



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**“Síntesis y resolución de β - y γ -amino ésteres catalizada por
CaL-B”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. MARINA ARGELIA ORTEGA ROJAS

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Jaime Escalante García

CO-DIRECTOR DE TESIS

Dr. Edmundo Castillo Rosales

"1919-2019: en memoria del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., 04 de septiembre de 2019

PC/1144/2019

M. en C. Marina Argelia Ortega Rojas
Candidata a Doctor en Ciencias
Presente

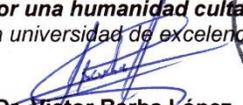
La Comisión Académica del Posgrado en su reunión del día 4 de septiembre del 2019 aprobó su solicitud para la integración del comité examinador de su tesis titulada: "Síntesis y resolución de β - y γ -amino ésteres catalizada por CaL-B", el jurado queda integrado por:

JURADO	NOMBRE	ADSCRIPCIÓN	LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
Presidente	Dr. Enrique Rudiño Piñera	IBT-UNAM	Biología Estructural Biología Molecular
Secretario	Dra. Laura Patricia Álvarez Berber	CIQ-UAEM	Diseño Molecular y Química Médica
Vocal	Dr. Héctor Manuel Luna Contla	UAM Xochimilco	Síntesis Orgánica
Vocal	Dra. Carmen Nina Pastor Colón	CIDC-UAEM	Estructura y Función de Macromoléculas
Vocal	Dr. Ismael León Rivera	CIQ-UAEM	Diseño Molecular y Química Médica
Suplente	Dr. Edmundo Castillo Rosales	IBT-UNAM	Biocatálisis
Suplente	Dr. Jaime Escalante García	CIQ-UAEM	Diseño Molecular y Química Médica

Por lo tanto, le pido se ponga en contacto con los Doctores antes mencionados para hacerles entrega del oficio de invitación a formar parte de jurado examinador y haga entrega de una copia de su tesis.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia


Dr. Víctor Barba López
Coordinador del Posgrado en Ciencias



El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Síntesis Asimétrica del Centro de Investigaciones Químicas (CIQ) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), bajo la asesoría del Dr. Jaime Escalante García y coasesoría del Dr. Edmundo Castillo Rosales, con el apoyo de la beca No. 266948, y el proyecto No. 256653, otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Durante el desarrollo de este trabajo se realizó la siguiente publicación:

Ortega-Rojas, M. A.; Rivera-Ramirez, J. D.; Avila-Ortiz, C. G.; Juaristi, E.; Gonzales-Munoz, F.; Castillo, E.; Escalante, Jaime. One-Pot Lipase-Catalyzed Enantioselective Synthesis of (*R*)-(-)-*N*-Benzyl-3-(bencilamino)butanamide: The effect of Solvent Polarity on Enantioselectivity. *Molecules* **2017**, *22*, 2189.

Parte de estos resultados fueron presentados en los siguientes congresos:

- 1) XV Jornada de Química **2016**. Ortega-Rojas, M. A.; Castillo, E.; Escalante, J.; "Biocatalizadores en la resolución de γ -Amino Ésteres". Cuernavaca, Morelos México.
- 2) 9º Encuentro de Química Inorgánica **2019**. Ortega-Rojas, M. A.; Escalante, Jaime; Razo-Hernández, Rodrigo S. "Modelado Molecular en la Resolución de β^3 -Amino Ésteres Catalizado por CaL-B". Ixtaczoitlán, Veracruz, México.

CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	vi
Índice de reacciones y compuestos	viii
Abreviaturas y símbolos.....	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Obtención de compuestos enantioméricamente puros.....	5
2.1.1. Síntesis de β - y γ -amino ácidos mediante el acervo quiral.	5
2.1.2. Síntesis asimétrica de β - y γ -amino ácidos.....	6
2.1.2.1. Síntesis vía auxiliar quiral.....	7
2.1.2.2. Síntesis vía catalizador quiral.....	8
2.1.2.3. Síntesis vía biocatalizador.	10
2.1.3. Síntesis de β - y γ -amino ácidos por resolución de racematos.....	12
2.1.3.1. Métodos de resolución directa	12
2.1.3.2. Métodos de resolución por derivatización.	13
2.1.3.2.1. Conversión a diastereoisómeros	13
2.1.3.2.2. Resolución cinética enzimática.....	14
2.1.4. Razón enantiomérica <i>E</i>	17
2.1.5. Ingeniería del medio	19
2.1.6. Lipasas	19
2.1.7. Lipasa B de <i>Candida antartica</i>	22
2.1.7.1. CaL-B en síntesis de β -amino ácidos a través de adiciones <i>aza</i> -Michael.....	24
2.1.7.2. CaL-B en resoluciones cinéticas de β - y γ -amino ácidos, precursores e intermediarios.....	26
2.1.8. Modelado molecular	32
3. El efecto de la polaridad de solvente en la síntesis y resolución <i>one pot</i> de (<i>R</i>)-(-)- <i>N</i> -Bencil-3-(bencilamino) butanamida catalizada por CaL-B.....	35
3.1. INTRODUCCIÓN	35
3.2. JUSTIFICACIÓN	36

3.3. HIPÓTESIS	36
3.4. OBJETIVO.....	37
3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
3.5.1. Perfil de productos obtenido en disolventes de polaridad opuesta: <i>n</i> -hexano y 2M2B	38
3.5.2. Enantioselectividad	40
3.5.3. Optimización de exceso enantiomérico	43
3.5.4. Cinética de la reacción	44
3.6. CONCLUSIONES.....	46
4. Influencia de la posición del sustituyente y el grupo amino en la resolución de β - y γ -amino ésteres <i>N</i> -protegidos catalizada por CaL-B.....	47
4.1. INTRODUCCIÓN	47
4.2. JUSTIFICACIÓN	48
4.3. HIPÓTESIS.....	48
4.4. OBJETIVO.....	48
4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
4.5.1. Síntesis racémica de γ^4 -, γ^3 - y γ^4 -Amino ésteres <i>N-tert</i> -butoxicarbonil protegidos (\pm)- 10a-c	49
4.5.2. Resolución enzimática de γ^4 -, γ^3 - y γ^2 -Amino ésteres <i>N-tert</i> -butoxicarbonil protegidos (\pm)- 10a-c catalizada por CaL-B.	50
4.5.3. Estudios computacionales	55
4.5.3.1. Preparación de las moléculas (ligandos y proteína).....	56
4.5.3.1.1. Preparación de los ligandos.....	56
4.5.3.1.2. Análisis estructural de CaL-B.....	57
4.5.3.1.3. Detección de la cavidad catalítica	59
4.5.3.1.4. Validación del Acoplamiento Molecular "Docking".....	60
4.5.3.2. Análisis de la interacción ligando-proteína de las moléculas de interés.	63
4.5.3.3. Acoplamiento Molecular "Docking"	66
4.5.3.3.1. El efecto del tamaño y posición del sustituyente	66
4.5.3.3.2. El efecto de exclusión estérica de la cavidad catalítica.....	68
4.5.3.3.3. Modo de unión de los ligandos.....	77
4.6. CONCLUSIONES.....	85

5. PARTE EXPERIMENTAL	88
5.1. Información general	88
5.2. Métodos analíticos.....	88
5.3. Síntesis y resolución <i>one pot</i> de (R)-(-)-N-Bencil-3-(bencilamino) butanamida catalizada por CaL-B. El efecto de la polaridad de solvente.	90
5.3.1. Síntesis química	90
5.3.2. Reacciones enzimáticas.....	91
5.4. El efecto del sustituyente y la posición del grupo amino en la resolución γ -amino ésteres <i>N-tert</i> -butoxicarbonil protegidos catalizada por CaL-B.....	93
5.4.1 Síntesis química	93
5.4.2. Reacciones enzimáticas.....	98
6. ESPECTROS.....	103
7. ANEXOS.....	119

RESUMEN

La síntesis estereoselectiva de β - y γ - amino ácidos ha sido una área de amplio estudio debido a que estas moléculas han mostrado propiedades farmacológicas por si solas o como componentes estructurales de moléculas más complejas. La importancia de obtener compuestos en forma enantiopura, radica en las diferentes propiedades biológicas que pudiera presentar cada enantiómero. Lo anterior ha impulsado el desarrollo de la síntesis asimétrica de estos compuestos siguiendo varias metodologías, dentro de las cuales destaca el uso de biocatalizadores mediante resolución cinética enzimática catalizada por lipasas. Las lipasas han sido ampliamente utilizadas en síntesis orgánica debido a que no necesitan cofactores, poseen alta termoestabilidad, presentan promiscuidad catalítica, son capaces de aceptar un amplio espectro de sustratos, y principalmente a su regio- quimio- y enantioselectividad. En este contexto la Lipasa B de *Candida antarctica* (CaL-B) es la enzima más comúnmente utilizada tanto a nivel industrial como académico, además tiene la capacidad de ser activa en disolventes orgánicos polares y no polares.

Tomando ventaja de la promiscuidad catalítica de CaL-B, nuestro grupo de investigación reportó 2009 y 2015 la síntesis racémica de β^3 -amino ésteres a través una estrategia de ingeniería de disolventes en la adición regioselectiva de bencilamina a crotonato de metilo. Se observó que el aducto de *aza*-Michael predomina en disolventes no polares como hexano, mientras que disolventes polares como 2-metil-2-butanol (2M2B) favorecen la sustitución sobre el grupo carbonilo generando la crotonamida. Además, se observó que el aducto de Michael obtenido en 2M2B mostró actividad óptica, sin embargo no se pudo establecer el origen del exceso enantiomérico observado y del porqué solo en 2M2B.

Por lo tanto, en este trabajo se demostró que el disolvente, además de controlar la regioselectividad del proceso enzimático, interviene en un proceso resolutivo el cual solo se observa en presencia de 2M2B. Se estableció una estrategia de ingeniería de disolventes en la síntesis y resolución del β^3 -amino éster en una reacción en un solo paso.

CaL-B también ha sido utilizada en la síntesis de compuestos de alto valor agregado, principalmente en reacciones de resolución cinética de segundos sustratos como aminas y alcoholes. La enantiodiscriminación del proceso sigue un modelo empírico para el enantiómero de reacción rápida, el cual está bien documentado y es conocido como la regla de Kazlauskas. Estudios de dinámica molecular

mostraron que el bolsillo nucleófilo está delimitado por el residuo de Trp104, lo que da origen a la estereoselectividad. Por el contrario, CaL-B muestra una menor estereoselectividad en la resolución de primeros sustratos como ácidos carboxílicos y sus derivados. Esto se debe a un bolsillo más grande y/o interacciones más débiles en la región del acilo, en comparación al bolsillo del nucleófilo. Sin embargo, nuestro grupo de investigación reportó la resolución cinética de β^3 -amino ésteres utilizando diferentes grupos *N*-protectores mediante transesterificación en tolueno, así como en la resolución de β^3 - $\beta^{2,3}$ - y β^2 -amino ésteres *N*-bencilados mediante hidrólisis utilizando 2M2B como disolvente. Estos resultados previos mostraron que la enantioselectividad en las reacciones de transesterificación como de hidrólisis está dirigida por el sustituyente en la posición tres y es independiente del grupo *N*-protector. En este trabajo se evaluó la hidrólisis en 2M2B catalizada por CaL-B para la resolución cinética de γ^4 -, γ^3 - and γ^2 -amino ésteres metílicos *N*-*tert*-butoxicarbonil protegidos. Los resultados obtenidos mostraron que el proceso es menos resolutivo para los γ^4 -, γ^2 -amino ésteres metílicos y para el γ^3 -amino éster metílico aun cumpliendo el requerimiento espacial del sustituyente en la posición tres.

Basados en estos resultados desarrollamos estudios de acoplamiento molecular que justifican los requerimientos espaciales en la región del acilo en la enzima, mediante una descripción de las interacciones no covalentes enzima-sustrato que explican la pérdida de selectividad en los γ -amino ésteres.

ABSTRACT

Stereoselective synthesis of β - and γ -amino acids has been an area of extensive study because these molecules have shown pharmacological properties alone or as structural components of more complex molecules. The importance of obtaining enantiopure compounds, lies in the different biological properties that each enantiomer could present. This has prompted the development of asymmetric synthesis of these compounds following several methodologies, within which emphasizes the use of biocatalysts by enzymatic kinetic resolution catalyzed by lipases. Lipases have been widely used in organic synthesis because they are independent cofactor, have high thermostability, have catalytic promiscuity, are capable of accepting a broad spectrum of substrates, and mainly their regio- chimo- and enantioselectivity. In this context Lipase B from *Candida antarctica* (CaL-B) is the most commonly used enzyme both industrially and academically, it also has the ability to be active in polar and non-polar organic solvents.

Taking advantage of the catalytic promiscuity of CaL-B, our research group reported 2009 and 2015 the racemic synthesis of β^3 -amino esters through a solvent engineering strategy in the regioselective addition of benzylamine to methyl crotonate. It was observed that the *aza*-Michael adduct predominates in non-polar solvents such as hexane, while polar solvents such as 2-methyl-2-butanol (2M2B) favor substitution on the carbonyl group generating crotonamide. In addition, it was observed that the Michael adduct obtained in 2M2B showed optical activity, however it was not possible to establish the origin of the enantiomeric excess observed and why only in 2M2B.

Therefore, in this work it was shown that the solvent, in addition to controlling the regioselectivity of the enzymatic process, is involved in a resolutive process which is only observed in the presence of 2M2B. A solvent engineering strategy was established in the synthesis and resolution of β^3 -amino ester in a one-step reaction.

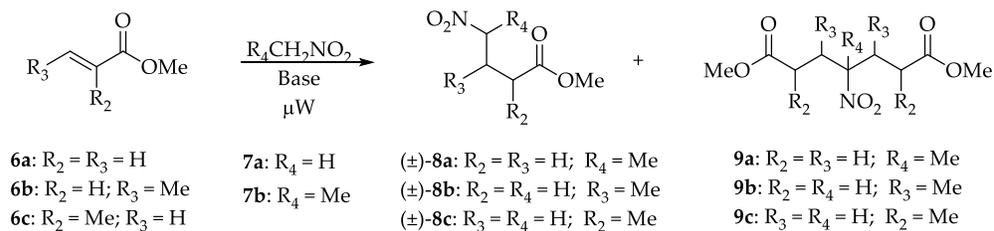
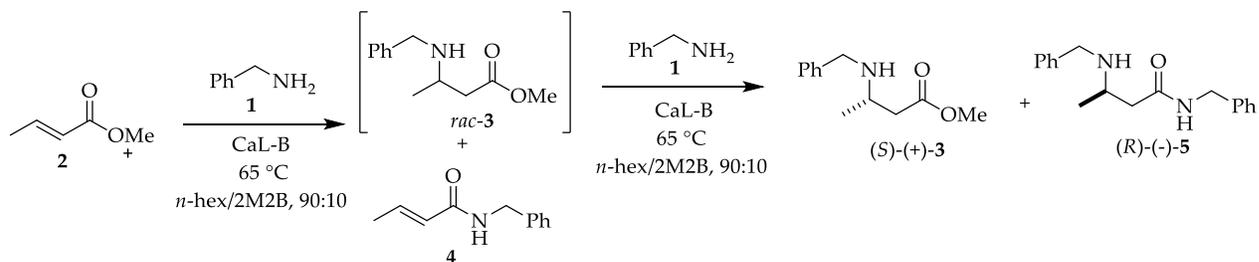
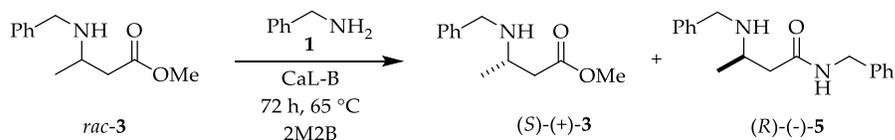
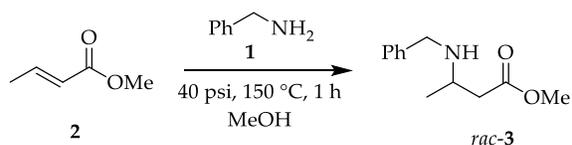
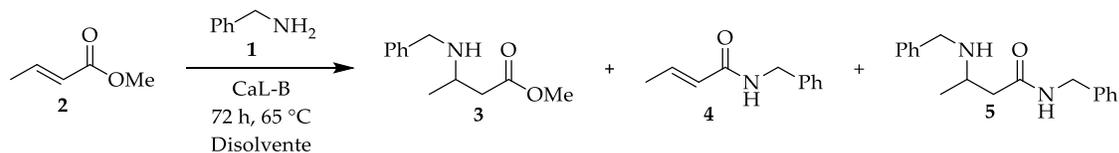
CaL-B has also been used in the synthesis of compounds of high added value, mainly in kinetic resolution reactions of second substrates such as amines and alcohols. The enantiodiscrimination of the process follows an empirical model for the rapid reaction enantiomer, which is well documented and known as the Kazlauskas rule.

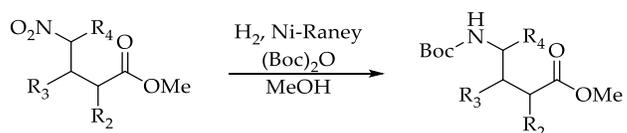
Molecular dynamics studies showed that the nucleophilic pocket is delimited by the Trp104 residue, which gives rise to sterelectivity. On the contrary, CaL-B shows a lower stereoselectivity in the resolution of first substrates such as carboxylic acids

and their derivatives. This is due to a more large pocket and/or weaker interactions in the acyl region, compared to the nucleophile pocket. However, our research group reported the kinetic resolution of β^3 -amino esters using different *N*-protecting groups by transesterification in toluene, as well as in the resolution of β^3 - $\beta^{2,3}$ - and β^2 -amino esters *N*-benzylated by hydrolysis using 2M2B as solvent. These previous results showed that enantioselectivity in transesterification and hydrolysis reactions is directed by the substituent at position three and is independent of the *N*-protective group. In this work the hydrolysis in 2M2B catalyzed by CaL-B was evaluated for the kinetic resolution of γ^4 -, γ^3 - and γ^2 -amino protected *N*-*tert*-butoxycarbonyl methyl esters. The results obtained showed that the process is less resolute for γ^4 -, γ^2 -amino methyl esters and for γ^3 -amino methyl ester even fulfilling the spatial requirement of the substituent at position three.

Based on these results, we develop molecular coupling studies that justify the spatial requirements in the acyl region in the enzyme, by describing the non-covalent enzyme-substrate interactions that explain the loss of selectivity in the γ -amino esters.

