prestar lo que se necesite, desde un reactivo, un libro, material de vidrio.

A todos los compañeros del Departamento.

Agradezco también a:

Verónica y Horacio por los espectros de RMN.

Al Prof. Peter Wipf (Pittsburgh University), por la donación del reactor de microondas, a la Dra. Graciela Mahler por permitirnos su uso y por las instancias de discusión.

Al Dr. Guillermo Moyna por traernos el catalizador.

Facultad de Química. UdelaR.

PEDECIBA (Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas)

CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica)

OPCW (Organization for the Prohibition of Chemical Weapons)

PDT (Programa de Desarrollo Tecnológico)

ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación)

ÍNDICE GENERAL

1	Introducción.	1
	1.1 Referencias bibliográficas.	8
2	Antecedentes.	9
	2.1. Transesterificación de β -cetoésteres catalizada por lipasas.	10
	2.2. Síntesis organocatalizada de derivados de ácido cinámico.	20
	2.3. Síntesis organocatalizada de fenilglicidatos y precursores.	28
	2.4. Referencias bibliográficas.	36
3	Objetivos y Metodología.	43
4	Resultados y Discusión.	48
	4.1. Transesterificación de β -cetoésteres catalizada por lipasas.	49
	4.2. Síntesis organocatalizada de derivados de ácido cinámico.	60
	4.3. Síntesis de fenilglicidatos y precursores.	66
	4.3.1. Epoxidación enzimática.	66
	4.3.1.1. Epoxidación de ácidos carboxílicos α,β -insaturados.	66
	4.3.1.2. Epoxidación de ésteres etílicos α,β -insaturados.	69
	4.3.2. Epoxidación organocatalítica.	71
	4.4. Referencias bibliográficas.	85
5	Conclusiones y trabajo Futuro.	87
	5.1. Conclusiones.	88
	5.1.1. Transesterificación de β -cetoésteres catalizada por lipasas.	88
	5.1.2. Síntesis de derivados de ácido cinámico.	88
	5.1.3. Síntesis de fenilglicidatos y precursores.	89
	5.2. Trabajo Futuro.	90
	5.3. Referencias bibliográficas.	91
6	Parte Experimental.	92
	6.1 Materiales y Equipos.	93
	6.2 Síntesis.	94
	6.1.2. Transesterificación de β -cetoésteres catalizada por lipasas.	94
	6.2.1.1. Procedimiento general para la reacción de transesterificación en microondas doméstico.	94
	6.2.1.2. Procedimiento general para la reacción de transesterificación en reactor de Microondas.	95
	6.2.2. Síntesis de derivados de ácido cinámico.	97

6.2.2.1.	Procedimiento general para la condensación de Knoevenagel en piridina.	97
6.2.2.2.	Condensación de Knoevenagel en agua.	99
6.2.2.3.	Condensación de Knoevenagel en tetrahidrofurano.	100
6.2.3.	Síntesis de fenilglicidatos y precursores.	101
6.2.3.1.	Epoxidación enzimática.	101
6.2.3.1.1.	Procedimiento general para la obtención de ésteres α,β -insaturados.	101
6.2.3.1.1.1.	Monohidrólisis de malonato de dietilo.	101
6.2.3.1.1.1.	Condensación de Knoevenagel para la obtención de ésteres α,β -insaturados. Procedimiento general.	102
6.2.3.1.2.	Procedimientos generales para la reacción de epoxidación enzimática.	105
6.2.3.1.2.1.	Con CAL B.	105
6.2.3.1.2.2.	Con HRPO.	105
6.2.3.2.	Epoxidación Organocatalítica.	106
6.2.3.2.1.	(<i>E</i>)-3-[4-(<i>tert</i> -butildimetilsililoxi)-3-metoxifenil]propenal (48).	106
6.2.3.2.2.	Procedimiento general para la reacción de epoxidación organocatalítica.	107
6.2.3.3.	Epoxidación química.	112
6.2.3.3.1.	Procedimiento general para la reacción de epoxidación con ácido <i>m</i> -cloroperbenzoico.	112
6.2.3.3.2.	Epoxidación con Oxone [®] .	113
6.3.	Referencias bibliográficas.	114
7	Producción científica.	115
7.1.	Publicaciones.	116
7.2.	Presentaciones a congresos.	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Prolina y análogos utilizados en organocatálisis.	7
Figura 2	Modelo del sitio activo de una lipasa, que explica la regla de Kazlauskas.	17
Figura 3	Monómeros predominantes en la lignina (monolignoles).	23
Figura 4	Principales unidades estructurales de la lignina.	24
Figura 5	Ejemplo de productos naturales que contienen grupos oxiranos y biosíntesis a partir de epóxidos.	29
Figura 6	Organocatalizador derivado de pirrolidina.	34
Figura 7	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-sitofilato, feromona de agregación de <i>Sitophilus granarius</i> .	49
Figura 8	Cromatograma, en las condiciones del <i>Programa 7</i> , de la transesterificación de 1 con (±)-2-pentanol. Tiempo de reacción: 1 hora.	52
Figura 9	Rendimiento en la transesterificación de 3-oxobutanoato de etilo (1) con (±)-2- y 3-pentanol como nucleófilos, en ausencia de disolvente e irradiado por microondas, con y sin enzima.	53
Figura 10	Cromatograma quiral, en las condiciones del <i>Programa 3</i> , de la mezcla racémica (±)-2-pentanol.	55
Figura 11	Cromatograma quiral, en las condiciones del <i>Programa 3</i> , de (S)-2-pentanol.	55
Figura 12	Cromatograma quiral, en las condiciones del <i>Programa 3</i> , de la transesterificación de 1 con (±)-2-pentanol. Tiempo de reacción: 1 hora.	56
Figura 13	Cromatograma, en las condiciones del <i>Programa 7</i> , de la transesterificación de 1 con (±)-2-pentanol y CAL B fresca. Tiempo de reacción: 30 minutos.	57
Figura 14	Cromatograma, en las condiciones del <i>Programa 7</i> , de la transesterificación de 1 con (±)-2-pentanol y CAL B 5 ^{to} reuso. Tiempo de reacción: 30 minutos.	58

Figura 15	Cromatograma, en las condiciones del <i>Programa 7</i> , de la transesterificación de 1 con (±)-2-pentanol y CAL B 10° reuso. Tiempo de reacción: 30 minutos.	59
Figura 16	Reutilización de CAL B en la transesterificación de 1 con (±)-2-pentanol como nucleófilo, en ausencia de disolvente e irradiado por microondas. Tiempo de reacción: 2 horas.	59
Figura 17	Espectro de ¹ H-RMN del compuesto 18 .	65
Figura 18	Estructura general de fenilglicidatos.	66
Figura 19	Cromatograma no quiral (<i>Programa 6</i>) de la mezcla diastereomérica 51 , obtenida con las condiciones de reacción de la entrada 5, Tabla 6.	75
Figura 20	Cromatograma quiral (<i>Programa 1</i>) de la mezcla diastereomérica 51 , obtenida con las condiciones de reacción de la entrada 5, Tabla 6.	75
Figura 21	Espectro de ¹ H-RMN de la mezcla diastereomérica 51 , obtenida con las condiciones de reacción de la entrada 5, Tabla 6.	77
Figura 22	Cromatograma no quiral (<i>Programa 6</i>) de 51 , obtenido con las condiciones de reacción de la entrada 11, Tabla 6.	78
Figura 23	Cromatograma quiral (<i>Programa 2</i>) de 51 , obtenido con las condiciones de reacción de la entrada 11, Tabla 6.	79
Figura 24	Espectro de ¹ H-RMN de 51 , obtenido con las condiciones de reacción de la entrada 11, Tabla 6.	80

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1	Biotransformación ésteres en disolventes orgánicos.	4
Esquema 2	Ciclo catalítico mediado por L-prolina.	6
Esquema 3	Ejemplos de feromonas de insectos que pueden ser sintetizadas utilizando β -cetoésteres como material de partida.	12
Esquema 4	Esquema general de reacciones de esterificación y transesterificación.	15
Esquema 5	Mecanismo de acción de serina-hidrolasas.	16
Esquema 6	Ácidos carboxílicos α,β -insaturados precursores de modelos de lignina.	21
Esquema 7	Síntesis de modelos de lignina. Polimerización de unidades base.	26
Esquema 8	Conversión organocatalítica de vainillina en 2-metoxi-4-vinilfenol.	27
Esquema 9	Potencial sintético de los fenilglicidatos como precursores de productos farmacéuticos.	30
Esquema 10	Epoxidación organocatalítica de aldehídos α,β -insaturados.	32
Esquema 11	Formación del ion iminio entre el aldehído α,β -insaturado y la amina.	33
Esquema 12	Mecanismo propuesto para la epoxidación de aldehídos α,β -insaturados.	35
Esquema 13	Modelo de reacción de transesterificación de β -cetoésteres	44
Esquema 14	Reacción general de condensación de Knoevenagel-Doebner de aldehídos aromáticos y ácido malónico organocatalizada.	45
Esquema 15	Versatilidad sintética de derivados de ácido cinámico, estilbenos y estirenos, obtenida mediante epoxidación y posterior apertura del epóxido formado.	46
Esquema 16	Epoxidación enzimática de ácidos y ésteres α,β -insaturados.	46

Esquema 17	Epoxidación organocatalítica de aldehídos α,β -insaturados.	47
Esquema 18	Transesterificación de 3-oxobutanoato de etilo (1), utilizando (\pm)-2-pentanol como nucleófilo, CAL A y CAL B como biocatalizadores, en ausencia de disolvente e irradiado por microondas (horno doméstico) a 400 W de potencia.	50
Esquema 19	Transesterificación de 1 y 2 utilizando (\pm)-2- y 3-pentanol como nucleófilos, CAL B como biocatalizador, en ausencia de disolventes e irradiado con microondas.	51
Esquema 20	Reacción general de condensación de aldehídos aromáticos y ácido malónico utilizando piperidina como organocatalizador y piridina como disolvente.	60
Esquema 21	Condensación de Knoevenagel-Doebner de 2-hidroxi- y 4-hidroxibenzaldehído con ácido malónico.	60
Esquema 22	Mecanismo propuesto para la formación de 4-vinilfenol.	62
Esquema 23	Metiluros de quinona intermedios en la doble descarboxilación en la reacción de Knoevenagel-Doebner.	63
Esquema 24	Condensación de Knoevenagel-Doebner de 4-hidroxibenzaldehído con ácido malónico en agua como disolvente.	64
Esquema 25	Epoxidación de alquenos mediada por CAL B.	67
Esquema 26	Auto-epoxidación de ácidos grasos insaturados vía formación de perácido mediada por CAL B.	67
Esquema 27	Ruta sintética para la preparación de los epóxidos de ácidos carboxílicos α,β -insaturados.	68
Esquema 28	Ruta sintética para la preparación de los epóxidos de ésteres etílicos α,β -insaturados.	69
Esquema 29	Ruta sintética para la preparación de los epóxidos de aldehídos α,β -insaturados.	72
Esquema 30	Mecanismo propuesto para la epoxidación de aldehídos α,β -insaturados para obtener los diasterómeros a y b .	81

Esquema 31 Mecanismo probable de la epoxidación de aldehídos α,β - 83
insaturados para obtener los diasterómeros **a'** y **b'**.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Conversiones obtenidas en la transesterificación de 3-oxobutanoato de etilo (1), utilizando (±)-2-pentanol como nucleófilo, CAL A y CAL B como biocatalizadores, en ausencia de disolvente e irradiado por microondas (horno doméstico) a 400 W de potencia. Conversión determinada por GC (<i>Programa 7</i>).	50
Tabla 2	Rendimientos obtenidos en la transesterificación de 1 y 2 con (±)-2- y 3-pentanol como nucleófilos, CAL B como biocatalizador, en ausencia de disolvente e irradiado por microondas. Tiempo de reacción: 2 h.	53
Tabla 3	Productos obtenidos en la condensación de Knoevenagel-Doebner de 2-hidroxi- y 4-hidroxibenzaldehído con ácido malónico.	60
Tabla 4	Condiciones de epoxidación de ácidos carboxílicos α,β -insaturados y resultados obtenidos.	68
Tabla 5	Condiciones de epoxidación de ésteres etílicos α,β -insaturados y resultados obtenidos.	70
Tabla 6	Condiciones de epoxidación de aldehídos α,β -insaturados y resultados obtenidos.	73

TABLA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
Ar	Aromático
BzOEt	Benzoato de etilo
CAL A	Lipasa A de <i>C. antártica</i>
CAL B	Lipasa B de <i>C. antártica</i>
d	Doblete
δ	Desplazamiento químico (ppm)
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]-7-undeceno
dd	Doblete de dobletes
ee	Exceso enantiomérico
EM	Espectrometría de masas
eq	Equivalente
Et ₂ O	Dietiléter
EtOH	Etanol
GC	Cromatografía gaseosa
Hex	Hexanos
HRPO	Peroxidasa de rabanito picante
Hz	Hertz
IE	Ionización electrónica
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
m	Multiplete
<i>m</i> CPBA	Ácido <i>m</i> -cloroperbenzoico
MW	Microondas
ppm	Partes por millón
q	Cuarteto
<i>rd</i>	Relación diasteromérica
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Singulete
t	Triplete
TA	Temperatura ambiente
<i>t</i> -BuOOH	<i>ter</i> -butilhidroperóxido
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography)

TMS	Tetrametilsilano
t_r	Tiempo de retención
rpm	Revoluciones por minuto
UHP	Urea-peróxido de hidrógeno
W	Watt

Introducción

1. Introducción

El presente trabajo de tesis se enmarca en la búsqueda de metodologías para la producción de “unidades base” o “bloques de construcción” para la preparación de compuestos con alto valor agregado, tanto de interés farmacéutico como industrial. Los bloques de construcción son en general moléculas altamente funcionalizadas, lo que les confiere el potencial de ser transformadas en nuevas familias de moléculas de interés sintético. Para dicho fin, se pueden plantear diferentes estrategias sintéticas clásicas o utilizar metodologías bio- y organocatálisis. Estas últimas suelen ser ambientalmente más responsables cuando se las compara con las metodologías tradicionales de síntesis orgánica.

Una gran parte de las moléculas de interés biológico son quirales, de modo que su preparación debe tener en cuenta este aspecto. Para lograr la síntesis enantioselectiva de un compuesto, se necesitan intermedios enantioméricamente puros, a menos que se resuelva la mezcla racémica del producto final. Es importante entonces, asegurar que el intermedio sea un enantiómero puro. Por lo tanto, un objetivo sintético relevante es el diseño bloques de construcción versátiles para emplear en síntesis enantioselectiva, los que pueden obtenerse, por ejemplo, mediante biotransformaciones.

La incorporación de etapas de biotransformación, utilizando microorganismos y/o enzimas aisladas, es una estrategia cada vez más explotada en síntesis orgánica tanto en la industria y como en la academia. La principal consideración para la incorporación de una biotransformación en una secuencia sintética, es el control de la regio- y estereoselectividad que se puede lograr utilizando una reacción catalizada por enzimas. Las biotransformaciones se están convirtiendo en metodologías aceptadas para generar compuestos ópticamente puros y para el desarrollo rutas sintéticas eficientes para la obtención de compuestos de interés. Las reacciones biocatalizadas son una alternativa competitiva a las metodologías de síntesis química convencional, por lo que representan una valiosa herramienta para el químico sintético.¹

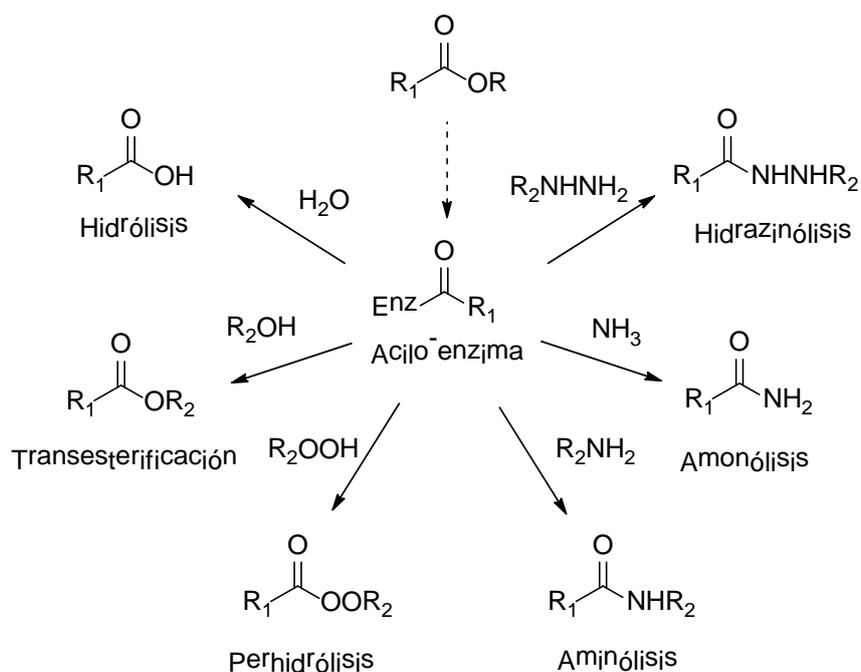
La mayoría de las biotransformaciones útiles en síntesis orgánica son las catalizadas por hidrolasas. Las catalizadas por oxidorreductasas son las segundas y las catalizadas por las restantes clases de enzimas son de baja, pero creciente, utilidad. Las enzimas se pueden dividir en seis grupos principales de acuerdo a la Unión Internacional de Bioquímica. Estos grupos son: (1) Oxidorreductasas: oxidación-reducción: oxigenación de enlaces C-H, C-C y C=C, eliminación de los átomos de hidrógeno equivalentes. (2) Transferasas: transferencia de grupos acilo, azúcar, fosforilo, aldehído, y cetona. (3) Hidrolasas: hidrólisis de glucósidos, anhídridos, ésteres, amidas, péptidos y otros grupos que contienen enlaces C-N. (4) Liasas: adición de HX a dobles enlaces como C=C, C=N y C=O y proceso inverso. (5) Isomerasas: isomerizaciones por migración de enlaces C=C, isomerización *cis-trans* y racemización. (6) Ligasas: formación de enlaces C-O, C-S, C-N, C-C y éster fosfato.¹

El uso de enzimas, especialmente lipasas, para la síntesis de fármacos quirales está bien establecida desde hace años y las biotransformaciones son aceptadas como una metodología común para la preparación de productos farmacéuticos quirales.² En los últimos años, se han descrito procesos interesantes, usando hidrolasas, oxidorreductasas o liasas como biocatalizadores para la síntesis de fármacos quirales.² Sin embargo, el uso de lipasas en disolventes orgánicos sigue siendo una excelente metodología para la preparación de sólo uno de los isómeros de fármacos quirales mediante reacciones de hidrólisis, transesterificación o aminólisis enzimática.³

Uno de los mayores inconvenientes de la utilización de lipasas en síntesis orgánica es la pobre solubilidad en medio acuoso de la mayoría de los compuestos orgánicos con más de cuatro átomos de carbono. El agua es un disolvente ineficiente para la mayoría de las aplicaciones en la química industrial ya que muchos compuestos orgánicos son inestables en disolución acuosa. Además, la eliminación de agua es un proceso más tedioso y costoso que cuando se utilizan disolventes orgánicos, debido a que en general estos disolventes tienen menor punto de ebullición que el agua. Muchas lipasas utilizadas en síntesis, han demostrado ser activas en

disolventes orgánicos presentando por esto varias ventajas: (a) fácil recuperación de sustrato y producto con alto rendimiento; (b) es posible utilizar sustratos no polares; (c) evita reacciones secundarias; (d) en muchos casos la lipasa es termodinámicamente más activa; (e) cambio del equilibrio termodinámico para favorecer la síntesis más que la hidrólisis.⁴

La biocatálisis en medios no acuosos ha sido ampliamente utilizada para la resolución de alcoholes, ácidos, ésteres o lactonas a través de reacciones de transesterificación enzimática usando diferentes lipasas.⁵ Por otra parte, procesos tales como la acilación enzimática de aminas o amoníaco, han demostrado ser de gran utilidad para la resolución de aminas y la preparación de amidas con centros quirales.⁶ Las lipasas pertenecen al grupo de las serina-hidrolasas, e involucra tres residuos claves en el centro activo (Ser, His y Asp), conocidos como "tríada catalítica". El mecanismo completo se describe en el capítulo 2. Antecedentes. El mecanismo catalítico de estas enzimas de estos procesos se conoce como el de la serina-hidrolasa,⁷ que es común para la hidrólisis de ésteres, y también para los procesos enzimáticos de transesterificación, aminólisis, amonólisis, hidrazinólisis y perhidrólisis de ésteres; en el que el agua, el nucleófilo natural que ataca al complejo acilo-enzima formado, es remplazado por un alcohol, amina, amoníaco, hidrazina o hidroperóxido respectivamente (Esquema 1).³

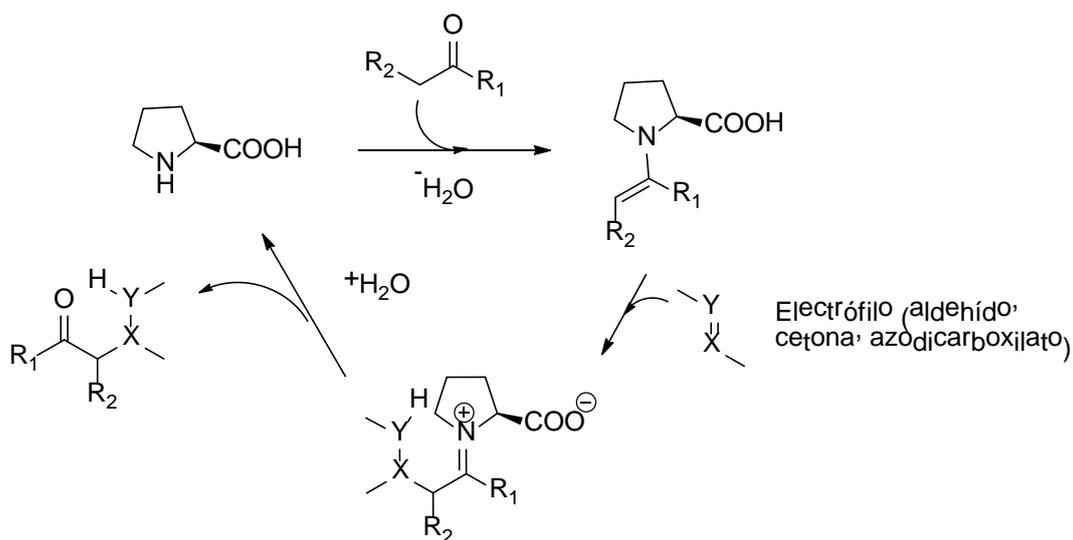


Esquema 1: Biotransformación de ésteres en disolventes orgánicos. Extraído de Fernández-Gotor y col.³

Por otro lado, la mayoría de las transformaciones enzimáticas tienen su contrapartida en química sintética. A menudo, sin embargo, los mecanismos por los cuales los catalizadores biológicos y sintéticos operan, difieren notablemente.⁸ La reacción aldólica catalítica asimétrica, fundamental para la formación de enlaces C-C, química y biológicamente, es un caso interesante a este respecto. Químicamente, esta reacción se lleva a cabo a través de metodologías que emplean determinadas cantidades de un enolato preformado en combinación con un catalizador quiral. Habitualmente, en el mecanismo de reacción está involucrado un metal. La mayoría de las enzimas, sin embargo, utilizan una estrategia fundamentalmente diferente y catalizan la reacción aldólica directa de dos carbonilos sin modificar. Las aldolasas de Clase I utilizan un mecanismo vía enamina, mientras que las de Clase II catalizan el proceso utilizando zinc como cofactor.⁸ El uso de aldolasas que utilizan un mecanismo vía enamina y aceptan sustratos orgánicos hidrófobos, ha demostrado un potencial sintético similar al de las reacciones aldólicas catalizadas por aminas. El aminoácido prolina es un efectivo catalizador asimétrico para la reacción aldólica directa entre acetona sin modificar y una variedad de aldehídos.⁸

Las moléculas orgánicas pueden catalizar reacciones químicas a través de cuatro mecanismos diferentes: (a) Activación de la reacción basada en la nucleofilia/electrofilia de los catalizadores. El catalizador quiral no se consume en la reacción y no requiere regeneración en paralelo. (b) Las moléculas orgánicas forman intermedios reactivos. El catalizador quiral se consume en la reacción y requiere la regeneración en un ciclo catalítico paralelo. (c) Reacciones de transferencia de fase. El catalizador quiral forma un complejo con el sustrato y se da un transporte entre un disolvente orgánico estándar y una segunda fase (fase sólida o acuosa en la que tiene lugar la reacción). (d) Transformaciones asimétricas aceleradas por cavidad molecular, en las que el catalizador se puede seleccionar en función del tamaño y la estructura.⁹

Las aminas secundarias quirales utilizadas como catalizadores pueden formar iones iminio con cetonas o aldehídos. Estos intermedios reaccionan ya sea por tautomería imina-enamina o un mecanismo relacionado, para formar la especie de enamina nucleófila, que pueden reaccionar convenientemente con un electrófilo activado, por ejemplo, aldehído, cetona, o azodicarboxilato, Esquema 2.¹⁰



Esquema 2: Ciclo catalítico mediado por L-prolina en reacciones aldólicas.¹⁰

El catalizador de mayor éxito utilizado para este tipo de reacciones ha sido, sin duda, L-prolina. Aunque, por lo general, el aminoácido utilizado es el

natural (L-prolina), ambos enantiómeros están disponibles, lo que es una ventaja sobre los métodos enzimáticos. Es notable la variedad de reacciones que pueden ser mediadas con este aminoácido, cuya simplicidad contrasta con la compleja maquinaria de las enzimas naturales (aldolasas de clase I) capaces de realizar transformaciones similares.¹⁰

La prolina no es la única molécula orgánica capaz de promover reacciones vía enamina, y no todas las reacciones vía enamina pueden ser mediada por la L-prolina.^{11,12} En los últimos años han sido descritos una gran variedad de catalizadores quirales, análogos a la prolina y estructuras más complejas, que mejoran la velocidad y la selectividad en un gran número de reacciones.¹³⁻²¹ En la figura 1 se muestran algunos catalizadores de este tipo.

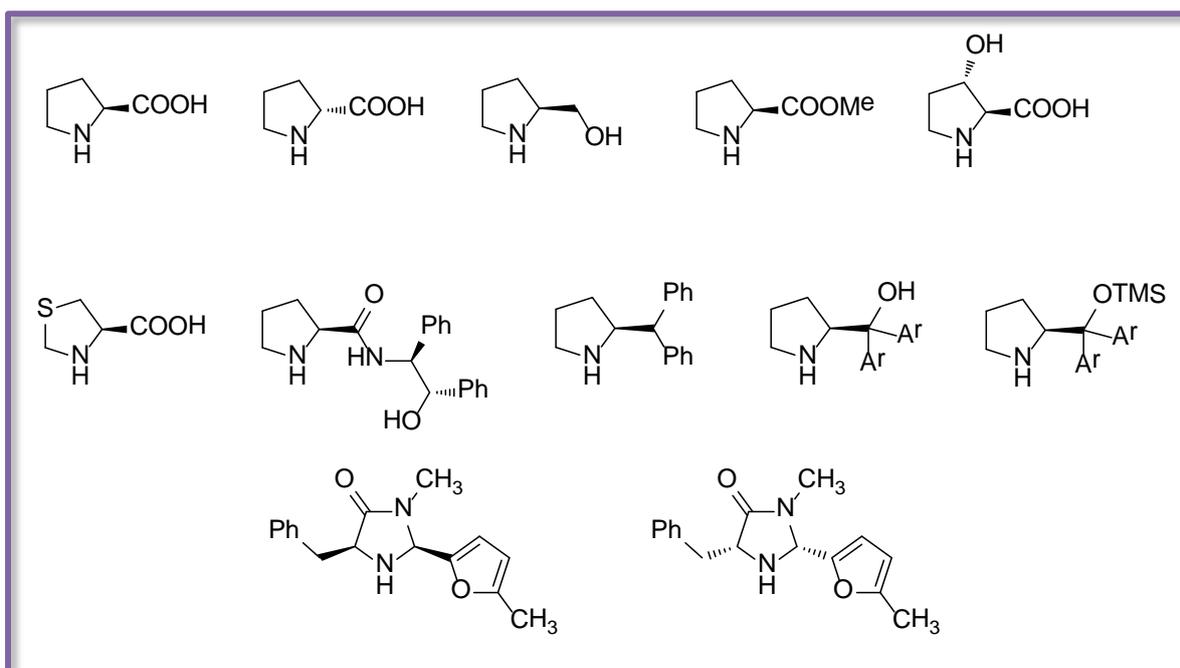


Figura 1: Prolina y análogos utilizados en organocatálisis.

En esta tesis se plantea la aplicación de biotransformaciones y organocatálisis para la preparación de bloques de construcción de gran versatilidad, útiles para la síntesis de diversos compuestos de interés.

1.1 Referencias bibliográficas.

- (1) Loughlin, W. A. *Bioresour. Technol.* **2000**, *74*, 49.
- (2) Gotor, V. *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6*, 420.
- (3) Gotor-Fernández, V.; Brieva, R.; Gotor, V. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2006**, *40*, 111.
- (4) Carrea, G.; Riva, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 2226.
- (5) Klibanov, A. M. *Nature* **2001**, *409*, 241.
- (6) Alfonso, I.; Gotor, V. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 201.
- (7) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*; 6th. ed.; Springer, 2011.
- (8) List, B.; Lerner, R. A.; Barbas III, C. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2395.
- (9) Dalko, P. I.; Moisan, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3726.
- (10) Dalko, P. I.; Moisan, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5138
- (11) Fache, F.; Piva, O. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 139.
- (12) Nakadai, M.; Saito, S.; Yamamoto, H. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 8167.
- (13) Ahrendt, K. A.; Borths, C. J.; MacMillan, D. W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4243.
- (14) Halland, N.; Aburel, P. S.; Jørgensen, K. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 661.
- (15) Halland, N.; Aburel, P. S.; Jørgensen, K. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1272.
- (16) Halland, N.; Hansen, T.; Jørgensen, K. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4955.
- (17) List, B. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5573.
- (18) Marigo, M.; Franzén, J.; Poulsen, T. B.; Zhuang, W.; Jørgensen, K. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6964.
- (19) Marigo, M.; Wabnitz, T. C.; Fielenbach, D.; Jørgensen, K. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 794.
- (20) Ouellet, S. G.; Tuttle, J. B.; MacMillan, D. W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 32.
- (21) Sundén, H.; Ibrahim, I.; Córdova, A. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *47*, 99.

Antecedentes

2. Antecedentes

Uno de los desafíos más significativos para la humanidad en el siglo veintiuno, es el desarrollo de una economía global sostenible. Dentro de éste, corresponde a la comunidad científica el desarrollo de procesos y tecnologías que permitan la producción sustentable de materiales a partir de fuentes naturales renovables.

El presente trabajo de tesis se enmarca en la búsqueda de metodologías para la producción de "unidades base" o "bloques de construcción" para la preparación de compuestos con alto valor agregado, tanto de interés farmacéutico como industrial. Los bloques de construcción son moléculas que contienen múltiples grupos funcionales, lo que les confiere el potencial de ser transformadas en nuevas familias de moléculas de interés sintético. Para ello se plantean diferentes estrategias sintéticas utilizando biocatálisis y organocatálisis. A continuación, se presentan los antecedentes descritos en la literatura, que fueron la base para diseñar la estrategia de investigación de este trabajo de tesis.

2.1. Transesterificación de β -cetoésteres catalizada por lipasas.

Los β -cetoésteres pueden ser utilizados como bloques de construcción quirales, en la preparación de una variedad importante de compuestos bioactivos o de alto valor agregado. Estos bloques de construcción pueden emplearse, por ejemplo, en la síntesis de feromonas de agregación de insectos, que son plagas de granos almacenados y causan graves pérdidas económicas en todo el mundo.¹

El control de plagas hasta ahora, se ha realizado mayoritariamente a través del uso indiscriminado de insecticidas o pesticidas, que además de ser tóxicos y nocivos para los seres humanos y el medio ambiente, muchas veces causan resistencia en los insectos.² El número de insectos y otras especies que desarrollan resistencia a los pesticidas está en constante crecimiento, forzando a la industria química al desarrollo de nuevos pesticidas. Estos hechos han contribuido a promover la utilización de

atrayerentes biológicos naturales, tales como las feromonas, para el seguimiento de plagas, permitiendo la aplicación de programas para su manejo integrado. El manejo integrado de plagas (MIP) combina estrategias químicas, biológicas y agrotécnicas de control a costos razonables y minimizando el daño ambiental. Un primer paso posible del programa es el monitoreo efectivo con el uso de feromonas.³

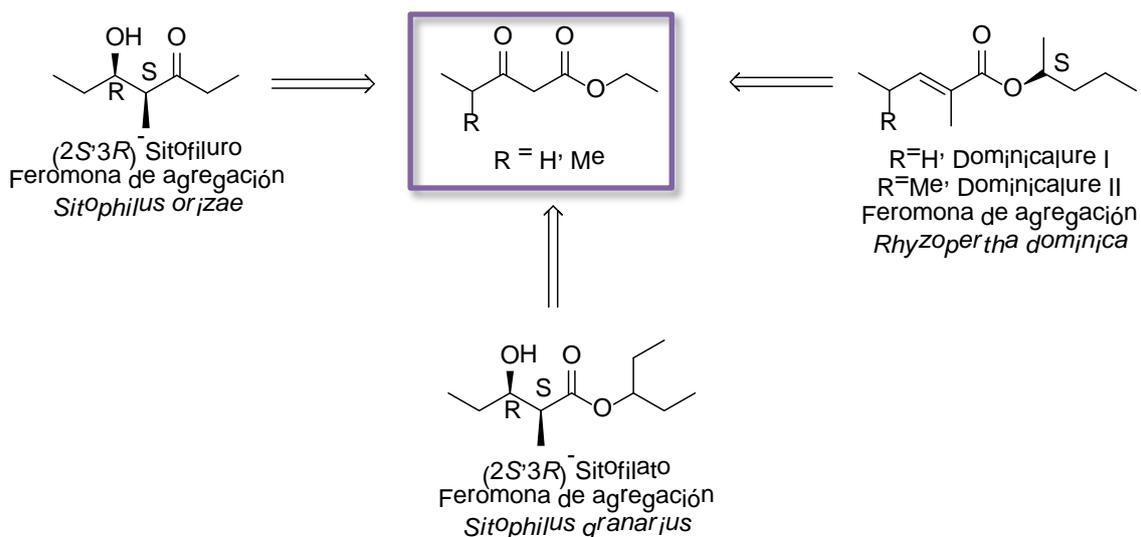
Los organismos vivos utilizan compuestos químicos para comunicarse entre ellos, así como con su entorno. Tanto las especies del reino animal como vegetal secretan y liberan estos compuestos, generando una respuesta en la relación emisor-receptor, desarrollando cambios en ambas especies. Estos compuestos químicos son conocidos como semioquímicos y son clasificados en dos categorías: aleloquímicos y feromonas. Los aleloquímicos son compuestos involucrados en la comunicación interespecífica y son clasificados de acuerdo al beneficio generado: kairomonas (el emisor es beneficiado), alomonas (el receptor es beneficiado), sinomonas (emisor y receptor beneficiados).⁴ Las feromonas son compuestos secretados hacia el exterior del cuerpo del animal o insecto y participan en la comunicación dentro de una misma especie. El término feromona (del griego *pherein* = transferir y *hormon* = excitar) se refiere a una sustancia secretada por un individuo y recibida por un segundo individuo de la misma especie, que causa una reacción específica, que puede ser un determinado comportamiento o el desarrollo de un proceso específico.³

En 1982 Phillips y col. describieron por primera vez, una feromona de agregación producida por el macho de *S. granarius.*, que atrae a ambos sexos.⁵ Esta feromona fue identificada como (2*S*,3*R*)-3-hidroxi-2-metilpentanoato de 1-etilpropilo, y llamada Sitofilato (Esquema 3).^{6,7}

La primera síntesis enantioselectiva de los dos enantiómeros de Sitofilato fue descrita por Chong en 1989.⁸ La estrategia sintética para la introducción de quiralidad involucró una epoxidación asimétrica de Sharpless de un alcohol alílico *cis* y la apertura regioselectiva del epóxido con Me₂CuLi, dando tanto (2*S*,3*R*) y como (2*R*,3*S*)-sitofilato. A partir de entonces, se han descrito diferentes rutas sintéticas para la obtención tanto de la mezcla

racémica como para los enantiómeros puros,⁹⁻¹⁴ las cuales involucran varios pasos de reacción y bajos rendimientos.

Las feromonas como Sitofilato, Sitofiluro y Dominicalure I y II, secretadas por los insectos plaga *Sitophilus granarius*, *Sitophilus oryzae* y *Rhyzopertha dominica* respectivamente, pueden ser sintetizadas además, utilizando β -cetoésteres como bloques de construcción (Esquema 3).¹⁵⁻¹⁷



Esquema 3: Ejemplos de feromonas de insectos que pueden ser sintetizadas utilizando β -cetoésteres como materiales de partida.

El desarrollo de metodologías económicas y ambientalmente responsables para la interconversión de β -cetoésteres sigue siendo un reto, ya que los procesos convencionales a menudo generan gran cantidad de desechos y/o se llevan a cabo bajo condiciones de reacción fuertes.¹

La incorporación de técnicas que implican biotransformaciones, tanto con microorganismos como con enzimas aisladas, se están convirtiendo en procedimientos cada vez más comunes en síntesis orgánica a nivel industrial y de laboratorio.¹⁸ La principal consideración para la incorporación de una biotransformación en una secuencia sintética es la del control quimio-, regio- y estereoselectivo que se puede lograr por medio de reacciones catalizadas por enzimas.¹⁸⁻²⁰ Las biotransformaciones se están convirtiendo en procesos muy utilizados para generar compuestos

ópticamente puros, así como para el desarrollo de rutas eficientes para la obtención de los mismos.¹⁸

La mayoría de las enzimas operan a temperatura ambiente, en disoluciones acuosas neutras y sin necesidad de protección de grupos funcionales presentes en el sustrato. En síntesis orgánica, estos biocatalizadores se pueden utilizar como único catalizador en una reacción, en combinación con otras enzimas, o con reactivos químicos comunes. Además, muchas enzimas aceptan sustratos no naturales, y empleando ingeniería genética se puede alterar su estabilidad, ampliar su especificidad por sustratos y aumentar su actividad específica. Por lo tanto, mientras que moléculas con varios grupos funcionales representan desafíos importantes al utilizar métodos sintéticos tradicionales, pueden ser sustratos adecuados en procesos enzimáticos. A través del uso de biocatalizadores, se pueden realizar modificaciones a moléculas complejas en procesos ambientalmente benignos, que son difíciles de obtener con metodologías convencionales.¹⁸

Las feromonas y hormonas de insectos se han empezado a comercializar como productos agroquímicos, siendo utilizadas en sus formas enantiopuras o en mezclas conocidas de estereoisómeros. Distintos enantiómeros pueden exhibir actividades biológicas diferentes, incluyendo actividad inhibidora, actividad sinérgica, etc. Las feromonas suelen ser muy eficaces, dado que se necesitan cantidades muy pequeñas para lograr la actividad deseada. Su preparación como productos comerciales es de gran interés, incluso si se trata de una ruta sintética de múltiples etapas en una escala menor que la de otros productos agroquímicos.¹⁸

Las feromonas de insectos, que actúan ya sea mediante la interrupción del apareamiento o por conducir a una captura masiva, se espera que se conviertan en la próxima generación de plaguicidas. Estas feromonas son, en general, moléculas ópticamente activas, siendo sus centros quirales fundamentales para su actividad. En algunos casos, los enantiómeros no naturales correspondientes a sus homólogos naturales, pueden inhibir fuertemente la respuesta a una feromona. Por lo tanto, es esencial una pureza óptica extremadamente alta para el uso práctico de una feromona.

Debido a que la utilidad de las feromonas es obvia, muchos grupos de investigación se han dedicado a desarrollar rutas quimioenzimáticas eficientes para la preparación a gran escala de estos compuestos.¹⁸

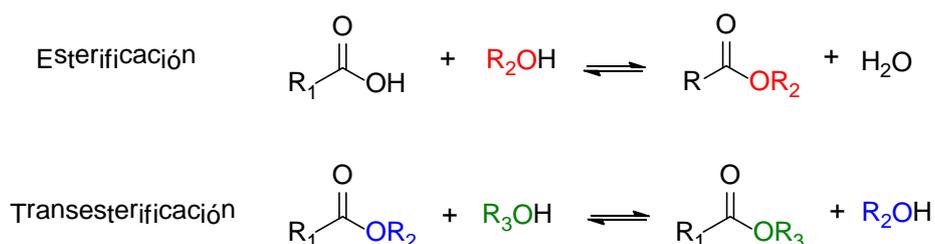
En la actualidad, son ampliamente reconocidas las transformaciones químicas catalizadas por enzimas como alternativas prácticas a la síntesis orgánica tradicional y como soluciones convenientes a ciertos problemas sintéticos difíciles de resolver. La aplicación de biocatalizadores representa por lo tanto, una oportunidad destacable para el desarrollo de procesos en química industrial y farmacéutica.^{21,22}

Durante los últimos años, se han hecho grandes esfuerzos para establecer rutas enantioselectivas para la preparación de compuestos enantioméricamente puros, debido a su importancia en las industrias farmacéutica, alimenticia y agrícola. Los procesos biocatalíticos se presentan como una excelente estrategia para la preparación de estos productos ya que son ambientalmente benignos, en contraste con los procesos de catálisis convencionales, especialmente los que utilizan metales pesados. La biocatálisis ha tenido un rol importante, por ejemplo, en la producción de antibióticos.^{19,20}

Por lo antedicho, es que las metodologías enzimáticas, se presentan como estrategias apropiadas para la funcionalización de los β -cetoésteres. En particular, la transesterificación de β -cetoésteres catalizada por lipasas puede ser utilizada como una herramienta eficaz para la interconversión de dichos sustratos.²³

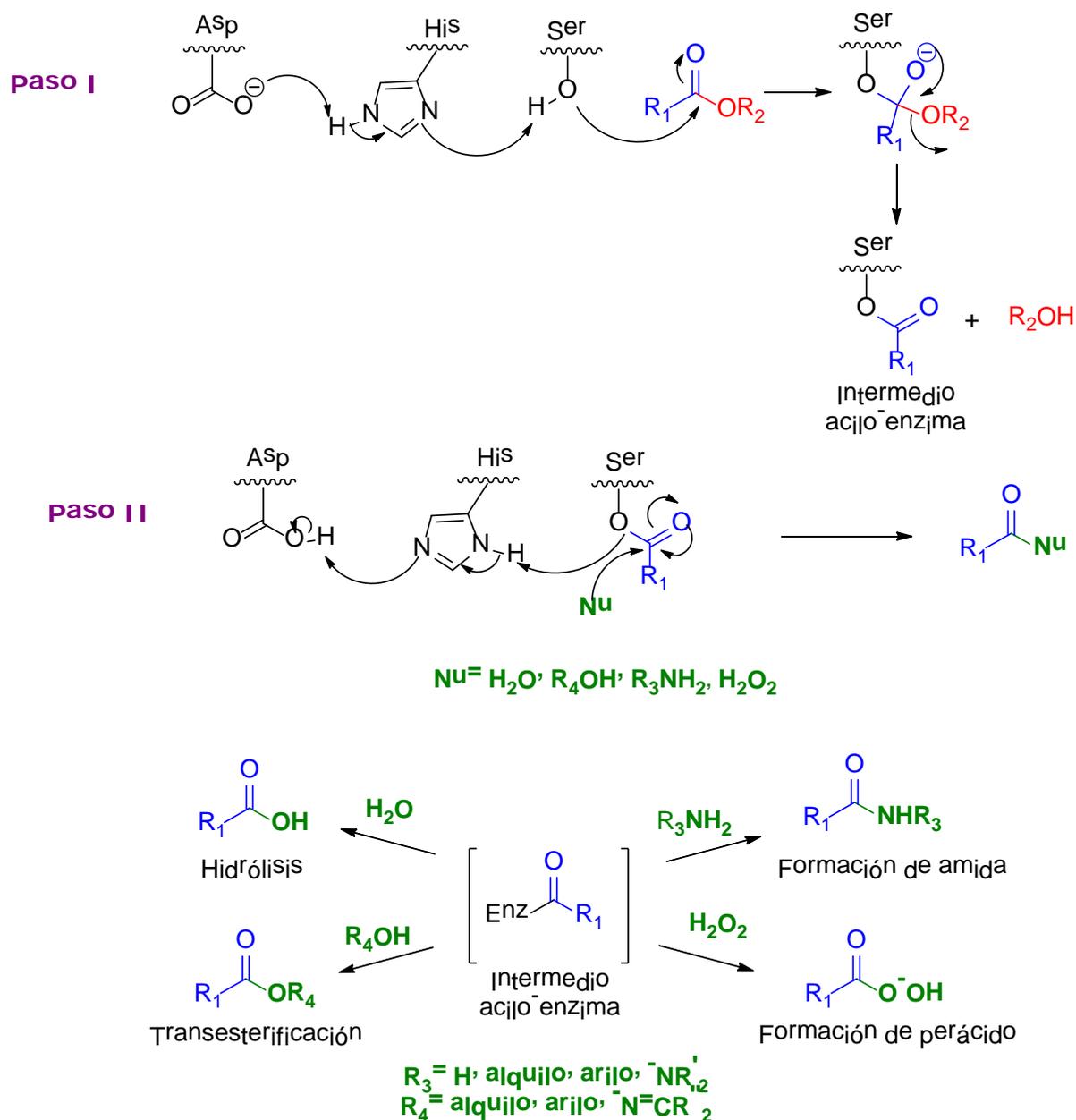
La transesterificación es una reacción de gran importancia en síntesis orgánica, tanto como la esterificación directa entre un ácido y un alcohol, e implica el intercambio de un grupo alcoxilo por otro. Cuando se trata un éster con un alcohol diferente, generalmente en presencia de un catalizador ácido, se pueden intercambiar los grupos alcohol. Ambas reacciones, esterificación y transesterificación, son equilibrios por lo que es necesario desplazarlos hacia la formación de productos (Esquema 4). En el caso de la esterificación, el agua generada interfiere con el completo avance de la

reacción, ya que contribuye a desplazar el equilibrio hacia los reactivos. El agua puede ser separada del medio de reacción utilizando un disolvente orgánico inmiscible con ella. Por su parte, en las transesterificaciones es necesario remover el alcohol producido para desplazar el equilibrio hacia la formación de los productos. La transesterificación es la metodología elegida para sintetizar ésteres, cuando se trabaja con compuestos que pueden descomponerse con agua.²⁴



Esquema 4: Esquema general de reacciones de esterificación y transesterificación.

Las lipasas, son enzimas que catalizan la hidrólisis de triglicéridos en ácidos grasos y glicerol.²⁵ Además de su función natural, catalizan también reacciones de hidrólisis de otros tipos de ésteres, de esterificación y de transesterificación.²³ Las lipasas (clasificadas como: EC 3.1.1.3)²⁶ pertenecen a la familia de las serina-hidrolasas al igual que las proteasas y las esterasas.²⁵ El mecanismo de acción, que ha sido estudiado en detalle, se presenta en el Esquema 5. Los residuos de Ser, Asp y His del sitio activo de la enzima, que participan en el mecanismo de reacción, forman la llamada tríada catalítica. Los residuos de Asp e His son los responsables de la desprotonación del grupo hidroxilo de la Ser, que ataca nucleofílicamente al carbonilo del sustrato (Paso I) El resto acilo del sustrato queda enlazado covalentemente a la enzima, formando el intermedio "acilo-enzima" liberando al grupo saliente (R₂-OH). A continuación, un nucleófilo (Nu), normalmente agua, ataca al intermedio acilo-enzima, regenerando la enzima y liberando el ácido carboxílico R₁-COOH (Paso II).²⁵



Esquema 5: Mecanismo de acción de serina-hidrolasas.²⁵

Cuando la enzima está operando en un entorno de baja actividad de agua (concentración efectiva de agua en el medio de reacción), cualquier otro nucleófilo puede atacar al intermedio acilo-enzima, lo que conduce a varias transformaciones sintéticas útiles, tal como se muestra en el Esquema 5.²⁵

Dado que los sustratos naturales de las lipasas son ésteres de glicerol (quiral), con un ácido aquiral, puede esperarse que las lipasas sean más útiles para hidrolizar ésteres de alcoholes quirales que ésteres de ácidos quirales. Aunque esto se cumple para la mayoría de las lipasas, un pequeño

grupo de lipasas también muestran una alta selectividad reconociendo la quiralidad de un resto ácido.²⁵

Las lipasas muestran, en particular, una alta enantioselectividad hacia alcoholes secundarios, no así con alcoholes primarios o terciarios. La "Regla de Kazlauskas"²⁷ predice qué enantiómero reacciona más rápido en la acilación de alcoholes secundarios racémicos. El modelo, representado en la Figura 2, muestra que el grupo de tamaño más grande (L) tiene prioridad sobre el grupo de tamaño medio (M), por lo que la reacción será más rápida en el caso de que el enantiómero se enlace al sitio activo como se muestra en la Figura 2a. Si esta prioridad coincide con la regla de Cahn, Ingold y Prelog,²⁸ el alcohol (*R*) reaccionará para producir el éster correspondiente. La misma estereopreferencia se observa para la hidrólisis de ésteres, en este caso se obtiene el alcohol (*R*) como producto.

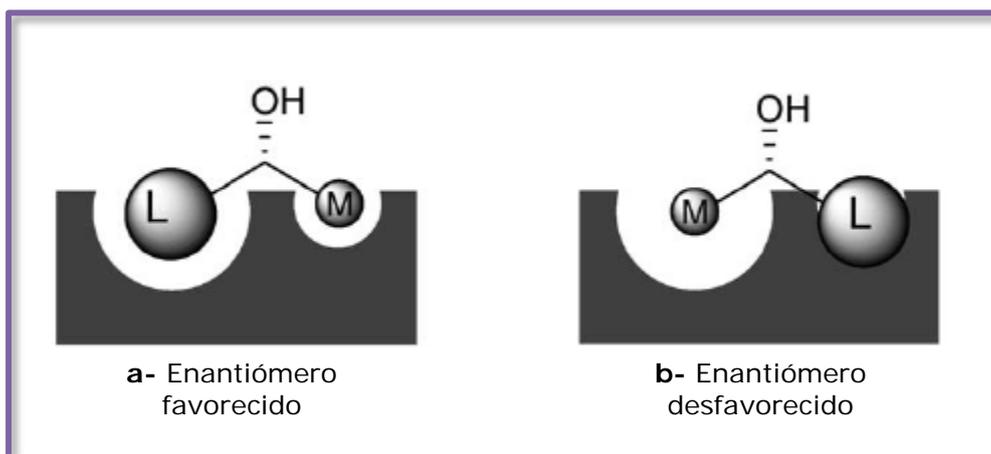


Figura 2: Modelo del sitio activo de la lipasa, que explica la regla de Kazlauskas. Extraído de Gotor-Fernández y col.²³

Hay muchos ejemplos para preparar alcoholes secundarios enantioméricamente puros, motivos estructurales que se encuentran frecuentemente en compuestos quirales intermedios en la síntesis de productos farmacéuticos. Su resolución puede llevarse a cabo por acilación de alcoholes racémicos o hidrólisis de ésteres utilizando lipasas en disolventes orgánicos. La hidrólisis enzimática y las reacciones de transesterificación pueden ser procesos complementarios para la resolución de alcoholes secundarios.²³

Una gran variedad de lipasas son producidas por bacterias, hongos y levaduras, y son excretadas como enzimas extracelulares, lo que facilita su producción a gran escala. La mayoría de estas enzimas son creadas por los organismos en dos isoformas (isoenzimas), generalmente indicadas como A y B. Ambas están estrechamente relacionadas estructuralmente y suelen mostrar la misma enantiopreferencia, pero como existen diferencias estructurales leves, éstas dan lugar a ciertas diferencias en la enantioselectividad. Las preparaciones comerciales de calidad técnica de lipasas normalmente contienen ambas isoformas; la única excepción notable es la lipasa de *Candida antarctica*, que se dispone comercialmente de ambas isoformas puras A y B por separado.²⁵

Las lipasas de *Candida antarctica* son, en la actualidad, las más versátiles para biotransformaciones preparativas. Son obtenidas a partir de la levadura *Candida antarctica*. Como lo indica su nombre, esta levadura se aisló en la Antártida con el objetivo de encontrar enzimas con propiedades extremas, para ser utilizados en formulaciones de detergentes.²⁵ La levadura produce dos isoenzimas A y B, que son muy diferentes entre sí. Mientras que la lipasa A (CAL A) es dependiente de calcio y estable térmicamente, la lipasa B (CAL B) es menos termoestable e independiente de calcio. La especificidad por el sustrato de ambas lipasas también varía, lo que tiene importancia relevante en aplicaciones biocatalíticas preparativas. La lipasa CAL A es altamente activa, de forma no específica, sobre los triglicéridos y no es muy útil sobre los ésteres simples no naturales. En cambio CAL B es activa sobre una amplia gama de ésteres no naturales.²⁵

Algunas enzimas presentan un comportamiento llamado "promiscuidad biocatalítica", que significa que una transformación química procede por un mecanismo de acción distinto al nativo.²⁹ Usualmente, el término también se usa para hacer referencia a la aceptación por parte de la enzima, de sustratos con estructuras muy diferentes de la de los nativos. El comportamiento promiscuo es a menudo una característica favorable en un biocatalizador. Como ejemplo, las lipasas son bien conocidas como enzimas altamente selectivas, pero también promiscuas. La lipasa B de *Candida antarctica* (CAL B), es un atractivo biocatalizador debido a su promiscuidad

ya que acepta de una amplia gama de sustratos no naturales y puede ser utilizada condiciones de reacción distintas a las naturales.²⁹

La irradiación por microondas se ha utilizado como un enfoque “verde” en síntesis orgánica clásica.^{30,31} Una amplia variedad de reacciones fueron descritas en agua, disolventes orgánicos o libres de disolventes, en las que la irradiación por microondas llevó a conversiones más altas y tiempos de reacción más cortos, en comparación con métodos de síntesis convencionales.³²⁻³⁵

El efecto de la irradiación por microondas en la síntesis orgánica se atribuye a una combinación de efectos térmicos (velocidad de calentamiento, sobrecalentamiento y puntos calientes) y a la absorción selectiva de la radiación por sustratos polares.³⁶ Los efectos no térmicos han sido profundamente discutidos y racionalizados de acuerdo al medio de reacción y consideraciones mecanísticas. Algunos autores han sugerido que estos efectos no térmicos son el resultado de la interacción directa del campo eléctrico inducido con moléculas específicas del medio de reacción.^{32,34}

El uso de microondas en combinación con la catálisis con lipasas, da lugar a mejoras en la conversión, en la velocidad de reacción y en la estereoselectividad.³⁷⁻⁴¹ Por otra parte, Rejasse y col. demostraron que la estabilidad de la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (CAL B, Novozym 435) en medios orgánicos mejora con irradiación por microondas, frente al calentamiento convencional, lo que explica el aumento observado en la conversión.^{42,43}

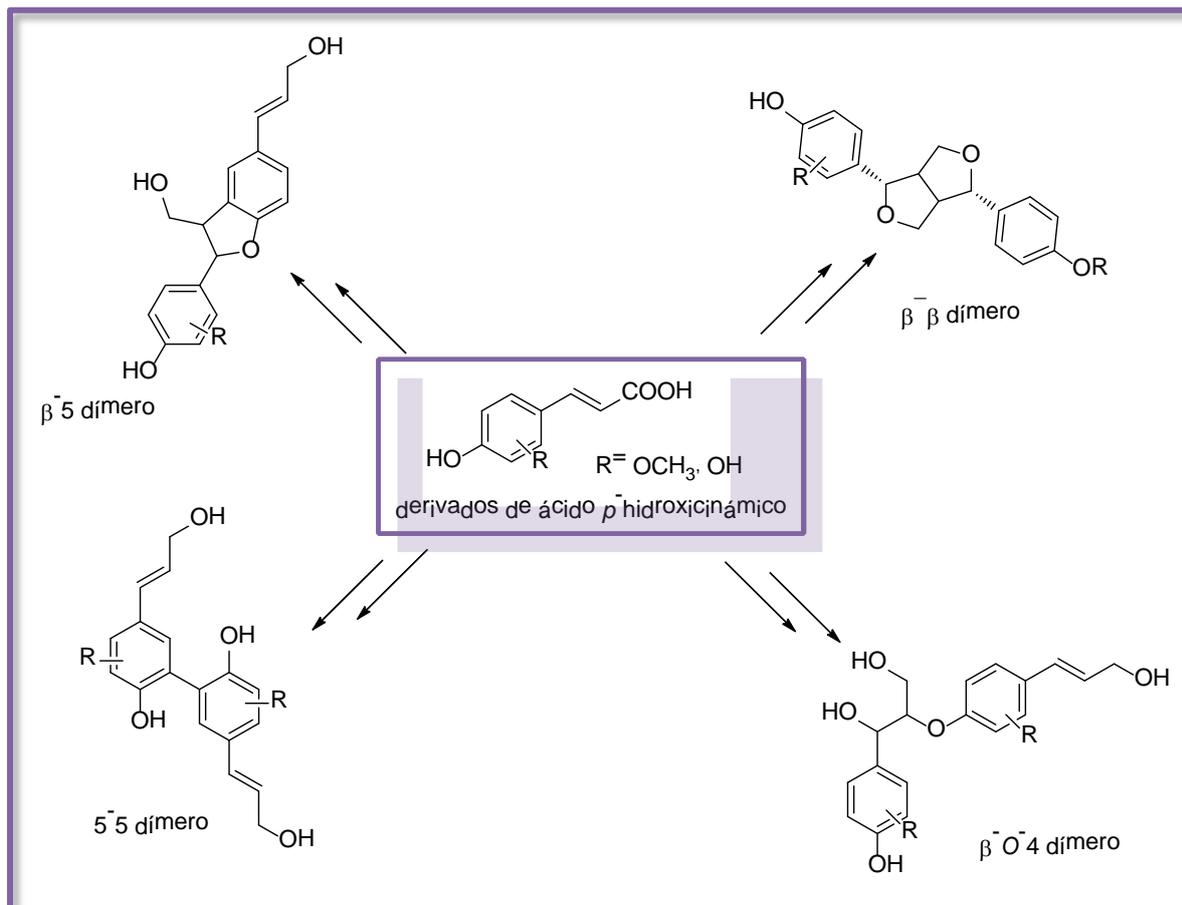
Yadav y col. destacaron que existe una sinergia entre la actividad de la lipasa y la irradiación por microondas en transesterificaciones catalizadas por CAL B.^{39,40,44} Han descrito que con esta metodología se obtienen conversiones de moderadas a buenas en tiempos cortos de reacción, si se comparan con los resultados obtenidos en reacciones calentadas por métodos convencionales. Sin embargo, estas reacciones se realizaron utilizando tolueno como disolvente y en concentraciones de sustrato bajas,

lo que puede traer como consecuencia problemas medioambientales y económicos.

La combinación de irradiación por microondas y procesos libres de disolventes ha sido investigada ampliamente en los últimos años.⁴⁵⁻⁵¹ Sin embargo, metodologías que involucren biocatálisis, ausencia de disolventes e irradiación por microondas, han sido poco descritas.^{43,52} El único trabajo descrito hasta el momento, que combina la transesterificación de β -cetoésteres catalizada por lipasas en ausencia de disolvente e irradiación por microondas, es el surgido a partir de este trabajo de tesis.⁵³

2.2. Síntesis organocatalizada de derivados de ácido cinámico.

Los ácidos carboxílicos α,β -insaturados son también compuestos versátiles que permiten el acceso a una variedad de intermedios sintéticos, como los fenilglicidatos y alcoholes cinámicos. Dichos ácidos forman parte de productos naturales, como la lignina y estructuras relacionadas.⁵⁴ En el Esquema 6 se muestran los modelos de lignina que pueden ser sintetizados a partir de derivados de ácido *p*-hidroxicinámico.



Esquema 6: Ácidos carboxílicos α,β -insaturados precursores de modelos de lignina.

La lignina forma parte constitutiva de los vegetales, junto con la celulosa y la hemicelulosa, y es en sí misma un compuesto de escaso valor intrínseco. Por otra parte, la industria de producción de pasta de celulosa y papel ha crecido ininterrumpidamente desde hace casi 40 años. Se predice que para el año 2015 se estarán produciendo más de 500 millones de toneladas de celulosa de las cuales es de esperar que muchas provengan de nuestras latitudes. Esos millones de toneladas de celulosa conllevan también unos 150 millones de toneladas de lignina que no pueden simplemente ser eliminados al medio.⁵⁵

Las compañías dedicadas a la producción de celulosa encontraron que podían combinar el deshacerse de la lignina con su aprovechamiento para generar energía, y es así que hoy en día aproximadamente un 65-70% de la energía necesaria en una planta de producción de pasta de celulosa se obtiene del quemado de la lignina y un 30-35% del uso de combustibles

fósiles. De hecho, las fábricas modernas como UPM en nuestro país, generan un excedente de energía que constituye un aporte al sistema energético nacional. Sin embargo, es un desafío inigualable y un enorme incentivo económico encontrar mejores usos para la lignina.

La madera es un material muy versátil que tiene una amplia variedad de aplicaciones mediante la explotación de sus componentes estructurales. Típicamente, contiene un 40-50% de celulosa, 25-30% de hemicelulosa, 20-30% de lignina y 2-5% de extractivos (resinas, aceites, fitoquímicos, fitoesteroides, etc.).⁵⁶ Cada uno de estos componentes tiene el potencial de ser explotado comercialmente. Hoy en día, dejando de lado su empleo como material de construcción, la madera tiene dos usos fundamentales. Por un lado, se emplea para proveer energía y por otro, en la industria de producción de papel, a través de los procesos de pulpa y tratamiento químico que producen la celulosa, materia prima del mismo. Aún en este último caso se calcula que sólo un 25% del árbol se emplea para obtener celulosa, siendo el resto dedicado a la quema.⁵⁷ Debido a que el valor de la madera ha seguido una curva decreciente en los últimos 25 a 30 años, y al encarecimiento progresivo y eventual desaparición de la química basada en combustibles fósiles, se está intentando cada vez más agregar valor a estos materiales que hoy en día, simplemente terminan en una caldera. Se prevé que la tecnología relacionada con la biomasa lignocelulósica permita en el futuro, el desarrollo de la *biorrefinería forestal integrada*, que consiste en la producción de un abanico de productos químicos, conjuntamente con los biocombustibles necesarios para aliviar la dependencia de los combustibles derivados del petróleo, para reducir la emisión de gases y el efecto invernadero, y mitigar otros problemas ambientales.⁵⁸ Estas fábricas podrían producir etanol, polímeros y diesel a partir de hemicelulosa y lignina.⁵⁹⁻⁶²

La lignina es un heteropolímero natural con una estructura tridimensional compleja y aparentemente al azar,⁶³ que todavía no ha sido resuelta entre otras razones porque al ser insoluble en la mayoría de los disolventes (excepto algunos líquidos iónicos) no puede extraérsela sin modificarla. Actualmente se sabe que la lignina es un material polimérico compuesto de

unidades fenilpropanoide derivadas de tres alcoholes cinamílicos (monolignoles): alcohol *p*-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico (Figura 3).^{54,64,65}

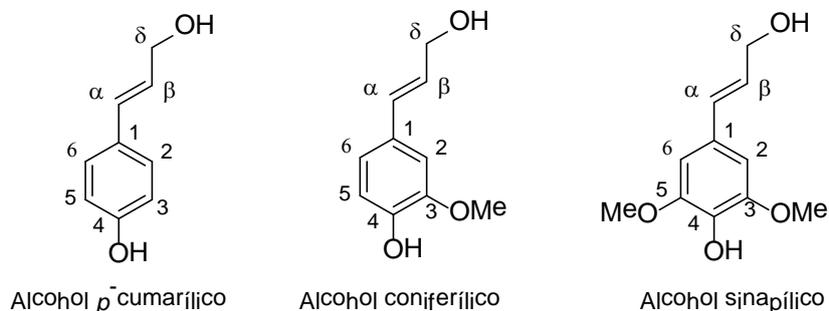


Figura 3: Monómeros predominantes en la lignina (monolignoles).

Dos tipos de enzimas, las peroxidasa y las lacasa, generan radicales fenoxilo a partir de los monolignoles. Dichos radicales reaccionan químicamente produciendo intermedios reactivos, los metiluros quinónicos. El ataque nucleofílico por agua, alcoholes o grupos hidroxilo fenólicos al metiluro quinónico, genera un dilignol. Los dilignoles generados sufren acoplamiento posteriores conduciendo al polímero resultante.⁶⁶⁻⁶⁹ Las estructuras posibles son muchas, pero la lignina se caracteriza por poseer algunos enlaces típicos entre las unidades. Las principales uniones son las conocidas como β -*O*-4 (β -ariléter), β -5 o α -*O*-4 (fenilcumarano), 5-5 (bifenilo), 4-*O*-5 (bifeniléter), β - β (resinol) y β -1 (β -arilo),⁷⁰ (Figura 4).

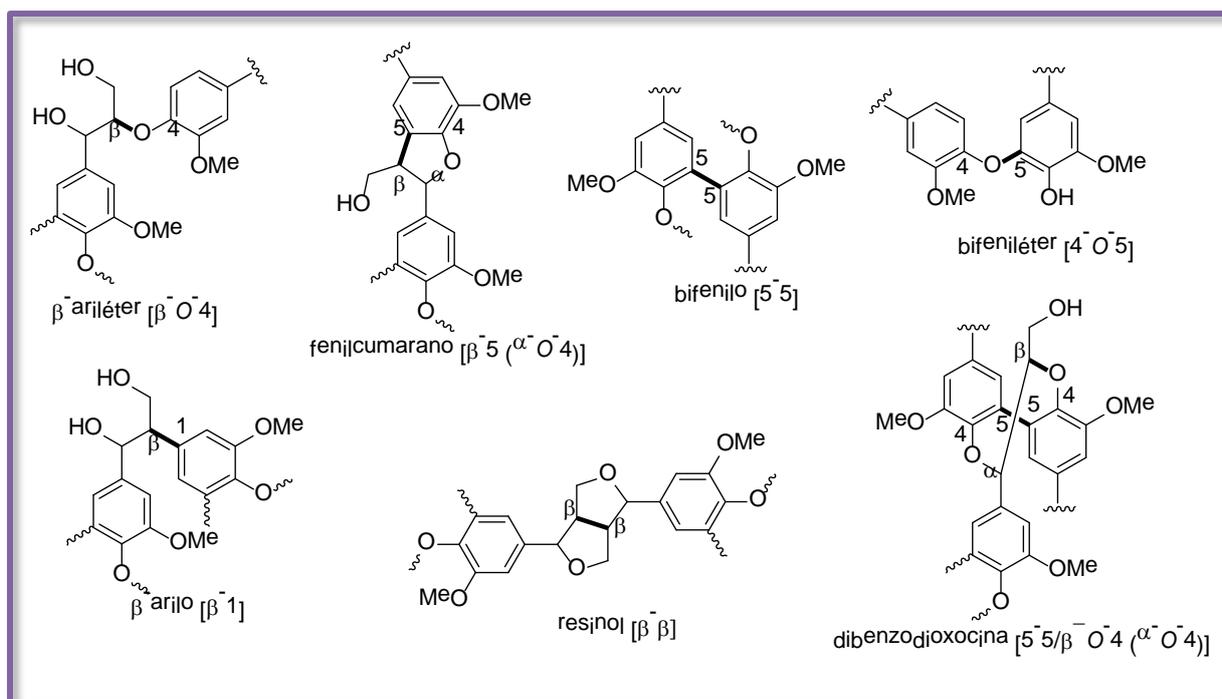


Figura 4: Principales unidades estructurales en la lignina. Los enlaces resaltados son aquellos que se forman en las reacciones de acoplamiento radicalario.

La lignina en sí misma es un problema en la industria de producción de pasta de celulosa, ya que al estar mezclada con ella es necesario someter a la madera a procesos químico-físicos que la eliminan, dejando la celulosa que es el producto de interés. El 80% de la celulosa producida a nivel mundial, actualmente se obtiene mediante el método Kraft.⁷¹

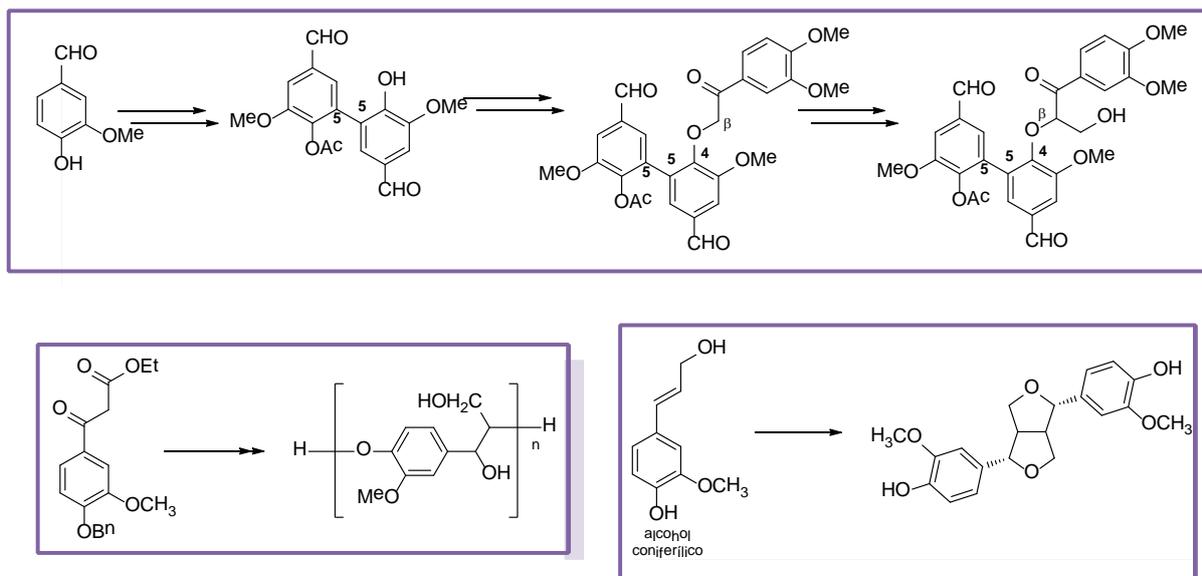
En un proceso Kraft, una disolución acuosa de NaOH y Na₂S conocida como licor blanco, reacciona con los chips de madera en un digestor a altas temperaturas y presiones. Durante el tratamiento, los aniones hidróxido e hidrosulfuro reaccionan con la lignina, causando la fragmentación del polímero en fracciones solubles en agua alcalina. El objetivo del proceso de pulpado es remover la lignina y separarla de la celulosa. La fragmentación de la macromolécula procede a través de la ruptura de los enlaces intermonoméricos, con la concomitante generación de grupos hidroxilo. La presencia de estos grupos incrementa la hidrofilia de la lignina y de los fragmentos de lignina. Como resultado, la solubilidad de los mismos en el licor de cocción se incrementa. Los productos del proceso Kraft son por un lado la pulpa de celulosa y por otro el llamado licor negro (LN) diluido que contiene las sustancias inorgánicas y la mayor parte de la lignina que

contenía la madera. El LN es concentrado, enviado a una caldera de recuperación de los productos inorgánicos (que se usan nuevamente como licor blanco), mientras que la lignina es quemada.^{71,72}

Para extraer el mayor valor posible de la biomasa es necesario el desarrollo de métodos eficientes para la separación y modificación de la misma. Todo proceso que permita generar métodos más eficientes para procesar la lignina sin destruirla más que en forma controlada, y extraer de ella materiales que tengan utilidad industrial o comercial, tendrá eventualmente un valor económico considerable. Por ejemplo, la vainillina, que puede aislarse a partir de licor negro por degradación de la lignina, tiene un valor de mercado de 10 U\$S por kilogramo, mientras que la lignina cuesta 5 centavos de dólar por kilogramo. El hecho de que esta sea una corriente que recién comienza a desarrollarse nos permite realizar investigaciones fundamentales sobre aspectos centrales en la elaboración de biomateriales a partir del LN de las fábricas de pulpa de celulosa. Eventualmente estas investigaciones pueden llevar a desarrollos patentables y aprovechables en el entorno productivo al cual se intenta conducir a nuestro país.