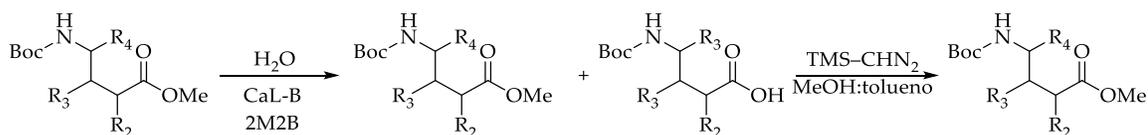
Índice de reacciones y compuestos





(\pm)-**8a**: $\text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{H}$; $\text{R}_4 = \text{Me}$
 (\pm)-**8b**: $\text{R}_2 = \text{R}_4 = \text{H}$; $\text{R}_3 = \text{Me}$
 (\pm)-**8c**: $\text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{H}$; $\text{R}_2 = \text{Me}$

γ^4 , (\pm)-**10a**: $\text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{H}$; $\text{R}_4 = \text{Me}$
 γ^3 , (\pm)-**10b**: $\text{R}_2 = \text{R}_4 = \text{H}$; $\text{R}_3 = \text{Me}$
 γ^2 , (\pm)-**10c**: $\text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{H}$; $\text{R}_2 = \text{Me}$

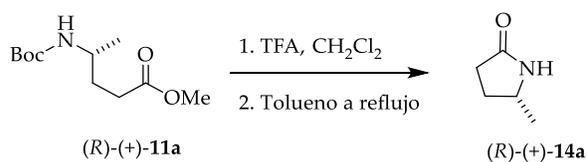


(\pm)-**10a**: $\text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{H}$, $\text{R}_4 = \text{Me}$
 (\pm)-**10b**: $\text{R}_2 = \text{R}_4 = \text{H}$, $\text{R}_3 = \text{Me}$
 (\pm)-**10c**: $\text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{Me}$

11a: $\text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{H}$, $\text{R}_4 = \text{Me}$
11b: $\text{R}_2 = \text{R}_4 = \text{H}$, $\text{R}_3 = \text{Me}$
11c: $\text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{Me}$

12a: $\text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{H}$, $\text{R}_4 = \text{Me}$
12b: $\text{R}_2 = \text{R}_4 = \text{H}$, $\text{R}_3 = \text{Me}$
12c: $\text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{Me}$

13a: $\text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{H}$, $\text{R}_4 = \text{Me}$
13b: $\text{R}_2 = \text{R}_4 = \text{H}$, $\text{R}_3 = \text{Me}$
13c: $\text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{Me}$



Abreviaturas y símbolos

ABA	Aminobenzamida
AcOEt	Acetato de etilo
Asp	Ácido aspártico o Aspartato
Bn	Bencilo
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonil
br s	Señal ancha (<i>broad signal</i>)
q	Señal cuádruple
CC	Cromatografía en columna
<i>c</i>	Conversión
CaL-B	Lipasa B de <i>Candida antartica</i>
Cat.	Catalizador
Cbz	Benciloxicarbonil
CL-MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas
CG	Cromatografía de Gases
CG-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
°C	Grados centígrados
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CHCl ₃	Cloroformo
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
d	Señal doble
dd	Señal doble de dobles
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DFT	Teoría de los funcionales de la densidad (<i>Density Functional Theory</i>)
<i>E</i>	Razón enantiomérica
<i>ee_p</i>	Exceso enantiomérico de producto
<i>ee_s</i>	Exceso enantiomérico del sustrato
Ent.	Entrada
eq	Equivalente
Exp.	Experimento
Fmoc	Fluorenil-9-metoxicarbonil
g	Gramo
Gln	Glutamina
GP	Grupo protector
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico

Hex	Hexano
HF	Hartree-Fock
His	Histidina
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HSBM	Molino de bolas de alta velocidad (<i>High Speed Ball Milling</i>)
Hz	Hertz
<i>i</i> BuOH	Isobutanol
<i>i</i> PrOH	Isopropanol
Ile	Isoleucina
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kDa	KiloDaltons
KMnO ₄	Permanganato de potasio
KR	Resolución cinética (<i>Kinetic Resolution</i>)
M	Molaridad
m	Señal múltiple o multiplete
MeOD	Metanol deuterado
MeOH	Metanol
min	minutos
MHz	Mega Hertz
MM	Mecánica molecular
mmol	milimol
<i>n</i> -hex	<i>n</i> -hexano
Ni-Raney	Niquel-Raney
nm	Nanómetros
PAM	Fenilalanina aminomutasa
PDB	Banco de datos de proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
psi	Libras por pulgada cuadrada (<i>Pounds per Square Inch</i>)
QM	Mecánica cuántica (<i>Quantum Mechanics</i>)
<i>R</i>	Constante universal de los gases
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de ¹ H
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de ¹³ C
RMSD	Raíz de la desviación cuadrática media (<i>Root Mean Square Deviation</i>)
s	Señal simple
<i>s</i>	Factor de selectividad
Ser	Serina
T	Temperatura
t	Señal triplete

<i>t</i>	Tiempo
t. a.	Temperatura ambiente
TLC	Cromatografía en capa fina (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
TFA	Ácido trifluoracético
Thr	Treonina
TMG	1,1,3,3-Tetrametilguanidina
TMS	Tetrametilsilano
TMS-CHN ₂	(Trimetilsilil)-diazometano
Trp	Triptófano
Val	Valina
2M2B	2-metil-2-butanol

1. INTRODUCCIÓN

Aunque menos abundantes que sus análogos α -amino ácidos, los β -amino y los γ -amino ácidos comparten la misma funcionalidad del grupo carbonilo y amino terminales, con la diferencia que, mientras para los α -amino ácidos es un carbono el que separa a los grupos amino y carboxilo, para los β -amino ácidos son dos carbonos y para los γ -amino ácidos tres (**Figura 1-A**). Adicionalmente el número de posiciones que pueden ser sustituidas aumenta con lo que aumenta la diversidad estructural de los β - y γ -amino ácidos. Seebach e Hintermann¹ introdujeron los términos β^2 y β^3 para distinguir entre isómeros posicionales en β -amino ácidos, de tal manera que, el número hace referencia a la posición de la cadena lateral en β -amino ácidos mono sustituidos; mientras el término $\beta^{2,3}$ hace referencia a las posiciones de las cadenas laterales en β -amino ácidos disustituidos (**Figura 1-B**); en este trabajo aplicamos esta misma terminología para γ -amino ácidos con distintos patrones de sustitución.

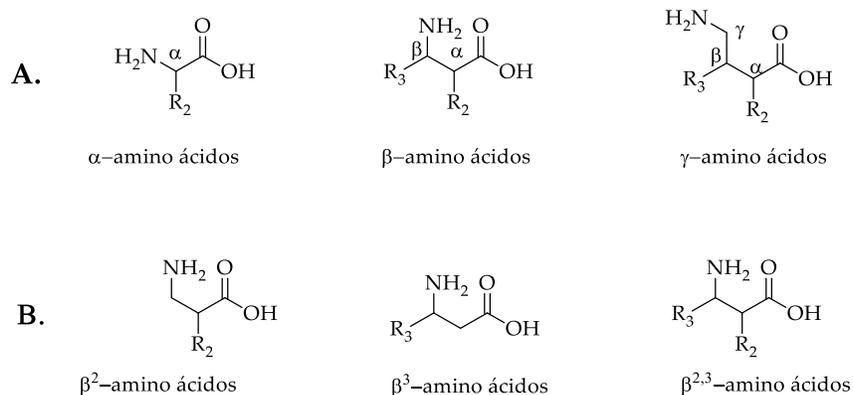


Figura 1. (A) Estructuras de α -, β - y γ -amino ácidos; (B) β -amino ácidos mono y disustituidos.

Mientras que los veinte amino ácidos esenciales son α -amino ácidos y son los componentes principales en las proteínas, la mayoría de los beta y los gamma amino ácidos solo se encuentran como metabolitos secundarios de plantas y hongos. Sin embargo, los dos ejemplos más significativos de β - y γ -amino ácidos son la β -alanina, el cual es un componente de algunos péptidos naturales como la carnosina presente

¹ Hintermann, T.; Seebach, D. *Synlett* **1997**, 437–438.

en el tejido muscular² y el ácido gamma aminobutírico (GABA) que es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central (CNC) en mamíferos (**Figura 2**).³

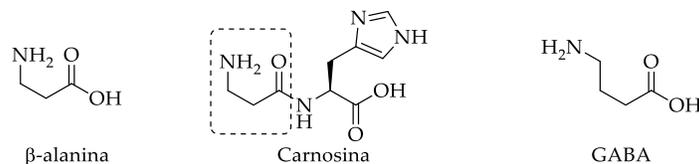


Figura 2. β-alanina, Carnosina dipéptido que se encuentra en el tejido muscular en mamíferos y GABA neurotransmisor inhibitorio del CNC.

La mayoría de los β-amino ácidos (a excepción de la β-alanina y el ácido β-aminoisobutírico) se encuentran de manera natural como metabolitos secundarios de bacterias, hongos y plantas en donde sirven como una herramienta para asegurar su supervivencia frente a otros organismos.⁴ Al tener uno y dos átomos más de carbono respectivamente los β- y γ-amino ácidos son más estables a la degradación frente a enzimas proteolíticas que sus análogos α, por lo que han sido utilizados en la síntesis de moléculas más complejas como los peptidomiméticos, para aumentar la afinidad y estabilidad metabólica de algunos péptidos terapéuticos hasta llegar al sitio de acción.⁵ Adicionalmente la síntesis de estas moléculas ha sido de gran interés debido a que han mostrado un amplio espectro de actividades farmacológicas por sí solas como es el caso de la Cispentacina, un β-amino ácido cíclico con propiedades antibióticas y antifúngicas,⁶ o el (R)-Baclofen un agonista de GABA utilizado como relajante muscular.⁷ Sin embargo, los β- y γ-amino ácidos se encuentran más comúnmente como componentes estructurales de moléculas más complejas como el Taxol, un alcaloide de origen vegetal empleado en el tratamiento del cáncer⁸ y la Hapalosina un depsipéptido cíclico de doce miembros el cual mostró su uso potencial en el tratamiento de pacientes con cáncer, al invertir la multiresistencia a

² Kohen, R.; Yamamoto, Y.; Cundy, K.C.; Ames B.N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 3175–3179.

³ Froestl, W. *Future Med. Chem.* **2011**, 3(2), 163–175.

⁴ Juaristi, E.; Soloshonok, V.A. *Enantioselective Synthesis of β-Amino acids*, 2nd ed. Eds.; Wiley-VCH: New York, **2005**.

⁵ Steer, D. L.; Lew, R. A.; Perlmutter, P.; Smith, A. I.; Aguilar, M. I. *Curr. Med. Chem.* **2002**, 9, 811–822.

⁶ Deng, Y.; Yglesias, M.V.; Arman, H.; Doyle M.P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 1–6.

⁷ Olpe, H.-R.; Demiéville, H.; Baltzer, V.; Bencze, W.L.; Koella, W. P.; Wolf, P.; Haas, H.L. *Eur. J. Pharmacol.* **1978**, 52, 133–136.

⁸ Yang, Y.; Alcaraz, A.A.; Snyder, J.P. *J. Nat. Prod.* **2009**, 72, 422–429.

fármacos mediada por la glicoproteína P (**Figura 3**).⁹ El especial comportamiento de estas moléculas se asocia a su estructura, por lo que su síntesis de manera enantiopura ha sido objeto de estudio.^{4, 10}

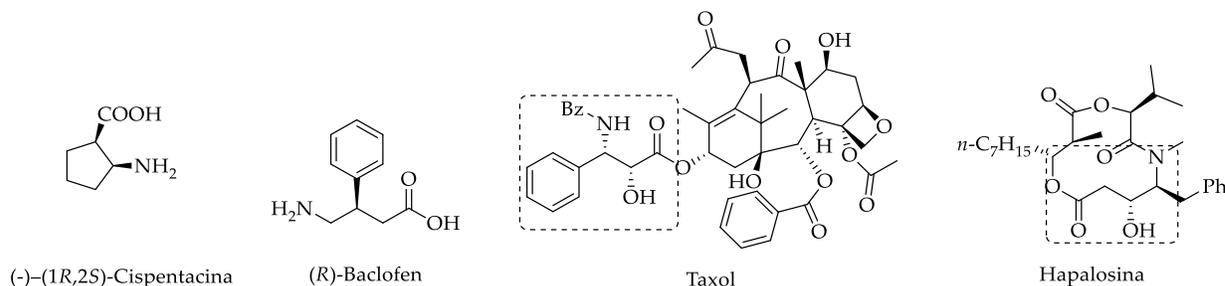


Figura 3. β - y γ -amino ácidos con propiedades farmacológicas.

Entre las metodologías descritas para las síntesis enantioselectiva de estas moléculas, se encuentran la homologación a partir de α -amino ácidos enantiopuros obtenidos de la naturaleza (*chiral pool*), la síntesis asimétrica y la resolución de racematos empleando catalizadores o auxiliares quirales. En este sentido, el uso de auxiliares quirales involucra más pasos de reacción (adición y remoción del auxiliar) mientras que los catalizadores quirales pueden ser caros o difíciles de sintetizar, aunados a las particulares condiciones de reacción, estos inconvenientes hacen que se opte por nuevas estrategias de síntesis como el uso de biocatalizadores. El uso de los biocatalizadores como las lipasas ofrece varias ventajas sobre los catalizadores convencionales como son su alta regio-, quimio- y estereoselectividad, adicionalmente el uso de biocatalizadores en síntesis orgánica se ha visto favorecido por el uso de disolventes orgánicos lo que ha permitido poder manipular las reacciones enzimáticas y aumentar el número de sustratos a ser transformados.¹¹ Durante los últimos años el uso de biocatalizadores se ha visto favorecido mediante el creciente desarrollo de nuevas técnicas de producción de enzimas, así como el desarrollo de herramientas computacionales que ayudan a entender, predecir y diseñar enzimas.¹²

⁹ Wagner, B.; Islas Gonzalez, G.; Tran Hun Dau, M-E. Zhu, J. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1999**, *7*, 737–747.

¹⁰ a) Ballard, C. E.; Yu, H.; Wang, B. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 471–498. b) Liu, M.; Sibi, M.P. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7991–8035. c) Lelais, G.; Seebach, D. *Peptide Science* **2004**, *76*, 206–244. d) Liljeblad, A.; Kanerva L.T. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5 831–5854. e) Ashfaq, M.; Tabassum, R.; Ahmad M. M.; Hassan, N. A.; Oku, H.; Rivera, G. *Med. Chem.* **2015**, *5*, 295–309. f) Ordóñez, M.; Cativiela, C.; Romero-Estudillo, I. *Tetrahedron: Asymmetry* **2016**, *27* 999–1055. g) Weiner, B.; Szymanski W.; Janssen, D. B.; Minnaarda, A. J.; Feringa. B. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1656–1691.

¹¹ Klivanov, A. M. *Nature* **2001**, *409*, 2041–2045.

¹² a) Wu, Q.; Soni, P.; Reez, M.T. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1872–1881. b) Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J.C.; Robins K. *Nature* **2012**, *485*, 185–194. c) Ferrario, V.; Ebert, C.; Nitti, P.; Pitacco, G.; Gardossi. L. *Current Biotechnology* **2015**, *4*, 87–99. d) Chen, H.; Meng, X.; Xu. X.; Liu, W.; Li S. *Applied*

Estudios de acoplamiento molecular proporcionan información valiosa de las interacciones no covalentes entre el sustrato y la enzima a un bajo costo computacional.

2. ANTECEDENTES

2.1. Obtención de compuestos enantioméricamente puros.

La obtención de compuestos enantioméricamente puros (cualquiera que estos sean) se pueden dividir en tres categorías dependiendo del material de partida utilizado: (i) a partir de compuestos enantiopuros obtenidos de la naturaleza, conocidos como acervo quiral (*chiral pool*); (ii) a partir de sustratos proquirales los cuales son transformados mediante síntesis asimétrica y (iii) la resolución de mezclas racémica obtenidas químicamente.¹³

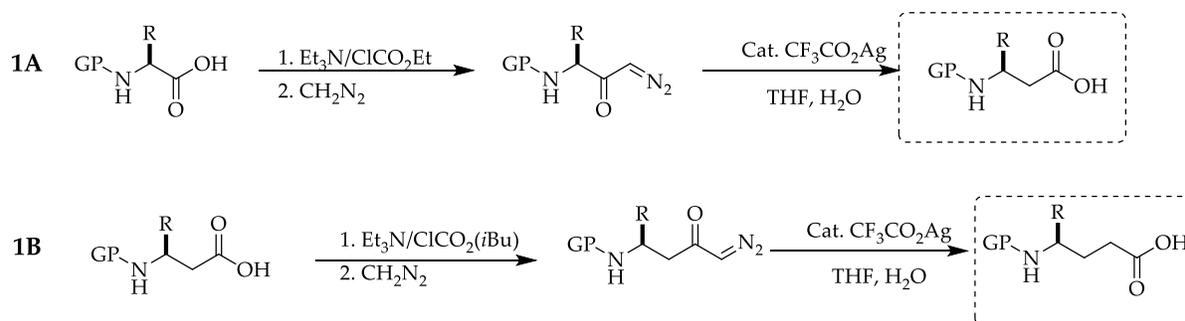
2.1.1. Síntesis de β - y γ -amino ácidos mediante el acervo quiral.

Esta es una de las primeras aproximaciones a la obtención de compuestos enantioméricamente puros; consiste en utilizar compuestos ópticamente puros obtenidos de la naturaleza, los cuales son utilizados como bloques de construcción para moléculas más complejas, sin afectar la configuración del centro estereogénico presente. El acervo quiral para obtención de β - y γ -amino ácidos son generalmente α -amino ácidos quirales comercialmente disponibles. La conversión de α - a β -amino ácidos se desarrolla en dos pasos, mediante la homologación de *Arndt-Eistern*; el primer paso consiste en la formación de la α -diazocetona a partir de el α -amino ácido *N*-protegido vía anhídrido mixto, en presencia de diazometano, y posterior rearrreglo de *Wolff* en presencia de cantidades catalíticas trifluoroacetato de plata y agua como nucleófilo (**Esquema 1A**). En analogía los β -amino ácidos *N*-protegidos son convertidos nuevamente a sus anhídridos mixtos y subsecuentes reacciones hasta la formación de los γ -amino ácidos (**Esquema 1B**).¹⁴ Esta reacción ha sido ampliamente reportada en la literatura, pero su aplicación a escala industrial no es viable debido a que el diazometano es inflamable, reactivo y presenta peligro de incendio y explosión.

¹³ Ghanem, A.; Aboul-Enein, H. Y. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3331-3351.

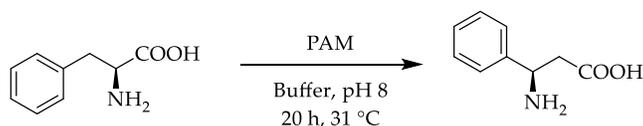
¹⁴ a) Seebach, D.; Overhand, M.; Kühnle, F. N. M.; Martinoni, B. *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 913-941.

b) Hintermann, T.; Gademann, K.; Jaun, B.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **1998**, *81*, 983-1002.



Esquema 1. Homologación de *Arndt-Eistern* en la síntesis de: β -amino ácidos (**1A**) y γ -amino ácidos (**1B**).

Dentro del mismo contexto la ruta biocatalítica para la síntesis particularmente de β -amino ácidos es mediante el uso de Aminomutasas. Las Aminomutasas catalizan la conversión de un α -amino ácido a su β isómero mediante la migración del grupo amino. Aunque este parece ser un procedimiento ideal para la síntesis de β -amino ácidos enantioméricamente puros las Aminomutasas presentan baja actividad y una alta especificidad al sustrato.¹⁵ La enzima *Taxus* fenilalanina aminomutasa (PAM) convierte varias (*S*)- α -arilalaninas en sus correspondientes (*R*)- β -fenilalaninas aunque con bajos rendimientos (**Esquema 2**).¹⁶



Esquema 2. Síntesis de (*R*)- β -fenilalanina mediante Aminomutasa.

La adquisición de los precursores quirales así como las particulares condiciones de reacción hacen que la síntesis a partir del acervo quiral sea poco práctica, por tanto, la síntesis asimétrica y la resolución de racematos obtenidos químicamente son las estrategias principales en la síntesis enantioselectiva de β - y γ -amino ácidos.

2.1.2. Síntesis asimétrica de β - y γ -amino ácidos

Una definición de síntesis asimétrica fue propuesta por *Morrison* y *Moher* en 1971: “La síntesis asimétrica es una reacción en la que un fragmento aquiral de un sustrato se convierte, mediante un reactivo, en una unidad quiral, de tal manera que los productos estereoisoméricos se producen en cantidades distintas.¹⁷ Podemos

¹⁵ a) Turner N. J. *Current Opinion in Chemical Biology* **2011**, *15*, 234–240. b) Zhang, D.; Chen, X.; Zhang, R.; Yao, P.; Wu, Q.; Zhu, D. *ACS Catal.* **2015**, *5*, 2220–2224.

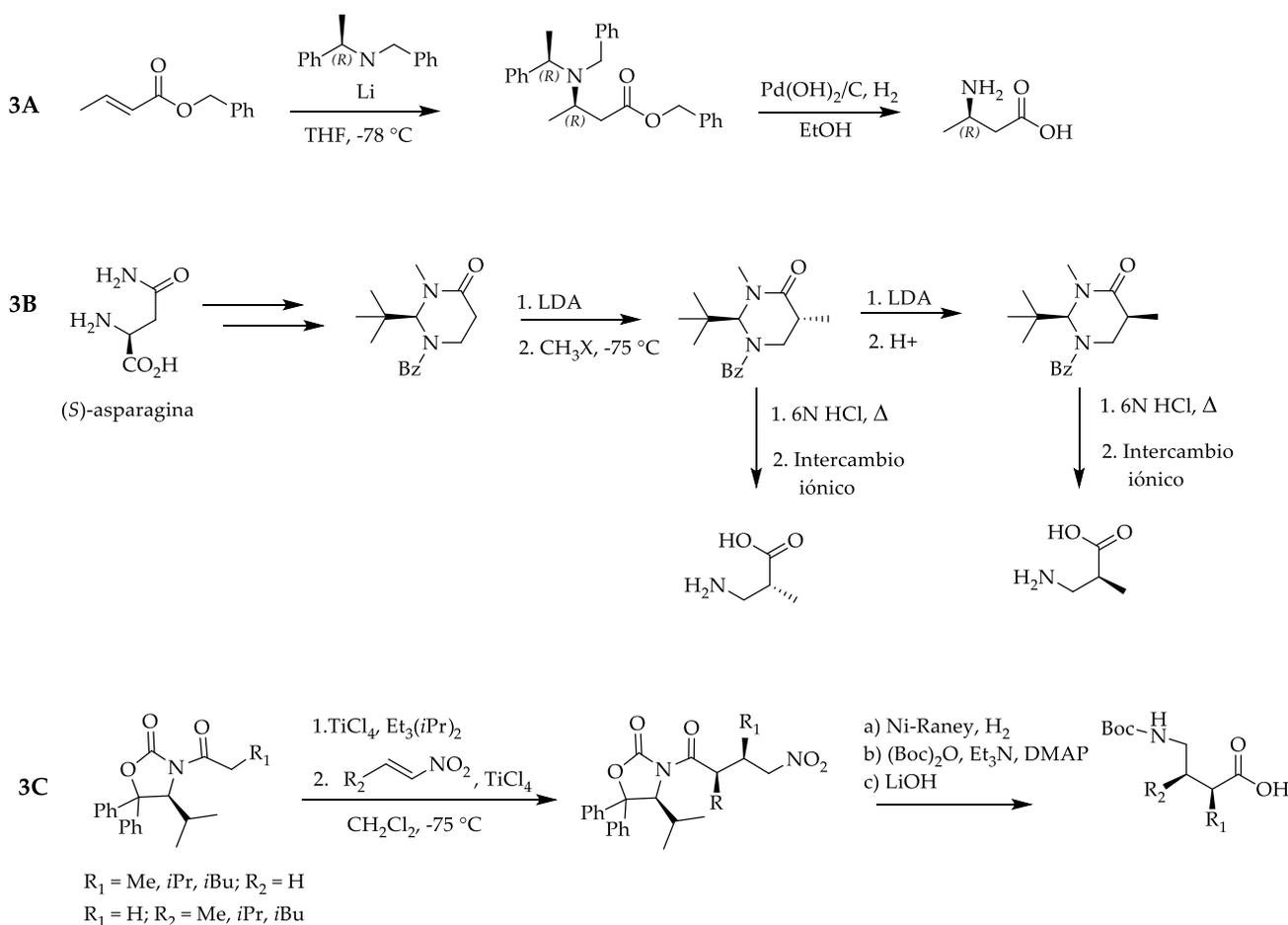
¹⁶ Cox, B. M.; Billsborrow, J. B.; Walker, K. D. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 6953–6959.