El LN contiene la mayor parte de la lignina y es quemado en la caldera de la planta para obtener la energía necesaria para su funcionamiento. La fábrica de pulpa de celulosa puede incrementar su producción en tanto no exceda la capacidad de la caldera de recuperación.⁷³ De esta forma, parte de la lignina podría sustraerse del ciclo sin comprometer la sustentabilidad del proceso y derivarse hacia la producción de otras sustancias químicas agregándole de este modo valor.⁷⁴

El grupo de investigación en el que se enmarca esta tesis, trabaja en la síntesis de modelos de lignina, en particular monolignoles, dímeros, trímeros y polímeros en general (Esquema 7).



Esquema 7: Síntesis de modelos de lignina. Polimerización de unidades base.

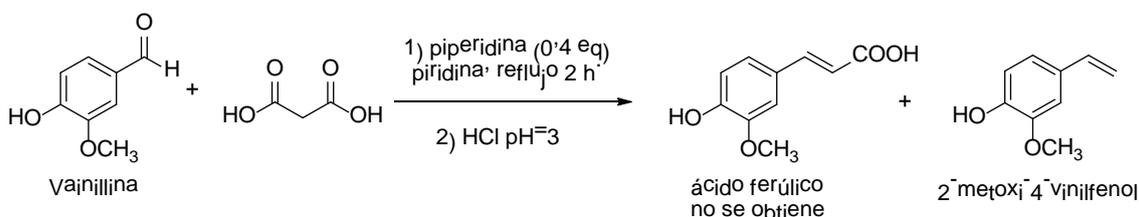
En la preparación de los alcoholes cumarílico, coniferílico y sinapílico, se obtienen los correspondientes derivados de ácido cinámico como intermedios sintéticos. Estos, son a su vez intermedios en la síntesis de fenilglucidos, que pueden obtenerse por epoxidación de las correspondientes olefinas.

La condensación de Knoevenagel de aldehídos y ácido malónico es generalmente promovida por bases, tales como piridina y piperidina. En estas condiciones organocatalíticas, se produce el ácido carboxílico α,β -insaturado correspondiente, derivado de ácido cinámico.⁷⁵

El término organocatalizador fue introducido en el 2000 por MacMillan.⁷⁶ Hasta ese momento, la catálisis enantioselectiva era una de áreas más importantes de investigación en síntesis orgánica, lográndose avances notables en el desarrollo de catalizadores organometálicos para síntesis asimétrica. Sin embargo, habían sido reportadas pocas transformaciones asimétricas en las que se emplearan moléculas orgánicas como catalizadores, a pesar de la amplia disponibilidad de productos químicos orgánicos enantiopuros y el potencial beneficio académico, industrial y económico que supone.⁷⁶ Los primeros antecedentes de la utilización de moléculas orgánicas pequeñas, y en particular α -aminoácidos para la

preparación enantioselectiva de sintones quirales data de la década de 1970, con los trabajos de Eder y de Hajos.^{77,78} Sin embargo, no es sino hasta principios de la década de 2000, con los trabajos de List y col. en reacciones aldólicas catalizadas por prolina,⁷⁹⁻⁸² que la metodología redescubre todo su potencial, y comienzan a estudiarse en profundidad sus posibilidades sintéticas. Desde entonces, la organocatálisis representa una de las áreas más atractivas de investigación en química orgánica. Esta popularidad se debe a la mayor estabilidad, menor costo e impacto ambiental que tienen los organocatalizadores respecto a los compuestos organometálicos.⁸³⁻⁸⁹

Es en este contexto, que en nuestro grupo de trabajo se llevó a cabo la condensación de Knoevenagel organocatalizada, de diferentes aldehídos aromáticos con ácido malónico.^{90,91} En la mayoría de los casos, el producto principal de la reacción es el ácido carboxílico α,β -insaturado correspondiente. Sin embargo cuando la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) fue empleada como electrófilo, se observó la formación de 2-metoxi-4-vinilfenol en lugar de ácido ferúlico ((*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxi)-2-propenoico) (Esquema 8).⁹²



Esquema 8: Conversión organocatalítica de vainillina en 2-metoxi-4-vinilfenol.⁹²

Esta transformación fue reportada en 2005 y desde entonces, se han descrito algunos resultados similares de esta reacción.^{93,94}

Los 4-vinilfenoles son productos naturales ampliamente distribuidos en las plantas.⁹⁵⁻⁹⁸ Además, dichos productos se emplean como reactivos para la preparación de polímeros y compuestos bioactivos.^{99,100}

Recientemente fue descrito un estudio computacional detallado del mecanismo de la reacción de Knoevenagel-Doebner.¹⁰¹ Los ácidos hidroxicinámicos se encuentran frecuentemente en las plantas y se ha propuesto que la descarboxilación enzimática puede ser la responsable de la producción de vinilfenol.¹⁰² En consecuencia, el diseño de estrategias para la síntesis de este tipo de compuestos y su ocurrencia en la naturaleza, son de creciente importancia. En particular, el planteo de la descarboxilación en condiciones organocatalíticas fue planteado por nuestro grupo a partir de este y otros trabajos de tesis.⁹²

2.3. Síntesis de fenilglicidatos y precursores.

Como se mencionó anteriormente, los derivados de ácido cinámico son intermedios en la síntesis de fenilglicidatos, que pueden obtenerse por epoxidación de las correspondientes olefinas. Los epóxidos son una clase muy importante de grupos funcionales, con gran potencial de aplicación en síntesis orgánica. Muchos productos naturales, como triptolida, epotilonas, y criptoficina A (Figura 5)¹⁰³ poseen unidades oxirano en su estructura, que son esenciales para su actividad biológica. Por otra parte, se cree que los epóxidos son intermedios clave en la biosíntesis de muchos productos naturales, tales como brevetoxina-B (Figura 5), monensina, y glabrescol. Por lo tanto, el desarrollo de métodos de epoxidación eficientes sigue siendo un reto sintético.¹⁰³

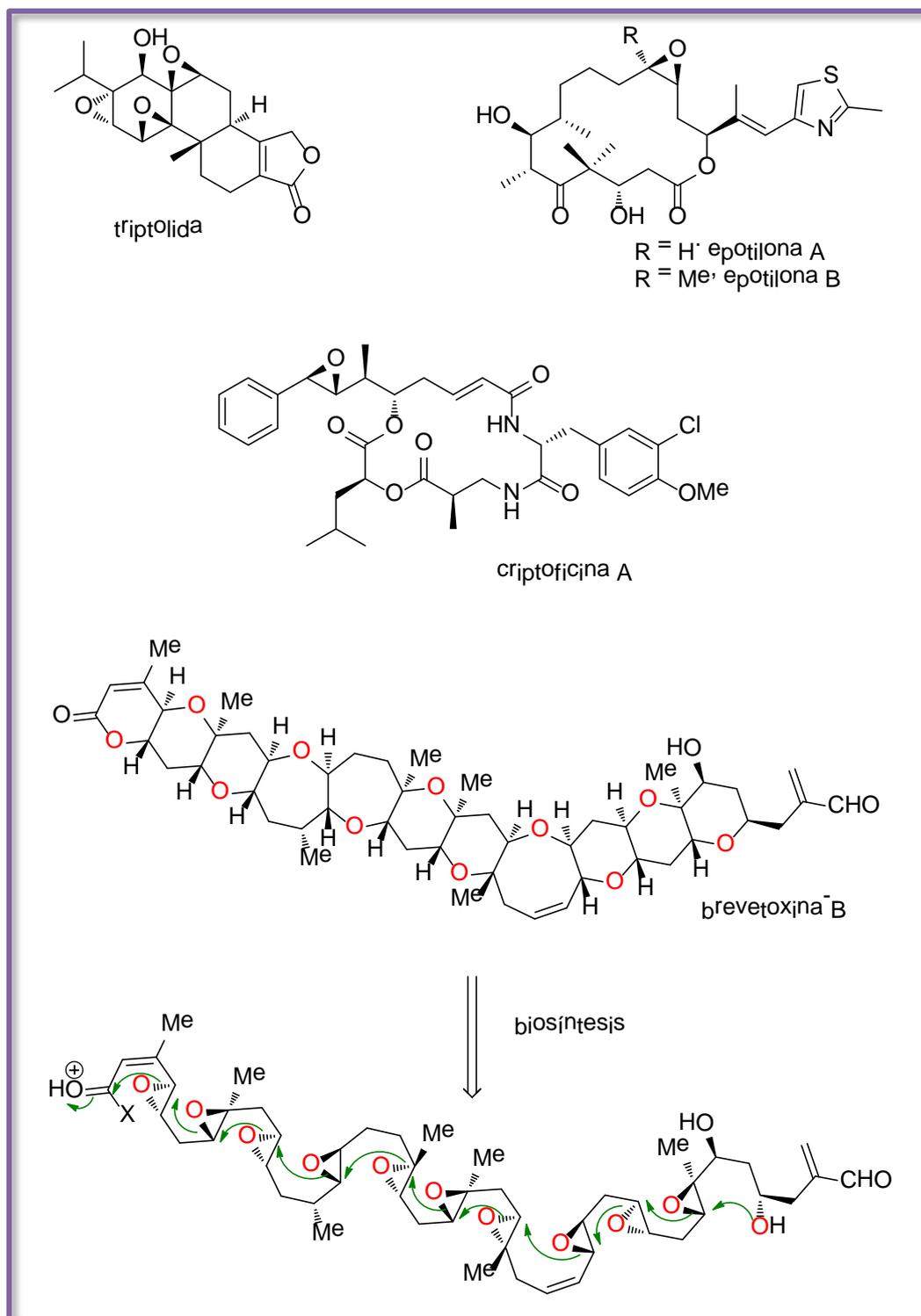
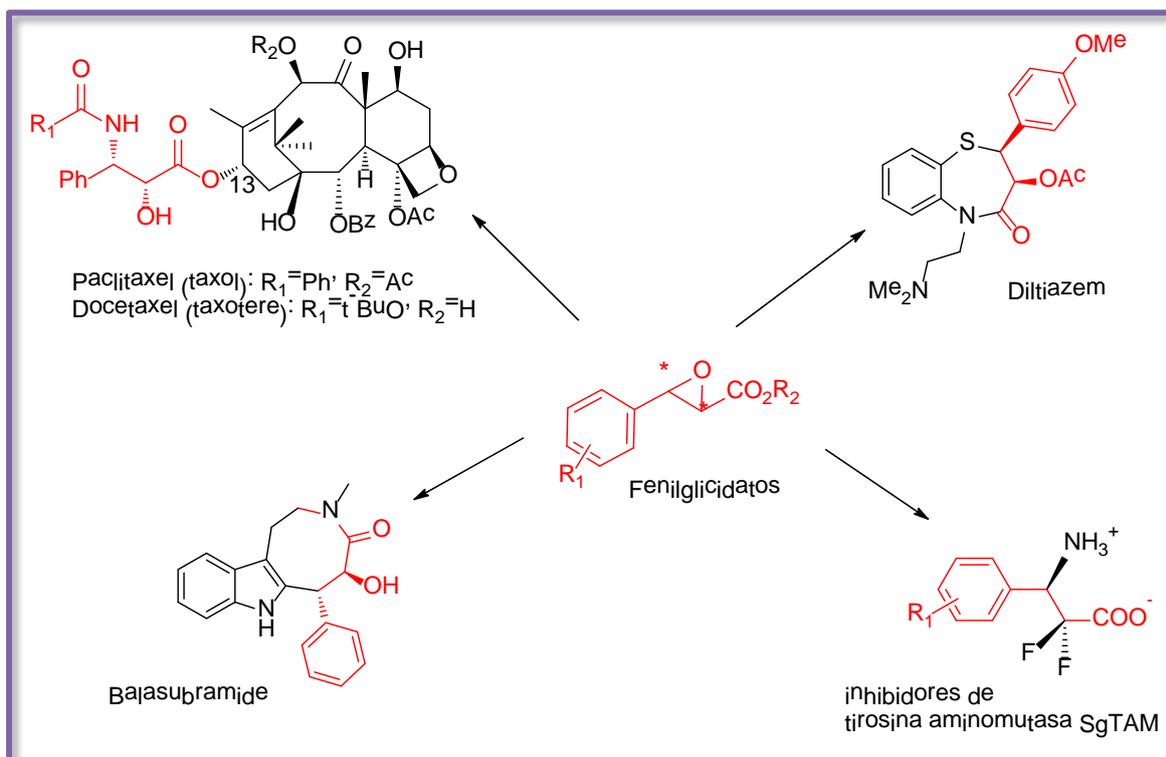


Figura 5: Ejemplo de productos naturales que contienen grupos oxirano y biosíntesis a partir de epóxidos. Extraído de Yang.¹⁰³

Los fenilglicidatos y derivados, así como estructuras relacionadas, son sintones altamente versátiles para la preparación de una gran variedad de intermedios farmacéuticos, como por ejemplo la cadena lateral de taxoides,^{104,105} (S)-ibuprofeno,¹⁰⁶ compuestos con actividad

antiparasitaria,¹⁰⁷ benzotiazepinas,¹⁰⁸ inhibidores de tirosina aminomutasa SgTAM,¹⁰⁹ o de compuestos naturales, como balasubramide¹¹⁰ (Esquema 9).



Esquema 9: Potencial sintético de los fenilglicidatos como precursores de productos farmacéuticos.

En los derivados de ácido cinámico, precursores de fenilglicidatos, el doble enlace a funcionalizar es poco reactivo, por estar conjugado con dos grupos que ejercen sobre él un efecto atrayente de electrones (grupos fenilo y carboxilo). El estudio de su reactividad, permitiría diseñar una estrategia sintética eficiente para la preparación de estos bloques de construcción.

En la literatura están descritos una gran variedad de métodos tanto químicos como enzimáticos para la epoxidación de olefinas. El encontrar un método de epoxidación que opere bajo condiciones suaves de reacción, y que sea responsable desde el punto de vista ambiental, ha sido y es un desafío importante para la química orgánica.

La epoxidación química de olefinas puede llevarse a cabo con perácidos orgánicos o una combinación de catalizadores basados en metales de transición y un co-oxidante (como H_2O_2 o $t\text{-BuOOH}$). En particular, todas las

epoxidaciones de derivados del ácido cinámico y estructuras relacionadas descritas en la literatura, son epoxidaciones químicas que utilizan complejos de metales pesados como catalizadores y condiciones drásticas, debido a la baja reactividad de los sustratos.¹¹¹⁻¹¹⁵

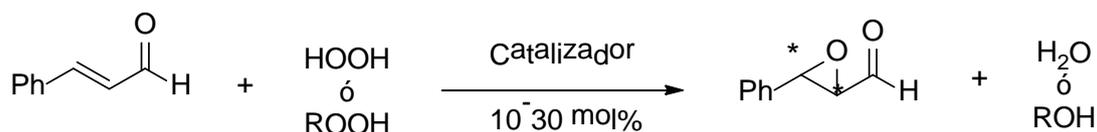
Los caminos enzimáticos usualmente permiten utilizar condiciones de reacción más suaves que los métodos químicos, además de ser alternativas menos contaminantes del medio ambiente.

La explotación de la promiscuidad biocatalítica de algunas lipasas para la oxidación de olefinas a sus correspondientes epóxidos, fue descrita por primera vez en la década de 1990 por Björkling y col.¹¹⁶⁻¹¹⁸ Algunas lipasas inmovilizadas, en particular la Lipasa B de *C. antarctica* inmovilizada sobre resina de poliacrilato, son capaces de catalizar la conversión de ácidos carboxílicos en ácidos percarboxílicos utilizando H₂O₂ como agente oxidante. La reacción se lleva a cabo en ausencia de ácidos minerales fuertes, normalmente imprescindibles como catalizadores en este tipo de conversiones. Los ácidos percarboxílicos posteriormente son los responsables de la oxidación *in situ* de la olefina para la obtención del correspondiente epóxido. Paralelamente la metodología fue utilizada en la síntesis de productos naturales,¹¹⁹ y optimizada realizando la formación del perácido en un reactor de membrana.¹²⁰ A partir de estos primeros trabajos, el uso de lipasas como biocatalizadores en reacciones de epoxidación de olefinas ha tenido un desarrollo creciente.¹²¹⁻¹³⁰ Del mismo modo que la irradiación por microondas producía un efecto sinérgico con la catálisis con lipasas para las reacciones de transesterificación, podría utilizarse para las reacciones de epoxidación biocatalizadas. La introducción de la irradiación por microondas como fuente de energía, permite aumentar la velocidad de reacción, así como mejorar la estabilidad de la enzima.¹³⁰

La epoxidación con peroxidasas de microorganismos y plantas está descrita como otra alternativa a la epoxidación química.¹³¹⁻¹³⁴ En particular, cloroperoxidasa (CPO) de *Caldariomyces fumago* y la peroxidasa de raíces de *Armoracia rusticana* (HRPO) han sido utilizadas para catalizar la peroxidación de alquenos a epóxidos.¹³⁵⁻¹³⁷

La apertura de epóxidos, con gran variedad de nucleófilos, es una metodología altamente valiosa para la introducción regio- y estereoselectiva de un gran número de grupos funcionales, ampliando así la versatilidad de estos bloques de construcción. El uso de enzimas para la apertura de epóxidos no está generalizado, encontrándose en la literatura sólo unos pocos ejemplos, y no son recientes.¹⁰⁶

Por otro lado, la síntesis de precursores de fenilglicidatos puede llevarse a cabo en presencia de organocatalizadores. La epoxidación asimétrica organocatalítica de aldehídos α,β -insaturados, utilizando distintos peróxidos como agentes oxidantes, se presenta como una alternativa atractiva para la producción de precursores de fenilglicidatos (Esquema 10).¹³⁸



Esquema 10: Epoxidación organocatalítica de aldehídos α,β -insaturados.

La epoxidación asimétrica catalítica ocupa un lugar destacado en el campo de la catálisis asimétrica debido a la importancia que presentan los epóxidos en la química orgánica. La epoxidación de alcoholes alílicos utilizando cantidades catalíticas de complejos de titanio y ésteres de tartrato enantiopuros, se conoce como la epoxidación asimétrica de Sharpless y representa una reacción de gran importancia.^{139,140} A partir de este trabajo, se han desarrollado otras metodologías de epoxidación estereoselectiva. A modo de ejemplo, Jacobsen y Katsuki han desarrollado, de manera independiente, complejos quirales de manganeso que son excelentes catalizadores para la epoxidación asimétrica de olefinas no funcionalizadas.^{141,142}

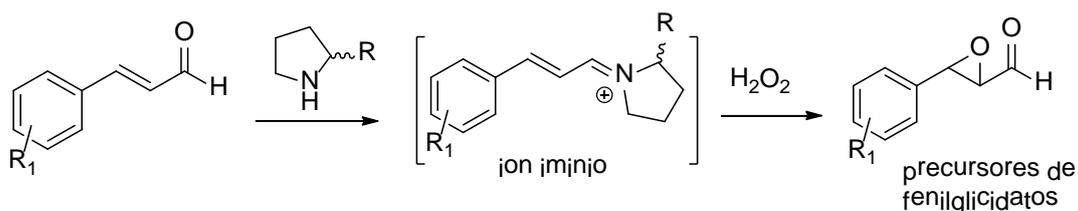
La epoxidación asimétrica de compuestos carbonílicos α,β -insaturados es otra funcionalización importante en química orgánica,¹⁴³ debido a la utilidad de los correspondientes compuestos α,β -epoxicarbonilos. Shibasaki y col., diseñaron varios complejos quirales de ácidos de Lewis, para la epoxidación

catalítica asimétrica de cetonas,¹⁴⁴ ésteres y amidas¹¹³ α,β -insaturados, usando *tert*-butilhidroperóxido como oxidante.

La epoxidación asimétrica de cetonas α,β -insaturadas, se ha conseguido por catálisis quiral de transferencia de fase usando hipoclorito de sodio como oxidante, obteniéndose los epóxidos con alta enantioselectividad.¹⁴⁵

Recientemente se han incorporado aminas quirales como organocatalizadores eficaces para una gran variedad de transformaciones asimétricas^{84,146} de aldehídos¹⁴⁷⁻¹⁴⁹ y cetonas¹⁵⁰⁻¹⁵² α,β -insaturados.

MacMillan y col. han demostrado que las aminas quirales usadas como catalizadores pueden activar aldehídos y cetonas α,β -insaturados mediante la formación de iones iminio (Esquema 11).^{76,82,147-152}



Esquema 11: Formación del ion iminio entre el aldehído α,β -insaturado y la amina

Las primeras epoxidaciones asimétricas organocatalíticas de aldehídos α,β -insaturados, fueron descritas en 2005 por Jørgensen y col., en condiciones de reacción simples y ambientalmente benignas, utilizando peróxidos, tales como H_2O_2 , *t*-BuOOH o UHP, como agentes oxidantes.¹³⁸ En dicho trabajo desarrollaron un protocolo eficiente para la epoxidación asimétrica de aldehídos α,β -insaturados, utilizando un derivado quiral de pirrolidina estéricamente impedido: (*S*)-2-[bis(3,5-bis(trifluorometil)fenil)(trimetilsililoxi)metil]pirrolidina (Figura 6) como organocatalizador.

Al mismo tiempo, Córdova y col. presentaron trabajos en los que se describe la epoxidación asimétrica organocatalizada de aldehídos α,β -insaturados con una amplia variedad de aminas quirales, obteniendo desde pobres a muy buenas diastereo- y enantioselectividades.^{153,154}

Tanto Jørgensen como Córdova, informaron que el catalizador derivado de pirrolidina: (S)-2-[bis(3,5-bis(trifluorometil)fenil)(trimetilsililoxi)metil]pirrolidina (Figura 6), era excelente para la epoxidación asimétrica, obteniéndose altas diastereo- y enantioselectividad, tanto en disolventes orgánicos como en medios acuosos, con variados agentes oxidantes.^{138,153,154}

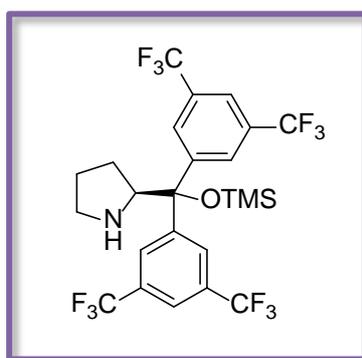
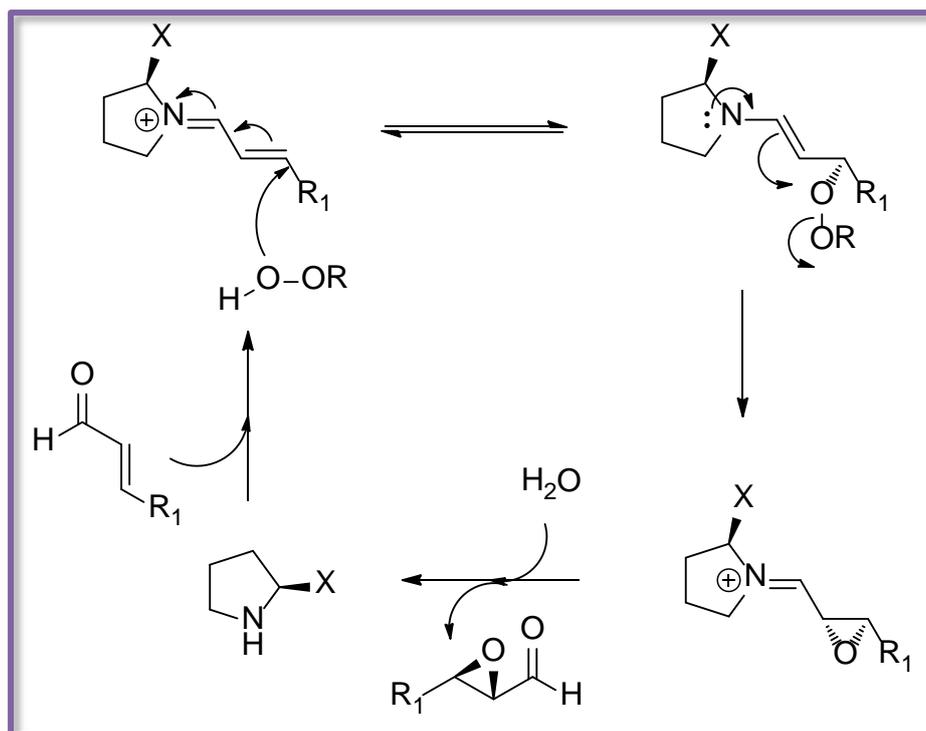


Figura 6: Organocatalizador derivado de pirrolidina, (S)-2-[bis(3,5-bis(trifluorometil)fenil)(trimetilsililoxi)metil]pirrolidina (**A**).

Ambos autores proponen un mecanismo que se inicia con la activación del aldehído α,β -insaturado por la formación de un ion iminio con la amina quiral, seguido de un ataque nucleofílico para formar el intermedio enamina (Esquema 12). La enamina ataca nucleofílicamente al peróxido, que luego se hidroliza para dar el epoxialdehído correspondiente.

Tanto la diastereo- como la enantioselectividad observada en la epoxidación van a depender de la configuración de la amina y del tamaño de los grupos presentes en la misma.^{138,153,154}



Esquema 12: Mecanismo propuesto para la epoxidación de aldehídos α,β -insaturados. Extraído de Zhao y col.¹⁵⁴

Finalmente, es interesante destacar que tal como indican los antecedentes recopilados en este capítulo, los aspectos a abordar son múltiples. Se debe transitar un camino desde lo tridimensional (aspectos conformacionales y estereoquímicos) a lo reactivo. El desafío se vuelve interesante si se considera la complejidad de los catalizadores empleados (orgánicos y biológicos) y el potencial de los procesos y productos desarrollados.

2.4. Referencias bibliográficas.

- (1) Mori, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7505.
- (2) Fields, P.; White, D. *Annu. Rev. Entomol.* **2002**, *47*, 331.
- (3) Zarbin, P. H. G.; Villar, J. A. F. P.; Corrêa, A. G. *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 1100.
- (4) Nandagopal, V.; Prakash, A.; Rao, J. *J. Biopest.* **2008**, *1*, 210.
- (5) Faustini, D. L.; Giese, W. L.; Phillips, J. K.; Burkholder, W. E. *J. Chem. Ecol.* **1982**, *8*, 679.
- (6) Phillips, J. K.; Miller, P. F.; Andersen, J. F.; Burkholder, W. E. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 6145.
- (7) Phillips, J. K.; Chong, J. M.; Andersen, J. F.; Burkholder, W. E. *Entomol. Exp. Appl.* **1989**, *51*, 149.
- (8) Chong, J. M. *Tetrahedron* **1989**, *45*, 623.
- (9) Mori, K.; Ishikura, M. *Liebigs Ann. Chem.* **1989**, *12*, 1263.
- (10) Cheskis, B. A.; Shpiro, N. A.; Moiseenkova, A. M. *Bull. Acad. Sci. USSR, Div. Chem Sci. (Engl. Transl.)* **1991**, *40*, 2205.
- (11) Gil, S.; Parra, M.; Rodriguez, P.; E., S. *Synthesis* **2005**, 3451.
- (12) DiBattista, J. P.; Webster, F. X. *Bioorg. Med. Chem.* **1996**, *4*, 423.
- (13) Mateus, C. R.; Feltrin, M. P.; Costa, A. M.; Coelho, F.; Almeida, W. P. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 6901.
- (14) Vicario, J. L.; Badía, D.; Dominguez, E.; Rodriguez, M.; Carrillo, L. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 3754.
- (15) Kalaitzakis, D.; Kambourakis, S.; Rozzell, D. J.; Smonou, I. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2418.
- (16) Kalaitzakis, D.; Rozzell, D. J.; Kambourakis, S.; Smonou, I. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2309.
- (17) Ravía, S. P.; Risso, M.; Kröger, S.; Vero, S.; Seoane, G.; Gaménara, D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24*, 1207.
- (18) Aleu, J.; Bustillo, A. J.; Hernández-Galán, R.; Collado, I. G. *Curr. Org. Chem.* **2007**, *11*, 693.
- (19) Gotor, V. *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6*, 420.
- (20) García-Urdiales, E.; Alfonso, I.; Gotor, V. *Chem. Rev* **2005**, *105*, 313.
- (21) Loughlin, W. A. *Bioresour. Technol.* **2000**, *74*, 49.
- (22) Koeller, K. M.; Wong, C.-H. *Nature* **2001**, *409*, 232.
- (23) Gotor-Fernández, V.; Brieva, R.; Gotor, V. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2006**, *40*, 111.

- (24) Otera, J.; Nishikido, J. *Reaction of alcohols with carboxylic acids and their derivatives In Esterification. Methods, Reactions, and Applications*; 1 ed.; John Wiley & Sons, 2010.
- (25) Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*; 6th. ed.; Springer, 2011.
- (26) <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>.
- (27) Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656.
- (28) Cahn, R. S.; Ingold, S. C.; Prelog, V. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1966**, *5*, 385.
- (29) Humble, M. S.; Berglund, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011*, 3391.
- (30) Leadbeater, N. E. *Microwave Heating as a Tool for Sustainable Chemistry*; CRC Press: Boca Ratón, FL, 2010.
- (31) Leadbeater, N. E.; McGowan, C. B. *Clean, Fast Organic Chemistry*; CEM Publishing: Matthews, 2006.
- (32) Dallinger, D.; Kappe, C. O. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2563.
- (33) Lindström, P.; Tierney, J.; Westman, J. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 9225.
- (34) Kappe, C. O. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 6250.
- (35) Kappe, C. O.; Dallinger, D. *Nat. Rev. Drug. Dis.* **2006**, *5*, 51.
- (36) De la Hoz, A.; Díaz Ortiz, A.; Moreno, A. *Chem. Soc. rev.* **2005**, 168.
- (37) Bachu, P.; Gibson, J. S.; Sperry, J.; Brimble, M. A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *2007*, 1618.
- (38) Jain, P.; Jain, S.; Gupta, M. N. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 1480.
- (39) Yadav, G. D.; Lathi, P. S. *J. Mol. Cat. A: Chemical* **2004**, *223*, 51.
- (40) Yadav, G. D.; Lathi, P. S. *Synth. Commun.* **2005**, *35*, 1699.
- (41) Yadav, G. D.; Borkar, I. V. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2009**, *48*, 7915.
- (42) Réjasse, B.; Lamare, S.; Legoy, M.-D.; Besson, T. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1086.
- (43) Réjasse, B.; Besson, T.; Legoy, M.-D.; Lamare, S. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3703.
- (44) Yadav, G. D.; Sajgure, A. D. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2007**, *82*, 964.
- (45) Andrews, P. C.; Deacon, G. B.; Junk, P. C.; Spiccia, N. F. *Green Chem.* **2007**, *9*, 1319.
- (46) Chichetti, S. M.; Ahearn, S. P.; Adams, B.; Rivkin, A. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8250.
- (47) Gupta, N.; Kad, G. L.; Singh, V.; Singh, J. *Synth. Commun.* **2007**, *37*, 3421.
- (48) Iida, H.; Moromizato, T.; Hamana, H.; Matsumoto, K. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *78*, 2037.
- (49) Liu, F.; You, Q.-D. *Synth. Commun.* **2007**, *37*, 3933.

-
- (50) Öztürk, G.; Gümgüm, B.; Kizil, M.; Emen, S. *Synth. Commun.* **2007**, *37*, 3981.
- (51) Öztürk, G.; Petit, A.; Kouklovsky, C. *Synth. Commun.* **2008**, *38*, 2707.
- (52) Matos, T. D.; King, N.; Simmons, L.; Walker, C.; McClain, A. R.; Mahapatro, A.; Rispoli, F.; McDonnell, K. T.; Shah, V. *Green Chem. Lett. Rev.* **2011**, *4*, 73.
- (53) Risso, M.; Mazzini, M.; Kröger, S.; Saenz-Méndez, P.; Seoane, G.; Gamenara, D. *Green Chem. Lett. Rev.* **2012**, *5*, 539.
- (54) Hatfield, R.; Vermerris, W. *Plant Physiol.* **2001**, *126*, 1351.
- (55) Hu, T. Q. In *Chemical modification, properties, and usage of lignin*; Kluwe Academic / Plenum Publishers: New York, 2002, p vii.
- (56) Rohella, R. S.; Sahoo, N.; Chakravorty, V. *Resonance* **1997**, 60.
- (57) "UK. In UK Forestry Commission, Forestry Statistics; Forestry Commission: Edinburgh, UK, 2001; pp. 1-48."
- (58) Ciellini, E.; Solaro, R. *Adv. Mater.* **1996**, *8(4)*, 305.
- (59) <http://www1.eere.energy.gov/biomass/>.
- (60) van Heiningen, A. "In Converting a Kraft Pulp Mill into an Integrated Forest Biorefinery," Solander Symposium, March 29th, 2007.
- (61) Ragauskas, A. J.; Nagy, M.; Kim, D. H.; Eckert, C. A.; Hallet, J. P.; Liotta, C. L. *Indust. Biotechnol.* **2006**, *2*, 55.
- (62) Ragauskas, A. J.; Williams, C. K.; Davison, B. H.; Britovsek, G.; Cairney, J.; Eckert, C. A.; Frederick, W. J.; Hallet, J. P.; Leak, D. J.; Liotta, C. L.; Mielenz, J. R.; Murphy, R.; Templer, R.; Tschaplinski, T. *Science* **2006**, *311*, 484.
- (63) Campbell, M. M.; Sederoff, R. R. *Plant Physiol.* **1996**, *110*, 3.
- (64) Freudenberg, K. *Science* **1965**, *148*, 595.
- (65) Higuchi, T. In *Biosynthesis of lignin: Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components.*; Higuchi, T., Ed.; Academic press: Orlando, 1985, p 141.
- (66) Argyropoulos, D. S.; Menachem, S. B. *Adv. Biochem. Eng. Biotech.* **1997**, *57*, 127.
- (67) Boudet, A.-M. *Plant Physiol. Biochem.* **2000**, *38*, 81.
- (68) Boudet, A.-M.; Chabannes, M. *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 561.
- (69) Higuchi, T. *Wood Sci. Technol.* **1990**, *24*, 23.
- (70) Ralph, J.; Lundquist, K.; Brunow, G.; Lu, F.; Kim, H.; Schatz, P. F.; Marita, J. M.; Hatfield, R. D.; Ralph, S. A.; Christensen, J. H.; Boerjan, W. *Phytochem. Rev.* **2004**, *3*, 29.
- (71) EPA US Environmental Protection Agency **2002**.
- (72) Tomat, D.; Johnson, S.; Sawyer, N. **2005**.
-

- (73) Keyoumu, A.; Sjö Dahl, R.; Henriksson, R.; Ek, M.; Gellerstedt, G.; Lindström, M. E. *Ind. Crops Prod.* **2004**, *20*, 143.
- (74) Gargulak, J. D.; Lebo, S. E. In *ACS Symposium Ser.* 2000; Vol. 742, p 304.
- (75) Tanaka, M.; Oota, O.; Hiramatsu, H.; Fujiwara, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*, 2473.
- (76) Ahrendt, K. A.; Borths, C. J.; MacMillan, D. W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4243.
- (77) Eder, U.; Sauer, G.; Wiechert, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1971**, *10*, 496.
- (78) Hajos, Z. G.; Parrish, D. R. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 1615.
- (79) List, B.; Lerner, R. A.; Barbas III, C. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2395.
- (80) List, B.; Pojarliev, P.; Castello, C. *Org. Lett.* **2001**, *3*, 573.
- (81) Notz, W.; List, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 7386.
- (82) List, B. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5573.
- (83) Dalko, P. I.; Moisan, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3726.
- (84) Dalko, P. I.; Moisan, L. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5138
- (85) Juhl, K.; Jørgensen, K. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1498.
- (86) MacMillan, D. W. C. *Nature* **2008**, *455*, 304.
- (87) Marigo, M.; Wabnitz, T. C.; Fielenbach, D.; Jørgensen, K. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 794.
- (88) Sundén, H.; Ibrahim, I.; Eriksson, L.; Córdova, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4877.
- (89) Wang, X.; List, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1119.
- (90) Derrudi, M. L.; Geymonat, F.; Aldabalde, V.; Gamenara, D.; Seoane, G.; Saenz-Méndez, P. In *XVII Simposio Nacional de Química Orgánica* Mondoza, Argentina, 2009.
- (91) Geymonat, F.; Aldabalde, V.; Derrudi, M. L.; Gamenara, D.; Seoane, G.; Saenz-Méndez, P. In *XVII Simposio Nacional de Química Orgánica* Mendoza, Argentina, 2009.
- (92) Aldabalde, V.; Risso, M.; Derrudi, M. L.; Geymonat, F.; Seoane, G.; Gamenara, D.; Saenz-Méndez, P. *Open J. Phys. Chem.* **2011**, *1*, 85.
- (93) Simpson, C. J.; Fitzhenry, M. J.; Stamford, N. P. J. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6893.
- (94) Sinha, A. K.; Sharma, A.; Joshi, B. P. *Tetrahedron* **2007**, *63*, 960.
- (95) Ames, J. M.; Macleod, G. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1201.
- (96) Chung, H. Y. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1803.
- (97) Pihlsgård, P.; Larsson, M.; Leufvén, A.; Lingnert, H. *J. of Agr. and Food Chem.* **2000**, *48*, 4844.
- (98) Janes, D.; Kantar, D.; Kreft, S.; Prosen, H. *Food Chem.* **2009**, *112*, 120.

- (99) Cong, R.; Pelton, R.; Russo, P.; Doucet, G. *Macromolecules* **2003**, *36*, 204.
- (100) Aslam, S. N.; Stevenson, P. C.; Phythian, S. J.; Veitch, N. C.; Hall, D. R. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 4214.
- (101) Bermúdez, E.; Ventura, O. N.; Saenz-Méndez, P. *J. Phys. Chem. A* **2010**, *114*, 13086.
- (102) Takemoto, M.; Achiwa, K. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 6595.
- (103) Yang, D. *Acc. Chem. Res* **2004**, *37*, 497.
- (104) Appendino, G.; Cravotto, G.; Enriú, R.; Gariboldi, P.; Barboni, L.; Torregiani, E.; Gabetta, B.; Zini, G.; Bombardelli, E. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 607.
- (105) Hamamoto, H.; Mamedov, V. A.; Kitamoto, M.; Hayashib, N.; Tsuboib, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 4485.
- (106) Cleij, M.; Archelas, A.; Furstoss, R. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5029.
- (107) Roldós, V.; Nakayama, H.; Rolón, M.; Montero-Torres, A.; Trucco, F.; Torres, S.; Vega, C.; Marrero-Ponce, Y.; Heguaburu, V.; Yaluff, G.; Gómez-Barrio, A.; Sanabria, L.; Ferreira, M. E.; Rojas de Arias, A.; Pandolfi, E. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, *43*, 1797.
- (108) Imashiro, R.; Seki, M. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4216.
- (109) Montanov, T. J.; Christianson, C. V.; Festin, G. M.; Shen, B.; Bruner, S. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3099.
- (110) Johansen, M. B.; Leduc, A. B.; Kerr, M. A. *Synlett* **2007**, *2007*, 2593.
- (111) Banfi, S.; Colonna, S.; Molinari, H. *Tappi J.* **1984**, *40*, 5207.
- (112) Lane, B. S.; Burgess, K. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2457.
- (113) Nemoto, T.; Ohshima, T.; Shibasaki, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9474.
- (114) Nemoto, T.; Tosaki, S.-Y.; Ohshima, T.; Shibasaki, M. *CHIRALITY* **2003**, *15*, 306.
- (115) Ohshima, T.; Nemoto, T.; Tosaki, S.-y.; Kakei, H.; Gnanadesikan, V.; Shibasaki, M. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 10485.
- (116) Björkling, F.; Frykman, H.; Godtfredsen, S. E.; Kirk, O. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 4587.
- (117) Björkling, F.; Godtfredsen, S. E.; Kirk, O. *J. Chem. Soc. Chem Commun.* **1990**, 1301.
- (118) Godtfredsen, S. E.; Kirk, O.; Björkling, F.; Christensen, L. B. 1990; Vol. WO 91/06574
- (119) De Zoete, M. C.; Van Ranewijk, F.; Maat, L.; Sheldon, R. A. *Reel. Trav. Chim. Pays-Bas* **1993**, *112*, 462.
- (120) Cuperus, F. P.; Bouwer, S. T.; Kramerand, G. F. X.; Derksen, J. T. P. *Biocatalysis* **1994**, *9*, 89.

- (121) Orellana-Coca, C.; Billakanti, J. M.; Mattiasson, B.; Hatti-Kaul, R. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2007**, *44*, 133.
- (122) Tufvesson, P.; Adlercreutz, D.; Lundmark, S.; Manea, M.; Hatti-Kaul, R. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2008**, *54*, 1.
- (123) Orellana-Coca, C.; Camocho, S.; Adlercreutz, D.; Mattiasson, B.; Hatti-Kaul, R. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2005**, *107*, 864.
- (124) Orellana-Coca, C.; Törnvall, U.; Adlercreutz, D.; Mattiasson, B.; Hatti-Kaul, R. *Biocatalysis and Biotransformation* **2005**, *23*, 431.
- (125) Kimb, Y. H.; Ana, E. S.; Park, S. Y.; Song, B. K. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2007**, *39*.
- (126) Alves Moreira, M.; Bergler Bitencourt, T.; Nascimento, M. G. *Synthetic Commun.* **2005**, *35*, 2107.
- (127) Ankudey, E. G.; Olivo, H. F.; Peeples, T. L. *Green Chem.* **2006**, *8*, 923.
- (128) Carboni-Oerlemans, C.; Domínguez de María, P.; Tuin, B.; Bargeman, G.; van der Meer, A.; van Gemert, R. *J. Biotech.* **2006**, *126*, 140.
- (129) Moreira, M. A.; Nascimento, M. G. *Cat. Comm.* **2007**, *8*, 2043.
- (130) Yadav, G. D.; Borkar, I. V. *AIChE Journal* **2006**, *52*, 1235.
- (131) Hager, L. P.; Lakner, F. J.; Basavapathruni, A. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **1998**, *5*, 95.
- (132) Hirata, T.; Izumi, S.; Ogura, M.; Yawata, T. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 15993.
- (133) Hu, S.; Gupta, P.; Prasad, A. K.; Grossa, R. A.; Parmar, V. S. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6763.
- (134) Manoj, K. M.; Lakner, F. J.; Hager, L. P. *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2000**, *9*, 107.
- (135) Rao, B.; Rao, M. V. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 279.
- (136) Geigert, J.; Leel, T. D.; Dalietos, D. J. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **1986**, *136*, 778.
- (137) Ortiz de Montellano, P. R.; Grab, L. A. *Biochemistry* **1987**, *1987*, 5310.
- (138) Marigo, M.; Franzén, J.; Poulsen, T. B.; Zhuang, W.; Jørgensen, K. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6964.
- (139) Hanson, R. M.; Sharpless, K. B. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 1922.
- (140) Katsuki, T.; Sharpless, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5976.
- (141) Zhang, W.; Loebach, J. L.; Wilson, S. R.; Jacobsen, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 2801.
- (142) Irie, R.; Noda, K.; Ito, Y.; Matsumoto, N.; Katsuki, T. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7345.
- (143) Porter, M. J.; Skidmore, J. *Chem. Commun.* **2000**, 1215.

- (144) Bougauchi, M.; Watanabe, S.; Arai, T.; Sasai, H.; Shibasaki, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2329.
- (145) Ooi, T.; Ohara, D.; Tamura, M.; Maruoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6844.
- (146) Seayad, J.; List, B. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 719.
- (147) Ouellet, S. G.; Tuttle, J. B.; MacMillan, D. W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 32.
- (148) Kunz, R. K.; MacMillan, D. W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3240.
- (149) Yang, J. W.; Hechavarria Fonseca, M. T.; Vignola, N.; List, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 108.
- (150) Halland, N.; Aburel, P. S.; Jørgensen, K. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1272.
- (151) Halland, N.; Hansen, T.; Jørgensen, K. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4955.
- (152) Halland, N.; Aburel, P. S.; Jørgensen, K. A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 661.
- (153) Sundén, H.; Ibrahim, I.; Córdova, A. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *47*, 99.
- (154) Zhao, G.-L.; Ibrahim, I.; Sundén, H.; Córdova, A. *Adv. Synth. Catal* **2007**, *349*, 1210.

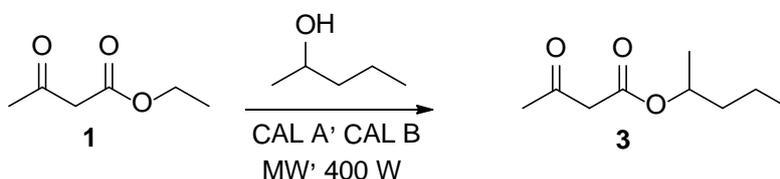
Objetivos y Metodología

3. Objetivos y Metodología

El objetivo general del presente trabajo de tesis se enmarca en la búsqueda de metodologías para la producción de “unidades base” o “bloques de construcción” para la preparación de compuestos con alto valor agregado, tanto de interés farmacéutico como industrial. Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

3.1. Búsqueda una metodología eficiente y ambientalmente responsable para la interconversión enzimática de β -cetoésteres relacionados estructuralmente.

Como metodología de trabajo se plantea la evaluación de la transesterificación enzimática con CAL A y CAL B, de una molécula modelo 3-oxobutanoato de etilo (**1**) utilizando (\pm)-2-pentanol como nucleófilo, irradiación por microondas, en un horno doméstico y ausencia de disolventes Esquema 13.



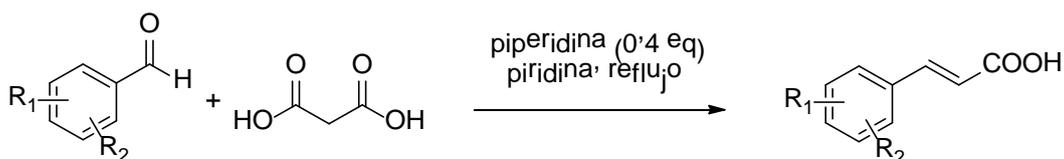
Esquema 13: Modelo de reacción de transesterificación de β -cetoésteres.

Seleccionado el biocatalizador y las condiciones de reacción, en el horno doméstico de microondas, se aplicará el procedimiento, con el mismo modelo de reacción, en un reactor de microondas de laboratorio. Una vez encontradas las condiciones de reacción para el reactor de microondas, se realizará la transesterificación de β -cetoésteres relacionados estructuralmente con feromonas de insectos.

Se plantea también estudiar la reutilización del biocatalizador para evaluar la estabilidad enzimática en las condiciones de reacción y para hacer económicamente atractiva la aplicación de esta metodología.

3.2. Síntesis de ácidos carboxílicos α,β -insaturados, precursores fenilglicidatos y de una gran variedad de intermedios sintéticos.

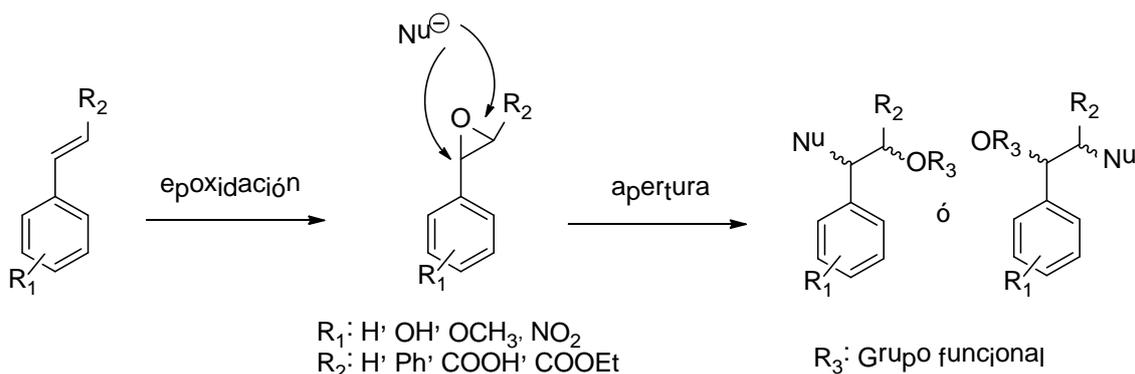
Se estudiará la reacción de Knoevenagel-Doebner para sintetizar los compuestos deseados, en condiciones suaves de reacción y organocatalizada (Esquema 14). Se optimizarán dichas condiciones de reacción utilizando distintos disolventes y carga de organocatalizador.



Esquema 14: Reacción general de condensación de Knoevenagel-Doebner de aldehídos aromáticos y ácido malónico organocatalizada.

3.3 Utilización de precursores de modelos de lignina y estructuras relacionadas, para el estudio de la reactividad química y el potencial de funcionalización de olefinas deficientes en electrones. Optimización de reacciones de epoxidación enzimática (catalizadas por lipasas y peroxidasas) y organocatalíticas.

La propuesta de investigación involucra para la síntesis de fenilglicidatos y análogos, el estudio de la funcionalización de olefinas deficientes en electrones, derivados de ácido cinámico, estilbenos y estirenos. La epoxidación de éstos permitirá obtener bloques de construcción versátiles, que mediante la apertura del epóxido permitan la preparación de un importante espectro de estructuras altamente funcionalizadas en forma regio- y estereoselectiva (Esquema 15).

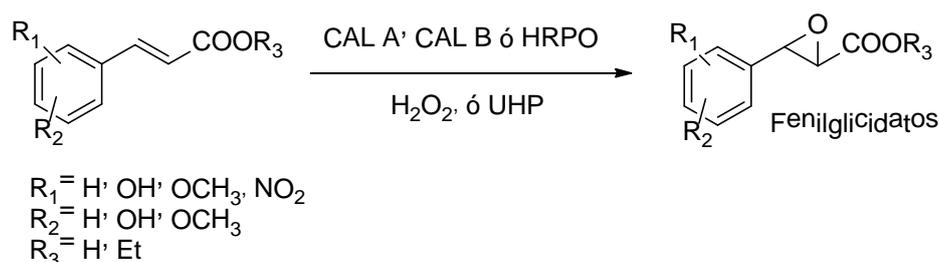


Esquema 15: Versatilidad sintética de derivados de ácido cinámico, estilbenos y estirenos, obtenida mediante epoxidación y posterior apertura del epóxido formado.

a) Síntesis de fenilglícidos mediante una estrategia biocatalítica

Se utilizarán como sustratos de partida los ácidos y ésteres α,β -insaturados obtenidos mediante la reacción de Knoevenagel-Doebner a partir de vainillina (recuperada del licor negro) y otros aldehídos aromáticos de origen comercial.

Se optimizarán estrategias enzimáticas para la epoxidación de ácidos o ésteres α,β -insaturados. Se utilizarán lipasas y peroxidasas de origen comercial como CAL A, CAL B y HRPO (Esquema 16).



Esquema 16: Epoxidación enzimática de ácidos y ésteres α,β -insaturados.

Se optimizarán las condiciones de reacción, empleando diferentes concentraciones de los agentes oxidantes como H_2O_2 y UHP, así como diferentes concentraciones de enzima. Los biocatalizadores serán utilizados tanto en disolventes orgánicos como en medios acuosos.

Resultados y Discusión

4. Resultados y Discusión

4.1. Transesterificación de β -cetoésteres catalizada por lipasas.

Dentro del grupo de trabajo en el que se realizó esta tesis, hay amplia experiencia en el uso de lipasas como biocatalizadores. Como se mencionó en el capítulo de antecedentes, los β -cetoésteres pueden emplearse como materiales de partida para la preparación de una amplia variedad de bloques de construcción quirales y en particular en la síntesis de feromonas de insectos, como por ejemplo (2*S*,3*R*)-sitofilato, feromona de agregación de *Sitophilus granarius* (Figura 7).¹⁻⁴

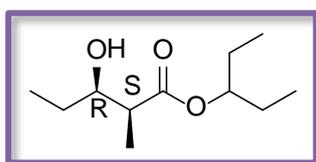


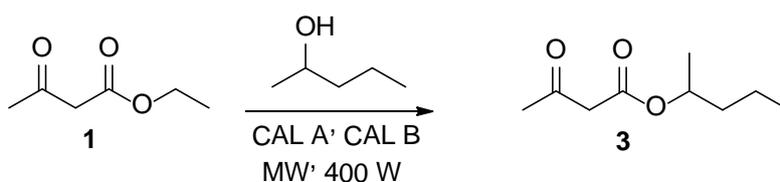
Figura 7: (2*S*,3*R*)-sitofilato, feromona de agregación de *Sitophilus granarius*.

En el marco del proyecto “Metodologías quimioenzimáticas para la síntesis enantioselectiva de feromonas de insectos”^{5,6} se realizó un screening de distintas lipasas como catalizadores para la reacción de transesterificación de β -cetoésteres con alcoholes secundarios. Como molécula modelo se utilizó 3-oxobutanoato de etilo (**1**) y como alcohol secundario (\pm)-2-pentanol. Una vez seleccionados los biocatalizadores que arrojaron mejores resultados, se llevó a cabo un estudio metodológico para optimizar las condiciones de reacción.⁷ De dicho trabajo surgió que con las lipasas comerciales de *C. antártica* A y B, CAL A (Chirazyme L-5 Iyo) y CAL B (Novozym 435) respectivamente, se obtuvieron los mayores porcentajes de conversión. Las condiciones óptimas para la reacción de transesterificación fueron en agitador orbital a 30 °C, 200 rpm y utilizando hexano como disolvente. Para CAL B se obtuvo una conversión de 87% en 48 horas y recién a 96 horas de reacción se logró llegar a conversión total.

En el marco de esta tesis se planteó ampliar este estudio, buscando una metodología más eficiente y amigable con el medio ambiente para la interconversión enzimática de β -cetoésteres relacionados estructuralmente.

Para esto se utilizó (\pm)-2- y 3-pentanol como nucleófilos, y las condiciones de reacción fueron irradiación por microondas y ausencia de disolventes. También se planteó estudiar la reutilización del biocatalizador para evaluar la estabilidad enzimática en las condiciones de reacción y para hacer económicamente atractiva la aplicación de esta metodología a la hora del escalado de la misma.⁸

Como modelo de reacción, se llevó a cabo la transesterificación de 3-oxobutanoato de etilo (**1**) con (\pm)-2-pentanol como nucleófilo en una relación molar de 1:2, en ausencia de disolvente y en un horno de microondas doméstico. Como catalizadores se usaron en esta oportunidad la lipasa comercial CAL A (NZL-101-IMB) inmovilizada y CAL B (Novozym 435) (Esquema 18).



Esquema 18: Transesterificación de 3-oxobutanoato de etilo (**1**), utilizando (\pm)-2-pentanol como nucleófilo, CAL A y CAL B como biocatalizadores, en ausencia de disolvente e irradiado por microondas (horno doméstico) a 400 W de potencia.

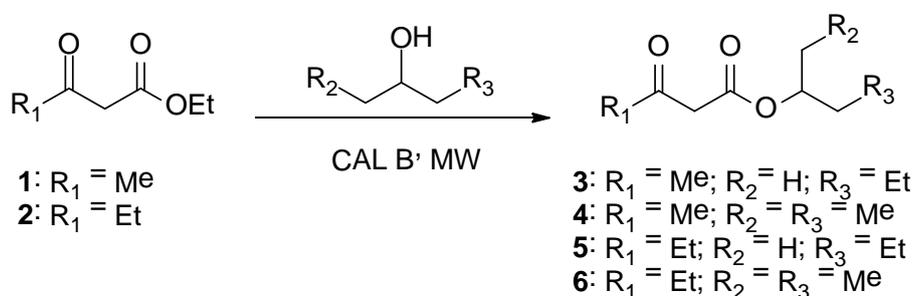
Los tiempos y las conversiones obtenidos para esta reacción se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1: Conversiones obtenidas en la transesterificación de 3-oxobutanoato de etilo (**1**), utilizando (\pm)-2-pentanol como nucleófilo, CAL A y CAL B como biocatalizadores, en ausencia de disolvente e irradiado por microondas (horno doméstico) a 400 W de potencia. Conversión determinada por GC (*Programa 7*).

Lipasa	Tiempo de reacción (h)	Conversión (%)
CAL A	4	0
	12	39
CAL B	4	68
	12	73

Dado que para CAL B se obtuvo más del doble de conversión que para CAL A para los mismos tiempos de reacción, se decidió seguir los estudios con CAL B.

Con el mismo modelo de reacción, se llevó a cabo la transesterificación de 3-oxobutanoato de etilo (**1**) con (±)-2- y 3-pentanol como nucleófilos y CAL B como biocatalizador. Los experimentos se realizaron a 50 °C en un reactor de microondas de laboratorio monomodo (CEM Discovery), equipado con un recipiente herméticamente cerrado conteniendo la mezcla de dador de acilo y alcohol en relaciones molares 1:2 y 1:1, para la síntesis de los compuestos **3** y **4** respectivamente (Esquema 19).



Esquema 19: Transesterificación de **1** y **2** utilizando (±)-2- y 3-pentanol como nucleófilos, CAL B como biocatalizador, en ausencia de disolventes e irradiado con microondas.

El avance de la reacción se determinó por cromatografía gaseosa. La Figura 8 muestra el cromatograma de la mezcla para 1 hora de reacción, con las condiciones cromatográficas del Programa 7. Los tiempos de retención para el 3-oxobutanoato de etilo (**1**) y 3-oxobutanoato de 2-pentilo (**3**) fueron de 17,5 y 28,0 minutos respectivamente y los porcentajes de áreas 4 y 96 % respectivamente. El porcentaje de área del producto **3** corresponde, en este caso, a la conversión.

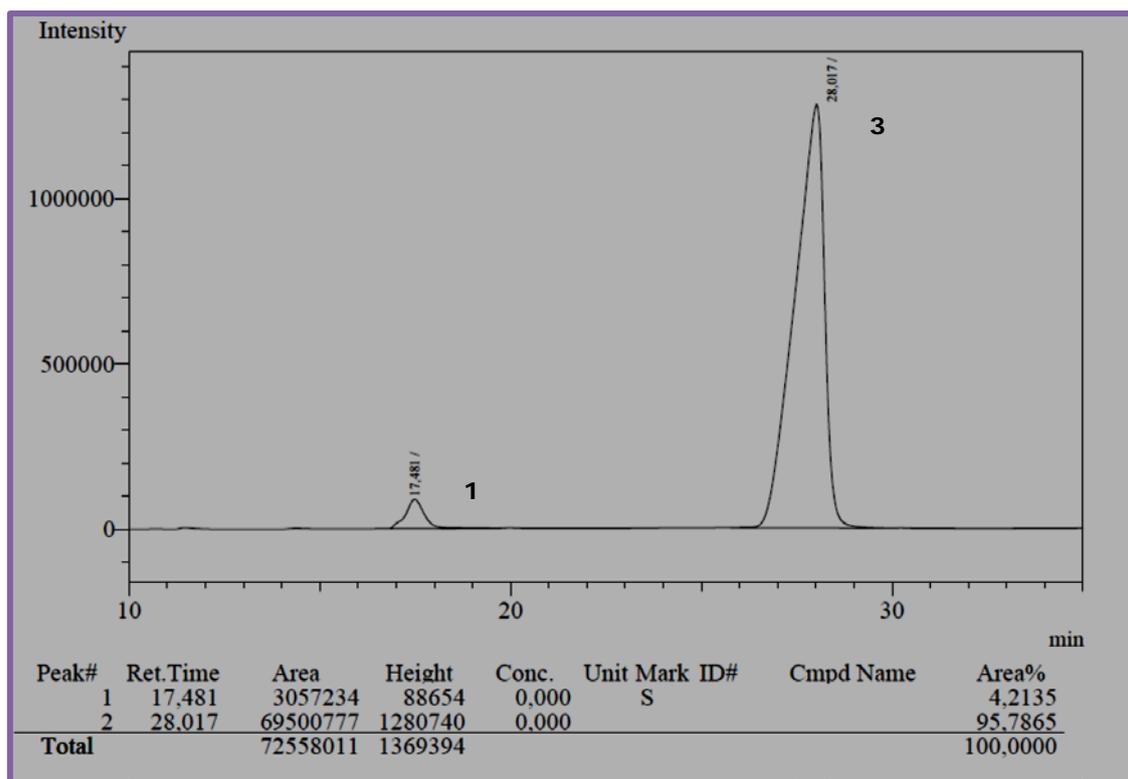


Figura 8: Cromatograma, en las condiciones del Programa 7, de la transesterificación de **1** con (\pm)-2-pentanol. Tiempo de reacción: 1 hora.

Los rendimientos (producto aislado) de las reacciones, llegaron hasta 96 % en 2 horas. (Figura 9, Tabla 2). Comparando estos rendimientos con los obtenidos en condiciones de calentamiento convencional,⁷ se observó que la irradiación por microondas no solo mantuvo la actividad de la enzima, sino que mejoró dichos rendimientos y redujo los tiempos de reacción, conforme a lo descrito en la literatura.⁹⁻¹¹ Además, en condiciones de reacción libre de disolventes, se observaron rendimientos significativamente más altos a los previamente descritos.⁹ Como control, se realizaron las reacciones en las mismas condiciones pero en ausencia de enzima, y el rendimiento de las mismas no alcanzó el 10 % en dos horas (Figura 9).

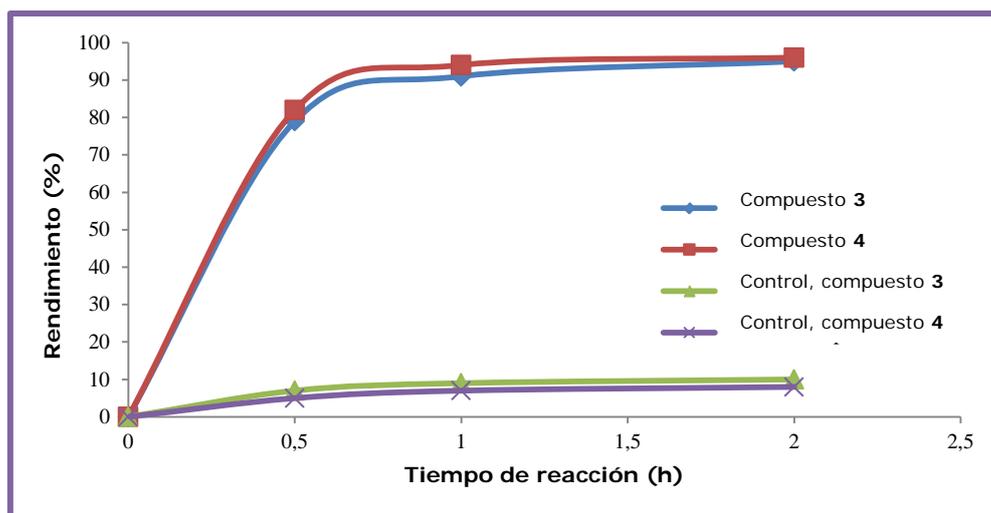


Figura 9: Rendimiento en la transesterificación de 3-oxobutanoato de etilo (**1**) con (±)-2- y 3-pentanol como nucleófilos, en ausencia de disolvente e irradiado por microondas, con y sin enzima.

Como se muestra en el Esquema 19, se realizaron las transesterificaciones, en las condiciones anteriormente mencionadas, usando 3-oxopentanoato de etilo (**2**) como sustrato y (±)-2- y 3-pentanol como nucleófilos, obteniéndose los productos **5** y **6** respectivamente, siendo **6** precursor directo de (2*S*,3*R*)-sitofilato, feromona de agregación de *Sitophilus granarius* (Figura 7).³ Las reacciones se llevaron a cabo a 50 y 70 °C y los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2: Rendimientos obtenidos en la transesterificación de **1** y **2** con (±)-2- y 3-pentanol como nucleófilos, CAL B como biocatalizador, en ausencia de disolvente e irradiado por microondas. Tiempo de reacción: 2 h.

Entrada	Sustrato	Producto	Temperatura (°C)	Rendimiento (%) [*]
1	1	3	50	96
2	1	3	70	67
3	1	4	50	95
4	1	4	70	59
5	2	5	50	96
6	2	5	70	59
7	2	6	50	97
8	2	6	70	85

* Rendimiento de producto aislado

Para los dos sustratos utilizados (**1** y **2**), se obtuvieron excelentes rendimientos a 50 °C (> a 90 %) (entradas 1, 3, 5 y 7, Tabla 2), no pudiéndose mejorar los mismos con el aumento de la temperatura (entradas 2, 4, 6 y 8, Tabla 2).

Para las reacciones realizadas con 2-pentanol racémico (productos **3** y **5**), el proceso fue altamente estereoselectivo, ya que mayoritariamente reaccionó el isómero (*R*), en concordancia con la regla de Kazlauskas,¹² obteniéndose los ésteres correspondientes con un *ee* > 99%. Dichas reacciones fueron monitoreadas por cromatografía gaseosa quiral, usando como estándares la mezcla racémica y los alcoholes ópticamente puros. La Figura 10 muestra el cromatograma realizado con una columna quiral, tomado en las condiciones del *Programa 3*, de la mezcla racémica del (±)-2-pentanol, donde los tiempos de retención de los enantiómeros son 28,0 y 28,4 min respectivamente. En el cromatograma del (*S*)-2-pentanol (Figura 11), tomado también con el *Programa 3*, muestra que el tiempo de retención de dicho enantiómero es de 28,5 min. Por lo tanto, se puede asegurar que el primer pico del cromatograma de la mezcla (±)-2-pentanol (Figura 10) corresponde al (*R*)-2-pentanol y el segundo al (*S*)-2-pentanol.

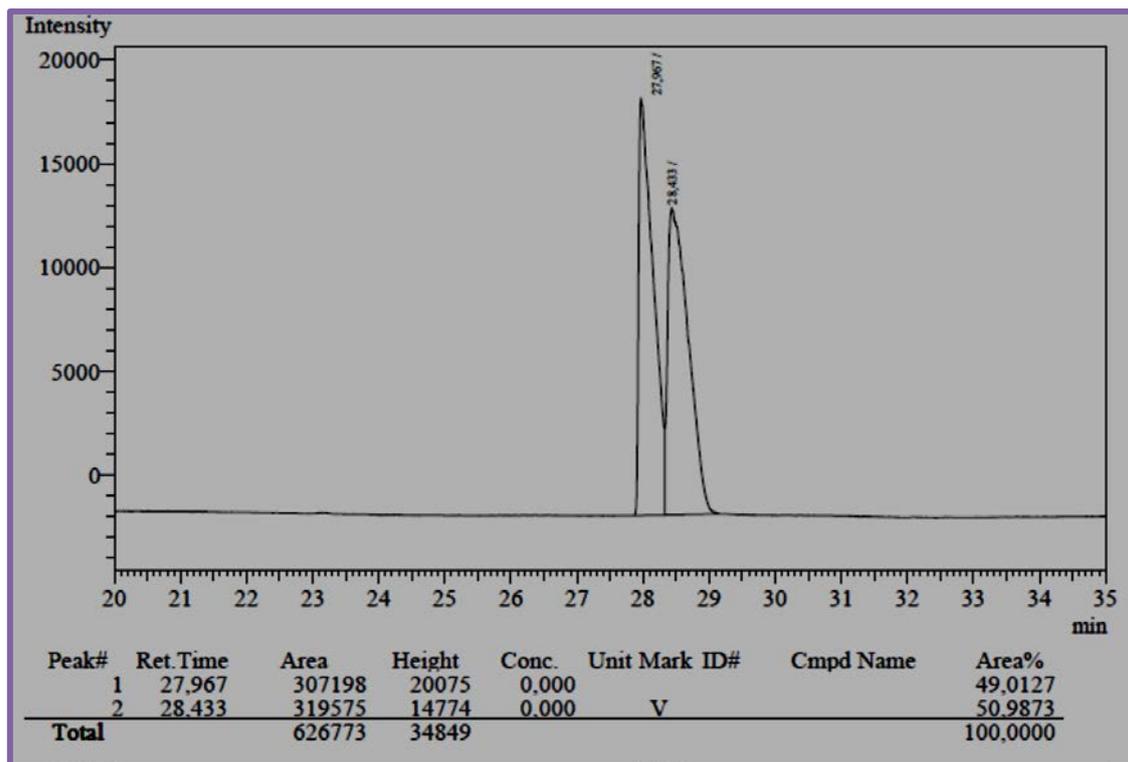


Figura 10: Cromatograma quiral, en las condiciones del *Programa 3*, de la mezcla racémica (\pm)-2-pentanol.

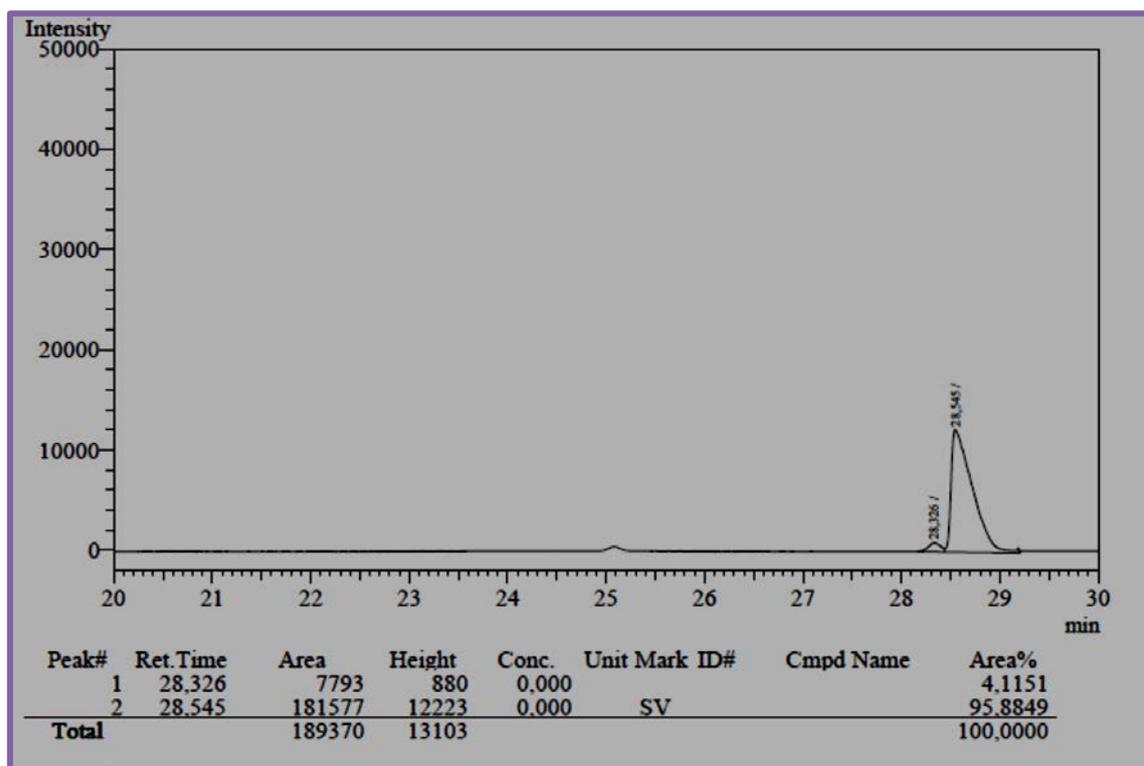


Figura 11: Cromatograma quiral, en las condiciones del *Programa 3*, de (S)-2-pentanol.

La Figura 12 muestra el cromatograma quiral de la transesterificación de **1** con (\pm)-2-pentanol en las condiciones del *Programa 3*. Puede observarse el consumo de (*R*)-2-pentanol, quedando sin reaccionar el enantiómero (*S*) ($t_r = 28,5$ min.), lo que confirma que se cumple la regla de Kazlauskas antes mencionada.