¹⁷ Juaristi, E. CINVESTAV; IPN, Introducción a la estequiometría y al análisis conformacional. 1998, p. 110.

clasificar a la síntesis asimétrica en dos grupos generales: síntesis asimétrica vía auxiliar quiral y síntesis asimétrica vía catalizador quiral.

2.1.2.1. Síntesis vía auxiliar quiral.

Este tipo de síntesis involucra cantidades estequiométricas del auxiliar quiral, el cual es incorporado al sustrato o al reactivo para inducir la asimetría, por lo general mediante la formación de estados de transición diastereoisoméricos de diferentes energías. Dentro de las metodologías descritas para la obtención de β - y γ -amino ácidos podemos citar la adición amiduros quirales a ésteres α,β -insaturados¹⁸ (**Esquema 3A**), alquilaciones diastereoselectivas a enolatos quirales¹⁹ (**Esquema 3B**), y la adición de enolatos de titanio derivados de acil-oxazolidinonas quirales a nitrolefinas²⁰ (**Esquema 3C**).



¹⁸ Davies, S. G.; Icbibara, O. *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, 2, 183-186.

¹⁹ a) Juaristi, E.; Quintana, D. *Tetrahedron: Asymmetry* **1992**, 3, 723-726. b) Juaristi, E.; Quintana, D.; Balderas, M.; García-Pérez, E. *Tetrahedron: Asymmetry* **1996**, 7, 2233-2246.

²⁰ Brenner, M.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta.* **1999**, 82, 2365-2379.

Esquema 3. Adición de (*R*)-*N*-(α -metilbencil)amiduro de litio a crotonato de metilo para la síntesis diastereoselectiva de β^3 -amino ácidos (**3A**). Alquilación diastereoselectiva de (*S*)-1-benzoil-2-*tert*-butil-3-metilperrhidropiridimidin-4-ona para síntesis de β^2 -amino ácidos enantioméricos a partir de (*S*)-aspargina (**3B**). Adición de enolatos de Titanio de 3-Acil-4-isopropil-5,5-difeniloxalidin-2-ona a nitro olefinas para la síntesis de γ^2 - y γ^3 - amino ésteres enantiméricamente puros (**3C**).

Sin embargo, la síntesis asimétrica mediante auxiliares quirales involucra el aumento número de pasos de ración, por la adición y remoción del auxiliar. Muchos de los auxiliares no son comercialmente disponible y se tienen que sintetizar aunado a las grandes cantidades del auxiliar que es utilizado en proporciones estequiométricas. Una alternativa es la síntesis asimétrica inducida mediante un catalizador quiral.

2.1.2.2. Síntesis vía catalizador quiral.

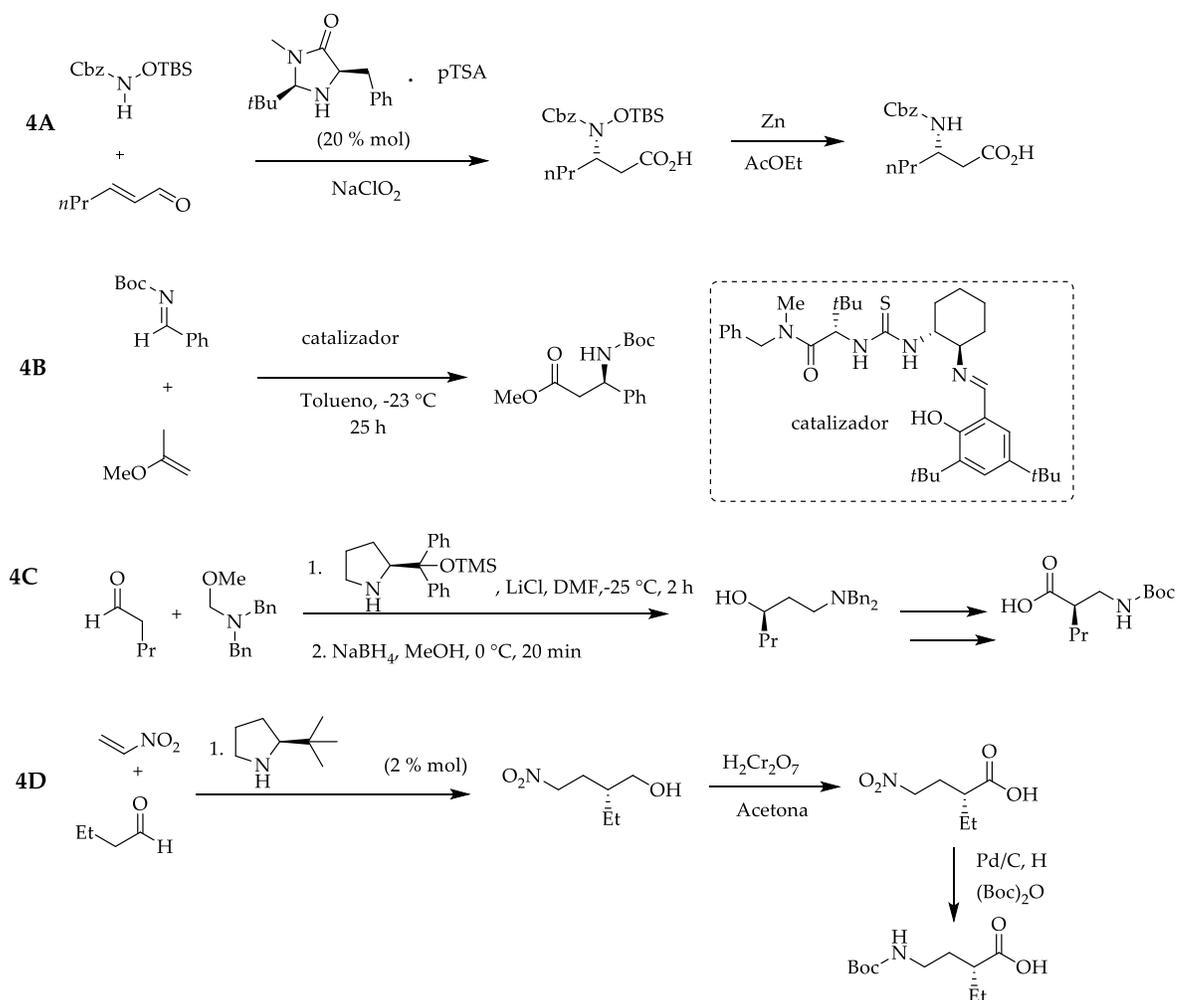
La catálisis asimétrica es una estrategia más sustentable en la síntesis de compuestos enantiméricamente puros, en este tipo de reacciones la entidad que promueve la quiralidad es el catalizador. Los métodos de catálisis asimétrica se pueden clasificar en tres grupos según el tipo de catalizador: catalizadores metálicos, organocatalizadores, o biocatalizadores.²¹ Dentro de las metodologías descritas para la obtención de β - y γ -amino ácidos vía organocatalizador podemos citar la adición *aza*-Michael de aminas a sistemas α,β -insaturados²² (**Esquema 4A y 4D**), la reacción de Mannich²³ (**Esquema 4B**) o la aminometilación de aldehídos²⁴ (**Esquema 4C**).

²¹ a) Enders, D.; Wang, C.; Liebich J. X. *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 11058–11076.

²² a) Chen, Y. K.; Yoshida, M.; MacMillan, D. W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9328–9329. b) Michigami, K.; Murakami, H.; Nakamura, T.; Hayama, N.; Takemoto Y. *Org. Biomol. Chem.*, **2019**, *17*, 2331–2335. c) Chi, Y.; Guo, L.; Kopf, N. A.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5608–5609.

²³ a) Wenzel, A. G.; Jacobsen, E. N. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 12964–12965. b) Pan, Y.; Zhao, Y.; Ma, T.; Yang, Y.; Liu, H.; Jiang, Z.; Tan, C-H. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 779 – 782. c) Zawa, M.; Morisaki, K.; Kondo, Y.; Morimoto, H.; Ohshima, T. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 17022 – 17028.

²⁴ Chi, Y.; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6804–6805.

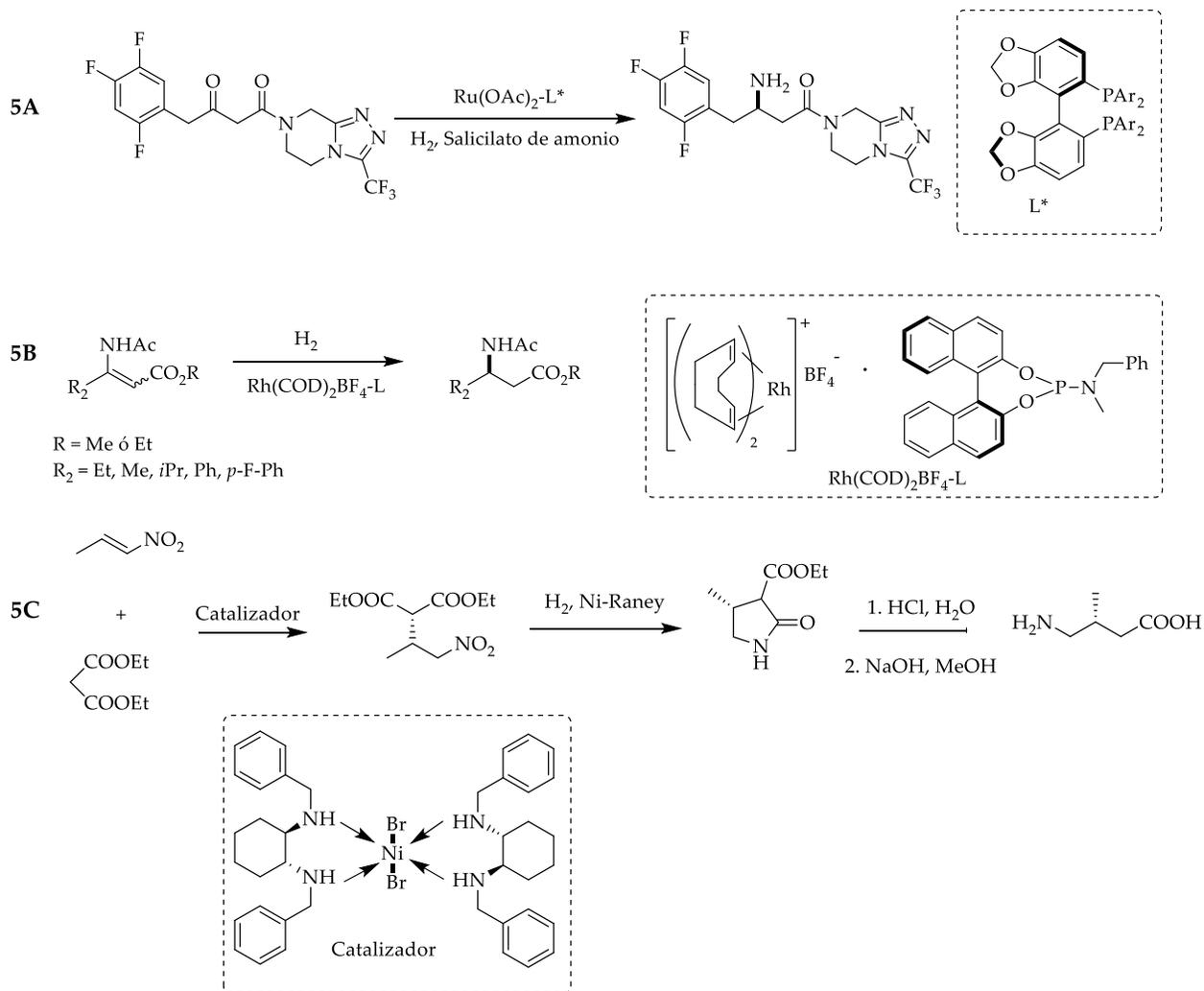


Esquema 4. Síntesis de β^3 amino ácidos por inducción asimétrica en: adición *aza*-Michael catalizadas por imidazolidinonas quirales (**4A**);^{22a} reacciones de Mannich por catalizada por derivados de urea quirales (**4B**).^{23a} Síntesis de β^2 amino ácidos por inducción asimétrica en aminometilación de aldehídos catalizada por pirrolidinas quirales (**4C**). Síntesis de γ^2 -amino ácidos mediante adición de Michael de aldehídos a nitro olefinas catalizado por pirrolidinas quirales (**4D**).^{22c}

Mientras que la catálisis por metales utiliza varios metales de transición en combinación con ligantes quirales. La catálisis por metales en síntesis de β -amino y γ -amino ácidos se ha aplicado en reacciones de animación reductiva²⁵ (**Esquema 5A**),

²⁵ Steinhuebel, D.; Sun, Y.; Matsumura, K.; Sayo, N.; Saito, T.; *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 11316–11317.

la hidrogenación de β-(amino) acrilatos²⁶ (**Esquema 5B**) adición de dietilmalonatos a nitrolefinas²⁷ (**Esquema 5C**), por citar algunos.



Esquema 5. Aminación reductiva asimétrica catalizada por complejos quirales de Rutenio (**5A**). Hidrogenación enantioselectiva de β-(Acilamino)acrilatos catalizada por complejos monodentados de Rodio (**5B**).^{26a} Adición enantioselectiva de dietilmalonato a nitropropeno catalizada por complejos quirales de Niquel (**5C**).

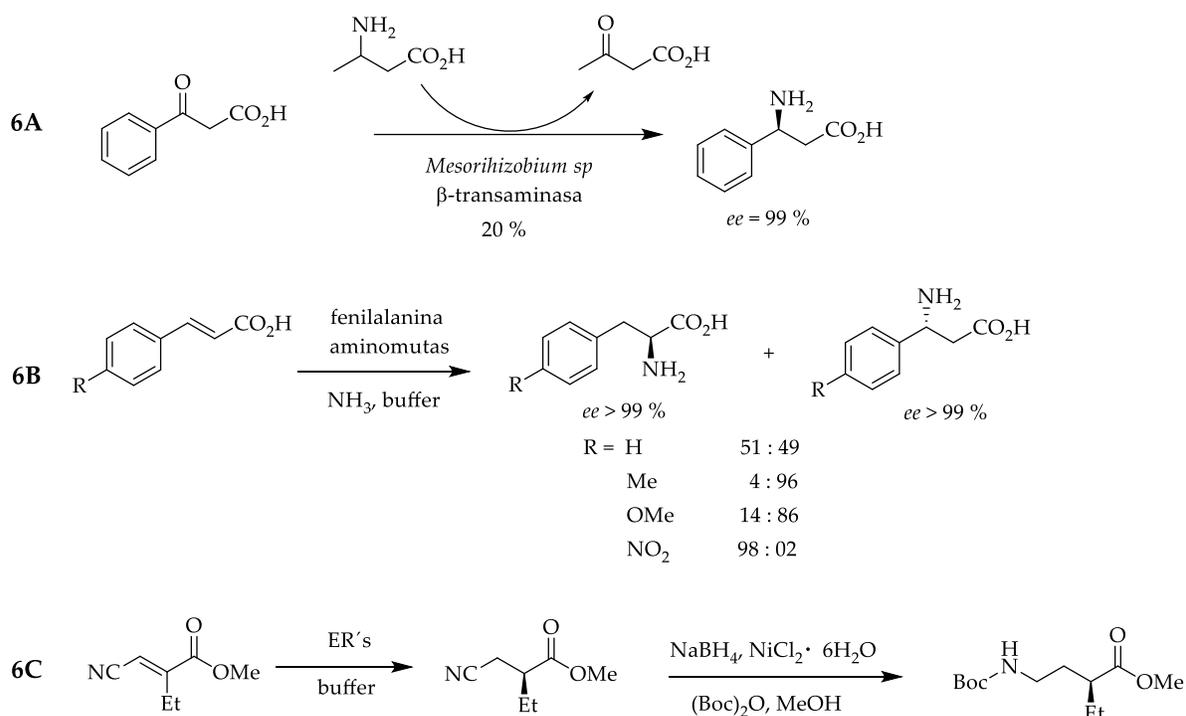
2.1.2.3. Síntesis vía biocatalizador.

La síntesis asimétrica de β- y γ-amino ácidos aún representa uno de los mayores retos de la biocatálisis, debido a que muchos de los biocatalizadores utilizados presentan

²⁶ a) Peña, D.; Minnaard, A. J.; de Vries, J. G.; Feringa, B. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14552–14553. b) Tang, W.; Wang, W.; Chi, Y.; Zhang X. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3509–3511. c) Jerphagnon, T.; Renaud, J.-L.; Bruneau, C. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15* 2101–2111.

²⁷ Resnikov, A. N.; Golovin, E. V.; Klimochkin, Y. N. *Russian J. of Org. Chem.* 2013, *49*, 664–668.

una baja conversión, la necesidad de cofactores y una alta especificidad que limita el número de sustratos a transformar. Dentro de las enzimas que son capaces de llevar a cabo la síntesis asimétrica de β -amino ácidos, se encuentran las Transaminasas²⁸ a partir de β -cetoácidos²⁹ (**Esquema 6A**) y las Fenilaminomutasas (PAM) las cuales catalizan la adición enantioselectiva de amoniaco en derivados del ácido cinámico³⁰ (**Esquema 6B**), mientras que las Eneereductasas (ER's) catalizan la reducción del doble enlace en β -cianoésteres α,β -insaturados precursores de γ^2 -amino ácidos.³¹



Esquema 6. Síntesis de aril β^2 -amino ácidos mediante: aminación de derivados de ácido cinámico catalizada por fenilaminomutasas (**6A**); Transaminación de β -cetoácidos catalizada por β -transaminasas (**6B**). Síntesis de γ^2 -amino ésteres mediante reducción de β -ciano ésteres α,β -insaturados(**6C**).

²⁸ Rudat, J.; Brucher, B. R.; Syldatk, C. *AMB Express* **2012**, 2:11.

²⁹ Kim, J.; Kyung, D.; Yun, H.; Cho, B.-K.; Seo, J.-H.; Cha, M.; Kim B.-G. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, 73, 1772–17782.

³⁰ Szymanski, W.; Wu, B.; B. Weiner, B.; de Wildeman, S.; Feringa, B. L.; Janssen, D. B.; J. *Org. Chem.* **2009**, 74, 9152–9157.

³¹ Brenna, E.; Gatti, F. G.; Manfredi, A.; Montib, D.; Parmeggiana, F. *Catal. Sci. Technol.* **2013**, 3, 1136–1146.

A pesar de la amplia gama de metodologías asimétricas reportadas en la literatura para la síntesis de β - y γ -amino ésteres, la adquisición de precursores quirales, las cantidades equimolares de auxiliares quirales, así como las particulares condiciones de reacción, limitan la aplicación de estos métodos a gran escala. Estas razones hacen que el método predominante para la obtención de β - y γ -amino ésteres sea la resolución de mezclas racémica obtenidas químicamente. Entiéndase por mezcla racémica una mezcla en cantidades equimolares de los dos enantiómeros de una molécula quiral.

2.1.3. Síntesis de β - y γ -amino ácidos por resolución de racematos

La resolución de racematos obtenidos químicamente es el método predominante para obtención de compuestos enantioméricamente puros entre los cuales se encuentran β -, γ -amino ácidos y sus derivados. Consiste en la separación de los dos componentes ópticamente activos de una mezcla racémica. De forma general podemos dividir estas metodologías en dos grupos: i) métodos de resolución directa y ii) métodos de resolución por derivatización.

2.1.3.1. Métodos de resolución directa

La primera resolución física de una mezcla racémica ocurrió en 1848 cuando *Louis Pasteur* separó los dos enantiómeros de cristales de las sales de tartrato de amonio. En un principio se sabía que estos compuestos tenían la misma constitución y conectividad y solo se diferenciaban en la manera que desviaban el plano de la luz polarizada por tanto, eran nombrados como (+)/(-) o *d* (dextrógiro) y *l* (levógiro). En 1874 *van't Hoff* y *Le Bel* propusieron de manera independiente que un compuesto quiral posee átomos de carbono sustituidos con cuatro ligandos diferentes orientados a las esquinas de un tetraedro, en cuyo centro está un átomo de carbono el cual es denominado centro estereogénico. En 1956 Cahn, Ingold y Prelog introducen los términos *R/S* para especificar el arreglo en el espacio de un centro estereogénico (configuración); estos términos se basan en reglas de prioridad de los ligandos.^{17,32}

Dado que no todos los enantiómeros cristalizan y son raros los que cristalizan en forma diferente, es necesario recurrir a otros métodos de separación directa como la

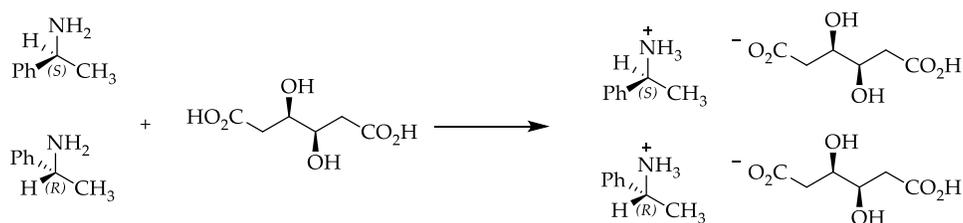
³² a) Mane, S. *Anal. Methods* **2016**, *8*, 7567–7586. b) van't Hoff, J. H. *Ach. Neer.* 1874, *9*, 445–454. c) Ridell F. G.; Robinson, M. J. T. *Tetrahedron* **1974**, *30*, 2001–2007. Le Bel, J. A.; *Bull. Soc. Chim. France* 1874, *22*, 337–347. Cahn, R. S.; Ingold C.K.; Prelog, V. *Experientia* 1956, *12*, 81–124.

cromatografía de líquidos quiral, esta emplea una fase estacionaria quiral. Este tipo de cromatografía depende de la absorción diferencial de los enantiómeros por la fase estacionaria quiral. Los enantiómeros forman complejos diastereoméricos rápidos y reversibles con la fase estacionaria quiral (interacciones de tipo enlace de hidrógeno e interacciones π - π aromáticas) de tal manera que el enantiómero que forme el complejo más estable con la fase estacionaria será retenido con mayor fuerza y por tanto será el último en eluir.¹³ Los principales inconvenientes de esta técnica son las cantidades excesivas de disolventes utilizados en los procesos a escala industrial, así como la elección de la fase estacionaria quiral que a menudo representa un alto costo.^{32a, 33} Por tanto, si la separación directa no es posible, es necesario hacer a los enantiómeros diferentes, uno del otro.

2.1.3.2. Métodos de resolución por derivatización.

2.1.3.2.1. Conversión a diastereoisómeros

Mientras los enantiómeros tienen las mismas propiedades físicas y químicas los diastereoisómeros presentan (en teoría) diferentes propiedades. Por tanto, la conversión de enantiómeros a diastereoisómeros mediante la unión covalente o no covalente de un agente de resolución representa uno de los métodos habituales para la resolución de mezclas racémicas. Dentro de los agentes de resolución se emplean a menudo materiales de origen natural (**Esquema 7**).^{32, 33}



Esquema 7. Resolución de la feniletilamina por derivatización a diastereoisómeros con ácido tartárico.

Una de las diferencias entre diastereoisómeros es su solubilidad, por tanto la cristalización fraccionada siempre ha sido el método más común para su separación, una vez separados se procede a la liberación del agente de resolución y los enantiómeros son obtenidos de manera enantiopura. Sin embargo, el hecho de estar limitado a sólidos ha impulsado la búsqueda de otros métodos como la resolución cinética.

³³ Keith, J. M.; Larrow, J. F.; Jacobsen, E. N. *Adv. Synth. Catal.* **2001**, *343*, 5–26.

2.1.3.2.2. Resolución cinética enzimática

Es posible inducir la resolución mediante una reacción selectiva de un enantiómero con un reactivo o catalizador quiral, mediante una resolución cinética KR, por sus siglas en inglés (*Kinetic Resolution*). El principio de la KR se basa en las diferentes velocidades de reacción (k_R y k_S) de cada uno de los enantiómeros [(R)-Sustrato y (S)-Sustrato] para formar un producto [(R)-Producto y (S)-Producto].^{13, 34} La eficiencia de una resolución cinética es expresada por el factor de selectividad $s = k_{\text{rápido}}/k_{\text{lento}}$.³³ Cuando un enantiómero reacciona con una entidad quiral (reactivo o catalizador) da lugar a estados de transición diastereoisoméricos que pueden ser de distinta energía, por tanto, el estado de transición de menor energía, dará lugar a la formación del producto cinético; el $\Delta\Delta G^\ddagger$ representa la diferencia energética entre los estados de transición diastereoméricos formados por cada enantiómero; idealmente se busca que esta diferencia sea lo suficientemente grande para obtener un proceso altamente resolutivo (**Figura 4**).³⁵

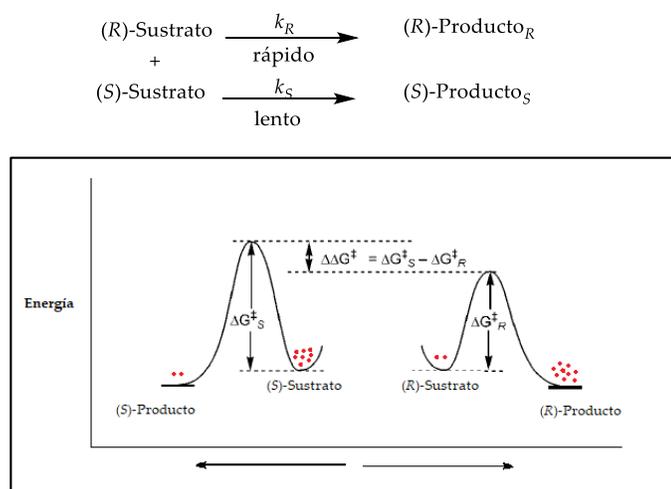


Figura 4. Diagrama de energía para una resolución cinética.

La entidad quiral puede ser un reactivo, un quimio-catalizador (un ácido, una base o un complejo metálico) o un biocatalizador (como una enzima o un microorganismo).¹³ En los últimos años el uso de biocatalizadores para transformaciones orgánicas se ha convertido en una alternativa cada vez más atractiva ante los métodos químicos convencionales. Los biocatalizadores ofrecen

³⁴ Gawley, R.; Aubé, J. *Principles of Asymmetric Synthesis*. 2nd Ed.; Elsevier: Oxford, 2012.

³⁵ Gotor, V.; Alfonso, I.; García-Urdiales, Eduardo. *Asymmetric Organic Synthesis with Enzymes*, WILEY-VCH : Germany, 2008.

varias ventajas sobre los quimio catalizadores como lo son: una alta eficiencia, son completamente biodegradables, actúan bajo condiciones de reacción suaves alrededor de 30 °C (por lo que reducen el riesgo de isomerización, racemización, rearrreglos y generación de subproductos), ofrecen promiscuidad catalítica (se cataliza una reacción no natural), promiscuidad del sustrato (conversión de un sustrato no natural), además de que pueden llevar a cabo la reacción en ambientes no naturales. Sin embargo las tres ventajas principales de una enzima son: quimioselectividad, regioselectividad y enantioselectividad. Presentan *quimioselectividad* al reaccionar preferentemente sobre un solo grupo funcional ente otros de reactividad similar. Muestran *regioselectividad* debido a que su compleja estructura tridimensional puede acomodar de manera específica al sustrato lo que permite llevar a cabo la reacción sobre uno de entre varios grupos funcionales que son químicamente idénticos pero están situados en diferentes posiciones dentro de la misma molécula sustrato. Además son altamente *enantioselectivas*, pues llevan a cabo la conversión preferente y en algunos casos exclusiva de solo uno de los enantiómeros de una mezcla racémica. Estas características evitan la necesidad de protección y desprotección de grupos de reactividad similar y que mediante síntesis química son indistinguibles. Por tanto, hacen que las enzimas sean especialmente atractivas en síntesis química.³⁶ Sin embargo, la resolución cinética está limitada a una conversión máxima del 50 %, esta limitación ha llevado a la evolución de la resolución cinética clásica a la resolución cinética dinámica en donde el enantiómero remanente es racemizado, en principio alcanzando un rendimiento cuantitativo de uno de los enantiómeros.³⁷

Mientras que en las reacciones enantioselectivas de sustratos proquirales el producto es obtenido con un exceso enantiomérico (*ee*) constante, en una resolución cinética la velocidad de la transformación de cada enantiómero varía con el grado de conversión (**Figura 5**). Ya que la proporción de los dos enantiómeros del sustrato no permanece constante durante la reacción. Por lo tanto, la pureza óptica tanto del sustrato (*ee_s*) como del producto (*ee_p*) se convierte en una función de la conversión. Entonces la comparación de valores de *ee* de dos resoluciones cinéticas sólo es significativo al mismo grado de conversión.³³

³⁶ Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6th Ed.; Springer-Verlag: Berlin 2011.

³⁷ Pellissier, H. *Tetrahedron* 2011, 67, 3769–3802.

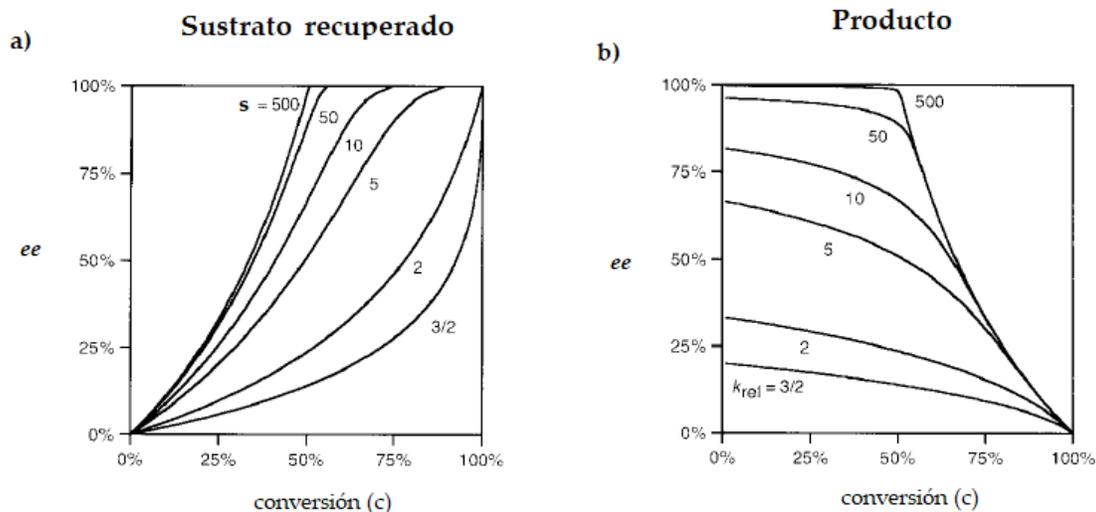
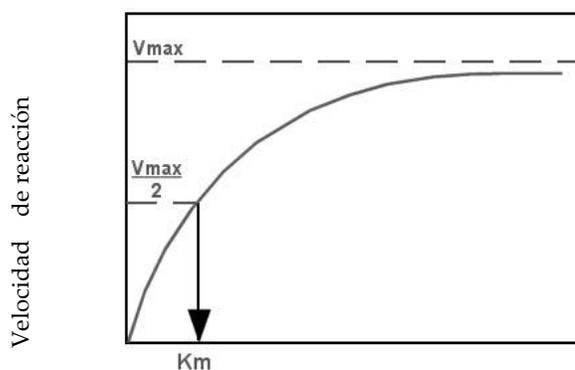


Figura 5. Gráficos de ee contra conversión como una función de factor de selectividad (s) para: **a)** sustrato recuperado calculado a partir de la expresión $s = \frac{\ln[1-c(1-ee)]}{\ln[1-c(1+ee)]}$; **b)** producto calculado a partir de la expresión $s = \frac{\ln[1-c(1+ee)]}{\ln[1-c(1-ee)]}$

El comportamiento cinético que presentan la mayoría de las reacciones enzimáticas se ajusta a las teorías propuestas por Michaelis-Menten. La catálisis enzimática requiere que el sustrato (S) se una inicialmente, no covalentemente, al sitio activo de la enzima, donde ocurre la reacción. La forma del complejo enzima-sustrato (E-S), es llamada complejo de Michaelis-Menten y la constante de Michaelis-Menten (K_m) es igual a la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de su valor máximo. La velocidad de conversión del complejo E-S a producto está dada por la constante de velocidad k_{cat} , también llamada número de recambio (**Figura 6**). De esta manera k_{cat}/K_m es la constante de especificidad para un enantiómero. Esta constante de especificidad puede ser empleada para evaluar la eficiencia global y especificidad de la enzima en un proceso determinado.³⁸ En términos generales la K_m indica la afinidad de la enzima por el sustrato, por tanto, entre menor sea el valor de K_m , mayor será la afinidad de la enzima por el sustrato.

³⁸ Carrea, G.; Riva, S. *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*, WILEY-VCH: Alemania, 2008.



[S]

Figura 6. Representación esquemática de una reacción simple siguiendo una cinética tipo Michaelis-Menten. V_{max} = valor máximo de velocidad; K_m (la constante de Michaelis-Menten) = concentración de sustrato [S] a la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la V_{max} .

2.1.4. Razón enantiomérica E

En 1982 Sih y colaboradores introdujeron el término "razón enantiomérica" (E) que describe la selectividad de una enzima en función de la conversión (c) y el exceso enantiomérico de sustrato y/o del producto (ee_s , ee_p).³⁹ E es un parámetro adimensional, que a diferencia del ee y el grado de conversión permanece constante durante toda la reacción y solo está determinado por las condiciones del sistema (por ejemplo: temperatura y actividad del agua). E mide la capacidad de una enzima para distinguir entre dos enantiómeros bajo condiciones de reacción determinadas y se corresponde con la relación entre las constantes de especificidad de los enantiómeros del sustrato (**Ecuación 1**).

$$E = \frac{[K_{cat}/K_m]S_R}{[K_{cat}/K_m]S_S} \quad \text{Ecuación 1}$$

Sih y colaboradores desarrollaron esta ecuación para una reacción enzimática reversible en términos del ee del sustrato o producto y el grado de conversión; donde K es la constante de equilibrio (**Ecuación 2 y 3**).

³⁹ a) Chen, C.-S.; Fujimoto, Y.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1294-1299. b) Chen, C.-S.; Wu, H.; Girdaukas, G.; Sih, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2812-2817. c) Chen, C.-S.; Sih, C. J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 695-707.

$$E = \frac{\text{Ln}[1-(1+K)c(1+ee_p)]}{\text{Ln}[1-(1+K)c(1-ee_p)]}$$

Ecuación 2

$$E = \frac{\text{Ln}[1-(1+K)(c+ee_s\{1-c\})]}{\text{Ln}[1-(1+K)(c-ee_s\{1-c\})]}$$

Ecuación 3

Cuando la reacción es irreversible o la reacción inversa es insignificante ($K = 0$), esta ecuación se puede reducir a lo siguiente:

$$E = \frac{\text{Ln}[1-c(1+ee_p)]}{\text{Ln}[1-c(1-ee_p)]} = \frac{\text{Ln}[(1-c)(1-ee_s)]}{\text{Ln}[(1-c)(1+ee_s)]}$$

Ecuación 4

En donde (c) es expresada por la siguiente ecuación:

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p}$$

Ecuación 5

E también puede expresarse en términos del ee_s y ee_p según la siguiente ecuación:

$$E = \frac{\text{Ln}[(1-ee_s)/1+(ee_s/ee_p)]}{\text{Ln}[(1+ee_s)/1+(ee_s/ee_p)]}$$

Ecuación 6

Como regla general, una reacción no selectiva tiene un valor E de 1, las reacciones con valores E inferiores a 15 se consideran generalmente poco eficientes para fines prácticos. La utilidad del proceso puede ser considerada moderada cuando los valores de E van de 15 a 30 y por encima de estos valores la selectividad se considera excelente.³⁶ Sin embargo valores de $E \geq 100$ son menos precisos de medir que aquellos valores de E moderados.⁴⁰

⁴⁰ Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J. *Hydrolases in Organic Synthesis*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 1999.

2.1.5. Ingeniería del medio

Desde el punto de vista de la síntesis orgánica la propiedad más valiosa de un biocatalizador es la enantioselectividad, las enzimas muestran una excelente enantioselectividad frente a sus sustratos naturales, sin embargo el principal interés es el uso de enzimas para síntesis estereoselectiva de sustratos no naturales, pero sí de interés sintético. En este sentido cuando un proceso enzimático no ha sido lo suficientemente selectivo ($E \leq 5$), se pueden recurrir a varias estrategias que ayudan a incrementar la selectividad. E puede ser modificada en función de las condiciones de reacción como la temperatura, concentración de sustratos, actividad de agua, tipo del disolvente. Esta última estrategia ha sido nombrada ingeniería del medio. El solvente puede influir en la reacción enzimática de al menos dos formas: 1) por interacción directa con la enzima, causando un cambio en la flexibilidad de esta, así como una inhibición competitiva por las moléculas de solvente, y 2) al influir en la solvatación de los sustratos y productos en el medio de reacción.^{11, 41}

Entre los biocatalizadores más utilizados se encuentran las lipasas, debido a que son capaces de aceptar una gran variedad de sustratos, además de poseer estabilidad en disolventes orgánicos, no necesitan cofactores, poseen promiscuidad catalítica y principalmente pueden ser altamente regio-, quimio- y enantioselectivas.⁴²

2.1.6. Lipasas

Las lipasas (EC 3.1.1.3) pertenecen a la familia de las hidrolasas. En la naturaleza, las lipasas catalizan la hidrólisis de uno o más de los tres enlaces éster presentes en acilgliceroles (de grasas y aceites) para liberar ácidos grasos y glicerol. Las lipasas pertenecen a la familia de las α, β hidrolasas, en donde también se encuentran las esterasa, peroxidasa y proteasa. Estas enzimas comparten una estructura terciaria formada por una lámina β de ocho hebras en su mayoría paralelas, rodeadas por hélices α . Además de una triada catalítica compuesta por: un residuo nucleófilico (serina, cisteína, aspartato), un residuo catalítico ácido (aspartato o glutamato) y un residuo de histidina (**Figura 7**).⁴³

⁴¹ a) Carrera, G.; Riva, S. *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*. WILEY-VCH: Weinheim Alemania, 2008. b) Li, C.; Tan, T.; Zhang, H.; Feng, W. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 28434–28441.

⁴² a) Busto, E.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504 – 4523. b) Jaeger, K-E.; Dijkstra B. w.; c) Reetz, M.T. *Annu. Rev. Microbiol.* **1999**, *53*, 15–51.

⁴³ a) Pleiss, J.; Fischer, M.; Schmid, R. D. *Chemistry and Physics of Lipids* **1998**, *93*, 67-80. b) Patel, R. N. *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries*; CRC Press: Boca Raton, Florida, 2007.

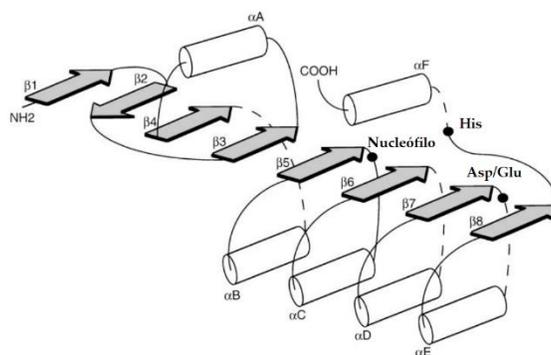
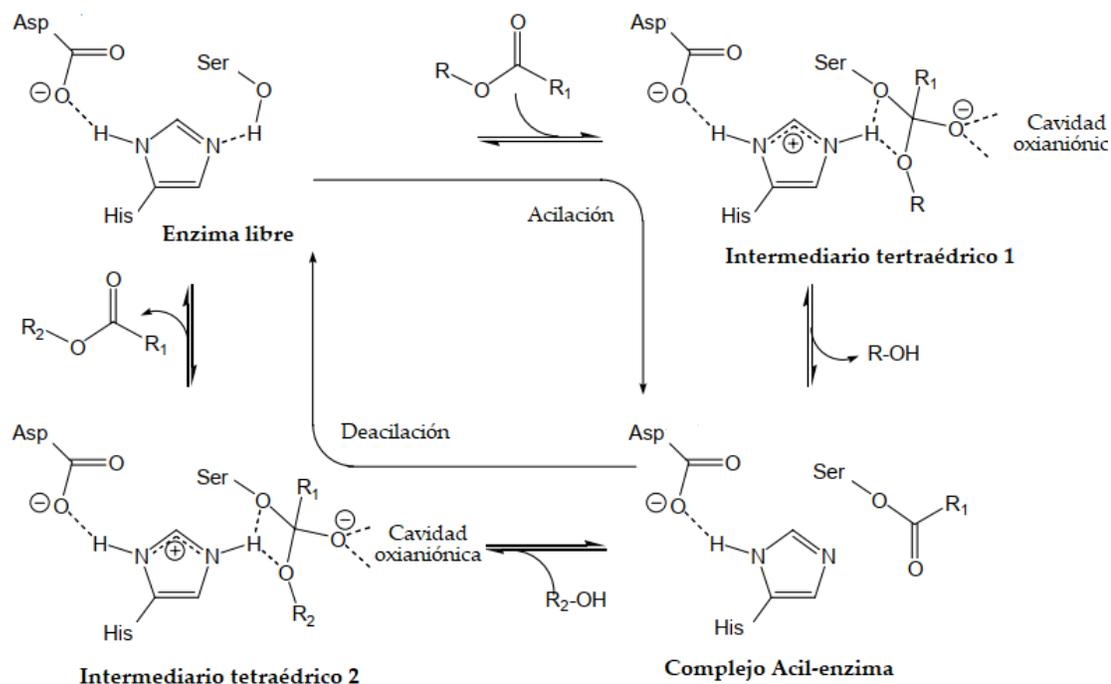


Figura 7. Estructura terciaria de la α/β hidrolasas: α hélices se muestran como cilindro, hebras β se muestran como flechas, triada catalítica se muestra como puntos.