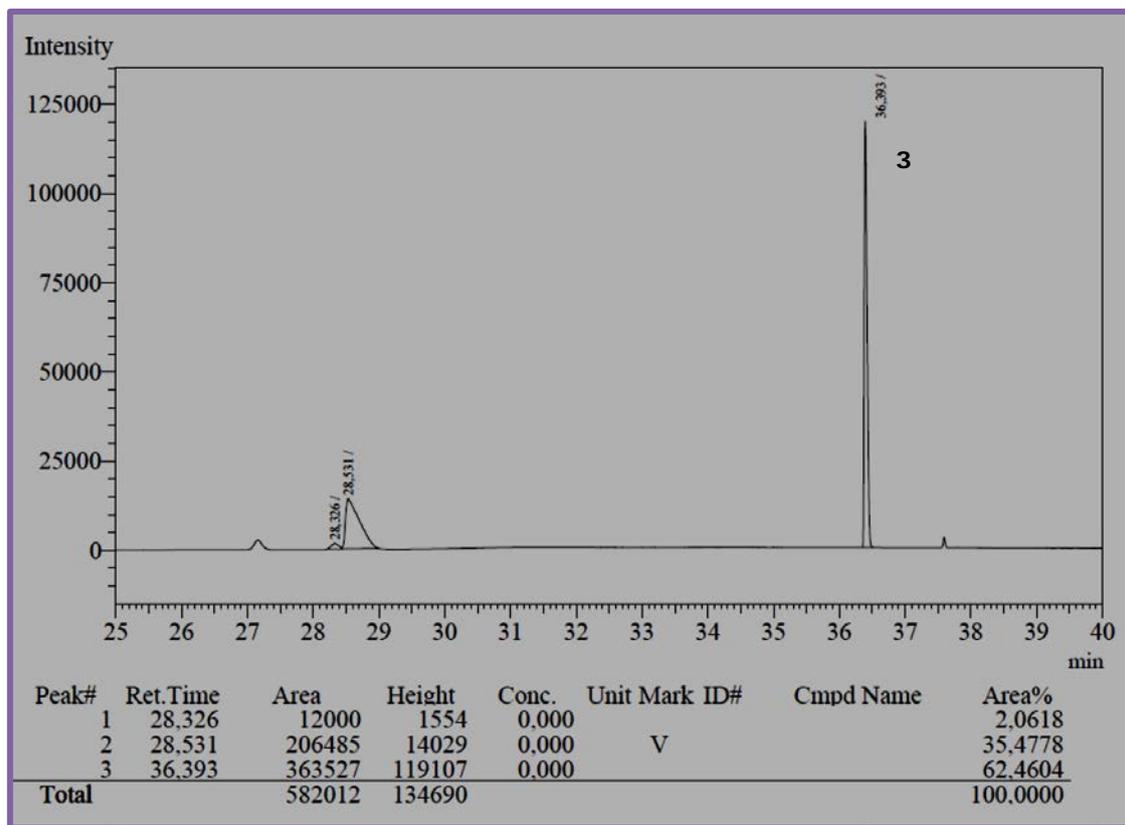


Figura 12: Cromatograma quiral, en las condiciones del *Programa 3*, de la transesterificación de **1** con (\pm)-2-pentanol. Tiempo de reacción: 1 hora.

Para asegurar la competitividad económica del proceso, se estudió la reutilización del biocatalizador. Después de cada ciclo de reacción, la enzima se filtró, se lavó 3 veces con hexano, se dejó secar 24 horas a temperatura ambiente y se reutilizó en un nuevo ciclo. Los resultados obtenidos mostraron que la irradiación por microondas no afectó la estabilidad de la lipasa, que no perdió su actividad enzimática en 10 ciclos consecutivos de uso. En los cromatogramas obtenidos a 30 minutos de reacción, con la lipasa sin uso (fresca), y con 5 y 10 usos, (Figuras 13, 14 y 15 respectivamente), puede verse que la conversión se mantuvo constante en los ciclos de uso del biocatalizador, siendo las mismas 74, 75 y 75%,

respectivamente. Lo mismo se muestra, para 2 horas de reacción, en la Figura 16.

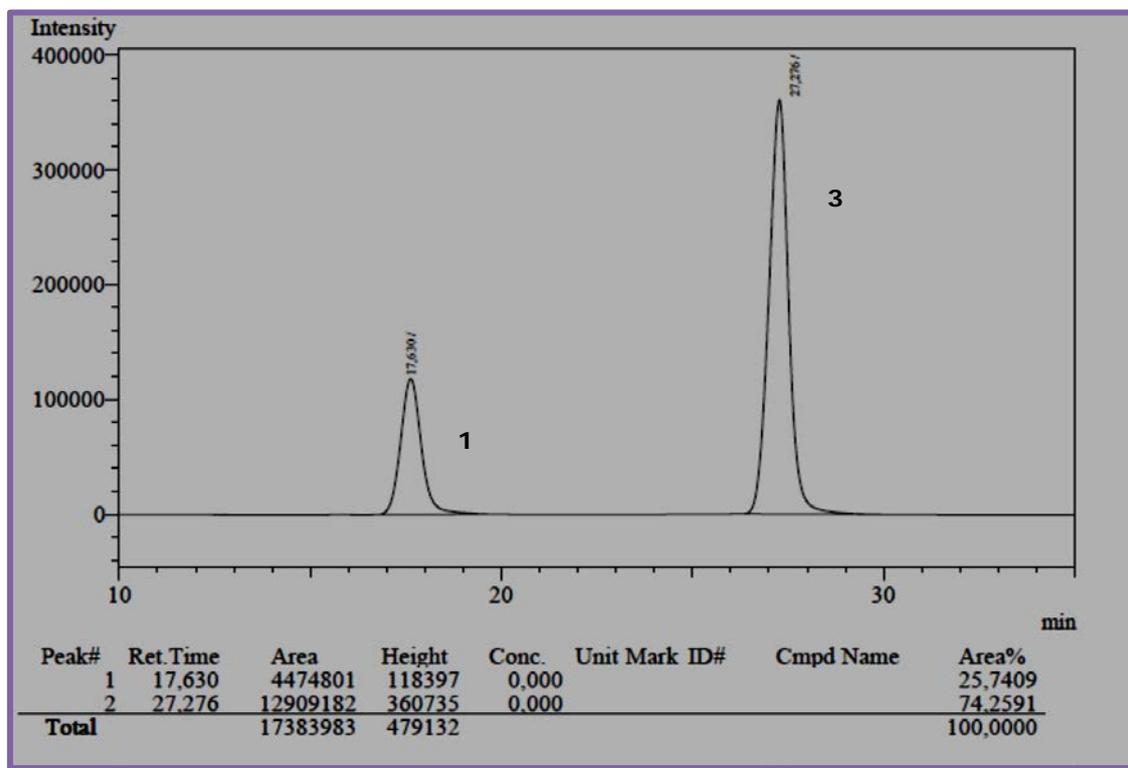


Figura 13: Cromatograma, en las condiciones del *Programa 7*, de la transesterificación de **1** con (\pm)-2-pentanol y CAL B fresca. Tiempo de reacción: 30 minutos.

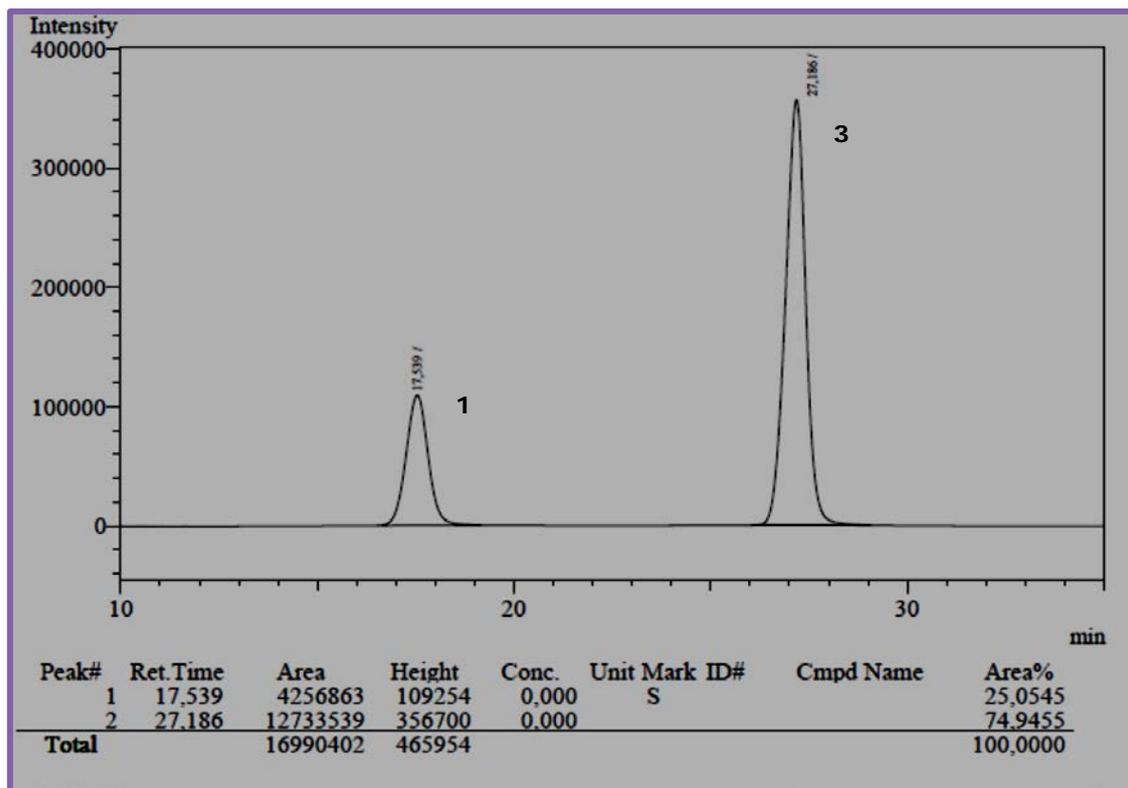


Figura 14: Cromatograma, en las condiciones del *Programa 7*, de la transesterificación de **1** con (±)-2-pentanol y CAL B 5^{to} reuso. Tiempo de reacción: 30 minutos.

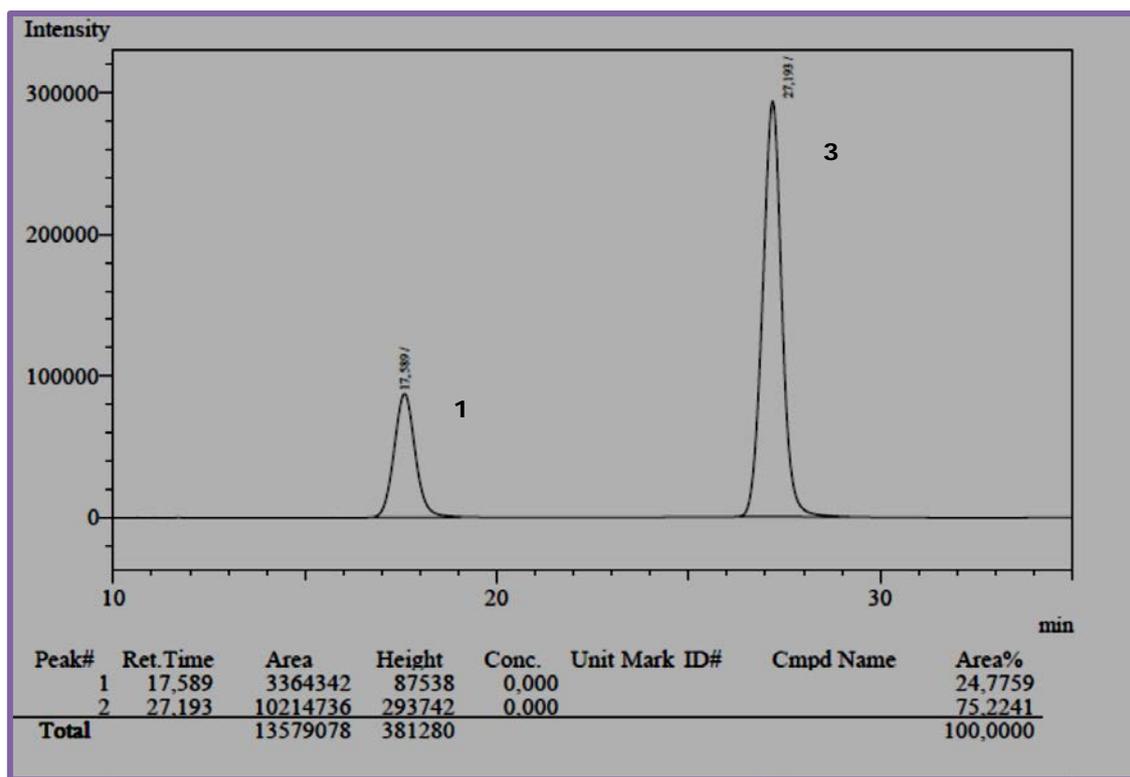


Figura 15: Cromatograma, en las condiciones del Programa 7, de la transesterificación de **1** con (\pm)-2-pentanol y CAL B 10^0 reuso. Tiempo de reacción: 30 minutos.

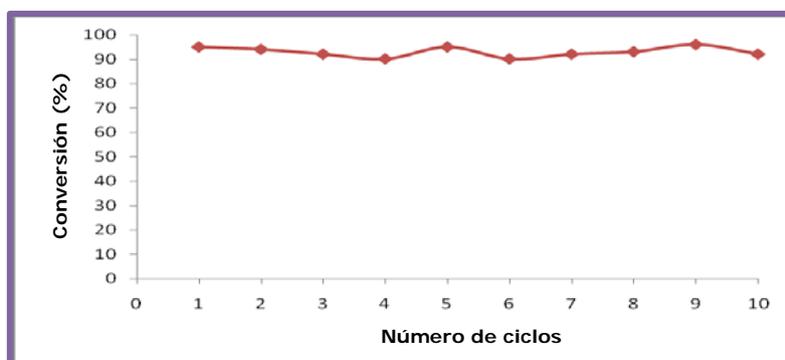
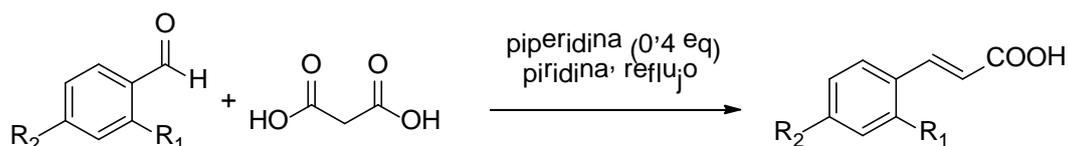


Figura 16: Reutilización de CAL B en la transesterificación de **1** con (\pm)-2-pentanol como nucleófilo, en ausencia de disolvente e irradiado por microondas. Tiempo de reacción: 2 horas.

Por lo tanto, este proceso de transesterificación catalizado por lipasa, en ausencia de disolvente e irradiado por microondas resulta ser simple y competitivo.

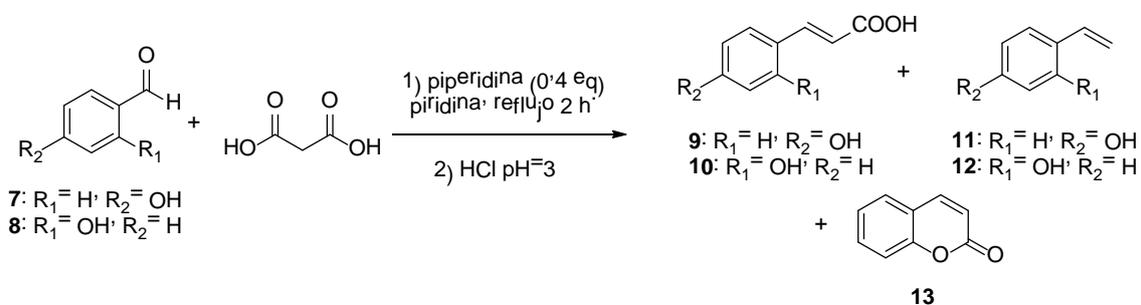
4.2. Síntesis organocatalizada de derivados de ácido cinámico.

En esta parte del proyecto de Tesis se realizó la reacción de Knoevenagel-Doebner para sintetizar ácidos carboxílicos α,β -insaturados. La condensación de aldehídos y ácido malónico fue promovida por bases, tales como piridina y piperidina, produciendo el ácido carboxílico α,β -insaturado correspondiente, en condiciones organocatalíticas (Esquema 20).¹³



Esquema 20: Reacción general de condensación de aldehídos aromáticos y ácido malónico utilizando piperidina como organocatalizador y piridina como disolvente.

En la mayoría de los casos, el producto principal de esta reacción fue el ácido carboxílico α,β -insaturado correspondiente. Sin embargo, cuando se utilizó 2-hidroxi- y 4-hidroxibenzaldehído, no se obtuvieron los ácidos carboxílicos sino la cumarina **13** y el vinilfenol **11** (Esquema 21, Tabla 3).¹⁴



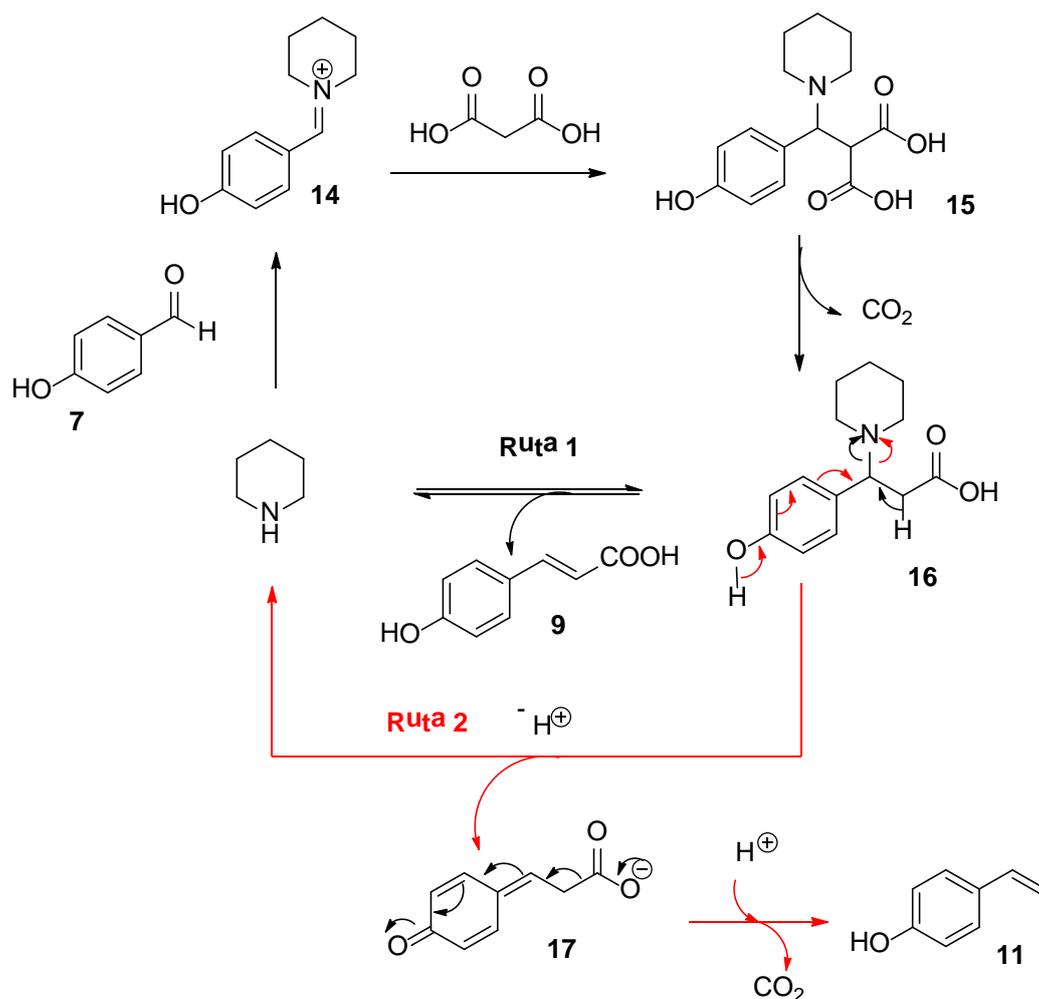
Esquema 21 Condensación de Knoevenagel-Doebner de 2-hidroxi- y 4-hidroxibenzaldehído con ácido malónico.

Tabla 3: Productos obtenidos en la condensación de Knoevenagel-Doebner de 2-hidroxi- y 4-hidroxibenzaldehído con ácido malónico.

Entrada	Aldehído	Productos (% obtenidos)		
1	7	9 (trazas)	11 (60 %)	
2	8	10 (0 %)	12 (0 %)	13 (15 %)

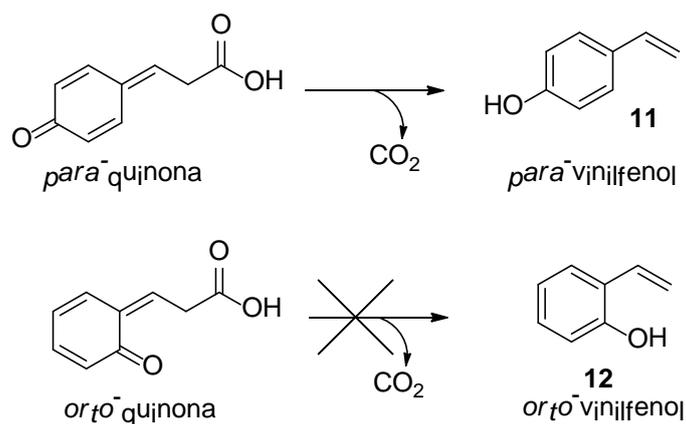
A pesar de que la reacción de Knoevenagel se ha empleado para obtener ácido cinámico y derivados, las condiciones de reacción, aislamiento y purificación del producto (en adelante work-up) previamente reportados son diferentes de los descritos en esta tesis. Simpson y col.¹⁵ señalaron que la formación de estireno se observó sólo cuando se utilizó el sustrato adecuado (2- o 4-hidroxibenzaldehído) conjuntamente con tolueno para eliminar la piridina por destilación a vacío. También encontraron que interrumpiendo la reacción con ácido, se favorecía la formación del estireno. Por el contrario, con nuestro estudio, se pudo corroborar que la formación del estireno no depende ni de las condiciones de reacción ni del work-up, dado que se formó antes del mismo.

Se analizó la condensación de Knoevenagel-Doebner con benzaldehídos 2-hidroxi- y 4-hidroxisustituídos, empleando una carga de catalizador inferior a la descrita anteriormente¹⁵ (diez veces menos) e interrumpiendo la reacción con HCl. A partir de estos experimentos, se comprobó que los aldehídos 4-hidroxisustituídos dan como producto el vinilfenol correspondiente. En la condensación de 4-hidroxibenzaldehído (**7**) con ácido malónico, se dio una segunda descarboxilación que condujo a la formación de 4-vinilfenol (**11**) (entrada 1, Tabla 3), que está de acuerdo con el mecanismo propuesto que se muestra en el Esquema 22. Esto no ocurre en la condensación de 2-hidroxibenzaldehído (**8**), en la que el producto obtenido fue la cumarina **13** (entrada 2, Tabla 3).



Esquema 22: Mecanismo propuesto para la formación de 4-vinilfenol.

A partir de estos resultados es evidente que sólo aldehídos 4-hidroxi-sustituidos conducen al vinilfenol correspondiente. Presumiblemente, a partir de benzaldehídos 2-hidroxi- y 4-hidroxi sustituidos se puede obtener un metiluro de quinona intermedio (Esquema 23). Sin embargo, la estabilidad y la reactividad de los metiluros de *orto*- y *para*-quinona no son las mismas.¹⁶



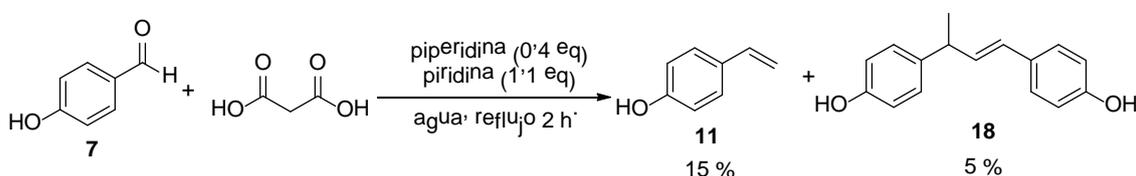
Esquema 23: Metiluros de quinona intermedios en la doble descarboxilación en la reacción de Knoevenagel-Doebner.

Los metiluros de quinona son intermedios reactivos comunes ampliamente empleados por la naturaleza, en particular en el mecanismo de acción mostrado por una variedad de compuestos bioactivos.^{17,18} La estabilidad de tales intermedios es esencial para evaluar el resultado de la reacción. Los metiluros *orto*-quinona son menos estables que los correspondientes isómeros *para*-¹⁶ y por lo tanto la formación de este último es favorecida. Teniendo esto en cuenta, la reacción de descarboxilación subsiguiente también se ve favorecida, produciéndose 4-vinilfenol. Cuando el benzaldehído de partida está sustituido en posición 2 por un grupo hidroxilo, se observa una vía más favorecida desde el punto de vista energético que la formación del metiluro de *orto*-quinona intermedio, obteniéndose un resultado diferente para la reacción. Con 2-hidroxibenzaldehído (**8**), se obtuvo la cumarina **13** (entrada 2, Tabla 3).

El hecho de que sólo 4-hidroxibenzaldehído sufre una segunda descarboxilación produciendo el correspondiente 4-vinilfenol, refuerza la idea de que un metiluro de quinona es un intermedio clave en esta reacción. Como se muestra en el Esquema 22, cuando se utilizó piperidina como organocatalizador, la reacción de Knoevenagel se inició con la formación del ion iminio **14**. Esto ha sido propuesto como un modo de activación en las reacciones organocatalizadas por aminas secundarias (tales como piperidina, pirrolidina o prolina).¹⁹ De acuerdo con la Ruta 1 del Esquema 22, el β -aminoácido **16** puede experimentar una reacción de β -eliminación que conduce al ácido 4-hidroxicinámico. También se puede dar la

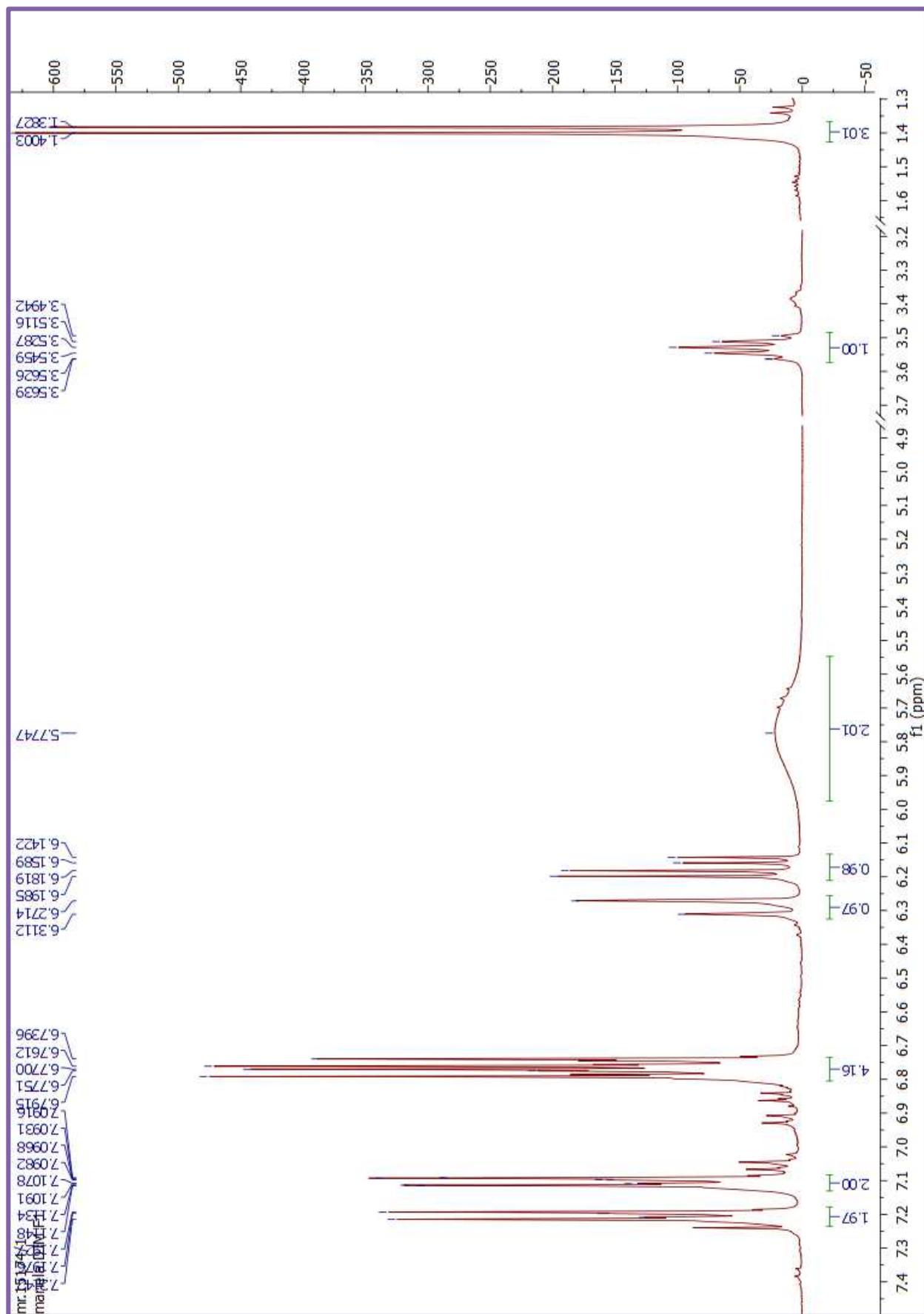
eliminación 1,6 de la piperidina, que conduce al metiluro de quinona **17** (Ruta 2, Esquema 22). En presencia de una base, el grupo fenol del metiluro de quinona se desprotona. La formación de este intermedio clave es la fuerza impulsora para la segunda descarboxilación, obteniéndose el producto **11** después de una protonación durante el work-up. Cuando el grupo fenólico está ausente o protegido, el metiluro de quinona no se obtiene y por lo tanto la segunda descarboxilación no tiene lugar y el producto es el ácido carboxílico α,β -insaturado que se obtiene por la Ruta 1.

Tanto la etapa de eliminación para obtener el ácido carboxílico α,β -insaturado como la descarboxilación que conduce a 4-vinilfenol, se espera que sean afectadas por las propiedades de los disolventes, tales como polaridad. Por lo tanto, se realizó la reacción en agua. Se puede esperar que el aumento de la constante dieléctrica aumente tanto la conversión global como la relación de 4-vinilfenol/ácido. Contrariamente a estos supuestos, cuando se realizó la reacción en agua (constante dieléctrica del agua, 20 °C = 80,1, constante dieléctrica de piridina, 20 °C = 13,26)²⁰ se obtuvo un resultado diferente (Esquema 24).



Esquema 24: Condensación de Knoevenagel-Doebner de 4-hidroxibenzaldehído con ácido malónico en agua como disolvente.

Durante la reacción se observó la formación de un nuevo producto **18**, que por datos espectroscópicos (Figura 17) corresponde con la estructura propuesta. Este producto podría ser obtenido por la dimerización de 4-vinilfenol.¹⁴ En la Figura 17, se muestra el espectro ¹H-RMN del compuesto **18**.



4.3. Síntesis de fenilglicidatos y precursores.

4.3.1. Epoxidación enzimática.

Los fenilglicidatos (Figura 18) y derivados, así como estructuras relacionadas, son sintones altamente versátiles para la preparación de una gran variedad de intermedios farmacéuticos.²¹⁻²⁷

En esta parte del trabajo se trató de preparar fenilglicidatos funcionalizados a través de la epoxidación enzimática de olefinas deficientes de electrones, como lo son los ácidos y ésteres α,β -insaturados. La epoxidación de estos sustratos, previamente sintetizados, se llevó a cabo empleando las lipasas A y B de *C. antarctica* (CAL A y CAL B)²⁸⁻³¹ y peroxidasa de rabanito picante (HRPO)^{32,33} y un complejo de peróxido de hidrógeno-urea (UHP) como oxidante. A fin de comparar los resultados, se llevó a cabo la epoxidación química con ácido *m*-cloroperbenzoico y Oxone[®].³⁴

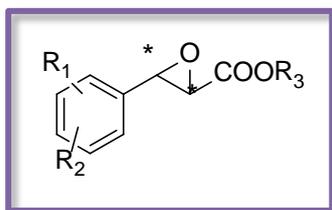
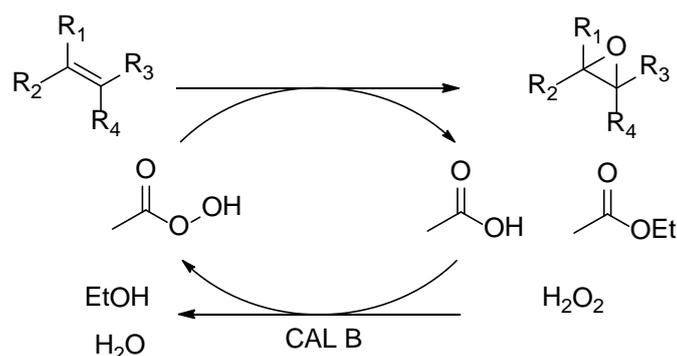


Figura 18: Estructura general de fenilglicidatos.

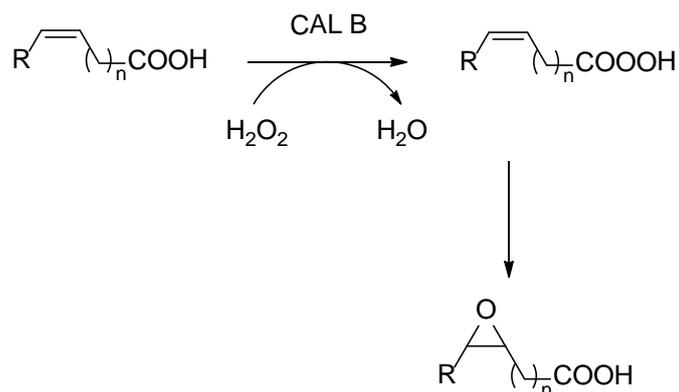
4.3.1.1. Epoxidación de ácidos carboxílicos α,β -insaturados.

Según lo descrito en la literatura,²⁸ en la epoxidación mediada enzimáticamente por CAL B, el AcOEt forma el ácido peracético, que es el encargado de epoxidar el doble enlace (Esquema 25).