Las lipasas actúan como catalizadores quirales en una reacción de sustitución nucleofílica sobre el grupo carbonilo, siguiendo un mecanismo de desplazamiento de acilación-desacilación (**Esquema 8**). En la etapa de acilación, la serina nucleofílica es activada por el par His/Asp, llevando un ataque nucleofílico al carbono carbonílico del sustrato, el oxianión generado es estabilizado en la cavidad oxianiónica, mientras que la histidina dona el protón al grupo saliente del intermedio tetraédrico, cuando la carga es regresada del oxígeno al carbono tetraédrico, el grupo saliente es liberado para formar el intermedio acil-enzima. La etapa de desacilación se realiza a través de un segundo intermedio tetraédrico, un segundo nucleófilo lleva el ataque sobre el complejo acil-enzima, el oxianión generado es estabilizado en la cavidad oxianiónica, mientras el segundo sustrato dona el protón a la serina saliente, liberando el producto y regenerando la enzima.⁴⁴ En un proceso resolutivo la enzima genera intermediarios tetraédricos de diferentes energías para cada uno de los enantiómeros dando lugar a la resolución de la mezcla racémica.

⁴⁴Tsai, S-W. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2016**, 127, 98–116.



Esquema 8. Mecanismo de reacción en de una lipasa en una reacción de sustitucion nucleofílica.

La mayoría de las lipasas se caracterizan por un fenómeno llamado de activación interfacial; cuando la lipasa esta disuelta en agua la entrada al sitio activo está cubierta por una tapa o "lid". Sin embargo, cuando entra en contacto con una interfaz entre agua y una fase apolar, es decir, aceite o en un disolvente orgánico, la tapa se abre, permitiendo a los sustratos entrar en el sitio activo, a esta característica se le atribuye la actividad de las lipasas en disolventes orgánicos, mientras que su actividad hacia sustratos solubles en agua es bastante baja.⁴⁵ La capacidad catalítica de las lipasas en medios orgánicos es una herramienta ampliamente utilizada en la síntesis orgánica. Desde que se descubrió que las enzimas pueden ser catalíticamente activas en solventes orgánicos puros, la cuestión de cómo seleccionar el solvente correcto para una conversión enzimática específica ha sido de crucial importancia.⁴¹ Una de las ventajas que ofrece el uso de estos biocatalizadores en medios orgánicos es aumentar el número de sustratos a reaccionar, especialmente

⁴⁵ Whitaker, J. R.; Voragen, A. G.; Wong, D. *HANDBOOK OF FOOD ENZYMOLOGY*; Marcel Dekker, Inc: New York, 2003.

los sustratos poco solubles en medios acuosos, el uso de disolventes orgánicos reduce el riesgo de contaminación microbiana, además de que algunos disolventes orgánicos son más fáciles para eliminar que el agua,^{46, 13} adicionalmente el uso de disolventes orgánicos anhidros también permite la supresión de la hidrólisis como una reacción natural de las lipasas favoreciendo su promiscuidad catalítica hacia reacciones de transesterificación, tiotransésterificación, aminólisis, incluso adición aldólica y adición de Michael^{11, 47} ventaja que, en conjunto una correcta elección de los disolventes permite el control de la quimioselectividad en las reacciones catalizadas por lipasa. Por tanto las lipasas han demostrado ser eficientes catalizadores estereoselectivos en la resolución cinética de un amplio variedad de compuestos quirales.^{10d, 13, 48}

2.1.7. Lipasa B de *Candida antarctica*

Lipasa B de *Candida antarctica* (CaL-B), es la enzima comercial más utilizada tanto a nivel académico como industrial.⁴⁹ CaL-B es una de las dos lipasas aislada de la levadura basidomicetos *Candida antarctica*, como su nombre lo indica, la cepa se halló en la Antártida cuando se buscaban enzimas con propiedades extremas. A diferencia de la mayoría de las lipasas, CaL-B no presenta el fenómeno de activación interfacial, es una lipasa activa tanto en medios acuosos como orgánicos, esta característica ha sido atribuida a una tapa corta que ha sido identificada como la hélice $\alpha 5$. La primera estructura cristalina de CaL-B (sin sustrato en la cavidad catalítica) fue reportada en 1994 por Uppenberg y colaboradores (código PDB: 1TCA).⁵⁰ CaL-B es una proteína globular que pertenece a la familia de las α/β -hidrolasas; posee siete hebras β centrales y diez α -hélices; es un monómero de 317 aminoácidos y una masa atómica de 33 kDa. Al igual que otras Lipasas, el sitio activo está compuesto por una tríada catalítica de Ser105/Asp187/His224, situada en el fondo de un canal estrecho e hidrofóbico de 10 Å × 4 Å de ancho y 12 Å de profundidad (**Figura 8**).⁵¹

⁴⁶ Banik, S. D.; Nordblad, M.; Woodley, J. M.; Peters, G. H. *ACS Catalysis*, **2016**, *10*, 6350–6361.

⁴⁷ U. T. Bornscheuler, R. J. Kazlauskas, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 6032–6040

⁴⁸ Santaniello, E.; Ferraboschi, P.; Grisenti, P.; Manzocchi, A.; *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1071–1132.

⁴⁹ Wu, Q.; Soni, P.; Reez, M.T. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1872–1881.

⁵⁰ Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S. Jones, T. A. *Structure* **1994**, *2*, 193–308.

⁵¹ Anderson, E.M; Larsson, K.M.; Kirk, O. *Biocatalysis and Biotransformations*, **1998**, *16*, 181–204.

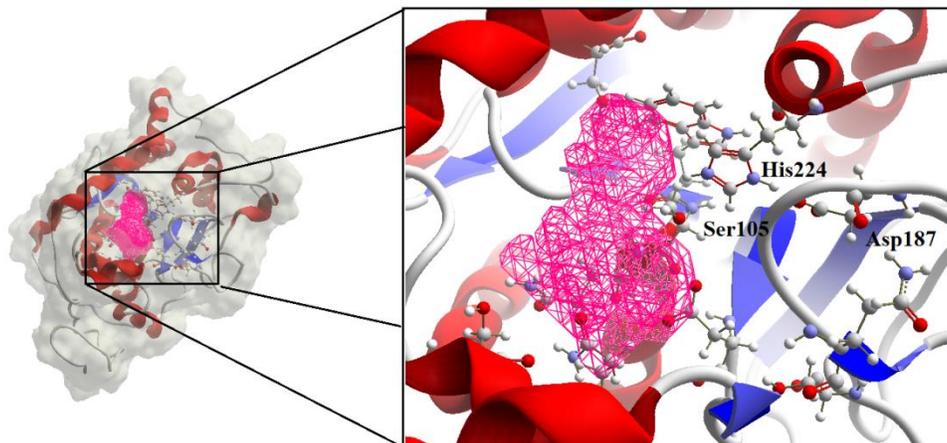


Figura 8. Sitio catalítico de CaL-B en 3D; hélices α (rojo), hebras β (azul), cavidad catalítica (rosa). Los residuos de la triada catalítica Ser105/Asp187/Hist224 se muestran en representación de esferas.

En un segundo reporte Uppenberg y colaboradores publicaron una nueva estructura cristalina de CaL-B (código PDB: 1LBS) con un inhibidor en la cavidad catalítica; el mecanismo para la catálisis requiere la transferencia del protón de la histidina al grupo saliente, lo que evidencia dos canales que corren casi paralelos desde la serina nucleofílica a la superficie y que apenas si están separados por las cadenas hidrofóbicas de Ile189 e Ile285. Dichos canales fueron identificados como región del acilo y región del nucleófilo (**Figura 9**).⁵²

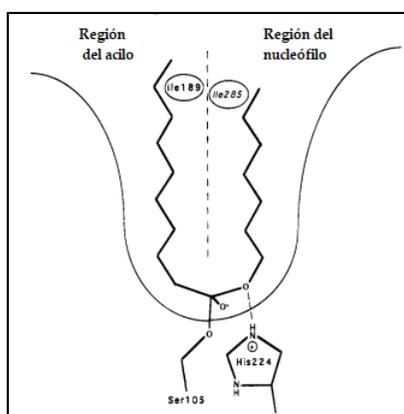


Figura 9. Cavidad catalítica de CaL-B dividido en dos partes: región del acilo y región del nucleófilo

⁵² Uppenberg, J.; Öhrner, N.; Norin, M.; Hult, K. Kleywegt, G.J.; Patkar, S.; Waagen, V.; Anthonsen, T.; Jones, T.A. *Biochemistry*, **1995**, *34*, 16838–16851.

CaL-B ha sido utilizada en la síntesis de compuestos de alto valor, principalmente en reacciones de resolución cinética de segundos sustratos como aminas⁵³ y alcoholes⁵⁴. En estos dos últimos casos la enantiodiscriminación sigue un modelo empírico para el enantiómero de reacción rápida en una resolución cinética catalizada por lipasas, la cual está bien documentada y es conocida como la regla de Kazlauskas.⁵⁵ Los estudios de dinámica molecular de CaL-B sugieren que la región del nucleófilo está delimitado por el residuo de Trp104, lo que da origen a la éstereselectividad de CaL-B.⁵² Por el contrario, CaL-B muestra una estereoselectividad más baja en la resolución de los ácidos carboxílicos y sus derivados. Esto se debe a un bolsillo más grande y/o interacciones más débiles en la región de acilo, en comparación con la alta especificidad de región del nucleófilo.^{12c, 44, 52}

2.1.7.1. CaL-B en síntesis de β -amino ácidos a través de adiciones *aza*-Michael

Otras reacciones que son catalizadas por CaL-B son reacciones de desimertización y las adiciones de *aza*-Michael. Estas últimas se han aplicado para la síntesis racémica de β -amino ésteres. La primera reacción de *aza*-Michael fue reportada en 1974⁵⁶ desde entonces se ha desarrollado una gran variedad de versiones asimétricas aplicando el uso de catalizadores quirales como catalizadores metálicos, organocatalizadores, o biocatalizadores. Estos dos últimos ofrecen varias ventajas sobre los catalizadores metálicos como lo son un manejo sencillo de la reacción, bajo condiciones suaves y no inertes; sin embargo, la principal desventaja de los organocatalizadores es que en su mayoría son moléculas orgánicas quirales pequeñas, de naturaleza amino, por tanto, una posible competencia entre el catalizador y el nucleófilo existe, comprometiendo la enantioselectividad de la reacción.⁵⁷ En el caso de los biocatalizadores se han empleado lipasas. Las lipasas aunque son de naturaleza proteica, actúan estabilizando al oxianión generado durante la reacción, mediante puentes de hidrógeno en la cavidad oxianiónica

⁵³ a) Ismail, H.; Lau, R.M.; van Langen, L.M.; van Rantwijk, F.; Švedas, V.K.; Sheldon, R.A. *Green Chem.* **2008**, *10*, 415–418.

⁵⁴ a) Braiucă, P.; Lorena, K.; Ferrario, V.; Ebert, C.; Gardossi, L. *Adv. Synth. Catal.*, **2009**, *351*, 1293–1302. b) Hernández, J.G.; Frings, M.; Bolm, C. *Chem. Cat. Chem.* **2016**, *8*, 1769–1772. c) Braia, N.; Merabet-Khelassi, M.; Aribi-Zouiouche, L. *Chirality*, **2018**, *30*, 1312–1320.

⁵⁵ Kazlauskas, R.J.; Weissfloch, A.N.E.; Rappaport, A.T.; Cuccia, L.A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656–2665.

⁵⁶ a) N. Sokoloff, P.; Latschinoff, Ber.; *Dtsch. Chem. Ges.* **1874**, *7*, 1384–1387. b) W. Heintz, N. Sokoloff, P. Latschinoff, Ber. *Dtsch. Chem. Ges.* **1874**, *7*, 1518–1520.

⁵⁷ Wang, J.; Li, P.; Choy, P. Y.; Chan, A. S. C.; Kwong, F. Y. *Chem. Cat. Chem.* **2012**, *4*, 917–925.

(Figura 10).⁵⁸ Cabe mencionar que se debe hacer una adecuada selección del sustrato así como de la reacción a fin de evitar reacciones secundarias como la sustitución nucleofílica sobre el grupo carbonilo, a través de un intermediario acil-enzima. Este inconveniente ha sido resuelto mediante estrategias de evolución dirigida de proteínas⁵⁹ o el uso de lipasas silvestres junto con la ingeniería de disolventes.⁶⁰

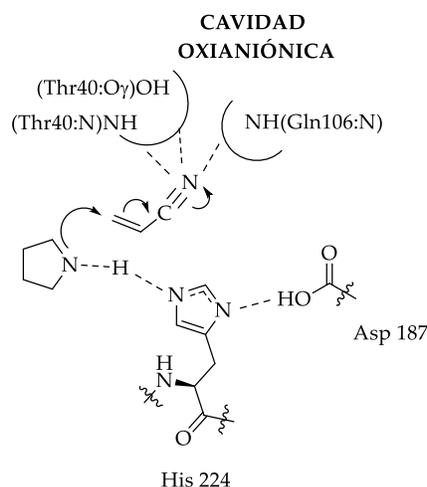
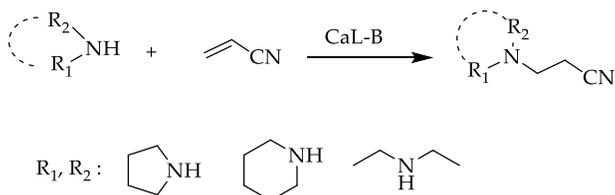


Figura 10. Mecanismo propuesto para la reacción aza-Michael catalizada por CaL-B.

Aunque la primera adición de aza-Michael catalizada por lipasas fue reportada en 1986;⁶¹ fue hasta 2004 que se reportó el uso de CaL-B en reacciones de adición la adición de aminas secundarias a acrilonitrilo (**Esquema 9**).^{58b}



Esquema 9. CaL-B en la adición de aminas secundarias a acrilonitrilo.

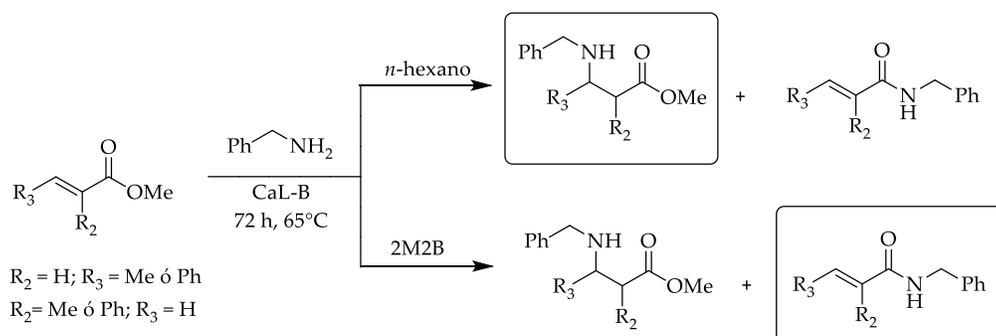
⁵⁸ a) Branneby, C.; Carlqvist, P.; Magnusson, A.; Hult, K.; Brinck, T.; Berglund, P. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 8774–8775. b) Torre, O.; Alfonso I.; Gotor V. *Chem. Commun.* **2004**, *15*, 1724–1725.

⁵⁹ Wu, Q.; Soni, P.; Reez, M.T. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1872–1881.

⁶⁰ a) Priego, J.; Ortíz-Nava, C.; Carrillo-Morales, M.; López-Munguía, A.; Escalante, J.; Castillo, E. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 536–539. b) Rivera-Ramirez, J. D.; Escalante, J.; Lopez-Murguía, A.; Marty, A.; Castillo, E. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2015**, *112*, 76–82.

⁶¹ Kitamme, T.; Ikeya, T.; Murata, K. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, *17*, 1331–1333.

CaL-B también ha sido utilizada en la síntesis de β -amino ésteres racémicos mediante una estrategia más directa, que consiste en la adición de aminas a sistemas α,β -insaturados. Sin embargo, debido a su naturaleza catalítica, CaL-B puede llevar a cabo la sustitución nucleofílica en el grupo carbonilo del sistema α,β -insaturado, el control de la quimioselectividad del proceso ha sido manipulado como una función de la polaridad del disolvente, sin fines resolutivos; de modo tal que, el producto *aza*-Michael se acumuló preferentemente en disolventes hidrofóbicos como el *n*-hexano; mientras que en disolventes más polares como 2-metil-2-butanol (2M2B) se acumuló el producto de sustitución sobre el grupo carbonilo, la crotonamida (**Esquema 10**).⁶⁰



Esquema 10. Control de la quimio selectividad de CaL-B en la adición bencilamina a diferentes acrilatos.

2.1.7.2. CaL-B en resoluciones cinéticas de β - y γ -amino ácidos, precursores e intermediarios.

Existe una gran variedad de reportes que describen la resolución enzimática de β -amino ácidos y precursores, mientras que la resolución de γ -amino ácidos ha sido menos reportada y solo se han descrito algunos ejemplos. En este sentido predomina la resolución de mezclas racémicas por sustitución nucleofílica sobre el grupo carbonilo, catalizada principalmente por lipasas, a partir β -amino ésteres y β -lactamas; estas últimas también de importancia farmacológica; mientras que solo algunos reportes para las resolución de γ -nitro ésteres, γ -lactamas configuracionalmente restringidas se encuentran disponibles. A pesar de la

habilidad de las β -lactamas para inhibir algunas serin-hidrolasas mediante intermediarios estables acil-enzima. Se ha reportado que algunas lipasas pueden llevar a cabo la apertura de anillos β -lactámicos entre ellas CaL-B (aunque de manera lenta). Una alternativa es usar reacciones enantioselectivas catalizadas por lipasas sobre grupos sustituyentes en β -lactamas.⁶² Según sea el caso podemos obtener β -amino ácidos empleando varias estrategia de resolución entre las cuales destacan la formación enlaces carbono nitrógeno mediante *N*-acilaciones de β -amino ésteres^{10d},⁶³ (**Figura 11A**), formación de enlaces carbono oxígeno por reacciones de *O*-acilación de β -lactamas *N*-hidroximetiladas^{10d} (**Figura 11B**); así como de hidrólisis de: β -lactamas^{10d},⁶⁴,⁶⁵ (**Figura 11C**), β -lactamas *N*-aciloximetiladas⁶⁶ (**Figura 11D**), β -amino ésteres⁶⁷ (**Figura 11E**), β -amino ésteres *N*-acilados^{10d} (**Figura 11F**), β -lactamas α -hidroxiaciladas⁶⁸(**Figura 11G**); e hidrólisis,⁶⁹ transesterificación⁷⁰ y aminólisis⁷¹ de β -amino éstres *N*-protegidos (**Figura 11H**).

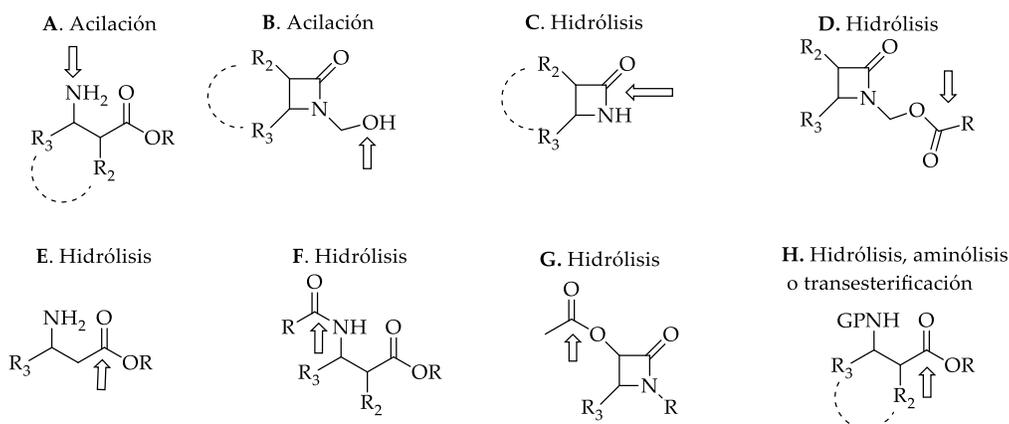


Figura 11. Resolución cinética enzimática de β -amino ácidos así como de algunos precursores o intermediarios, como los β -amino ésteres y β -lactamas.