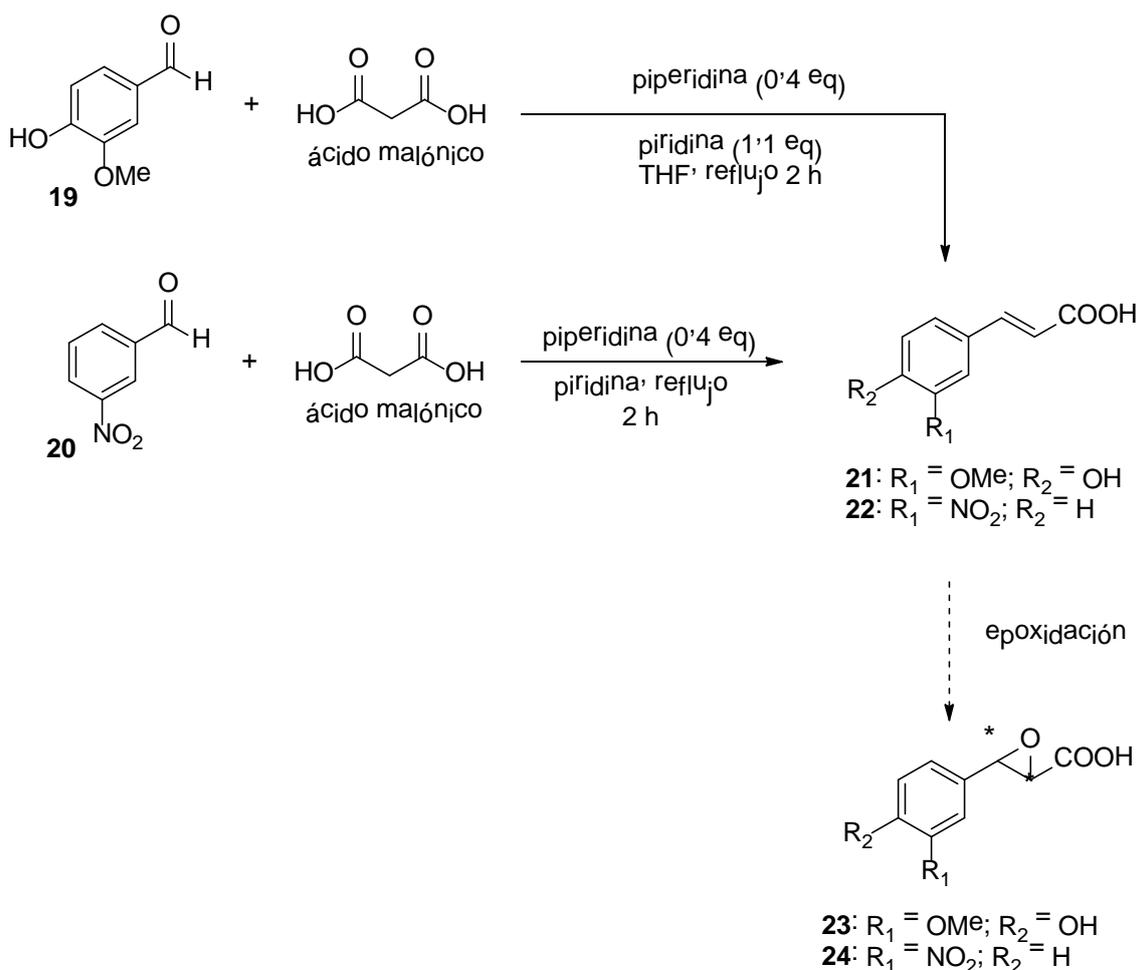
Esquema 25: Epoxidación de alquenos mediada por CAL B.²⁸

Estando el grupo ácido carboxílico en la olefina a epoxidar, el perácido se podría formar en dicho grupo sin necesidad del agregado adicional tanto de un ácido (como ácido octanoico) o de acetato de etilo (Esquema 26). Esta metodología es ampliamente utilizada en la epoxidación de ácidos grasos insaturados.³⁰



Esquema 26: Auto-epoxidación de ácidos grasos insaturados vía formación de perácido mediada por CAL B.³⁰

Por lo explicado anteriormente, es que se probaron estas dos metodologías (con y sin AcOEt) para la preparación de los epóxidos de ácidos carboxílicos α,β -insaturados, así como también la epoxidación química. En el Esquema 27 se muestra la ruta sintética planteada para la preparación de estos epóxidos. En la Tabla 4 se muestran las condiciones de reacción ensayadas y los resultados obtenidos.



Esquema 27: Ruta sintética para la preparación de los epóxidos de ácidos carboxílicos α,β -insaturados.

Tabla 4: Condiciones de epoxidación de ácidos carboxílicos α,β -insaturados y resultados obtenidos.

Entrada	Condiciones de reacción	Tiempo (h)	Producto	Rendimiento (%)
1	UHP/AcOEt/CAL B/37 °C/ 150 rpm	72	23	----
			24	----
2	UHP/CAL B/37 °C / 150 rpm	72	23	----
			24	----
3	<i>m</i> CPBA/CH ₂ Cl ₂ /TA	72	23	----

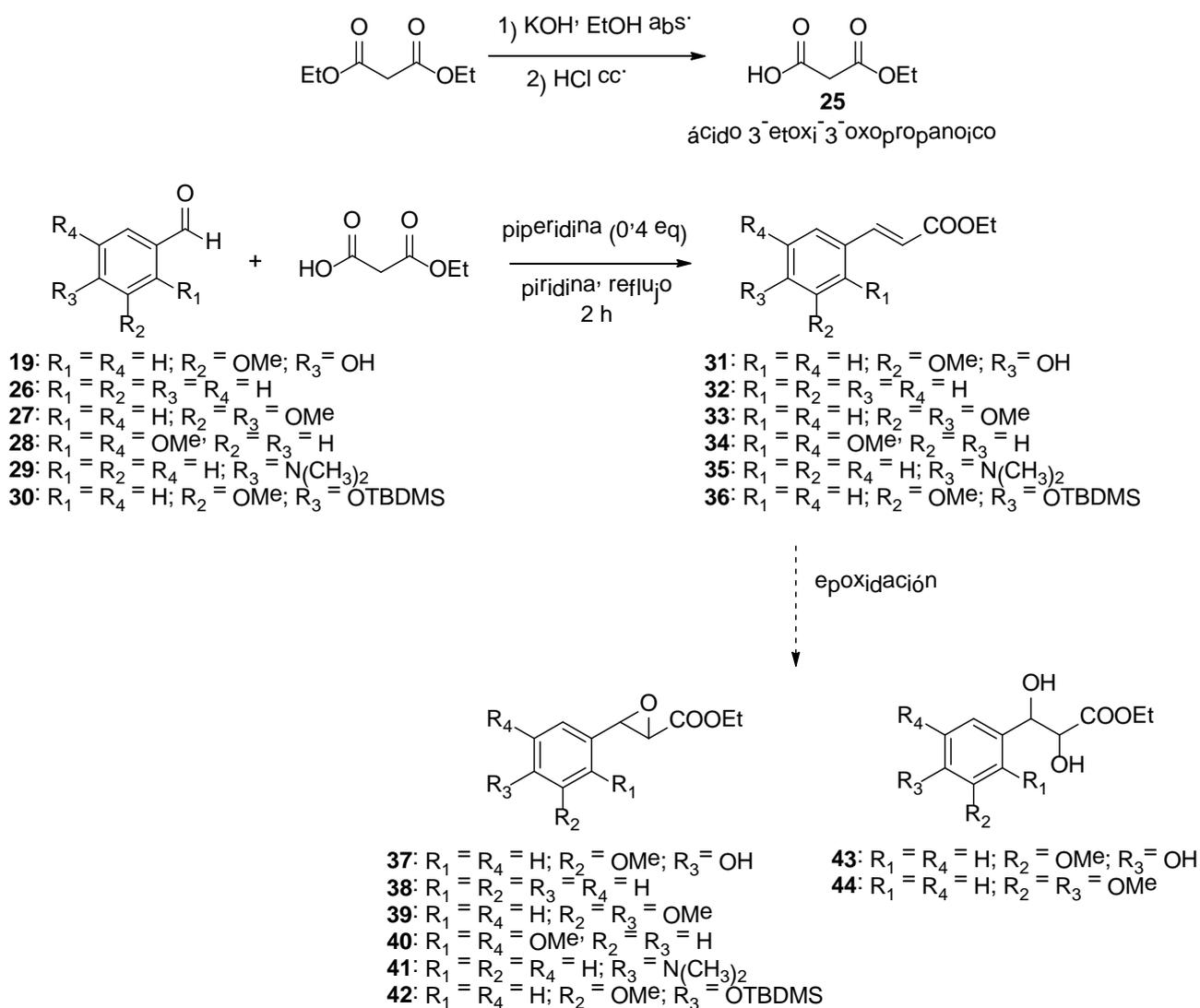
Tanto la epoxidación mediada enzimáticamente como la química no condujeron al epóxido cuando se utilizaron ácidos carboxílicos como sustratos. Estos grupos funcionales son fuertes atrayentes de electrones, lo que disminuye más aún la nucleofilia de este tipo de doble enlace. En la

epoxidación enzimática el sustrato permanece incambiado después de las 72 horas de reacción y en la química ocurre descomposición del mismo.

4.3.1.2. Epoxidación de ésteres etílicos α,β -insaturados.

En vista de que la epoxidación de ácidos carboxílicos α,β -insaturados no condujo a los productos deseados, se probó con los correspondientes ésteres α,β -insaturados.

En el Esquema 28 se muestra la ruta sintética planteada y en la Tabla 5 las condiciones ensayadas y los resultados obtenidos.



Esquema 28: Ruta sintética para la preparación de los epóxidos de ésteres etílicos α,β -insaturados.

Tabla 5: Condiciones de epoxidación de ésteres etílicos α,β -insaturados y resultados obtenidos.

Entrada	Condiciones de reacción	Tiempo (h)	Producto	Rendimiento (%)
1	UHP/AcOEt/CAL B/37 °C/ 150 rpm	96	37	4
		48	38	----
		48	39	7
		96	40	----
		96	41	----
2	UHP/BzOEt/CAL B/ Hexanos/37 °C/150 rpm	48	40	trazas
3	UHP/Ácido octanoico/ CAL B/Hexanos/37 °C/ 150 rpm	48	39	trazas
4	UHP/AcOEt/CAL B/Buffer pH=9/37 °C/150 rpm	48	39	trazas
5	UHP/Ácido octanoico/ CAL B/Tolueno/Buffer pH=9/37 °C/150 rpm	48	39	trazas
6	UHP/Ácido laurico/CAL B/ Tolueno/MW (50 °C)	12	39	trazas
7	UHP/Ácido laurico/CAL A/ Tolueno/37 °C/150 rpm	48	39	----
8	UHP/Ácido laurico/CAL A/ Tolueno/MW (50 °C)	12	39	----
9	UHP/HRPO/Buffer pH=6,5/ 37 °C/150 rpm	24	37	----
		240	42	----
10	<i>m</i> CPBA/CH ₂ Cl ₂ /TA	8	37	3
		8	38	----
		24	39	----
		8	40	----
		8	43	9
11	Oxone®/NaHCO ₃ /Acetona/ CH ₃ CN/H ₂ O/TA	48	39	6
		48	44	12

Con ninguna de las condiciones enzimáticas ensayadas se logró obtener el epóxido con buenos rendimientos, recuperándose material de partida y otros productos no identificados. Sólo los ésteres 4-hidroxi-3-metoxi- y 3,4-dimetoxi- sustituidos (**31** y **33** respectivamente) condujeron a los epóxidos

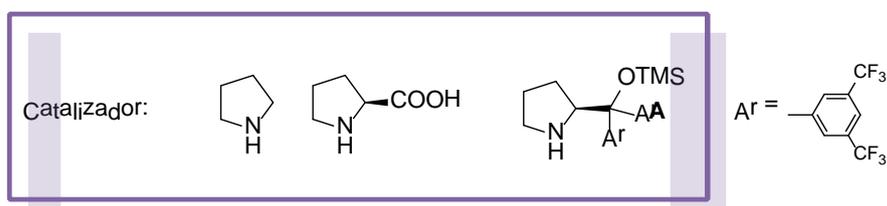
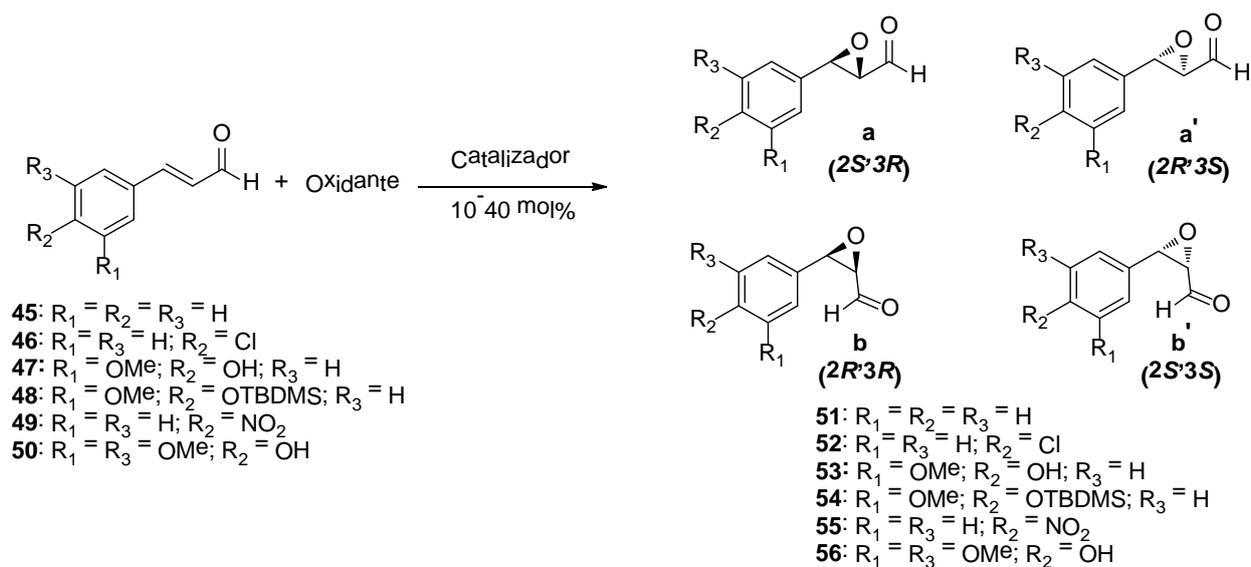
37 y **39** respectivamente, con muy bajos rendimientos (entrada 1, Tabla 5) y con algunas de las condiciones sólo trazas (entradas 2-6, Tabla 5). Con la utilización de microondas como fuente de energía, se disminuyó el tiempo de reacción, aunque no se logró mejorar el rendimiento (entrada 8, Tabla 5). La utilización de la lipasa A de *C. antarctica*, tampoco condujo al epóxido deseado (entradas 7 y 8, Tabla 5). Utilizando la enzima HRPO, no se obtuvieron los epóxidos en ningún caso. Cuando el sustrato tiene el grupo hidroxilo libre, el producto obtenido podría tratarse de un dímero^{35,36} y cuando el sustrato tiene el grupo hidroxilo protegido, no se observó reacción, recuperándose el material de partida (entrada 9, Tabla 5).

Con la epoxidación química con *m*CPBA se obtuvo el epóxido **37** con bajo rendimiento y otro producto que corresponde, de acuerdo a los datos espectroscópicos, al epóxido abierto (diol **43**) (entrada 10, Tabla 5). Cuando se utilizó Oxone[®], ocurre lo mismo que con *m*CPBA, con un tiempo de reacción más prolongado que con éste. Los productos de esta reacción fueron el epóxido **39** y el diol **44** con un 6 % y un 12 % de rendimiento respectivamente (entrada 11, Tabla 5).

4.3.2. Epoxidación organocatalítica.

Debido a que no se logró la síntesis de fenilglicidatos por epoxidación directa de ácidos y ésteres α,β -insaturados, en esta etapa se trata de epoxidar aldehídos α,β -insaturados, precursores de dichos fenilglicidatos.

A continuación se describe la epoxidación organocatalítica de aldehídos α,β -insaturados, utilizando como catalizadores pirrolidina, L-prolina y un derivado quiral de pirrolidina (Esquema 29). Como agentes oxidantes se utilizaron peróxido de hidrógeno, UHP y *t*-butilhidroperóxido. Cinamaldehído (**45**) se utilizó como aldehído α,β -insaturado modelo para optimizar las condiciones de reacción.



Esquema 29: Ruta sintética organocatalítica para la preparación de los epóxidos de aldehídos α,β -insaturados.

Las condiciones de reacción ensayadas y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Condiciones de epoxidación de aldehídos α,β -insaturados y resultados obtenidos.

Entrada	Condiciones de reacción	Tiempo (h)	Producto	<i>rd</i> (aa':bb') [*]	<i>ee</i> (%) (a) ^{**}
1	L-Prolina (0,3 eq)/H ₂ O ₂ 30% (7,0 eq)/Et ₃ N (0,8 eq)/CH ₂ Cl ₂ /TA	48	51	----	----
2	<i>m</i> CPBA/CH ₂ Cl ₂ /TA	72	51	----	----
3	L-Prolina (0,4 eq)/H ₂ O ₂ 30% (1,7 eq)/DBU (1,1 eq)/CH ₂ Cl ₂ /TA	48	51	47:53	----
4	L-Prolina (0,4 eq)/ <i>t</i> -BuOOH 90% (2,0 eq)/DBU (1,1 eq)/CH ₂ Cl ₂ /TA	36	51	43:57	----
5	L-Prolina (0,4 eq)/ <i>t</i> -BuOOH 90% (1,2 eq)/DBU (1,1 eq)/CH ₂ Cl ₂ /TA	6	51	43:57	----
6	L-Prolina (0,4 eq)/ UHP (2,2 eq)/DBU (1,1 eq)/ CH ₂ Cl ₂ /TA	120	51	48:52	----
7	Pirrolidina (0,4 eq)/ <i>t</i> -BuOOH 90% (1,7 eq)/ DBU (1,1 eq)/CH ₂ Cl ₂ /TA	21	51	57:43	----
8	Pirrolidina (0,4 eq)/ H ₂ O ₂ 30% (1,7 eq)/DBU (1,1 eq)/CH ₂ Cl ₂ /TA	120	51	46:54	----
9	A (0,1 eq)/ <i>t</i> -BuOOH 90% (1,5 eq)/CH ₂ Cl ₂ /TA	24	51	88:12	94
10	A (0,1 eq)/UHP (2,2 eq)/CH ₂ Cl ₂ /TA	24	51	92:8	96
11	A (0,1 eq)/H ₂ O ₂ 50% (1,5 eq)/CH ₂ Cl ₂ /TA	6	51	97:3	96
		4	52	94:6	99
		3	55	98:2	97
12	A (0,1 eq)/ H ₂ O ₂ 50% (3,5 eq)/CH ₂ Cl ₂ /TA	120	53	----	----
13	A (0,2 eq)/ <i>t</i> -BuOOH 90% (3,5 eq)/CH ₂ Cl ₂ /TA	120	54	93:7	97
		168	56	92:8	98

^{*} *rd* determinada por GC y ¹H-RMN.

^{**} *ee* determinado por GC quiral. Asignación de la configuración absoluta por comparación con datos de literatura.³⁷⁻³⁹

En todos los casos la conversión del sustrato fue del 100%, no obteniéndose más de un 32% de rendimiento de producto aislado debido a dificultades en su purificación por cromatografía en columna.

La relación diasteromérica (*rd*) fue determinada por GC y ¹H-RMN y el exceso enantiomérico (*ee*) por GC quiral. La configuración absoluta de los carbonos quirales fue asignada por comparación con los datos de literatura.³⁷⁻³⁹

Con L-prolina como catalizador se obtuvo el epóxido deseado **51** cuando se utilizaron H₂O₂, *t*-BuOOH y UHP como agentes oxidantes (entradas 3-6, Tabla 6), con una relación diasteromérica moderada. El tiempo de reacción disminuyó notoriamente con 1,2 eq de *t*-BuOOH. Con pirrolidina como catalizador, se obtuvieron diferentes relaciones diasteroméricas según el agente oxidante empleado, *t*-BuOOH o H₂O₂, observándose también variaciones en el tiempo de reacción requerido para consumir completamente el reactivo (entradas 7 y 8, Tabla 6).

Ninguno de estos dos catalizadores indujo una estereoquímica determinada en el producto obtenido a pesar de que la L-prolina es una amina quiral.

La Figura 19 muestra el cromatograma no quiral (*Programa 6*) de la mezcla diasteromérica **51** con las condiciones de reacción de la entrada 5, Tabla 6. En dicho cromatograma pueden verse dos picos de tiempos de retención 9,5 y 10,1 minutos que corresponden a los diasterómeros **bb'** y **aa'** respectivamente, con una relación diasteromérica *rd* de 43:57 (*aa'*:*bb'*). En la Figura 20 se muestra la cromatografía gaseosa quiral, en las condiciones del *Programa 1*, en la que se observan los cuatro picos correspondientes a cada par de enantiómeros de cada diasterómero.

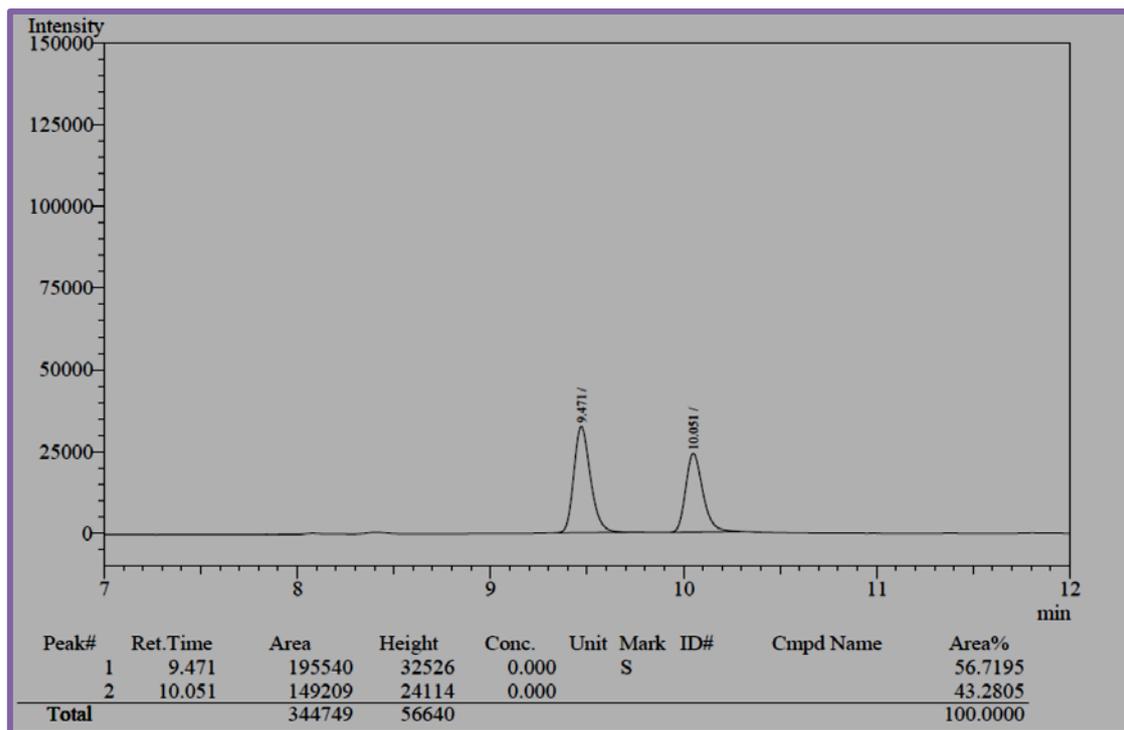


Figura 19: Cromatograma no quiral (*Programa 6*) de la mezcla diastereomérica **51**, obtenida con las condiciones de reacción de la entrada 5, Tabla 6.

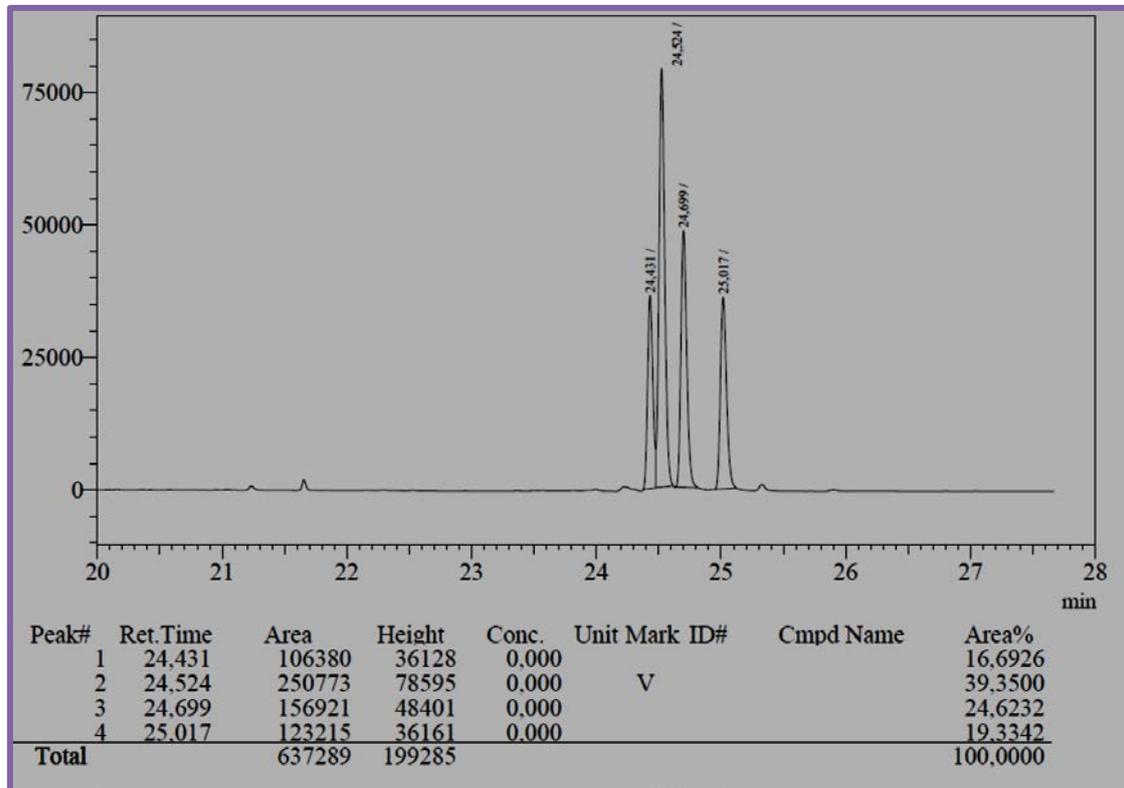


Figura 20: Cromatograma quiral (*Programa 1*) de la mezcla diastereomérica **51**, obtenida con las condiciones de reacción de la entrada 5, Tabla 6.

La presencia de los dos diastereómeros fue confirmada por ^1H -RMN. En la Figura 21 se muestra el espectro de la mezcla diastereomérica **51**, donde pueden verse duplicadas las señales de los protones del epóxido, correspondientes a cada uno de los diastereómeros.

Por las constantes de acoplamiento J de los protones base de los epóxidos puede saberse de qué diastereómero se trata. Una $J = 4,5$ Hz corresponde a una estructura en la que los protones están en *syn* con respecto al plano del epóxido, por lo tanto se trata del diastereómero **51bb'**. Con una $J = 1,8$ Hz, los protones se encuentran en *anti* con respecto al plano del epóxido y corresponde al diastereómero **51aa'**.^{40,41}

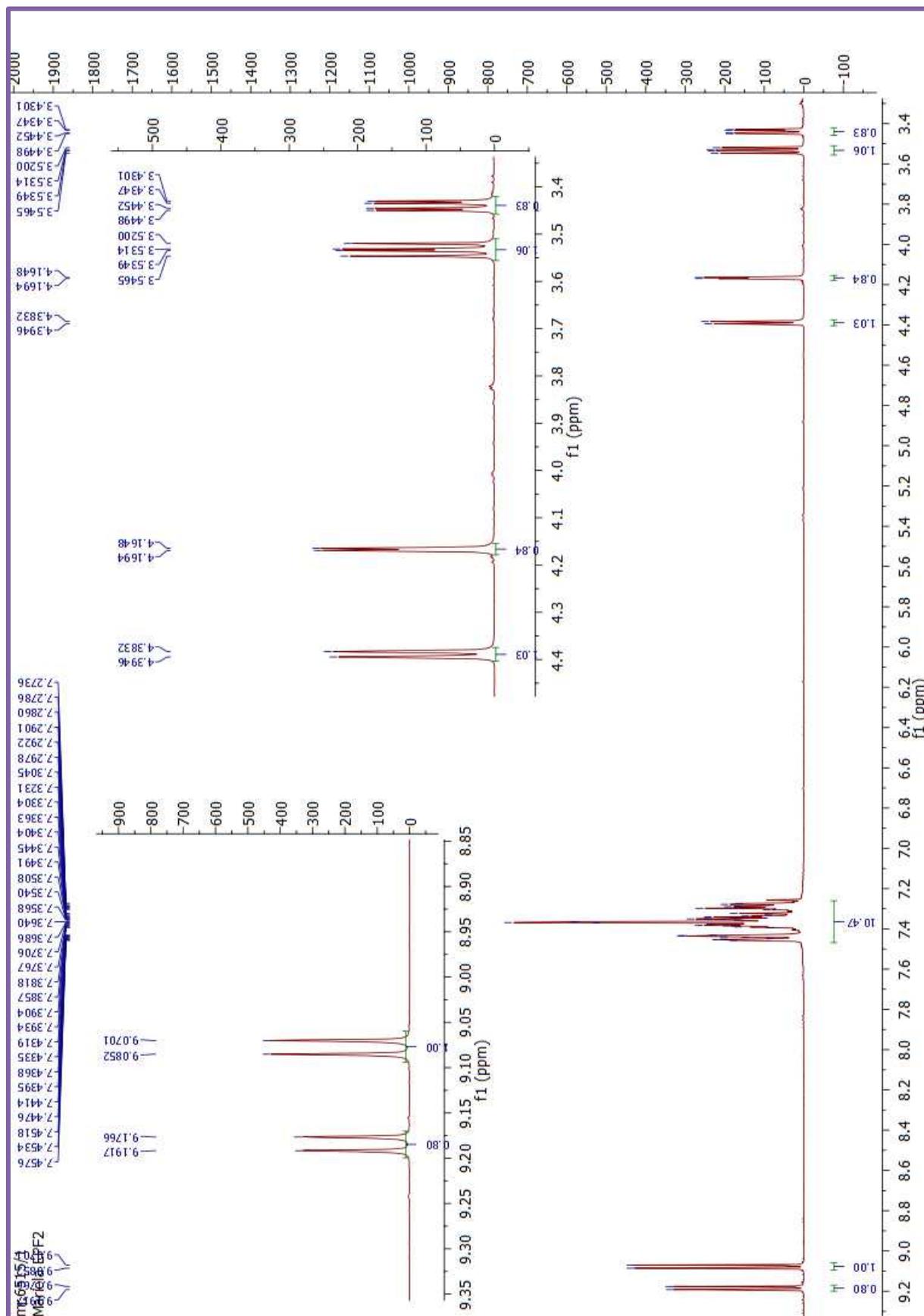


Figura 21: Espectro de ^1H -RMN de la mezcla diastereomérica **51**, obtenida con las condiciones de reacción de la entrada 5, Tabla 6.

Cuando se utilizó el catalizador quiral (*S*)-2-[bis(3,5-bis(trifluorometil)fenil)(trimetilsililo)metil]pirrolidina (**A**), para la reacción de epoxidación de cinamaldehído (**45**), el correspondiente epóxido **51** se obtuvo con una *rd* de 88:12, 92:8 y 97:3 cuando se utilizaron como agentes oxidantes *t*-BuOOH, UHP y H₂O₂ respectivamente. Los *ee* obtenidos para estas mismas condiciones fueron 94, 96 y 96% respectivamente (entradas 9-11, Tabla 6). Los mejores *rd* y *ee* se obtuvieron utilizando 0,1 eq del catalizador **A** y 1,5 eq de H₂O₂ 50% (entrada 11, Tabla 6).

En las Figuras 22 y 23 pueden verse los cromatogramas, tomados con las mismas condiciones cromatográficas que los anteriormente mostrados para la mezcla diastereomérica, del epóxido **51** con las condiciones de reacción de la entrada 11, Tabla 6. Ahora, los diastereómeros que aparecen a tiempos de retención 9,4 y 10,0 minutos, del cromatograma de la Figura 22, presentan una *rd* de 97:3 (aa':bb'). Del cromatograma de la Figura 23 se obtuvo el *ee* de 96 % para el enantiómero **a**.

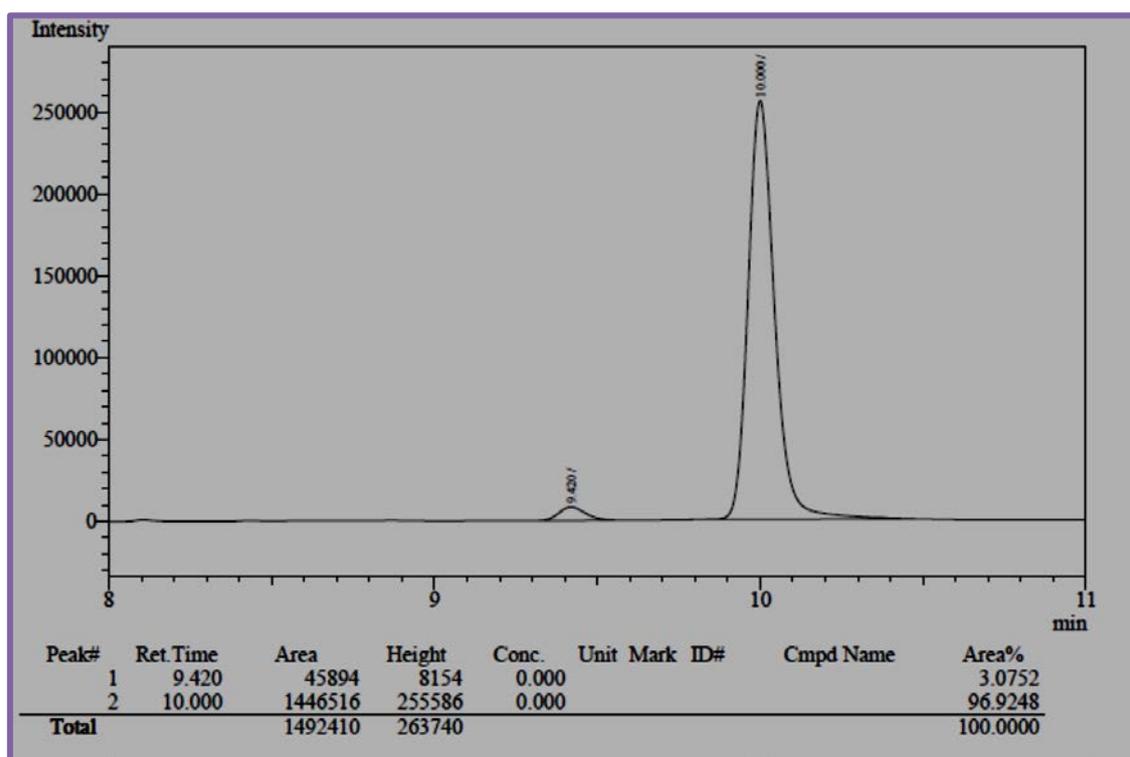


Figura 22: Cromatograma no quiral (*Programa 6*) de **51**, obtenido con las condiciones de reacción de la entrada 11, Tabla 6.

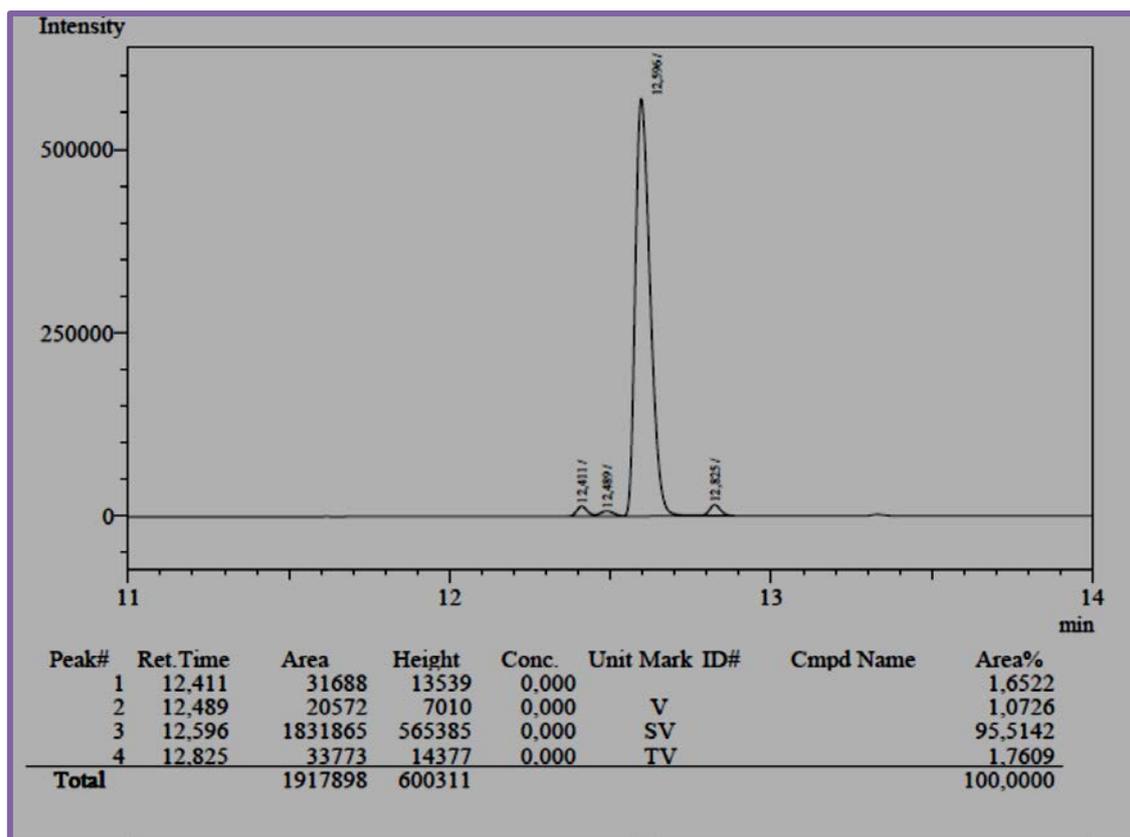


Figura 23: Cromatograma quiral (*Programa 2*) de **51**, obtenido con las condiciones de reacción de la entrada 11, Tabla 6.