⁶² Park, S.; Forró, E.; Grewal, H.; Fülöp, F.; Kazlauskas, R. J. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 986–995.

⁶³ Sanchez, V. M.; Rebolledo F.; Gotor, V. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 37–40.

⁶⁴ Galla, Z.; Beke, F.; Forró, E.; Fülöp, F. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2016**, *12*, 107–112.

⁶⁵ Forró, E.; Fülöp, F. *Current Medicinal Chemistry* **2012**, *19*, 6178–6187.

⁶⁶ Nagai, H.; Shiozawa, T.; Achiwa, K.; Terao, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 1933–1938.

⁶⁷ Tasnádi, G.; Forró, E.; Fülöp, F. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 2072–2077.

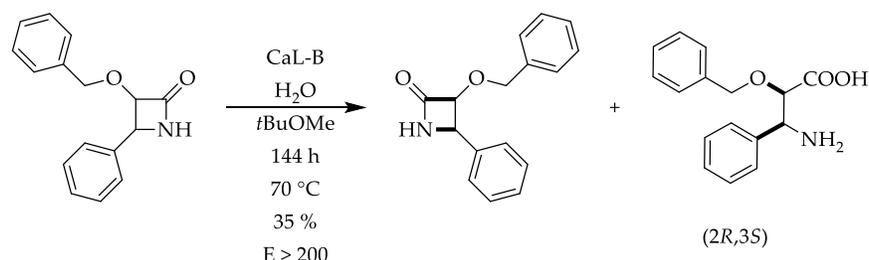
⁶⁸ Forró, E.; Fülöp, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, *16*, 3074–3079.

⁶⁹ Rangel, H.; Carrillo-Morales, M.; Galindo, J. M.; Obregón-Zuñiga, A.; Juaristi, E.; Escalante, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2015**, *26*, 325–332.

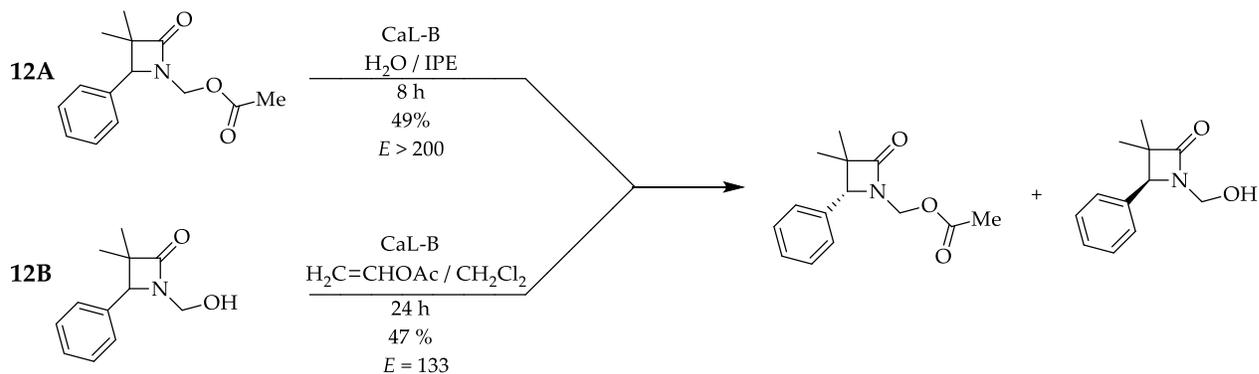
⁷⁰ Flores-Sánchez, P.; Escalante, J.; Castillo, E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 629–634.

⁷¹ Strompen, S.; Weiss, M.; Gröger, H.; Hilterhaus, L.; Liese, A. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2013**, *355*, 2391–2399. **b)** Strompen, S.; Weiß, M.; Ingram, T.; Smirnova, I.; Gröger, H.; Hilterhaus, L.; Liese, A. *Biotech. Bioeng.* **2012**, *109*, 1479–1489.

La apertura diastereoselectiva del anillo β -lactámico, en lactamas 3,4-disustituidas precursoras de un intermediario clave en la síntesis del Taxol⁷² (**Esquema 11**); así como, la resolución de β -lactamas *N*-sustituidas, mediante reacción de hidrólisis a partir β -lactamas *N*-aciloximetiladas (**Esquema 12A**) o directamente a través de transesterificación de β -lactamas *N*-hidroximetiladas (**Esquema 12B**), son dos estrategias en la resolución de β -lactamas catalizadas por CaL-B. La primera directamente sobre el anillo y la segunda a través del sustituyente sobre el nitrógeno.⁶⁶



Esquema 11. Hidrólisis de β -lactamas 3,4 disustituidas catalizada por CaL-B.

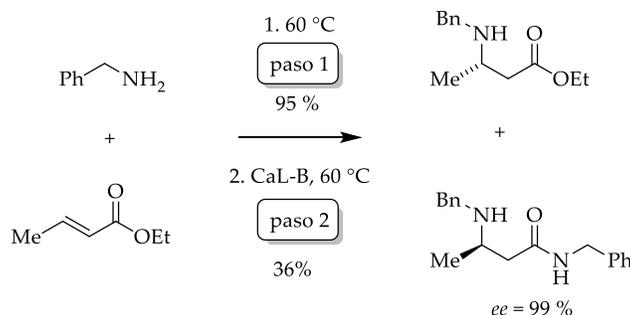


Esquema 12. Resolución de β -lactamas *N*-sustituidas catalizada por CaL-B.

Por otro lado, la resolución cinética de β -amino ésteres se ha realizado generalmente mediante reacciones de sustitución nucleofílica sobre el grupo carbonilo a partir de sus mezclas racémicas obtenidas químicamente. En 2009 se reportó la resolución enzimática de β^3 -amino ésteres *N*-bencilados alifáticos de cadena corta en ausencia de disolvente, mediante un proceso quimio-enzimático *one pot* en dos etapas; la

⁷² Galla, Z.; Beke, F.; Forró, E.; Fülöp, F. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2016**, *123*, 107–112.

adición *aza*-Michael no enzimática de bencilamina a sistemas α , β -insaturados y subsecuente resolución vía aminólisis catalizada por CaL-B (**Esquema 13**).⁷³

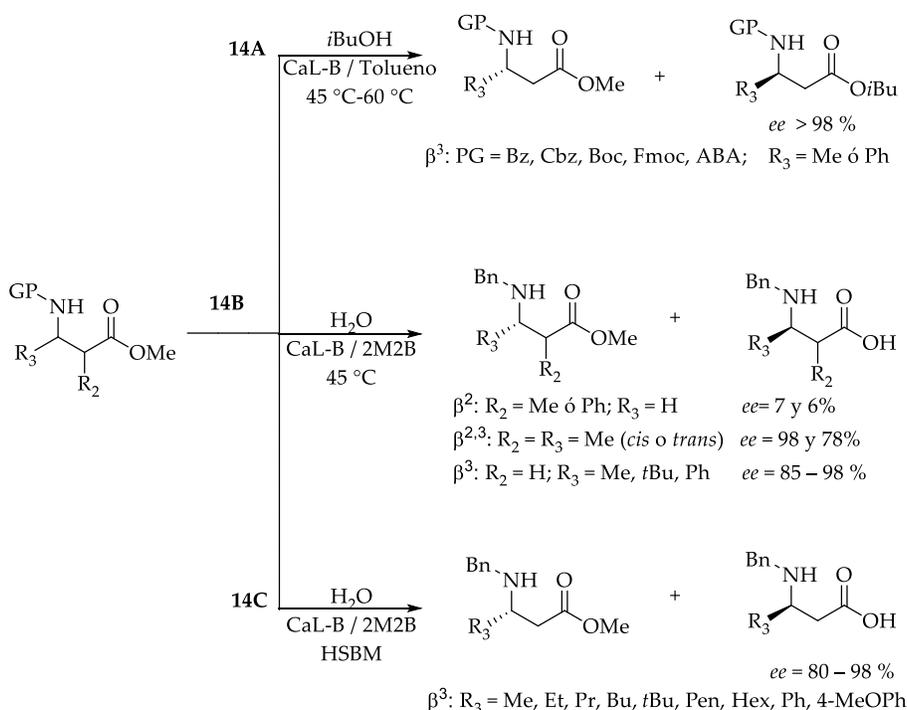


Esquema 13. CaL-B en la resolución de β^3 -amino ésteres *N*-bencilados por aminólisis

En este contexto, se ha descrito que CaL-B cataliza la resolución cinética de β^3 -amino ésteres utilizando diferentes grupos *N*-protectores mediante transesterificación en tolueno⁷⁰ con buenos rendimientos y una alta enantioselectividad ($E > 200$) (**Esquema 14A**), así como en la resolución de β^3 -, β^2 -, y $\beta^{2,3}$ -amino ésteres *N*-bencilados, mediante hidrólisis utilizando 2M2B como disolvente bajo condiciones de reacción en calentamiento convencional⁶⁹ (**Esquema 14B**) o utilizando nuevas estrategias de síntesis, como el uso de molinos de bolas de alta velocidad HSBM por sus siglas en inglés⁷⁴ (*high speed ballmilling*) (**Esquema 14C**). Estos resultados mostraron que la enantioselectividad en las reacciones de transesterificación como de hidrólisis es dirigida por el sustituyente en la posición tres y es independiente del grupo *N*-protector.

⁷³ Weiß, M.; Gröger H. *Synlett* **2009**, *8*, 1251–1254.

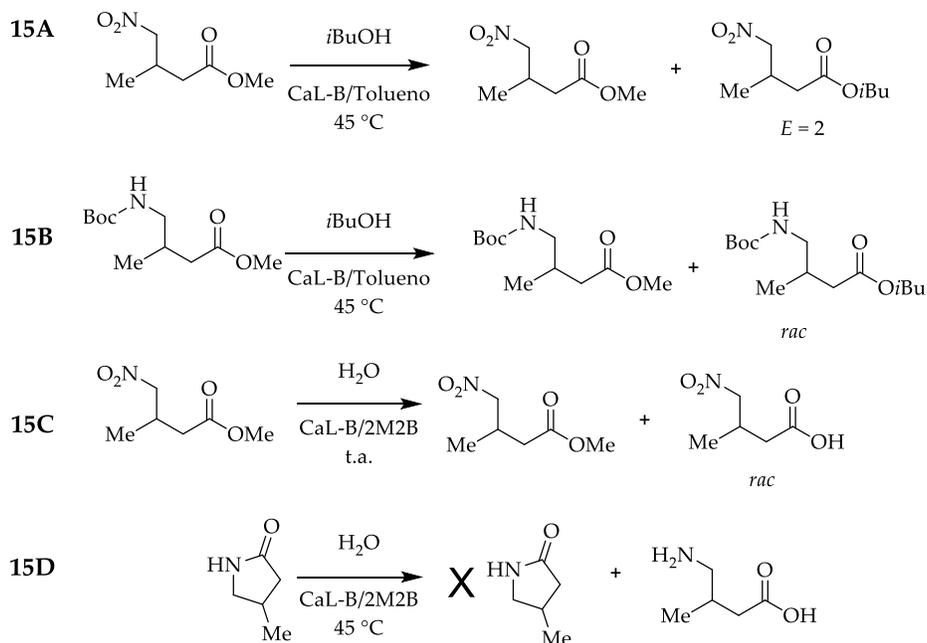
⁷⁴ Pérez-Venegas, M.; Reyes-Rangel, G.; Neri, A.; Escalante, J.; Juaristi, E. *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 1728–1734.



Esquema 14. CaL-B en la resolución de β^3 -amino ésteres *N*-protegidos por transesterificación (**14A.**), β^2 -y $\beta^{2,3}$ -, y β^3 -amino ésteres *N*-bencilados por hidrólisis (**14B** y **14C**).

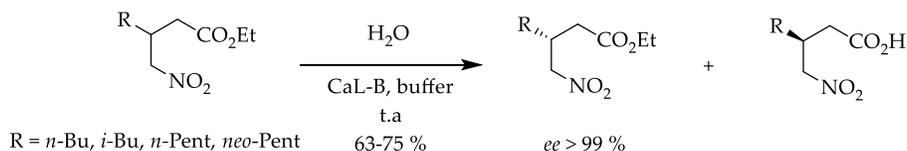
Estas mismas metodologías se han aplicado a la resolución de γ -amino ésteres, precursores y derivados. Los resultados de la transesterificación de γ -nitro y γ -amino ésteres en tolueno (**Esquema 15A** y **15B**), así como la hidrólisis de γ -nitro ésteres y γ -lactamas en 2M2B (**Esquema 15C** y **15D**), mostraron que los procesos transcurren de manera racémica o con muy baja selectividad.⁷⁵

⁷⁵ a) Díaz-Coutiño, D. Tesis doctoral: 2009, Centro de Investigaciones Químicas UAEM; Cuernavaca, Morelos. b) Ortega-Rojas, M.A. Tesis maestría: 2015, Centro de Investigaciones Químicas UAEM; Cuernavaca, Morelos.



Esquema 15. Estrategias para la resolución de γ -amino ésteres precursores y derivados catalizada por CaL-B, aplicando las mismas metodologías de resolución para β^3 -amino ésteres.

La obtención de γ^3 -amino ácidos de ha descrito a través de la resolución de γ^3 -nitro ésteres precursores mediante reacciones de hidrólisis enzimática utilizando CaL-B a temperatura ambiente en solución buffer. Los resultados mostraron una preferencia hacia el enantiómero con el sustituyente hacia adelante sin embargo, es necesaria un avance significativo en el grado de conversión para poder recuperar los ésteres remanentes de manera enantioselectiva ($E < 50$) (**Esquema 16**).⁷⁶

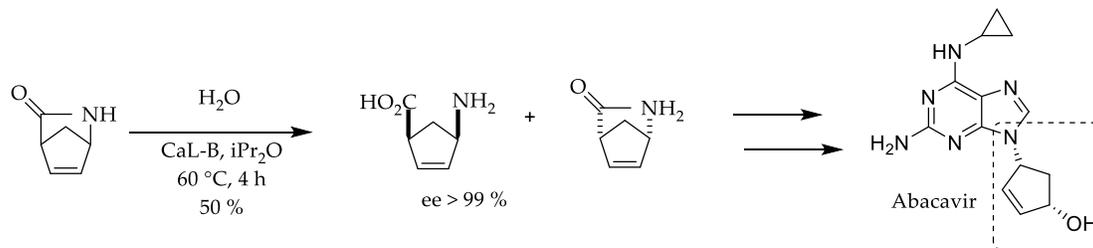


Esquema 16. CaL-B en la resoluciones de γ^3 -nitro ésteres mediante reacciones de hidrólisis enzimática.

A diferencia del basto número de reportes empleando CaL-B para la síntesis β -amino ácidos mediante apertura enantioselectiva de β -lactamas, solo hemos encontrado un reporte para la resolución γ -lactamas. En este reporte CaL-B cataliza

⁷⁶ Felluga, F.; Pitacco, G.; Valentin, E.; Venneri, C. D. *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 945–955.

la hidrólisis enantioselectiva ($E > 200$) de una γ -lactama intermediaria en la síntesis del Abacavir, un fármaco con propiedades antivirales (**Esquema 17**).⁷⁷



Esquema 17. CaL-B en apertura de γ -lactamas mediante reacción de hidrólisis.

En general CaL-B muestra una mejor enantioselectividad en la resolución de β^3 -amino ésteres en comparación con los β^2 -amino ésteres y los γ^3 -nitro ésteres.^{69, 70, 74-76} En este sentido los estudios en cristalografía han permitido una investigación más detallada de la enantioselectividad en los procesos resolutivos catalizados por enzimas.

2.1.8. Modelado molecular

Norin y colaboradores⁷⁸ hace una descripción detallada y sencilla de los modelos teóricos aplicados al modelado molecular.

Los modelos teóricos son importantes para entender y predecir observaciones físicas y químicas. Los modelos se pueden basar en mecánica cuántica, mecánica molecular o una combinación de los mismos.

Los métodos de Mecánica Cuántica QM por sus siglas en inglés (*Quantum Mechanics*), describen los sistemas tomando en cuenta todas las partículas atómicas, se basan en la solución de la ecuación de Schrödinger. Sin embargo esto solo es posible para el átomo de hidrógeno. Por esta razón se han desarrollado varios métodos que utilizan aproximaciones.

Los métodos semiempíricos por su parte, solo tratan a los electrones de valencia a nivel de mecánica cuántica, mientras que el núcleo se parametriza a partir de experimentos o cálculos *ab initio*; este tratamiento reduce el costo computacional sin embargo, pueden dar resultados erróneos si se aplican a sistemas para los que no están parametrizados.

Los métodos Hartree-Fock (HF) proporcionan una solución aproximada de la ecuación de Schrödinger. Se basa en la aproximación de que los electrones se

⁷⁷ Forró, E.; Fülöp, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 31, 5263–5268.

⁷⁸ a) Haeffner, F.; Norin, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, 47, 591–600. b) Levine I. N. *QUÍMICA CUÁNTICA*. 5th Ed. Pearson Educación: Madrid España, **2001**.

mueven independientemente uno del otro, cada uno sintiendo solo el campo medio del otro más la atracción de los núcleos. Este método ha sido muy exitoso en la predicción de geometrías moleculares y energías.

La Teoría de los Funcionales de Densidad (DFT) no intenta calcular la función de onda molecular como los dos métodos anteriores sino que calcula la densidad de probabilidad electrónica molecular y la energía electrónica molecular a partir de ella. Se basa en el hallazgo de que todas las propiedades electrónicas del estado fundamental de una molécula están determinadas únicamente por la densidad electrónica. La ventaja de este método es que incluye la correlación electrónica aproximadamente al mismo costo computacional que los cálculos HF. La desventaja es que los cálculos no pueden ser mejorados de una forma sistemática.

Estos modelos son capaces de modelar la formación y ruptura de enlaces en el estado de transición sin embargo, son muy costosos (computacionalmente hablando) para ser aplicados en simulaciones de sistemas moleculares grandes y utilizados como herramienta de predicción de rutina.

Los métodos de Mecánica Molecular (MM) utilizan principios de mecánica clásica; el principio consiste en considerar que las moléculas poseen longitudes de enlace y ángulos de enlace que se esfuerzan por mantener. Los átomos de la molécula se parametrizan para actuar como esfera. Utiliza parámetros de fuerza y tensión de enlace, lo cual permite interacciones entre átomos no enlazados. La ley de Hookel es usada para describir a los enlaces químicos como un oscilador armónico simple, mientras que los átomos son descritos mediante las superficies de van der Waals y las cargas parciales localizadas en el centro de los átomos. No considera a los electrones de manera explícita por lo cual no es posible el estudio de la ruptura y formación de enlaces. Los métodos de Mecánica Molecular utilizan campos de fuerzas, estos se han desarrollado de acuerdo a los sistemas moleculares para los que son aplicados.

El acoplamiento molecular (Docking) es una técnica de Mecánica Molecular basado en un algoritmo computacional que predice la energía y los modos de unión e interacción entre un sustrato (ligando) y un receptor (proteína) de estructura 3D conocida. Las conformaciones calculadas para la interacción ligando-proteína son comúnmente nombradas como poses. Las mejores poses son evaluadas según la mejor puntuación (score) esta puede ser la energía de unión, la energía libre, o alguna otra medida cualitativa. Las poses nos proveen información valiosa como: la orientación del ligando, la conformación, interacciones no covalentes ligando-proteína, diferentes modos de unión para sustratos diferentes en la misma cavidad

o la conformaciones más cercanas a desencadenar el mecanismo catalítico. Los resultados del acoplamiento molecular han sido utilizados eficientemente para la mutación de residuos clave en contacto cercano con el sustrato a un costo computacional bajo.^{12e, 79}

Las resoluciones enzimáticas han sido modeladas por teorías de la Mecánica cuántica basadas en el modelado del estado de transición y las diferencias energéticas en los estados de activación para cada uno de los enantiómeros ($\Delta\Delta G^\ddagger$) y su correlación con la razón enantiomérica (E) según la siguiente ecuación:

$$E = e^{-\frac{\Delta\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad \text{Ecuación 7}$$

Sin embargo una pequeña diferencia en la energía de activación provoca un gran aumento en el valor de la razón enantiomérica.^{77a, 80} De esta manera un amplio número de investigaciones que abordan las características estructurales y catalíticas de CaL-B se han desarrollado en términos del acoplamiento molecular y han promovido algunos avances importantes para entender la enantioselectividad en los procesos resolutivos, aunque la mayoría de estos trabajos están enfocados a la resolución de segundos sustratos (nucleófilos)^{12a, 81} y solo unos cuantos enfocados a la resolución de derivados de ácidos carboxílicos.⁶²

⁷⁹ Gu, B.; Hu, Z. E.; Yang, Z.-J. Li, J.; Zhou, Z.-W.; Wang, N.; Yu, X.-Q. *Chemistry Select* **2019**, *4*, 3848,3854.

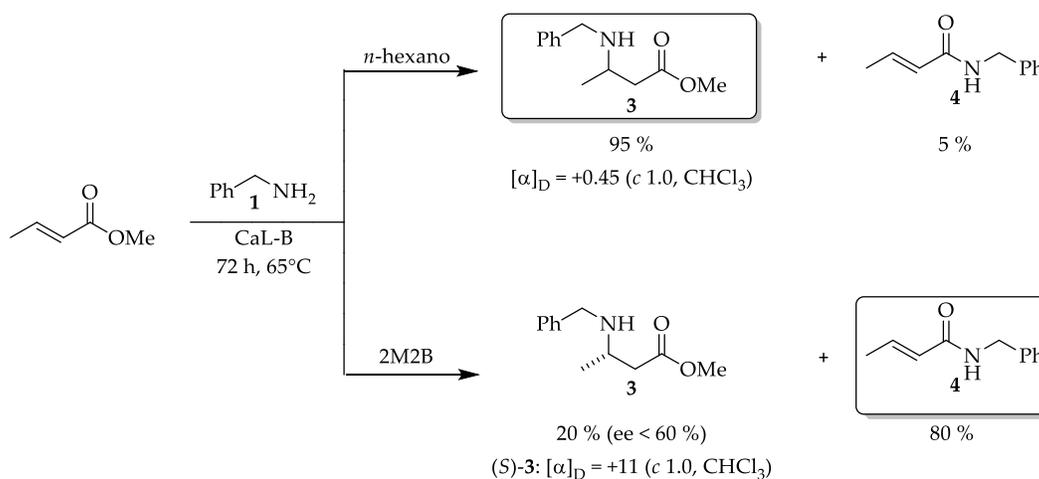
⁸⁰ Raza, S.; Fransson, L.; Hult K. *Protein Science* **2001**, *10*, 329–338.

⁸¹ Gu, J.; Liu, J.; Yu, H. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2011**, *72*, 238-247.

3. El efecto de la polaridad de solvente en la síntesis y resolución *one pot* de (R)-(-)-N-Bencil-3-(bencilamino)butanamida catalizada por CaL-B.

3.1. INTRODUCCIÓN

En 2009 nuestro grupo de investigación reportó el control de la quimioselectividad en la adición de bencilamina (**1**) a crotonato de metilo (**2**) catalizada por CaL-B, mediante una estrategia basada en la ingeniería de disolventes.⁶⁰ La quimioselectividad de este proceso enzimático fue manipulada en función de la polaridad de los disolventes; los resultados obtenidos mostraron que el aducto *aza*-Michael (**3**) se acumuló preferentemente en un medio hidrofóbico como *n*-hexano, mientras que en un disolvente más polar como 2M2B se formó preferentemente la crotonamida (**4**). Adicionalmente mientras que el aducto **3** obtenido en *n*-hexano no mostró un valor de rotación óptica significativo $\{[\alpha]_D^{20} = +0.45 (c 1.0, CHCl_3)\}$; el aducto **3** obtenido en 2M2B mostró tener actividad óptica positiva de $[\alpha]_D^{20} = +11.0 (c 1.0, CHCl_3)$, que concuerda con un valor de *ee* de alrededor del 60 % a favor del enantiómero de configuración *S*. (Esquema 18).



Esquema 18. Efecto del disolvente en la adición enzimó-catalizada de **1** a **2**.

Si bien se ha reportado que CaL-B es capaz de catalizar un proceso resolutivo una vez que se ha formado el aducto *rac*-**3** mediante reacciones de hidrólisis como de

aminólisis.^{69, 73} En nuestro reporte previo no se encontraron evidencias de ningún otro producto, que sugieran un proceso de resolución enzimática. Tampoco se estableció el origen del exceso enantiomérico observado y por qué solo se observó en 2M2B. En ese sentido, si dos reacciones como la adición *aza*-Michael y la reacción de sustitución sobre el grupo acilo son catalizadas por la misma enzima, se podría anticipar que los ésteres enantiopuros podrían obtenerse mediante una reacción en un solo paso, y eso implicaría el efecto de la polaridad del solvente. No solo para el control de la quimioselectividad, sino también en la enantioselectividad de la reacción, es decir, en el proceso de resolución. Mientras que otros grupos reportan que el origen del exceso enantiomérico no se debe a una adición *aza*-Michael asimétrica, sino a una resolución enzimática mediante aminólisis, sus reacciones se llevaron a cabo en ausencia de disolventes y en un proceso quimioenzimático de dos pasos. En este capítulo se estudiará la reacción “*one pot*” entre bencilamina (**1**) y crotonato de metilo (**2**) catalizada por CaL-B para determinar el efecto de la polaridad del disolvente y cómo afecta la enantioselectividad del proceso enzimático.

3.2. JUSTIFICACIÓN

Los resultados previos han motivado al desarrollo y validación de un proceso de adición de *aza*-Michael asimétrica catalizada por CaL-B. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que el *ee* de (*S*)-(+)-**3a** provenga de un proceso de resolución sobre *rac*-**3**; en cuyo caso se pretende encontrar la proporción de 2M2B a la que comienza el proceso de resolución, ya que en *n*-hexano como disolvente el proceso es racémico.

3.3. HIPÓTESIS

- Se puede manipular la adición *aza*-Michael de **1** a **2**, de tal manera que, cuando la reacción es llevada a cabo en *n*-hexano la reacción procede de forma racémica, mientras que la adición de **1** a **2** en 2M2B se lleva a cabo mediante una adición *aza*-Michael asimétrica.
- El proceso de adición *aza*-Michael de **1** a **2** en 2M2B como disolvente transcurre en forma racémica del mismo modo que en *n*-hexano, sin embargo en la reacción en 2M2B se favorece un proceso de resolución por aminólisis, el cual no se observó en *n*-hexano.

3.4. OBJETIVO

Encontrar el origen del *ee* de (S)-(+)-**3a**.

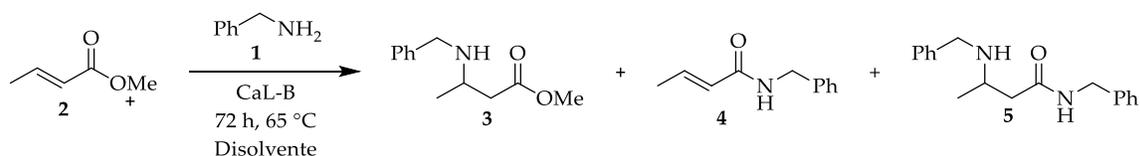
Por una adición tipo Michael asimétrica catalizada por CaL-B.

Por una reacción de resolución sobre *rac*-**3** catalizada por CaL-B.

3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

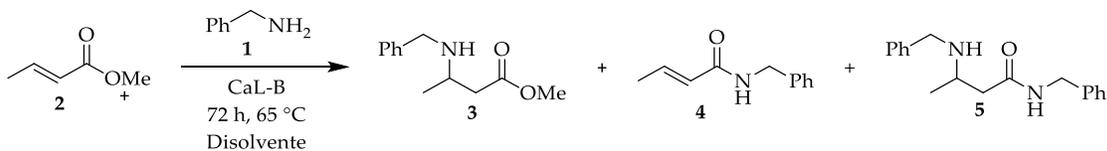
3.5.1. Perfil de productos obtenido en disolventes de polaridad opuesta: *n*-hexano y 2M2B

Se realizaron varios experimentos para determinar cómo la quimio y enantioselectividad son influenciadas por la polaridad del medio de reacción en la adición de bencilamina (**1**) a crotonato de metilo (**2**). Los experimentos fueron reproducidos por triplicado utilizando *n*-hexano y 2M2B. Además de la reacción control en ausencia de enzima. El crudo de las reacciones fue analizado por cromatografía de gases acoplado a masas (CG-MS). Los análisis de los crudos de las reacciones enzimáticas mostraron la formación del producto de adición aza-Michael (**3**), la crotonamida (**4**); y un producto de doble adición, la β-aminoamida (**5**) (Esquema 19).

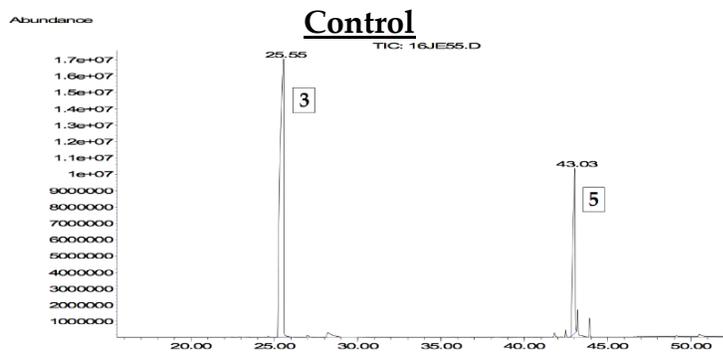


Esquema 19. Adición de bencilamina (**1**) a crotonato de metilo (**2**) catalizada por CaL-B.

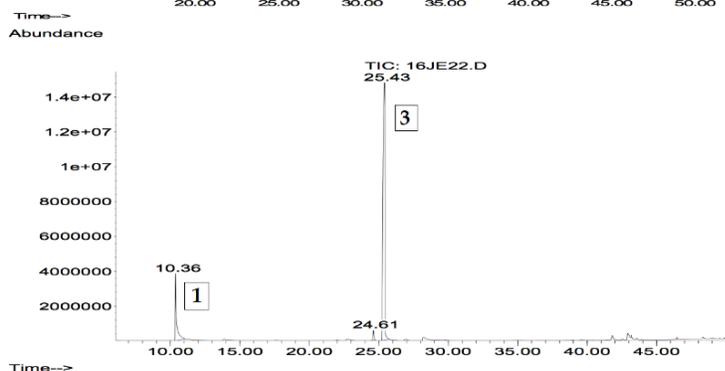
Todos estos compuestos fueron identificados mediante estándares según los siguientes tiempos de retención: **1**: 10.34 min, **3**: 25.4 min, **4**: 28.03 y **5**: 42.8 (**Figura 12**). Como se muestra en la **Figura 12**, el medio de reacción determina la acumulación diferenciada de los productos. Los resultados de las reacciones control muestran que la enzima es esencial para la formación de crotonamida **4**, ya que en ausencia de la enzima **4** no se detectó; se observó el aducto aza-Michael **3** como el producto principal en los dos medios. Cabe destacar que el producto de doble adición **5** se acumula en *n*-hexano pero no en 2M2B (**Figura 12A** y **12B**). En presencia de enzima, **3** se acumula preferentemente en *n*-hexano, mientras que en 2M2B se favorece la acumulación de **4**; por otro lado, se observó que **5** se forma en ambos medios, aunque la proporción de **5** fue ligeramente mayor en 2M2B que en *n*-hexano (**Figura 12C** y **12D**). Con estos resultados se infiere que en ausencia de enzima, 2M2B no es un solvente adecuado para la formación del producto de doble adición **5**.



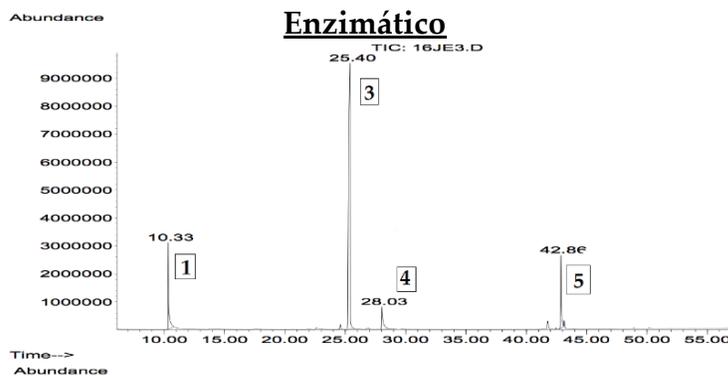
12A *n*-hexano



12B 2M2B



12C *n*-hexano



12D 2M2B

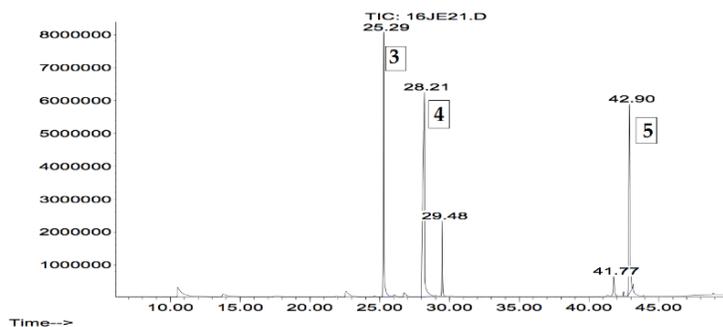
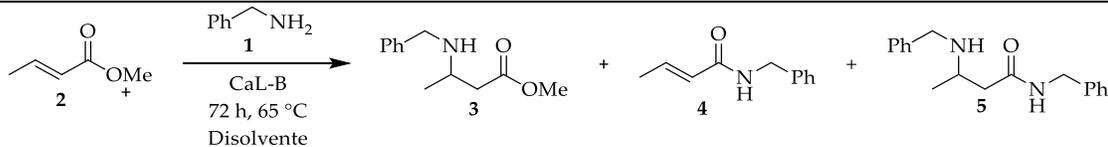


Figura 12. Perfil de productos determinado por CG en la reacción de adición de 1 a 2 *n*-hexano y 2M2B: En ausencia de enzima (12A y 12B); CaL-B catalizada (12C y 12D).

3.5.2. Enantioselectividad

Como se mencionó antes, además de la formación de los productos **3** y **4**, se detectó el producto de doble adición **5** el cual no había sido observado en experimentos previos. En *n*-hexano las proporciones de **3**, **4** y **5** fueron 81, 7 y 12 % respectivamente, mientras que en 2M2B se obtuvieron en una proporción de 29, 48 y 23 %. Cabe señalar que tanto el producto **3** como el **5** obtenidos en *n*-hexano mostraron valores bajos de *ee*, 1.1 y 3.4 % respectivamente (**entrada 1, Tabla 1**). En contraste los productos **3** y **5** obtenidos en 2M2B mostraron un mayor *ee* 96 y 72 % respectivamente (**entrada 3, Tabla 1**). Estos resultados son consistentes con los obtenidos en nuestro informe anterior^{60a} en donde el aducto *aza*-Michael **3** predomina en *n*-hexano y es prácticamente racémico, mientras que en 2M2B se favorece la formación de la crotonamida **4**, pero **3** obtenido muestra un mayor *ee*.

Tabla 1. Conversión y proporción de **3**, **4** y **5**; obtenidos en la adición de bencilamina (**1**) a cronotato de metilo (**2**).

								
Ent.	Enzima	Disolvente	Conversión ^a	Proporción (%) ^b 3 / 4 / 5	<i>aza</i> -Michael 3		Doble adición 5	
					[α] _D ^c	<i>ee</i> (%) ^d	[α] _D ^c	<i>ee</i> (%) ^e
1	CaL-B	<i>n</i> -hexano, 100%	64	81/7/12	+0.3	1.1	-1.4	3.4
2	Control	<i>n</i> -hexano, 100%	67	74/--/26	0	0	0	0
3	CaL-B	2M2B, 100%	59	29/48/23	+15.6	96	-19.2	67
4	Control	2M2B, 100%	46	100/--/--	0	0	0	0
5	CaL-B	<i>n</i> -hexano/2M2B, 50:50	67	29/48/23	+11.6	79.8	-20.8	67.8
6	Control	<i>n</i> -hexano/2M2B, 50:50	53	90/--/10	0	0	0	0
7	CaL-B	<i>n</i> -hexano/2M2B, 90:10	84	28/25/47	+7.7	75	-21	72
8	Control	<i>n</i> -hexano/2M2B, 90:10	74	80/--/20	0	0	0	0

Condiciones de reacción: 3.5 mmol de bencilamina **1**, 1.5 eq de cronotato de metilo **2**, 10 mg/ mL de CaL-B (Novozyme 435), 0.1 g de malla molecular en 7 mL de disolvente.

^a Rendimiento determinado como product aislado en base al consumo de **1**.

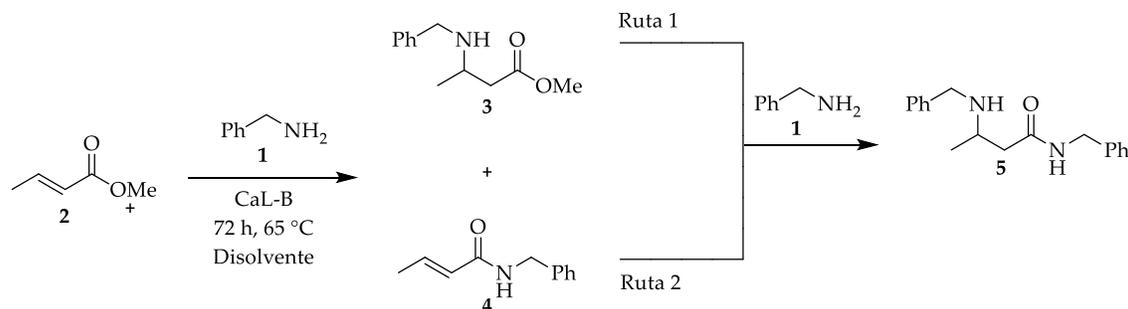
^b Determinado como proporción mediante CG.

^c(c 1.0, CHCl₃).

^dee determinado mediante HPLC-Quiral. Chiracel OD-H, hexano/*i*-PrOH 98:02. 0.8 mL min⁻¹, UV-VIS 210 nm. Tiempos de retención: (R)-3: 11 min, (S)-3: 13 min.

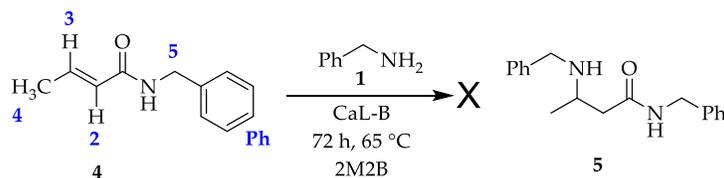
^eee determinado por HPLC-Quiral. CHIRALPAK® AS-H, hexano/*i*-PrOH 80:20. 1 mL min⁻¹, UV-VIS 210nm. Tiempos de retención (S)-5: 20.4 min, (R)-5: 29.4 min.

Como se muestra en el **Esquema 20**, el compuesto **5** podría producirse por la sustitución nucleófila sobre el grupo carbonilo en el sustrato **3** (Ruta 1) o por la adición *aza*-Michael de bencilamina **1** al sustrato **2** (Ruta 2).



Esquema 20. Posibles rutas para la formación del producto **5**: (Ruta 1) aminólisis del producto **3**; (Ruta 2) adición *aza*-Michael de **1** al sustrato **4**.

Para aclarar cuál de las dos rutas fue la correcta, se llevó a cabo la adición de bencilamina los sustratos **3** y **4** catalizada por CaL-B. El primer experimento consistió en colocar el compuesto **4** en 2M2B (0.5 M) en presencia de CaL-B (10 mg mL⁻¹), 0.75 eq de bencilamina **1** y malla molecular; esta mezcla se calentó a 65 °C durante 72 h. La enzima se eliminó por filtración y se lavó con diclorometano (DCM). El crudo de reacción se analizó mediante TLC y resonancia magnética nuclear de protón (RMN-¹H), sin observar la formación del compuesto **5** (**Figura 13**).



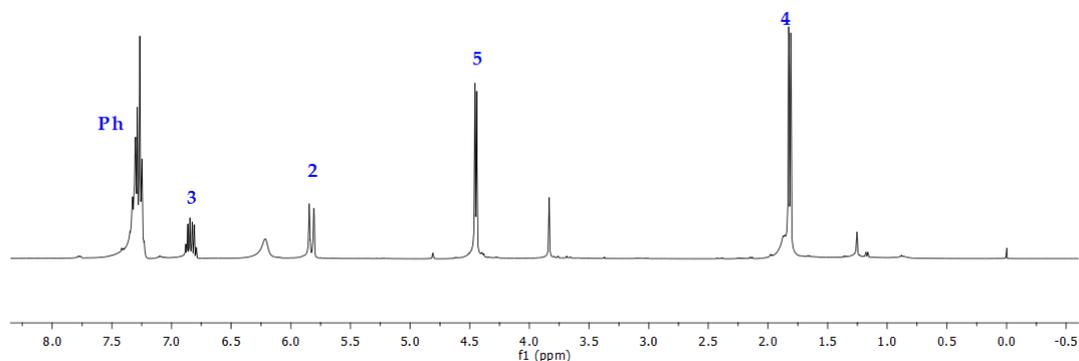


Figura 13. RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) del crudo de reacción de la adición de bencilamina (1) a la crotonamida (4) catalizada por CaL-B.

En un segundo experimento, y después de sintetizar *rac*-3 de acuerdo a la literatura,⁸² se colocó a *rac*-3 en 2M2B (0.5 M) junto con bencilamina 1 (0.75 eq), CaL-B (10 mg mL^{-1}) y malla molecular, a 65 °C durante 3 h. El crudo de la reacción se analizó por TLC y RMN ^1H , observando la formación del compuesto 5 en 41% (**Figura 14**).