Si se comparan los espectros de ^1H -RMN de las Figuras 21 y 24, se ve claramente que las señales de uno de los diastereómeros prácticamente desaparecen.

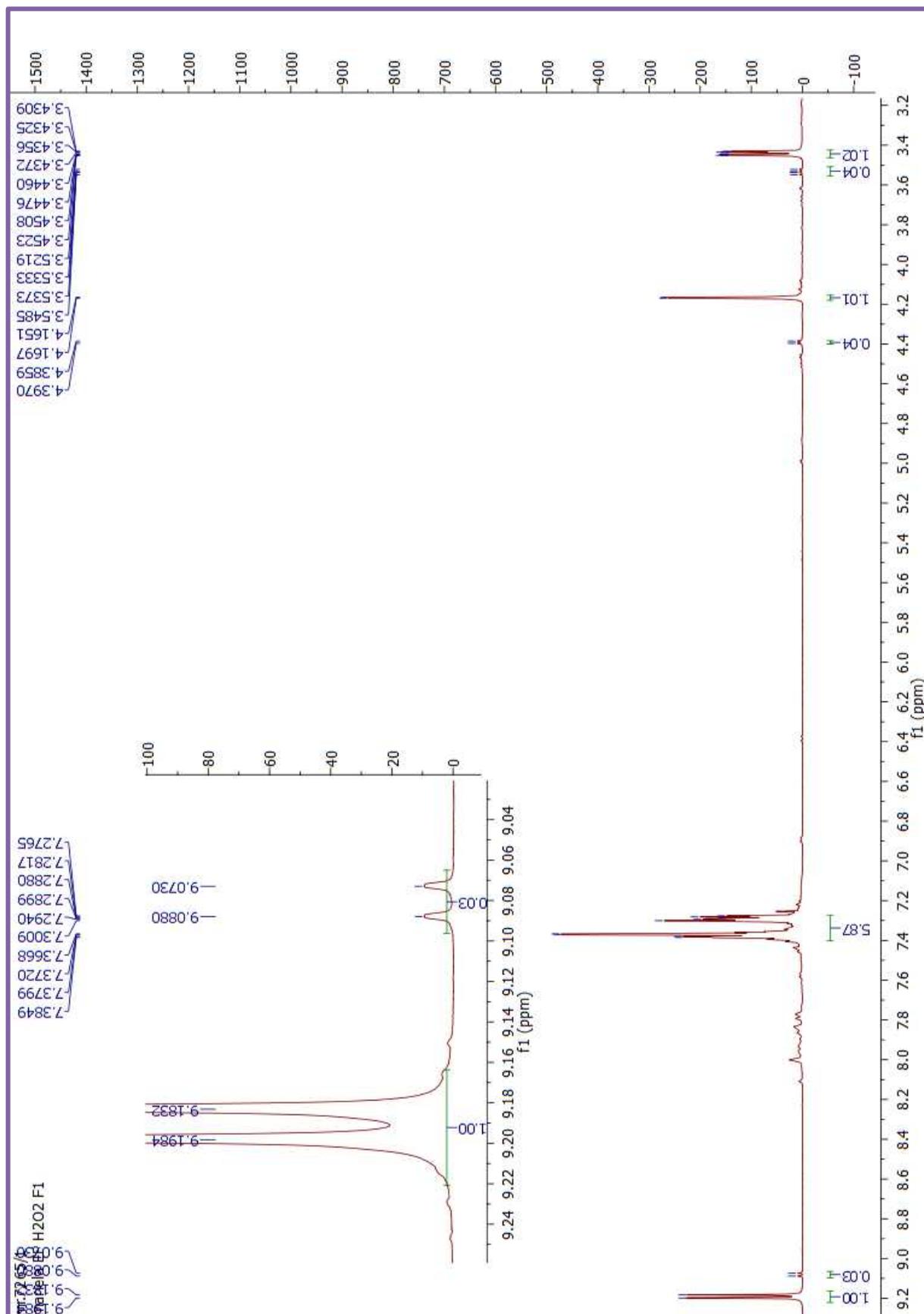
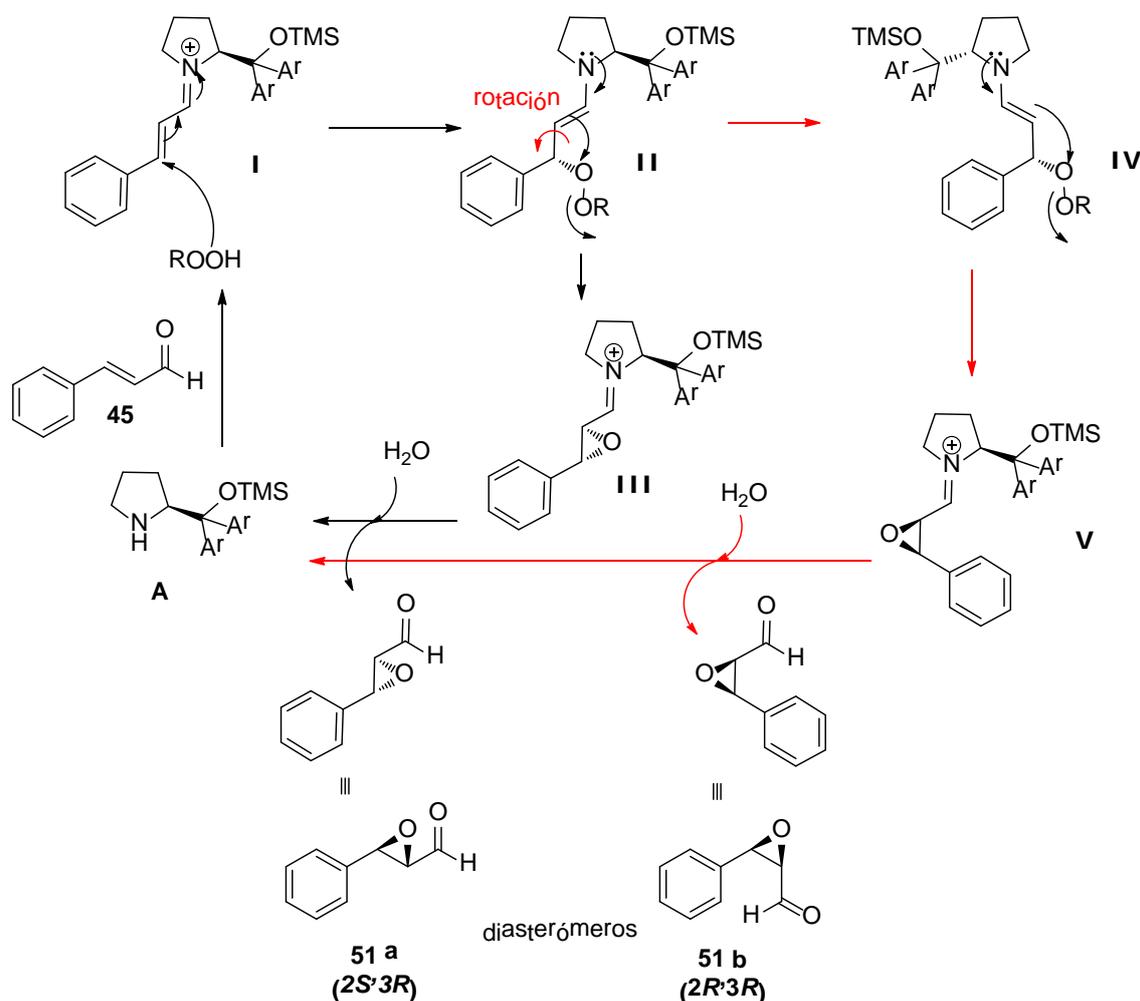


Figura 24: Espectro de ^1H -RMN de **51**, obtenido con las condiciones de reacción de la entrada 11, Tabla 6.

La estereoquímica absoluta de la epoxidación asimétrica catalizada por la amina quiral **A** derivada de pirrolidina fue establecida por comparación de la rotación óptica del epoxialdehído **51**, $[\alpha]_D^{22} = -16,4$ (c 2,5; MeOH) con datos de literatura, $[\alpha]_D^{23} = +14,3$ (c 0,48; CHCl_3)³⁷, lo que reveló que la estereoquímica absoluta de **51** es (2*S*,3*R*).^{38,42}

El mecanismo propuesto para la epoxidación de aldehídos α,β -insaturados se presenta en el Esquema 30.^{38,42,43}



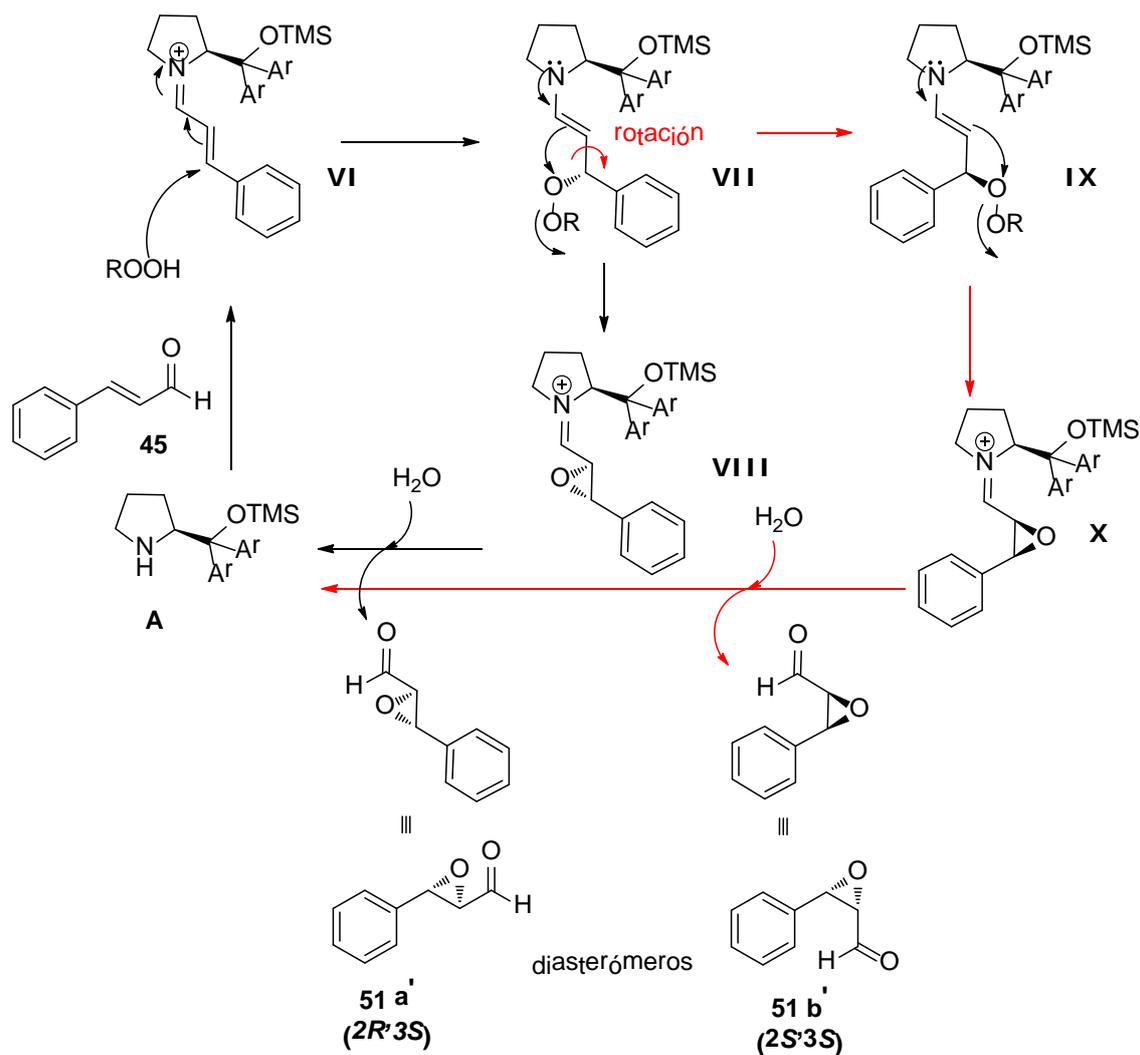
Esquema 30: Mecanismo propuesto para la epoxidación de aldehídos α,β -insaturados para obtener los diastereómeros **a** y **b**.^{38,42,43}

La reacción comienza con la activación del aldehído α,β -insaturado por la formación del ion iminio **I** con la pirrolidina quiral **A**, seguido por el ataque nucleofílico estereoselectivo del agente oxidante sobre el carbono conjugado

β , dando la enamina correspondiente **II**. A continuación, la enamina quiral **II** ataca nucleofílicamente al peróxido, seguido por la hidrólisis del resultante ion iminio intermedio **III**.

La alta enantioselectividad observada en la obtención de **51 a** es explicable debido a la estabilización de la configuración del ion iminio **I** intermedio (*trans*) así como del blindaje de una de las caras de los intermedios iminio **I** y enamina **II**, por los grupos arilo voluminosos. El diastereómero **51 b** implica un intermedio enamina **IV**, en el cual los grupos arilo y el peróxido se encuentran del mismo lado, configuración menos estable que la de la enamina **II**.

Para la obtención del enantiómero **51 a'** (Esquema 31), la configuración del intermedio iminio **VI** debe ser *cis*, menos estable que el iminio **I**. Su correspondiente diastereómero **51 b'**, implica también el iminio *cis* **VI** pero además la enamina **IX**, con los grupos voluminosos del mismo lado, bajando más la estabilidad.



Esquema 31: Mecanismo probable de la epoxidación de aldehídos α,β -insaturados para obtener los diastereómeros **a'** y **b'**.^{38,42,43}

Por lo tanto, utilizando el catalizador **A** con todos los aldehídos α,β -insaturados probados, se obtuvieron relaciones diastereoméricas y excesos enantioméricos altos, evidenciando que tales catalizadores generan una alta inducción asimétrica (entradas 9-13, Tabla 6).

Cuando se utilizaron sustratos con el anillo aromático sustituido con grupos aceptores de electrones, los tiempos de reacción disminuyeron con respecto a los tiempos de reacción de los sustratos sustituidos con grupos dadores de electrones (entradas 11-13, Tabla 6). Además, tanto la carga de catalizador y la del agente oxidante, para obtener los correspondientes epóxidos con sustituyentes dadores de electrones en el anillo aromático, debieron ser

mayores que las utilizadas para la obtención de los epóxidos de los aldehídos α,β -insaturados con sustituyentes aceptores de electrones en el anillo aromático.

4.4. Referencias bibliográficas

- (1) Mori, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7505.
- (2) Ravía, S. P.; Risso, M.; Kröger, S.; Vero, S.; Seoane, G.; Gamenara, D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24*, 1207.
- (3) Kalaitzakis, D.; Kambourakis, S.; Rozzell, D. J.; Smonou, I. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2418.
- (4) Kalaitzakis, D.; Rozzell, D. J.; Kambourakis, S.; Smonou, I. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, 2309.
- (5) Proyecto de investigación: "Síntesis de feromonas de agregación de *Sitophilus granarius* y *Sitophilus orizae*, plagas (de granos almacenados) de importancia económica en Uruguay". Programa de Desarrollo Tecnológico (PDT).
- (6) Proyecto de investigación: "Development of pheromone-based tools for the reduction of pesticide use in the management of agricultural pests in Uruguay: chemical characterization and chemoenzymatic synthesis of pheromones". Organization for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW).
- (7) Kröger, S. In *Departamento de Química Orgánica*; Facultad de Química, UdelaR: Montevideo, 2008; Vol. Informe de Licenciatura.
- (8) Risso, M.; Mazzini, M.; Kröger, S.; Saenz-Méndez, P.; Seoane, G.; Gamenara, D. *Green Chem. Lett. Rev.* **2012**, *5*, 539.
- (9) Yadav, G. D.; Lathi, P. S. *J. Mol. Cat. A: Chemical* **2004**, *223*, 51.
- (10) Yadav, G. D.; Lathi, P. S. *Synth. Commun.* **2005**, *35*, 1699.
- (11) Yadav, G. D.; Sajgure, A. D. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2007**, *82*, 964.
- (12) Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656.
- (13) Tanaka, M.; Oota, O.; Hiramatsu, H.; Fujiwara, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1988**, *61*, 2473.
- (14) Aldabalde, V.; Risso, M.; Derrudi, M. L.; Geymonat, F.; Seoane, G.; Gamenara, D.; Saenz-Méndez, P. *Open J. Phys. Chem.* **2011**, *1*, 85.
- (15) Simpson, C. J.; Fitzhenry, M. J.; Stamford, N. P. J. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 6893.
- (16) Bouchoux, G. *Chem. Phys. Lett.* **2010**, *495*, 192.
- (17) Van De Water, R. W.; Pettus, T. R. R. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5367.
- (18) Zhou, Q.; Turnbull, K. D. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 2847.
- (19) List, B. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 5573.

- (20) Lide, D. R. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*; 84th. ed.; CRC Press: Boca Ratón, 2003-2004.
- (21) Appendino, G.; Cravotto, G.; Enriú, R.; Gariboldi, P.; Barboni, L.; Torregiani, E.; Gabetta, B.; Zini, G.; Bombardelli, E. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 607.
- (22) Hamamoto, H.; Mamedov, V. A.; Kitamoto, M.; Hayashib, N.; Tsuboib, S. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 4485.
- (23) Montavon, T. J.; Christianson, C. V.; Festin, G. M.; Shenb, B.; Brunera, S. D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 3099.
- (24) Cleij, M.; Archelas, A.; Furstoss, R. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5029.
- (25) Roldós, V.; Nakayama, H.; Rolón, M.; Montero-Torres, A.; Trucco, F.; Torres, S.; Vega, C.; Marrero-Ponce, Y.; Heguaburu, V.; Yaluff, G.; Gómez-Barrio, A.; Sanabria, L.; Ferreira, M. E.; Rojas de Arias, A.; Pandolfi, E. *Eur. J. Med. Chem.* **2008**, 1797.
- (26) Imashiro, R.; Seki, M. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4216.
- (27) Johansen, A. B.; Leduc, M. A. K. *Synlett* **2007**, *16*, 2593.
- (28) Ankudey, E. G.; Olivo, H. F.; Peeples, T. L. *Green Chem.* **2006**, *8*, 923.
- (29) Moreira, M. A.; Nascimento, M. G. *Cat. Comm.* **2007**, *8*, 2043.
- (30) Carboni-Oerlemans, C.; Domínguez de María, P.; Tuin, B.; Bargeman, G.; van der Meer, A.; van Gemert, R. *J. Biotech.* **2006**, *126*, 140.
- (31) Yadav, G. D.; Borkar, I. V. *AIChE Journal* **2006**, *52*, 1235.
- (32) Ortiz de Montellano, P. R.; Grab, L. A. *Biochemistry* **1987**, *1987*, 5310.
- (33) Rao, B.; Rao, M. V. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 279.
- (34) Hajra, S.; Bhowmick, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 2223.
- (35) Nishimura, R. T.; Giammanco, C. H.; Vosburg, D. A. *J. Chem. Ed.* **2010**, *87*, 526.
- (36) Zhang, A.; Lu, F.; Sun, R.; Ralph, J. *Planta* **2009**, *229*, 1099.
- (37) Nemoto, T.; Ohshima, T.; Shibasaki, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 9474.
- (38) Marigo, M.; Franzén, J.; Poulsen, T. B.; Zhuang, W.; Jørgensen, K. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6964.
- (39) Wang, X.; List, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1119.
- (40) Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; Kiemle, D. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*; 7th. ed.; Wiley, 2005.
- (41) Piazza, G. J.; Foglia, T. A.; Nuñez, A. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1998**, *75*, 939.
- (42) Zhao, G.-L.; Ibrahim, I.; Sundén, H.; Córdova, A. *Adv. Synth. Catal* **2007**, *349*, 1210.
- (43) Sundén, H.; Ibrahim, I.; Córdova, A. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *47*, 99.

Conclusiones y Trabajo Futuro

5. Conclusiones y Trabajo Futuro

5.1. Conclusiones

5.1.1. Transesterificación de β -cetoésteres catalizada por lipasas.

Se sintetizaron 4 β -cetoésteres mediante transesterificación catalizada por lipasas, utilizando 3-oxobutanoato de etilo y 3-oxopentanoato de etilo como dadores de acilo y (\pm)-2- y 3-pentanol como nucleófilos. Las reacciones se llevaron a cabo con irradiación de microondas y en sistemas sin disolventes. La evaluación de estas condiciones de reacción mostró que existe sinergia entre el biocatalizador y la irradiación por microondas como fuente de energía, lográndose aumentar las conversiones y disminuir los tiempos de reacción.

Los experimentos realizados utilizando CAL B como biocatalizador, posicionan a esta metodología como una alternativa “verde” a los métodos convencionales. Las reacciones se llevaron a cabo en tiempos de reacción cortos (alta conversión en 2 horas), con alta concentración de sustrato, work-up sencillo y disminución significativa de residuos generados.¹

La metodología desarrollada fue utilizada en la síntesis de (2*R*,3*S*)-sitofilato, feromona de agregación de *Sitophilus granarius*.²

La amplia reutilización del biocatalizador fue también un objetivo importante conseguido con la metodología ensayada, ya que se pudo desarrollar procesos económicamente viables, posibilitando así el escalado de las reacciones.

5.1.2. Síntesis de derivados de ácido cinámico.

Se realizó la reacción de Knoevenagel-Doebner para sintetizar ácidos carboxílicos α,β -insaturados, utilizando piridina y piperidina como organocatalizadores. Se analizó la condensación con benzaldehídos 2-hidroxi- y 4-hidroxisustituidos, con una carga de catalizador inferior a la

descrita en la literatura e interrumpiendo la reacción con HCl. Los productos obtenidos no fueron los ácidos carboxílicos esperados, sino que se obtuvieron una cumarina y 4-vinilfenol.

Los estudios realizados permitieron formular un mecanismo alternativo para la reacción de Knoevenagel-Doebner, diferente al planteado hasta el momento, basado en evidencias experimentales sobre el papel del catalizador y del disolvente.³

Cuando la reacción se llevó a cabo en condiciones distintas a la de los métodos convencionales, utilizando, por ejemplo, agua como disolvente, se obtuvo el dímero derivado de vinilfenol correspondiente.³

5.1.3. Síntesis de fenilglicidatos y precursores.

Se planteó la síntesis de fenilglicidatos y precursores, por epoxidación de olefinas deficientes de electrones, bajo condiciones suaves de reacción, tanto bio- como organocatalíticas.

La epoxidación organocatalítica se logró con el empleo de diferentes catalizadores y agentes oxidantes.

Los epóxidos sintetizados por organocatálisis, precursores de fenilglicidatos, se obtuvieron con alta diastereoselectividad y excelente enantioselectividad cuando el organocatalizador utilizado fue la amina quiral derivada de pirrolidina (**A**): (S)-2-[bis(3,5-bis(trifluorometil)fenil)(trimetilsililoxi) metil] pirrolidina

Todas las reacciones se realizaron en condiciones suaves y ambientalmente responsables, sin el uso de metales como catalizadores.

No se lograron funcionalizar sustratos de baja reactividad como los carboxilatos α,β -insaturados a través de epoxidación enzimática con CAL B.

Como conclusión general de este trabajo puede decirse que:

1. Se utilizaron diferentes metodologías sintéticas que incluyeron reacciones bio- y organocatalíticas. Se optimizaron todos los procesos involucrados, llegando a obtener, en la mayoría de los casos, buenos rendimientos y estereoselectividades, en tiempos de reacción cortos.^{1,3}
2. Con las metodologías desarrolladas, se lograron obtener bloques de construcción con una importante variación estructural, que se están comenzando a utilizar en el grupo para distintos propósitos sintéticos.²

5.2. Trabajo Futuro

Se plantea realizar el escalado de las reacciones de transesterificación de β -cetoésteres catalizada por lipasas para la obtención de cantidades importantes de bloques de construcción útiles.

Se buscará expandir la versatilidad encontrada de la reacción de Knoevenagel-Doebner para la obtención de otros bloques de construcción estructuralmente similares.

Se estudiarán modificaciones y se optimizarán los métodos de purificación de los epóxidos obtenidos mediante reacciones organocatalizadas, de modo aumentar los rendimientos en los producto aislados.

Se ensayará la apertura de los epóxidos con variados nucleófilos y obtener así estructuras altamente funcionalizadas.

5.3. Referencias bibliográficas

- (1) Risso, M.; Mazzini, M.; Kröger, S.; Saenz-Méndez, P.; Seoane, G.; Gamenara, D. *Green Chem. Lett. Rev.* **2012**, *5*, 539.
- (2) Ravía, S. P.; Risso, M.; Kröger, S.; Vero, S.; Seoane, G.; Gamenara, D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24*, 1207.
- (3) Aldabalde, V.; Risso, M.; Derrudi, M. L.; Geymonat, F.; Seoane, G.; Gamenara, D.; Saenz-Méndez, P. *Open J. Phys. Chem.* **2011**, *1*, 85.

Parte Experimental

6. Parte Experimental

6.1. Materiales y equipos.

Los reactivos químicos comerciales fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Inc. y se usaron sin purificación adicional. Los disolventes se purificaron y se secaron mediante procedimientos convencionales.¹ Las lipasas comerciales de *C. antártica* A y B, CAL A (NZL-101-IMB) y CAL B (Novozym 435) fueron adquiridas en Novozymes. La peroxidasa de rabanito picante (HRPO) se adquirió en Sigma-Aldrich Inc.

Para las reacciones en microondas se utilizó un horno doméstico marca Tem y un reactor de laboratorio monomodo CEM Corporation (Discovery) equipado con tubos Pyrex de 10 mL, septo hermético y agitación magnética.

Las reacciones de epoxidación biocatalíticas se llevaron a cabo en un shaker orbital Thermoforma, Modelo 420.

El avance de las reacciones se controló usando cromatografía en capa fina (TLC) de sílica gel (Kieselgel HF254 Macherey-Nagel) y se visualizó con luz UV (254 nm) y *p*-anisaldehído en disolución etanólica ácida. Para las cromatografías en columna se usó sílica gel flash (Kiesegel 60, 230-240 mesh Macherey-Nagel). Las cromatografías gaseosas (GC) se realizaron en Cromatógrafos Shimadzu Modelos 2010 y 2014, con detector de ionización de llama (FID), con una columna MEGADEX DET TBS β (25 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) para cromatografía gaseosa quiral y con una columna Carbowax 20M MEGA (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) para cromatografía gaseosa no quiral. Los programas de temperatura utilizados en cromatografía gaseosa quiral fueron: **Programa 1:** 40 °C / 3°/min / 90 °C / 10 °C/min / 150 °C (5 min), T_{SPL}: 220 °C, T_{FID}: 250 °C; **Programa 2:** 90 °C (5 min) / 10 °C/min / 170 °C (3 min), T_{SPL}: 220 °C, T_{FID}: 250 °C; **Programa 3:** 38 °C (10 min) / 1 °C/min / 60 °C / 10 °C/min / 150 °C (5 min), T_{SPL}: 220 °C, T_{FID}: 250 °C; **Programa 4:** 90 °C (5 min) / 10 °C/min / 200 °C (4 min), T_{SPL}: 220 °C, T_{FID}: 250 °C; **Programa 5:** 90 °C (5 min) / 10 °C/min / 210 °C (10 min), T_{SPL}: 220 °C, T_{FID}: 250 °C. Los programas de temperatura utilizados en

cromatografía gaseosa no quiral fueron: **Programa 6:** 80 °C / 15 °C/min / 220 °C (5 min), $T_{SPL.}$: 220 °C, $T_{FID.}$: 250 °C; **Programa 7:** 60 °C / 2 °C/min / 120 °C / 10 °C/min / 180 °C, $T_{SPL.}$: 220 °C, $T_{FID.}$: 250 °C; **Programa 8:** 60 °C / 12 °C/min / 175 °C (7 min) / 40 °C/min / 240 °C (3 min), $T_{SPL.}$: 220 °C, $T_{FID.}$: 250 °C.

La rotación específica fue medida a 22 °C en un polarímetro Krüss P8000 usando una celda de 0,5 dm. Los valores de $[\alpha]_D^{22}$ están dados en $^{\circ} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ y los valores de concentración se expresan en g/100 mL.

Para los espectros de masa (EM) se utilizó un equipo GC-MS QP-2010 Shimadzu. Los espectros de EI-EM (ionización electrónica-EM) fueron obtenidos en modo scan desde m/z 29 a 350.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN de ^1H y ^{13}C) se realizaron en un espectrómetro Bruker Avance DPX 400, a 30 °C, con CDCl_3 como disolvente (a no ser que se especifique lo contrario) en presencia de TMS como patrón interno. Los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en ppm y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz.

6.2. Síntesis.

6.2.1. Transesterificación de β -cetoésteres catalizada por lipasas.

6.2.1.1. Procedimiento general para la reacción de transesterificación en microondas doméstico.

Las reacciones de transesterificación catalizadas por las lipasas CAL A y CAL B se llevaron a cabo en un microondas doméstico a 400 W de potencia, por duplicado, en un tubo de ensayo y en ausencia de disolvente. El dador de acilo utilizado fue 3-oxobutanoato de etilo (**1**). La relación lipasa/dador de acilo (m/m) fue 0,3 y la relación dador de acilo/alcohol (eq/eq) fue 0,5. A una mezcla del dador de acilo y alcohol se le añade la enzima y se irradia con microondas a intervalos de a 5 minutos hasta conversión total. Se

tomaron alícuotas cada hora y se analizaron por TLC y GC. El producto de la transesterificación es el 3-oxobutanoato de 2-pentilo (**3**).²

Rendimiento (con CAL A): 76%

Rendimiento (con CAL B): 96%

GC (Programa 7): $t_{r1} = 17,5$ min.

$t_{r3} = 27,9$ min.

¹H-RMN: δ (ppm) = 5,04-4,96 (m; 1H, CH), 3,44 (s; 2H, CH₂), 2,29 (s; 3H, CH₃), 1,66-1,57 (m; 2H, CH₂), 1,39-1,35 (m; 2H, CH₂), 1,26 (d; $J=6,3$ Hz, 3H, CH₃), 0,94 (t; $J=7,3$ Hz, 3H, CH₃).

¹³C-RMN: δ (ppm) = 206,1; 171,2; 72,6; 50,9; 38,3; 30,4; 20,2; 18,9; 14,2.

6.2.1.2. Procedimiento general para la reacción de transesterificación en reactor de microondas.

Las reacciones de transesterificación catalizadas por la lipasa CAL B se llevaron a cabo en un reactor de microondas monomodo a 50 y 70 °C, por duplicado, en un tubo Pyrex hermético y en ausencia de disolvente. Los dadores de acilo utilizados fueron 3-oxobutanoato de etilo (**1**) y 3-oxopentanoato de etilo (**2**). La relación lipasa/dador de acilo (m/m) fue 0,3 y la relación dador de acilo/alcohol (eq/eq) fue 0,5 y 1 cuando se utiliza (±)-2- y 3-pentanol respectivamente. A una mezcla del dador de acilo y alcohol se le añade la enzima y se irradia con microondas durante dos horas. Se tomaron alícuotas a 30, 60 y 120 minutos y se analizaron por TLC y GC. Una vez completada la reacción, se filtró la enzima y el filtrado se purificó por cromatografía en columna (sílica gel flash, Hex:AcOEt 8:2).

3-oxobutanoato de 2-pentilo (3):

Rendimientos: 50 °C: 96%

70 °C: 67%

Espectroscopía descrita en sección 6.2.1.1.

3-oxobutanoato de 3-pentilo (4)²:

Rendimientos: 50 °C: 95%

70 °C: 59%

¹H-RMN: δ (ppm) = 4.86-4.77 (m; 1H, CH), 3,45 (s; 2H, CH₂), 2,30 (s; 3H, CH₃), 1,62-1,55 (m; 4H, CH₂), 0,91 (t; $J=7,3$ Hz, 6H, CH₃).

¹³C-RMN: δ (ppm) = 203,8; 167,6; 78,5; 49,7; 36,7; 26,7; 9,9.

3-oxopentanoato de 2-pentilo (5)²:

Rendimientos: 50 °C: 96%

70 °C: 59%

¹H-RMN: δ (ppm) = 4,92-5,00 (m; 1H, CH), 3,47 (s; 2H, CH₂), 2,57 (q; $J=7,2$ Hz, 2H, CH₂), 1,64-1,55 (m; 2H, CH₂), 1,43-1,37 (m; 2H, CH₂), 1,28 (d; $J=6,3$ Hz, 3H, CH₃), 1,09 (t; $J=6,9$ Hz, 3H, CH₃), 0,91 (t; $J=7,2$ Hz, 3H, CH₃).

¹³C-RMN: δ (ppm) = 203,6; 171,0; 71,4; 48,8; 37,8; 30,3; 19,9; 18,7; 14,3.

3-oxopentanoato de 3-pentilo (6)²:

Rendimientos: 50 °C: 97%

70 °C: 85%

¹H-RMN: δ (ppm) = 4,85-4,79 (m; 1H, CH), 3,46 (s; 2H, CH₂), 2,59 (q; $J=7,3$ Hz, 2H, CH₂), 1,63-1,56 (m; 4H, CH₂), 1,11 (t; $J=7,3$ Hz, 3H, CH₃), 0,91 (t; $J=7,3$ Hz, 6H, CH₃).

¹³C-RMN: δ (ppm) = 203,8; 167,6; 78,5; 49,7; 36,7; 26,7; 9,9; 7,9.

6.2.2. Síntesis de derivados de ácido cinámico.

6.2.2.1. Procedimiento general para la condensación de Knoevenagel en piridina.

1,0 g de ácido malónico (9,6 mmoles) se disolvió en 10 mL de piridina (124 mmoles). Se agregó el benzaldehído sustituido correspondiente (6,4 mmoles) y 0,24 mL de piperidina (2,4 mmoles). La mezcla se calentó a reflujo durante 2 horas. Luego de enfriar, la disolución se vertió en agua-hielo y se añadió HCl concentrado hasta pH = 3. La disolución acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se destiló a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílica gel flash, Hex:AcOEt 7:3).

Ácido 3-(4-hidroxifenil)-propenoico (9)³:

Rendimiento: 2 %

¹H-RMN (acetona-d₆): δ (ppm) = 9,09 (s; 1H, COOH), 7,64 (d; $J=16,0$ Hz, 1H, CH=CH-COOH), 7,57 (d; $J=8,8$ Hz, 2H, ArH₂H₆), 6,91 (d; $J=8,7$ Hz, 2H, ArH₃H₅), 6,36 (d;

$J=15,9$ Hz, 1H, CH=CH-COOH, 5,32 (s, 1H, OH).

^{13}C -RMN (acetona- d_6): δ (ppm) = 169,0; 155,8; 138,2; 129,9; 127,5; 116,5; 115,8.

4-vinilfenol (11)³:

Rendimiento: 60 %

^1H -RMN: δ (ppm) = 7,30 (d; $J=8,7$ Hz, 2H, Ar H_3H_5), 6,79 (d; $J=8,6$ Hz, 2H, Ar H_2H_6), 6,65 (dd; $J_1=17,6$ Hz, $J_2=10,9$ Hz, 1H, CH=CH $_2$), 5,60 (dd; $J_1=17,6$ Hz, $J_2=0,9$ Hz, 1H, CH=CH $_2$), 5,26 (s, 1H, OH), 5,12 (dd; $J_1=10,9$ Hz, $J_2=1,0$ Hz, 1H, CH=CH $_2$).

^{13}C -RMN: δ (ppm) = 155,3; 136,1; 130,6; 127,6; 115,4; 111,8.

2H-croman-2-ona (13)³:

Rendimiento: 15 %

^1H -RMN (acetona- d_6): δ (ppm) = 8,01 (d; $J=9,6$ Hz, 1H, CH=CH-C(O)O), 7,73-7,68 (m; 1H, Ar H_8), 7,66-7,61 (m; 1H, Ar H_6), 7,39-7,33 (m; 2H, Ar H_7H_9), 6.44 (d; $J=9,6$ Hz, 1H, CH=CH-C(O)O).

^{13}C -RMN (acetona- d_6): δ (ppm) = 159,7; 154,2; 143,7; 131,8; 128,3; 124,4; 119,1; 116,5; 116,4.

Ácido 3-(3-nitrofenil)-2-propenoico (22):

Rendimiento: 86 %

^1H -RMN (acetona- d_6): δ (ppm) = 8,54-8,52 (m; 1H, ArH_2), 8,30-8,27 (m; 1H, ArH_4), 8,16 (d; $J=7,7$ Hz, 1H, ArH_6), 7,85-7,72 (m; 2H, ArH_5 , $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$), 6,76 (d; $J=16,1$ Hz, 1 H, $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$).

^{13}C -RMN (acetona- d_6): δ (ppm) = 166,4; 148,9; 142,0; 136,5; 133,8; 130,3; 124,3; 122,6; 121,6.

6.2.2.2. Condensación de Knoevenagel en agua.

1,0 g de ácido malónico (9,6 mmol) se disolvió en 10 mL agua. Se agregaron 0,56 mL de piridina (7,0 mmoles), 0,78 g de 4-hidroxibenzaldehído (6,4 mmoles) y 0,24 mL de piperidina (2,4 mmoles). La mezcla se calentó a reflujo durante 2 horas. Luego de enfriar, la disolución se vertió en agua-hielo y se añadió HCl concentrado hasta $\text{pH} = 3$. La disolución acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y el disolvente se destiló a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílica gel flash, Hex:AcOEt 7:3).

4-vinilfenol (11):

Rendimiento: 15%

Espectroscopia descrita en sección 6.2.2.1

(E)-4,4'-(1-buteno-1,3-diil)-difenol (18)³:

Rendimiento: 5 %

^1H -RMN: δ (ppm) = 7,23-7,18 (m; 2H, ArH), 7,13-7,08 (m; 2H, ArH), 6,81-6,73 (m; 4H, ArH), 6,29 (d; $J_1=15,9$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}(\text{CH}_3)$), 6,17 (dd; $J_1=15,9$ Hz, $J_2=6,7$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}(\text{CH}_3)$), 5,74 (s, 2H, OH), 3,56-

3,49 (m, 1H, CH(CH₃)), 1,39 (d, *J*=7,0 Hz, 3H, CH₃).

¹³C-RMN: δ (ppm) = 154,7; 153,8; 138,1; 133,5; 130,5; 128,4; 127,6;
127,4; 115,5; 155,3; 41,7; 21,4

6.2.2.3. Condensación de Knoevenagel en tetrahidrofurano.

Síntesis de ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenoico (21):

1,0 g de ácido malónico (9,6 mmol) se disolvió en 10 mL THF. Se agregaron 0,56 mL de piridina (7,0 mmoles), 0,97 g de 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (6,4 mmoles) y 0,24 mL de piperidina (2,4 mmoles). La mezcla se calentó a reflujo durante 2 horas. Luego de enfriar, la disolución se vertió en agua-hielo y se añadió HCl concentrado hasta pH = 3. La disolución acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y el disolvente se destiló a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílica gel flash, Hex:AcOEt 7:3). Rendimiento: 80 %

¹H-RMN (DMSO-d₆): δ (ppm) = 9,57 (s, 1H, COOH), 7,50 (d; *J*=15,9 Hz, 1H, CH=CH-COOH), 7,28 (d; *J*=1,9 Hz, 1H, ArH₂), 7,09 (dd; *J*₁=8,2 Hz, *J*₂=1,9 Hz, 1H, ArH₆), 6,80 (d; *J*=8,1 Hz, 1H, ArH₅), 6,37 (d; *J*=15,9 Hz, 1H, CH=CH-COOH), 3,82 (s; 3H, OCH₃).

¹³C-RMN (DMSO-d₆): δ (ppm) = 168,5; 149,5; 148,4; 145,0; 126,2;
123,3; 116,0; 111,6; 56,1.

6.2.3. Síntesis de fenilglicidatos y precursores.

6.2.3.1. Epoxidación enzimática.

6.2.3.1.1. Procedimiento general para la obtención de ésteres α,β -insaturados.

6.2.3.1.1.1. Monohidrólisis de malonato de dietilo.⁴

4,0 g de malonato de dietilo (25 mmoles) se disolvieron en 16 mL de EtOH absoluto. La mezcla se agitó y se le adicionó gota a gota, desde un embudo con ecualizador, una disolución de 1,4 g de KOH (25 mmoles) 16 mL de EtOH absoluto, durante 90 minutos. Durante este agregado se formó un precipitado abundante. La suspensión se agitó durante otras 2 horas y luego se dejó sin agitación toda la noche. Se incorporó un refrigerante y la reacción se calentó a reflujo 1 hora para obtener una disolución homogénea. La disolución caliente se filtró rápidamente con un Büchner caliente y el precipitado se lavó con EtOH absoluto caliente (10 mL). Los volúmenes de filtrado y de lavado combinados se redujeron a aproximadamente 30 mL y la disolución se enfrió en un baño de hielo. Los cristales se colectaron por filtración, se lavaron con Et₂O y se secaron en estufa por aproximadamente 30 minutos.

La sal de potasio obtenida se disolvió en agua con agitación magnética, se enfrió a 0 °C y se agregó HCl concentrado (16 mmoles, 1 eq) gota a gota durante 40 minutos, manteniendo la temperatura de la disolución por debajo de 5 °C.

Luego de agitar por otros 20 minutos, la suspensión se filtró y la sal se lavó con Et₂O. El filtrado (H₂O + Et₂O) se separó y la capa acuosa se extrajo con 2 porciones de Et₂O. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución saturada de NaCl, se secaron con Na₂SO₄ y se destiló el disolvente a presión reducida. El producto es un aceite claro.

6.2.3.1.1.2. Condensación de Knoevenagel para la obtención de ésteres α,β -insaturados. Procedimiento general.

1,0 g de ácido 3-etoxi-3-oxopropanoico (7,6 mmoles) se disolvió en 10 mL de piridina (124 mmoles). Se agregó el benzaldehído sustituido correspondiente (5,0 mmoles) y 0,20 mL de piperidina (2,0 mmoles). La mezcla se calentó a reflujo durante 2 horas. Luego de enfriar, la solución se vertió en agua-hielo y se añadió HCl concentrado hasta pH = 5. La disolución acuosa se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 mL). La fase orgánica se lavó con disolución saturada de CuSO₄ y con disolución saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente se destiló a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílica gel flash, Hex:AcOEt 7:3).

3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propenoato de etilo (31):

Rendimiento: 90 %

¹H-RMN: δ (ppm) = 7,62 (d; $J=15,9$ Hz, 1H, CH=CH-COOEt), 7,07 (dd; $J_1=8,2$ Hz, $J_2=1,9$ Hz, 1H, ArH₆), 7,03 (d; $J=1,9$ Hz, 1H, ArH₂), 6,92 (d; $J=8,2$ Hz, 1H, ArH₅), 6,29 (d; $J=15,9$ Hz, 1H, CH=CH-COOEt), 5,91 (s; 1H, OH), 4,26 (q; $J=7,1$ Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3,92 (s; 3H, OCH₃), 1,34 (t; $J=7,1$ Hz, 3H, OCH₂CH₃).

¹³C-RMN: δ (ppm) = 167,3; 147,9; 146,8; 144,7; 127,0; 123,0; 115,6; 114,7; 109,3; 60,4; 55,9; 14,4.

3-fenilpropenoato de etilo (32):

Rendimiento: 93 %

¹H-RMN: δ (ppm) = 7,69 (d; $J=16,0$ Hz, 1H, CH=CH-COOEt), 7,56-7,49 (m; 2H, ArH₂H₆), 7,42-7,35 (m; 3H, ArH₃H₄H₅), 6,44 (d; $J=16,0$ Hz, 1H, CH=CH-

COOEt), 4,26 (q; $J=7,2$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 1,34 (t; $J=7,1$ Hz, 3H, OCH_2CH_3).

^{13}C -RMN: δ (ppm) = 167,5; 148,0; 145,1; 129,3; 128,5; 127,6; 60,2; 14,4.

3-(3,4-dimetoxifenil)propenoato de etilo (33):

Rendimiento: 74 %

1H -RMN: δ (ppm) = 7,63 (d; $J=15,9$ Hz, 1H, $CH=CH-COOEt$), 7,11 (dd; $J_1=8,3$ Hz, $J_2=2,0$ Hz, 1H, ArH_6), 7,06 (d; $J=2,0$ Hz, 1H, ArH_2), 6,87 (d; $J=8,3$ Hz, 1H, ArH_5), 6,32 (d; $J=15,9$ Hz, 1H, $CH=CH-COOEt$), 4,26 (q; $J=7,1$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3,92 (s; 6H, OCH_3), 1,34 (t; $J=7,1$ Hz, 3H, OCH_2CH_3).

^{13}C -RMN: δ (ppm) = 168,0; 148,1; 148,0; 144,9; 127,1; 123,5; 115,5; 114,6; 109,9; 60,6; 56,0; 14,4

3-(2,5-dimetoxifenil)propenoato de etilo (34):

Rendimiento: 78 %

1H -RMN: δ (ppm) = 7,96 (d; $J=15,9$ Hz, 1H, $CH=CH-COOEt$), 6,86-6,78 (m; 3H, $ArH_3H_4H_6$), 6,28 (d; $J=15,9$ Hz, 1H, $CH=CH-COOEt$), 4,26 (q; $J=7,1$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3,88 (s; 3H, OCH_3), 3,84 (s; 3H, OCH_3), 1,34 (t; $J=7,1$ Hz, 3H, OCH_2CH_3).

^{13}C -RMN: δ (ppm) = 166,8; 153,5; 150,0; 145,0; 125,4; 115,9; 114,2; 113,0; 111,2; 62,2; 56,0; 55,7; 14,4.

3-[4-(dimetilamino)fenil]propenoato de etilo (35):

Rendimiento: 88 %

$^1\text{H-RMN}$: δ (ppm) = 7,62 (d; $J=15,9$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH-COOEt}$), 7,42 (d; $J=8,9$ Hz, 2H, ArH_3H_5), 6,66 (d; $J=8,9$ Hz, 2H, ArH_2H_6), 6,22 (d; $J=15,9$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH-COOEt}$), 4,24 (q; $J=7,1$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3,01 (s; 6H, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 1,32 (t; $J=7,1$ Hz, 3H, OCH_2CH_3).

$^{13}\text{C-RMN}$: δ (ppm) = 168,0; 151,7; 145,1; 129,7; 122,3; 112,6; 111,8; 60,1; 40,2; 14,4.

3-{4-[(*tert*-butildimetilsilil)oxi]-3-metoxifenil}propenoato de etilo (36):

Rendimiento: 75 %

$^1\text{H-RMN}$: δ (ppm) = 7,61 (d; $J=15,9$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH-COOEt}$), 7,05-6,99 (m; 2H, ArH_2H_6), 6,83 (d; $J=8,7$ Hz, 1H, ArH_5), 6,30 (d; $J=15,9$ Hz, 1H, $\text{CH}=\text{CH-COOEt}$), 4,25 (q; $J=7,2$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3,83 (s; 3H, OCH_3), 1,33 (t; $J=7,1$ Hz, 3H, OCH_2CH_3), 0,99 (s; 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0,16 (s; 6H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$).

$^{13}\text{C-RMN}$: δ (ppm) = 167,3; 151,2; 147,5; 144,7; 128,3; 122,2; 121,1; 115,9; 110,7; 60,4; 55,4; 30,2; 25,7; 18,5; 14,4; 0,02.

6.2.3.1.2. Procedimientos generales para la reacción de epoxidación enzimática.

6.2.3.1.2.1. Con CAL B.

A una disolución del ácido o del éster etílico α,β -insaturado (0,50 mmoles) en el disolvente elegido (5 mL) se le adicionó UHP (2,0 eq) y la enzima (10 mg). La mezcla se agitó en un shaker orbital a 150 rpm y 37 °C o en un reactor de microondas monomodo a 55 °C (según las condiciones mostradas en la tabla 3, sección 2.1 del capítulo de *Resultados y Discusión*). Finalizada la reacción, la mezcla se filtró y el sólido se lavó con AcOEt. El filtrado se lavó con una disolución 10 % de NaHCO₃. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se destiló el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílica gel flash, Hex:AcOEt 7:3).

6.2.3.1.2.2 Con HRPO.

Si disolvió el éster etílico α,β -insaturado (0,50 mmoles) en la mínima cantidad de acetona y se le adicionó una disolución 0,1 M de buffer fosfato pH = 6,5 (20 mL), 1,5 mL de una disolución de HRPO (1 mg/mL, 1033 UE/mg) en buffer fosfato y UHP (1,1 eq). Se incubó en un shaker orbital a 150 rpm y 37 °C. Luego de la incubación, la mezcla se extrajo con CH₂Cl₂, la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se destiló el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílica gel flash, Hex:AcOEt 7:3)

3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)oxirano-2-carboxilato de etilo (37):

Rendimiento: 4 %

¹H-RMN: δ (ppm) = 7,01-6,99 (m; 2H, ArH₂H₆), 6,91 (d; J=8,6 Hz, 1H, ArH₂), 5,07 (s; 1H, OH), 4,51 (d; J=1,8 Hz, 1H, CH-O-CH-COOEt), 4,24 (q; J=7,1 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3,90 (s, 3H, OCH₃), 3.75 (d; J=1,8 Hz,

1H, CH-O-CH-COOEt), 1,29 (t, $J=7,1$ Hz, 3H, OCH₂CH₃)

¹³C-RMN: δ (ppm) = 171,3; 148,2; 147,1; 127,0; 123,0; 114,7; 109,3; 62,3; 61,0; 58,4; 56,0; 14,1.

3-(3,4-dimetoxifenil)oxirano-2-carboxilato de etilo (39):

Rendimiento: 7 %

¹H-RMN: δ (ppm) = 6,91 (dd; $J_1=8,2$ Hz, $J_2=2,0$ Hz, 1H, ArH₆), 6,85 (d; $J=8,2$ Hz, 1H, ArH₅), 6,74 (d; $J=2,0$ Hz, 1 H, ArH₂) 4,29 (q; $J=7,2$ Hz, 2H, OCH₂CH₃), 4,05 (d; $J=1,8$ Hz, 1H, CH-O-CH-COOEt), 3,91 (s; 6H, OCH₃), 3,50 (d; $J=1,8$ Hz, 1H, CH-O-CH-COOEt), 1,33 (t; $J=7,1$ Hz, 3H, OCH₂CH₃)

¹³C-RMN: δ (ppm) = 171,0; 149,7; 148,9; 126,9; 117,7; 112,0; 109,3; 61,3; 61,0; 58,3; 56,0; 14,1.

6.2.3.2. Epoxidación organocatalítica.

6.2.3.2.1. (E)-3-[4-(*tert*-butildimetilsililoxi)-3-metoxifenil]propenal (48).

A una disolución de (*E*)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propenal (100 mg, 0,56 mmoles) en 6,0 mL de CH₂Cl₂ seco, agitada a 0 °C y en atmósfera de nitrógeno, se le adicionó triflato de *ter*-butildimetilsilano (354 mg, 1,34 mmoles) y 2,4,6-trimetilpiridina (162 mg, 1,34 mmoles). La mezcla se dejó llegar a temperatura ambiente y se continuó la agitación por 24 horas. Completada la reacción, se destiló el disolvente a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (sílica gel flash, Hex:AcOEt 9:1).

Rendimiento: 70 %

^1H -RMN: δ (ppm): 9,55 (d; $J=7,8$ Hz, 1H, CHO), 7,30 (d; $J=15,8$ Hz, 1 H, CH=CH-CHO), 7,00-6,94 (m; 2H, ArH), 6,81-6,76 (m; 1H, ArH), 6,51 (dd; $J_1=15,8$ Hz, $J_2=7,8$ Hz, 1H, CH=CH-CHO), 3,75 (s; 3H, OCH₃), 0,91 (s; 9H, C(CH₃)₃), 0,09 (s; 6H, Si(CH₃)₂).

^{13}C -RMN: δ (ppm): 195,3; 152,3; 148,7; 145,0; 130,3; 128,9; 122,5; 121,3; 111,1; 55,6; 25,7; 19,0; 14,4; 0,03.

6.2.3.2.2. Procedimiento general para la reacción de epoxidación organocatalítica.

Una disolución del catalizador correspondiente (0,1-0,4 eq) en CH₂Cl₂ (2 mL) se agitó y se le adicionó el aldehído α,β -insaturado (0,25 mmoles) y el agente oxidante. La mezcla de reacción se agitó vigorosamente a temperatura ambiente. Cuando se utilizó L-prolina o pirrolidina como catalizador se agregó trietilamina (0,8 eq) o DBU (1,1 eq) a la mezcla de reacción. Completada la reacción, se destiló el disolvente a presión reducida y el residuo se purificó por cromatografía en columna (sílica gel flash, Hex:AcOEt 7:3).

3-feniloxirano-2-carbaldehído, mezcla de diasterómeros (51aa'bb'):

Condiciones de reacción: entrada 5, Tabla 6, Capítulo 4.

Rendimiento: 10 %

rd (aa':bb'): 43:57

GC (*Programa 6*): $t_{r51bb'}$ = 9,5 min.
 $t_{r51aa'}$ = 10,1 min.

GC quiral (*Programa 1*): $t_{r51bb'}$ = 24,4 min, 24,5 min.
 $t_{r51aa'}$ = 24,7 min, 25,0 min.

EM m/z (%): 148 [10, M^+], 147 [24, M^+-H], 119 [31, M^+-CHO], 91 [100, $M^+-COCHO$], 89 (41), 77 [$M^+-C_3H_3O_2$], 65 (21), 51 (21), 29 [10, CHO^+].

1H -RMN: δ (ppm): 51 aa' = 9,18 (d; $J=6,0$ Hz, 1H, CH-CHO), 7,46-7,27 (m; 5H, ArH), 4,17 (d; $J=1,8$ Hz, 1H, CH-O-CH-CHO), 3,44 (dd; $J_1=6,0$ Hz, $J_2=1,8$ Hz, 1H, CH-O-CH-CHO).

51 bb' = 9,08 (d; $J=6,0$ Hz, 1H, CH-CHO), 7,46-7,27 (m; 5H, ArH), 4,39 (d; $J=4,5$ Hz, 1H, CH-O-CH-CHO), 3,53 (dd; $J_1=6,0$ Hz, $J_2=4,6$ Hz, 1H, CH-O-CH-CHO).

^{13}C -RMN: δ (ppm): 51 aa' = 196,9; 134,2; 129,2; 128,7; 125,7; 63,0; 56,7.

51 bb' = 199,2; 132,5; 128,8; 128,7; 126,2; 59,2; 58,4.

(2*S*,3*R*)-3-feniloxirano-2-carbaldehído (51a)⁵:

Condiciones de reacción: entrada 11, Tabla 6, Capítulo 4.

Rendimiento: 13 %

rd (aa':bb') (%): 97:3

ee (a) (%): 96

$[\alpha]_D^{22} = -16,4$ (c 2,5, MeOH)

GC (*Programa 6*): $t_{r51bb'}$ = 9,4 min.

$t_{r51aa'}$ = 10,0 min.

GC quiral (*Programa 2*): $t_{r51bb'}$ = 12,4 min, 12,5 min.

$t_{r51aa'}$ = 12,6 min, 12,8 min.

$^1\text{H-RMN}$: δ (ppm) = 9,19 (d; $J=6,1$ Hz, 1H, CH-CHO), 7,48-7,19 (m; 5H, ArH), 4,17 (d; $J=1,8$ Hz, 1H, CH-O-CH-CHO), 3,44 (dd; $J_1=6,0$ Hz, $J_2=1,9$ Hz, 1H, CH-O-CH-CHO).

$^{13}\text{C-RMN}$: δ (ppm) = 196,7; 134,2; 129,0; 128,8; 125,8; 63,0; 56,5.

(2S,3R)-3-(4-clorofenil)oxirano-2-carbaldehído (52a)⁵:

Condiciones de reacción: entrada 11, Tabla 6, Capítulo 4.

Rendimiento: 26 %

rd (aa':bb') (%): 94:6

ee (a) (%): 99

GC (*Programa 6*): $t_{r52bb'}$ = 12,3 min.

$t_{r52aa'}$ = 13,1 min.

GC quiral (*Programa 4*): $t_{r52bb'}$ = 15,3 min, 15,4 min.

$t_{r52aa'}$ = 15,5 min, 15,8 min.

EM *m/z* (%): 182 [19, M^+], 184 [6, M^++2], 153 [25, $M^+-\text{CHO}$], 155 [9 $M^+-\text{CHO}+2$], 125 [100, $M^+-\text{COCHO}$], 127 [32, $M^+-\text{COCHO}+2$], 111 [11, $M^+-\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_2$], 113 [4, $M^+-\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_2+2$], 89 [92, $M^+-\text{COCHO-HCl}$], 75 (12), 63 (25), 29 [11, CHO^+].

$^1\text{H-RMN}$: δ (ppm) = 9,19 (d; $J=6,0$ Hz, 1H, CH-CHO), 7,36 (d; $J=8,5$ Hz, 2H, ArH_3H_5), 7,23 (d; $J=8,6$ Hz, 2H, ArH_2H_6), 4,15 (d; $J=1,8$ Hz, 1H, CH-O-CH-CHO), 3,41 (dd; $J_1=6,0$ Hz, $J_2=1,8$ Hz, 1H, CH-O-CH-CHO).

$^{13}\text{C-RMN}$: δ (ppm) = 196,8; 135,1; 132,4; 128,8; 127,2; 63,2; 56,5.

(2*S*,3*R*)-3-[4-(*tert*-butildimetilsililoxi)3-metoxifenil]oxirano-2-carbaldehído (54a):

Condiciones de reacción: entrada 13, Tabla 6, Capítulo 4.

Rendimiento: 32 %

rd (aa':bb') (%): 93:7

ee (a) (%): 97

GC (*Programa 8*): $t_{r54bb'}$ = 16,5 min.

$t_{r54aa'}$ = 18,9 min.

GC quiral (*Programa 4*): $t_{r54bb'}$ = 18,6 min, 18,8 min.

$t_{r54aa'}$ = 19,2 min, 19,5 min.

$^1\text{H-RMN}$: δ (ppm) = 9,87 (d; $J=6,0$ Hz, 1H, CH-CHO), 6,64-6,58 (m; 3H, ArH), 4,04 (d; $J=1,8$ Hz, 1H, CH-O-CH-CHO), 3,87 (s, 3H, OCH₃), 3,49 (dd; $J_1=6,0$ Hz, $J_2=1,8$ Hz, 1H, CH-O-CH-CHO), 0,99 (s, 9H, C(CH₃)₃), 0,19 (s, 6H, Si(CH₃)₂).

(2*S*,3*R*)-3-(4-nitrofenil)oxirano-2-carbaldehído (55a)⁵:

Condiciones de reacción: entrada 11, Tabla 6, Capítulo 4.

Rendimiento: 28 %

rd (aa':bb') (%): 98:2

ee (a) (%): 97

$[\alpha]_D^{22}$ = -19,6 (c 2,1, MeOH)

GC (*Programa 8*): $t_{r55bb'}$ = 19,2, min.

$t_{r55aa'}$ = 20,4 min.

GC quiral (*Programa 5*): $t_{r55bb'}$ = 19,4 min, 19,5 min.

$t_{r55aa'}$ = 19,7 min, 20,0 min.

EM m/z (%): 193 [33, M^+], 192 [43, M^+-H], 164 [10, M^+-CHO], 136 [40, $M^+-COCHO$], 118 [54, $M^+-CHO-NO_2$], 89 (100), 71 [41, $C_3H_3O_2^+$], 63 (58), 29 [13, CHO^+].

1H -RMN: δ (ppm) = 9,23 (d; $J=5,9$ Hz, 1H, CH-CHO), 8,26 (d; $J=8,5$ Hz, 2H, Ar H_3H_5), 7,50 (d; $J=8,5$ Hz, 2H, Ar H_2H_6), 4,31 (d; $J=1,7$ Hz, 1H, CH-O-CH-CHO), 3,46 (dd; $J_1=5,9$ Hz, $J_2=1,8$ Hz, 1H, CH-O-CH-CHO).

^{13}C -RMN: δ (ppm) = 195,7; 148,3; 141,5; 126,6; 124,1; 62,8; 57,5.

(2S,3R)-3-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)oxirano-2-carbaldehído (56a):

Condiciones de reacción: entrada 13, Tabla 6, Capítulo 4.

Rendimiento: 23 %

rd (aa':bb') (%): 92:8

ee (a) (%): 98

$[\alpha]_D^{22} = -19,0$ (c 1,6, MeOH)

GC (*Programa 8*): $t_{r56bb'}$ = 17,2 min.

$t_{r56aa'}$ = 18,4 min.

GC quiral (*Programa 5*): $t_{r56bb'}$ = 18,3 min, 18,5 min.

$t_{r56aa'}$ = 19,1 min, 19,6 min.

1H -RMN: δ (ppm) = 9,82 (d; $J=6,0$ Hz, 1H, CH-CHO), 7,16 (s; 2H, Ar H), 6,22 (s; 1H, OH), 4,02 (d; $J=1,8$ Hz, 1H, CH-O-CH-CHO), 3,97 (s, 6H, OCH₃), 3,82 (dd; $J_1=5,9$ Hz, $J_2=1,8$ Hz, 1H, CH-O-CH-CHO).

^{13}C -RMN: δ (ppm) = 190,9; 147,4; 140,8; 128,3; 106,7; 60,9; 56,5.

6.2.3.3 Epoxidación química.

6.2.3.3.1. Procedimiento general para la reacción de epoxidación con ácido *m*-cloroperbenzoico.

Una solución del éster etílico α,β -insaturado o aldehído α,β -insaturado (0,50 mmoles) en CH_2Cl_2 (5 mL) se agitó y se le adicionó ácido *m*-cloroperbenzoico (1,5 eq). La mezcla de reacción se agitó vigorosamente a temperatura ambiente. Completada la reacción, la mezcla se lavó con solución 10 % de NaHCO_3 . La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y se destiló el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílica gel flash, Hex:AcOEt 7:3).

3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)oxirano-2-carboxilato de etilo (37):

Rendimiento: 3 %

Espectroscopía descrita en sección 6.2.3.1.2

2,3-dihidroxi-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)propanoato de etilo (43):

Rendimiento: 12 %

^1H -RMN: δ (ppm) = 7,02-7,00 (m; 2H, ArH_2H_6), 6,90 (d; $J=8,6$ Hz, 1H, ArH_2), 6,21 (d; $J=3,0$ Hz, 1H, CH-CH-COOEt), 5,71 (s; 1H, PhOH), 4,51 (d; $J=3,1$ Hz, 1H, CH-CH-COOEt), 4,24 (q; $J=7,1$ Hz, 2H, OCH_2CH_3), 3,89 (s, 3H, OCH_3), 3,75 (d; $J=1,8$ Hz, 1H, CH-O-CH-COOEt), 3,26 (s; 1H, OH), 2,79 (s; 1H, OH), 1,24 (t, $J=7,1$ Hz, 3H, OCH_2CH_3).

^{13}C -RMN: δ (ppm) = 170,9; 148,2; 147,6; 130,7; 119,8; 115,7; 109,8; 86,2; 78,0; 61,0; 56,1; 14,2.

6.2.3.3.2. Epoxidación con Oxone®.

Una solución 0,03 M de **33** en acetona:acetonitrilo:agua (1:1:2), se agitó y se le adicionó oxone® (1,5 eq) y NaHCO₃ (3,5 eq) en tres porciones a temperatura ambiente. La reacción se monitoreó por TLC y una vez que se completó, la suspensión resultante se trató con agua y se extrajo con Et₂O. La fase orgánica se lavó con solución saturada de NaCl, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se destiló el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna (sílica gel flash, Hex:AcOEt 8:2).

3-(3,4-dimetoxifenil)oxirano-2-carboxilato de etilo (**39**):

Rendimiento: 6 %

Espectroscopía descrita en sección 6.2.3.1.2

3-(3,4-dimetoxifenil)-2,3-dihidroxiopropanoato de etilo (**44**):

Rendimiento: 10 %

¹H-RMN: δ (ppm) = 7,09-7,01 (m; 2H, ArH₂H₆), 6,86 (d; J=8,2 Hz, 1 H ArH₂), 6,24 (d; J=3,0 Hz, 1H, CH-CH-COOEt), 4,53 (d; J=3,1 Hz, 1H, CH-CH-COOEt), 4,24 (q; J=7,2 Hz, 2H, OCH₂CH₃), 3,89 (s; 6H, OCH₃), 3,66 (s, 1H, OH), 2,11 (s, 1H, OH), 1,24 (t; J=7,1 Hz, 3H, OCH₂CH₃).

¹³C-RMN: δ (ppm) = 172,0; 149,3; 148,9; 128,4; 119,7; 111,0; 110,3; 76,4; 73,6; 62,4; 55,9; 14,1

6.3. Referencias bibliográficas

- (1) Armarego, W. L. F.; Perrin, D. D. *Purification of Laboratory Chemicals*; 4th. ed.; Butterworth-Heinemann: Oxford, 1996.
- (2) Risso, M.; Mazzini, M.; Kröger, S.; Saenz-Méndez, P.; Seoane, G.; Gamenara, D. *Green Chem. Lett. Rev.* **2012**, *5*, 539.
- (3) Aldabalde, V.; Risso, M.; Derrudi, M. L.; Geymonat, F.; Seoane, G.; Gamenara, D.; Saenz-Méndez, P. *Open J. Phys. Chem.* **2011**, *1*, 85.
- (4) Hediger, M. E. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4995.
- (5) Zhao, G.-L.; Ibrahim, I.; Sundén, H.; Córdova, A. *Adv. Synth. Catal* **2007**, *349*, 1210.

Producción científica

7. Producción científica

7.1. Publicaciones.

Este trabajo de tesis de maestría ha dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

"Concise and stereoselective chemoenzymatic synthesis of Sitophilate, the male-produced aggregation pheromone of *Sitophilus granarius* (L.)". Ravia, S.; Risso, M.; Kroger, S.; Vero, S.; Seoane, G.; Gamenara, D. *Tetrahedron: Asymmetry* 24 (19), 1207-1211, **2013**. DOI:10.1016/j.tetasy.2013.08.004

"Microwave-assisted solvent-free lipase catalyzed transesterification of β -ketoesters". Risso, M.; Mazzini, M.; Kröger, S.; Saenz Méndez, P.; Seoane, G.; Gamenara, D. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 1-5, **2012** DOI:10.1080/17518253.2012.672596

"Organocatalyzed Decarboxylation of Naturally Occurring Cinnamic Acids: Potential Role in Flavoring Chemicals Production". Aldabalde, V.; Risso, M.; Derrudi, M. L.; Geymonat, F.; Seoane, G.; Gamenara, D.; Saenz Méndez, P. *Open Journal of Physical Chemistry* 1, 85-93, **2011**. DOI:10.4236/ojpc.2011.13012.

7.2. Presentaciones a congresos.

LIGNANOS COMO BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN. EPOXIDACIÓN DE OLEFINAS DEFICIENTES DE ELECTRONES

Risso, M.; Gamenara, D.; Seoane, G.; Saenz Méndez, P.

Tercer Encuentro Nacional de Ciencias Químicas, 4-6 noviembre 2013, Montevideo, Uruguay.

Tipo de presentación: Póster.

BIO- AND ORGANOCATALYTIC EPOXIDATION OF ELECTRON POOR OLEFINS

Risso, M.; Gamenara, D.; Seoane, G.; Saenz Méndez, P.

4th International IUPAC Conference on GREEN CHEMISTRY, 25-29 agosto 2012, Foz do Iguaçu, Brazil.

Tipo de presentación: Póster.

EPOXIDACIÓN ORGANOCATALÍTICA DE ALDEHÍDOS α,β -INSATURADOS.

Risso, M.; Gamenara, D.; Seoane, G.; Saenz Méndez, P.

XVIII Simposio Nacional de Química Orgánica, 13-16 noviembre 2011. Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina.

Tipo de presentación: Póster.

EPOXIDACIÓN ORGANOCATALÍTICA DE ALDEHÍDOS α,β -INSATURADOS.

Risso, M.; Gamenara, D.; Seoane, G.; Saenz Méndez, P.

Segundo Encuentro Nacional de Ciencias Químicas, 24-26 de octubre 2011, Montevideo, Uruguay

Tipo de presentación: Póster.

TRANSESTERIFICACIÓN DE β -CETOÉSTERES CATALIZADA POR LIPASAS Y ASISTIDA POR IRRADIACIÓN DE MICROONDAS EN AUSENCIA DE DISOLVENTES.

Risso, M.; Mazzini, M.; Saenz Méndez, P.; Seoane, G.; Gamenara, D.

IV Encuentro Regional de Biocatálisis y Biotransformaciones, 8-10 de diciembre de 2010. Montevideo, Uruguay.

Tipo de presentación: Oral

EPOXIDACIÓN QUÍMICA Y ENZIMÁTICA DE LIGNANOS.

Risso, M.; Saenz Méndez, P.; Seoane, G.; Gamenara, D.

Primer Encuentro Nacional de Ciencias Químicas, 3-4 de diciembre 2009, Montevideo, Uruguay

Tipo de presentación: Póster.

REACCIONES DE TRANSESTERIFICACIÓN CATALIZADAS POR LIPASAS EN SISTEMAS SIN DISOLVENTES Y MEDIANTE IRRADACIÓN POR MICROONDAS

Mazzini, M.; Risso, M.; Saenz Méndez, P.; Seoane, G.; Gamenara, D.

XVII Simposio Nacional de Química Orgánica, 15-18 noviembre 2009. Mendoza, Argentina.

Tipo de presentación: Póster.

LIGNANOS COMO BLOQUES DE CONSTRUCCIÓN. EPOXIDACIÓN QUÍMICA Y ENZIMÁTICA DE OLEFINAS DEFICIENTES EN ELECTRONES

Risso, M.; Geymonat, F.; Derrudi, L.; Aldabalde, V.; Álvez, L.; Seoane, G.; Gamenara, D.; Saenz Méndez, P.

XVII Simposio Nacional de Química Orgánica, 15-18 noviembre 2009. Mendoza, Argentina.

Tipo de presentación: Póster.

ENZYMATIC APPROACHES FOR THE SYNTHESIS OF INSECT PHEROMONES

Ravía, S.; Álves, L.; Guarnieri, I.; Risso, M.; Santos, M.; Kröger, S.; Rossini, C.; González, A.; Seoane, G.; Saenz Méndez, P. Gamenara, G.

13th Brazilian Meeting on Organic Synthesis, 31 de Agosto-4 de setiembre. San Pedro, San Pablo, Brazil.

Tipo de presentación: Póster.

MICROWAVE ASSISTED AND SOLVENT FREE LIPASE-CATALYZED TRANSESTERIFICATION OF B-KETO-ESTERS.

Risso M.; Seoane G.; Saenz Méndez, P.; Gamenara D.

9th International Symposium on Biocatalysis, Berna, Suiza, 5-9 de julio de 2009.

Tipo de presentación: Póster.

ENZYMATIC EPOXIDATIONS OF LIGNANS AS A VALUABLE TOOL FOR THE PREPARATION OF KEY BUILDING BLOCKS.

Risso M.; Aldabalde V.; Alves L.; Derrudi L.; Geymonat F.; Maggio I.; Seoane G.; Pandolfi E.; Gamenara D.; Saenz Méndez P.

9th International Symposium on Biocatalysis, 5-9 de julio de 2009, Berna, Suiza.

Tipo de presentación: Póster.