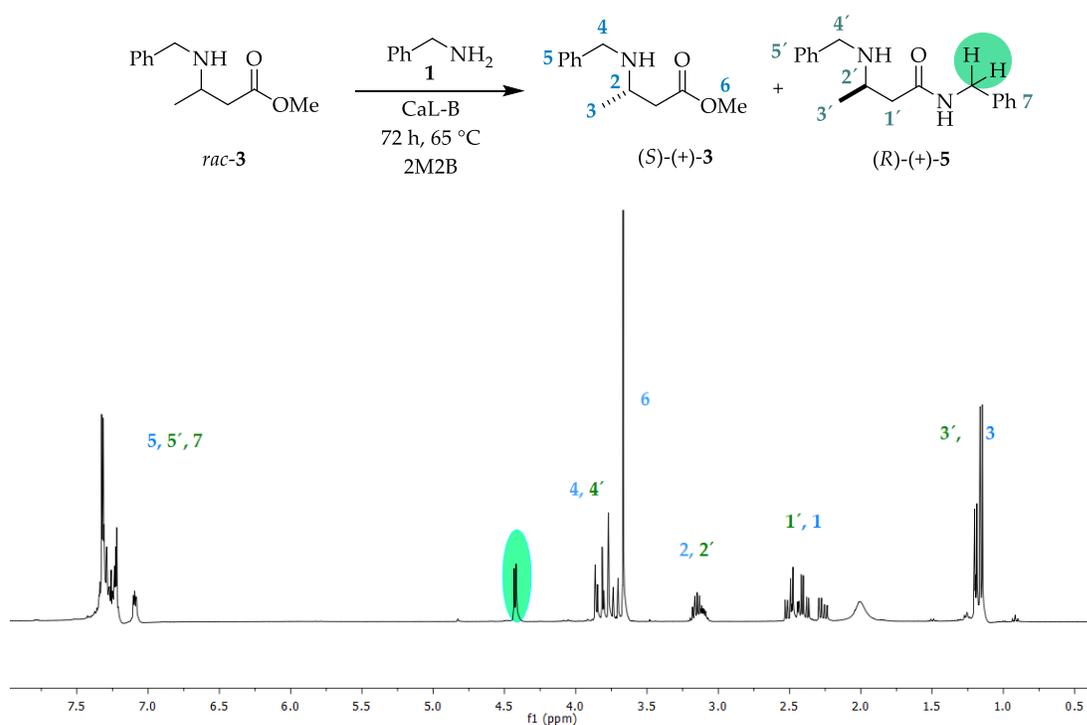


Figura 14. RMN- ^1H (400 MHz, CDCl_3) Crudo de reacción de la adición de bencilamina 1 al compuesto *rac*-3 catalizada por CaL-B.

⁸² Escalante, J.; Carrillo-Morales, M.; Linzaga, I. *Molecules* **2008**, *13*, 340-347.

Este resultado confirmó que el origen del producto **5** es vía una reacción de aminólisis resolutive sobre el sustrato *rac*-**3** (Ruta 2, **Esquema 20**). El remanente del compuesto **3**, mostró una rotación específica de $[\alpha]_D = +7.9$ (*c* 1.0, CHCl₃); mientras para el producto **5** fue de $[\alpha]_D = -24.5$ (*c* 1.0, CHCl₃). Estos resultados concuerdan con los reportados por otros grupos de investigación para la resolución de β³-amino ésteres a través de un proceso de aminólisis resolutive.⁷³ Por tanto, estos resultados aclararon el origen del *ee* del compuesto (S)-(+)-**3** obtenido en 2M2B, mediante un proceso de resolución catalizada por CaL-B sobre el compuesto *rac*-**3**.

Para determinar cómo la presencia de 2M2B influyó en la reacción de resolución, se realizó la reacción en una mezcla 50:50 de *n*-hexano/2M2B. En estas condiciones, nuevamente se obtuvieron los tres productos **3**, **4** y **5** en una proporción de 29, 48 y 23 % respectivamente, y aunque las proporciones no cambiaron con respecto a las obtenidas en 2M2B, los valores de *ee* para **3** y **5** disminuyeron a 79.8% y 67.8% respectivamente (**entrada 5, Tabla 1**). Es importante mencionar que en la reacción control la proporción de **5** disminuyó de 26 a 10 % con respecto a la proporción obtenida en la reacción blanco en *n*-hexano 100% (**entrada 2 y 6, Tabla 1**). Estos resultados muestran que el 2M2B limita la formación de **5**, ya que a medida que aumenta la proporción de 2M2B la proporción de **5** disminuye hasta no observarse en la reacción control en 2M2B (**entrada 2, 4 y 6; Tabla 1**). Estos resultados confirman que en la reacción catalizada en 2M2B, **5** es un producto de resolución enzimática por lo que muestra los mayores valores de *ee*. El bajo *ee* del compuesto **5** obtenido en *n*-hexano, se debió probablemente al hecho de que el proceso químico es mucho más rápido que el proceso enzimático.

3.5.3. Optimización de exceso enantiomérico

Si bien los mejores valores de *ee* para los compuestos (S)-(+)-**3** y (R)-(-)-**5**, se obtuvieron en 100% de 2M2B, este disolvente también favorece la formación del producto de sustitución nucleofílica **4** (el cual puede ser considerado un subproducto de la reacción). Por lo tanto, se decidió diseñar un sistema en el que la formación de **4** pudiera minimizarse y al mismo tiempo que se favoreciera el proceso de resolución sobre *rac*-**3**. Este nuevo sistema fue *n*-hexano/2M2B 90:10. La reacción se monitoreó mediante RMN-¹H y las proporciones fueron determinadas mediante CG. Los productos **3**, **4** y **5** se encontraron en 28, 25, 47 % respectivamente; los compuestos **3** y **5** mostraron un *ee* de 75 y 67 % respectivamente (**entrada 7, Tabla 1**). Se observa que aunque los *ee* de los productos no mejoraron con respecto a los obtenidos en la reacción 50:50 de *n*-hexano/2M2B, la proporción de la crotonamida **4** si disminuyó de 48 a 25 %. Estos resultados tienen una relación directa en términos

de la polaridad del disolvente, y aunque en los procesos enzimáticos la presencia de *n*-hexano inhibe la formación del compuesto **4** al mismo tiempo que favorece la formación química del compuesto **5** (**Figura 15A**). Mientras que las reacciones blanco mostraron que el 2M2B limita la formación química del el producto **5**, lo que se puede utilizar en favor del proceso resolutivo (**Figura 15B**).

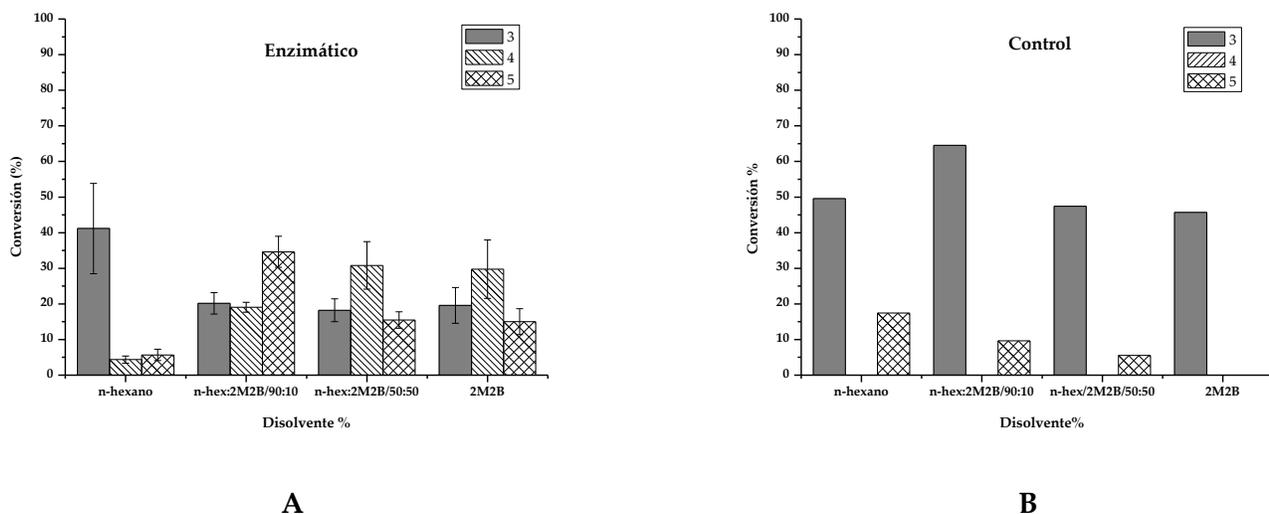
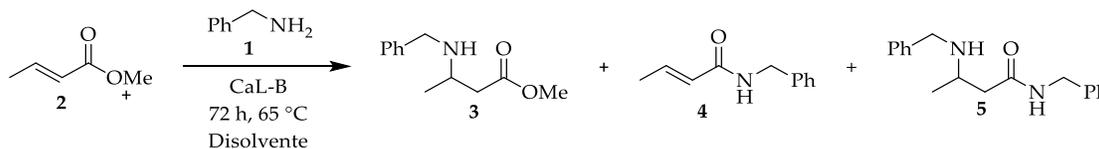


Figura 15. Influencia de la polaridad del disolvente en la quimioselectividad de la adición de bencilamina (**1**) a crotonato de metilo (**2**): en presencia de CaL-B (**A**), en ausencia de enzima (**B**)

3.5.4. Cinética de la reacción

La cinética de la reacción en la adición de **1** a **2**, muestra el orden y velocidad de formación de los productos **3**, **4** y **5**. La reacción fue monitoreada por CG a diferentes tiempos hasta alcanzar 24 h. Los resultados mostraron que el primer compuesto en formarse es el compuesto **3**, el cual se observa a partir de los 0.25 h, mientras que el compuesto **4** se acumula de manera lenta a partir de las a dos horas de tiempo de reacción. Finalmente el compuesto **5** aparecer a partir de las cuatro horas (**Figura 16**). Con estos resultados se confirma que la cantidad de *n*-hexano limita la formación de la crotonamida **4** ya que, aunque la sustitución sobre el grupo carbonilo es la reacción natural de la enzima, la adición *aza*-Michael es más rápida;

por tanto el aducto de Michael es el primero en formarse. Estas observaciones concuerdan con lo reportado para el mecanismo de la reacción ya que la enzima estabiliza al intermediario oxianión formado en la adición *aza*-Michael sin la intervención del intermediario acil-enzima, que muchas veces es paso limitante en la velocidad de la reacción.^{44, 58}

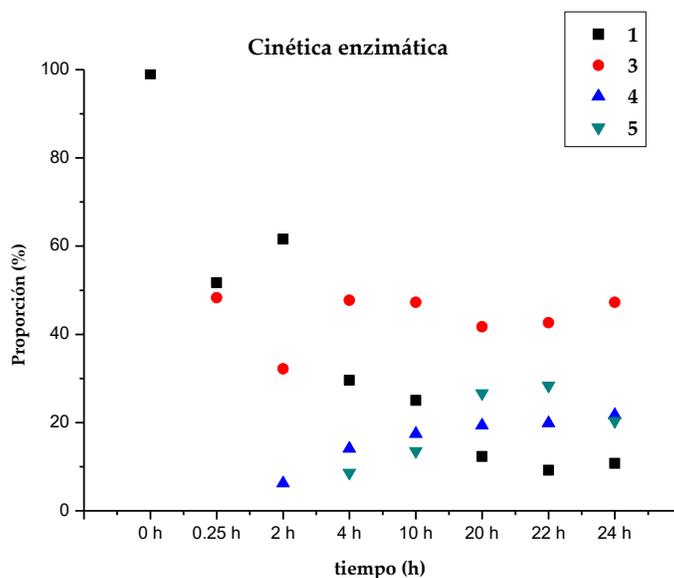
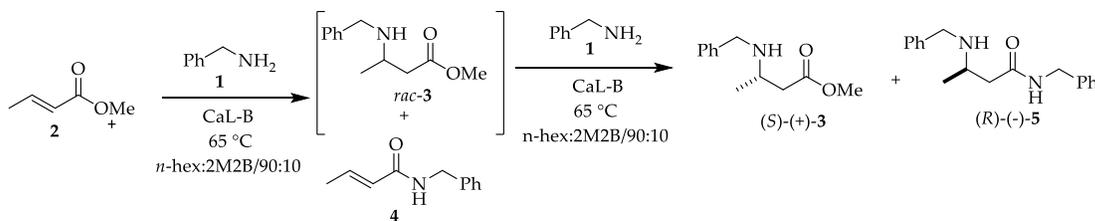


Figura 16. La cinética de la reacción de adición de bencilamina (1) a crotonato de metilo (2).

3.6. CONCLUSIONES

No se encontraron evidencias de un proceso de adición de *aza*-Michael asimétrica en la adición de bencilamina a crotonato de metilo catalizada por CaL-B en 2M2B, *n*-hexano, y mezcla de ambos, como medio de reacción.

Las evidencias obtenidas en este estudio muestran una reacción en cascada catalizada por CaL-B. Primero ocurre la adición *aza*-Michael de bencilamina al crotonato de metilo para obtener *rac*-**3**, en seguida una reacción de aminólisis para obtener (*R*)-(-)-**5**.

A través de las reacciones control se determinó que el *n*-hexano favorece la síntesis química del compuesto *rac*-**5**, por el contrario, el 2M2B limita su formación.

Estos resultados aclaran el origen de los altos valores de *ee* para (*S*)-(+)-**3** obtenido en 100 % de 2M2B (96 %), debido a un proceso de aminólisis resolutive sobre *rac*-**3**, catalizado por CaL-B. Por el contrario los bajos *ee* de **3** obtenido en *n*-hexano (1 %) se deben a que el proceso de aminólisis está favorecido en este medio. Por tanto, el proceso químico es más rápido que el enzimático.

Se estableció una estrategia a través de ingeniería de disolventes para controlar la quimioselectividad en la adición de *aza*-Michael catalizada por CaL-B, al mismo tiempo, que se favorece la resolución a través de una reacción de aminólisis influenciada por el disolvente.

4. Influencia de la posición del sustituyente y el grupo amino en la resolución de β - y γ -amino ésteres *N*-protegidos catalizada por CaL-B.

4.1. INTRODUCCIÓN

CaL-B ha sido ampliamente utilizada en la resolución de segundos sustratos como aminas y alcoholes secundarios.^{12c, 44, 83} La enantioselectividad de estos procesos ha sido bien establecida mediante estudios de modelado molecular.^{12c} Por otro lado, CaL-B muestra una menor estereoselectividad en la resolución de los ácidos carboxílicos y sus derivados.⁴⁴ Estudios de modelado molecular muestran un bolsillo más grande y/o interacciones más débiles en la región de acilo, en comparación con la alta especificidad de bolsillo del nucleófilo.^{12c, 52, 78} Dentro de los reportes para la resolución de derivados de ácidos carboxílicos CaL-B muestra una mejor selectividad frente a aquellos derivados con beta estereocentros en comparación con aquellos que poseen alfa o gamma estereocentros.⁴⁴ En nuestro grupo de investigación se ha utilizado exitosamente a CaL-B en la resolución de derivados de ácidos carboxílicos con β estereocentros como lo son los β^3 -amino ésteres *N*-protegidos y *N*-bencilados, mediante reacciones de transesterificación en tolueno⁷⁰ o hidrólisis en 2M2B respectivamente.⁶⁹ La transesterificación en tolueno ha sido aplicada a la resolución de γ^3 -nitro ésteres y γ^3 -amino ésteres *N*-protegidos con beta estereocentros. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran una baja selectividad ($E < 2$).⁷⁵ Recientemente nuestro grupo de investigación reportó que la hidrólisis de β^3 -, β^2 - y $\beta^{2,3}$ -amino ésteres *N*-bencilados, en 2M2B, fue dirigida por el sustituyente en la posición tres, de tal manera que la reacción procede con buen rendimiento y de forma enantioespecífica ($E > 200$); aún con un sustituyente voluminoso como *tert*-butilo.^{69, 74} Estos resultados han motivado a explorar la resolución de γ^4 -, γ^3 -, γ^2 -amino ésteres *N*-protegidos bajo las mismas condiciones, con la finalidad de determinar si el requerimiento espacial del sustituyente en la posición tres gobierna la resolución de los γ -amino ésteres, como sucede con sus análogos beta. Adicionalmente extender esta metodología a derivados con gamma estereocentros como lo es el γ^4 -amino éster *N*-protegido.

⁸³ Orreniuos, C.; Haeffner, F.; Rotticci, D.; Norin, T.; Hult, K. *Biocatalysis and Biotransformation* **1998**, 16, 1-15.

Por tanto en este capítulo se estudiará la resolución cinética enzimática de γ^4 -, γ^3 -, γ^2 -amino ésteres metílicos *N-tert*-butoxicabonil (*N*-Boc) protegidos catalizada por CaL-B mediante hidrólisis en 2M2B. Basados en los resultados experimentales para estas resoluciones y los previamente obtenidos para los β^3 -amino ésteres metílicos *N*-protegidos⁷⁰ y β^3 -, β^2 - y $\beta^{2,3}$ -amino ésteres metílicos *N*-bencilados^{69,74} se desarrollaron estudios de modelado molecular que justifican los requerimientos espaciales en la región del acilo de la enzima, mediante una descripción de las interacciones no covalentes enzima-sustrato.

4.2. JUSTIFICACIÓN

Debido a que las metodologías exploradas para la resolución de γ^3 -amino ésteres precursores y derivados a través de procesos de transesterificación o hidrólisis, ambas utilizando a CaL-B, no han sido eficaces, resulta interesante evaluar procesos de resolución de γ^4 -, γ^3 -, γ^2 -amino ésteres *N*-protegidos por hidrólisis en 2M2B y observar si el requerimiento espacial que gobierna la resolución de β^3 -, β^2 - y $\beta^{3,2}$ -amino ésteres, aplica para sus análogos gamma. Es importante encontrar las bases moleculares que rigen la selectividad del proceso mediante estudios de acoplamiento molecular.

4.3. HIPÓTESIS

La resolución de los γ^4 -, γ^3 -, γ^2 -amino ésteres está dirigida por el sustituyente en la posición tres. De tal manera que la resolución de los γ^3 -amino ésteres deberá ser enantioespecífica.

4.4. OBJETIVO

Determinar el efecto del patrón de sustitución en las reacciones de resolución de γ^4 -, γ^3 -, γ^2 -amino ésteres *N*-Boc protegidos en reacciones de hidrólisis en 2M2B catalizada por CaL-B.

Encontrar los factores estéricos e interacciones más importantes en el acoplamiento de los enantiómeros de los de β^3 -, β^2 -, $\beta^{2,3}$ -, γ^4 -, γ^3 -, γ^2 -amino ésteres *N*-protegidos con la proteína, mediante estudios de Docking que justifique los resultados experimentales y el requerimiento espacial en la posición tres.

4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.1. Síntesis racémica de γ^4 -, γ^3 - y γ^4 -Amino ésteres *N*-*tert*-butoxicarbonil protegidos (\pm)-10a-c

Los nitro ésteres (\pm)-**8a-c** se sintetizaron mediante la reacción de adición de Michael de sus nitronatos a los acrilatos correspondientes disponibles comercialmente **6a-c**, según la metodología descrita en la literatura.⁸⁴ Además de los productos deseados (\pm)-**8a-c**, se observó la formación de los compuestos **9a-c** como subproductos de reacción (**Tabla 2**), de manera similar a lo reportado en la literatura.⁸⁴

Tabla 2. Conversión y proporción de (\pm)-**8a-c** y **10a-c**.

Sustrato	R ₃ CH ₂ NO ₂ (eq)	Base (eq)	Condiciones Watts/ T (°C)/t (min)	Conversión (%) ^a	Proporción (%) 8/9
6a	1.25	TMG (0.55)	50/60/5	65	58/42 ^b
6b	2.5	DBU (0.05)	50/60/15	58	98/2 ^c
6c	1.25	TMG (0.50)	50/60/20	66	65/35 ^d

^aConversión calculada en base al consumo del sustrato α,β -insaturado. Proporción determinada por:

^bproducto aislado, ^c¹H-NMR, ^dCG-MS.

Los nitro ésteres racémicos (\pm)-**8a-c** se redujeron utilizando hidrógeno molecular y Ni-Raney como catalizador, y protegieron *in situ* utilizando Di-*tert*-butildicarbonato [(Boc)₂O] como grupo protector para obtener los γ -amino ésteres *N*-*tert*-butoxicarbonil protegidos racémicos (\pm)-**10a-c**, como aceites incoloros con rendimientos moderados (**Tabla 3**).

⁸⁴ Escalante, J.; Diaz-Coutiño F. D. *Molecules* **2009**, *14*, 1595-1604.

Tabla 3. Reacción de reducción y *N*-Boc protección de (\pm)-**10a-c**.

	γ^4 , (\pm)- 10a : $R_2 = R_3 = H$; $R_4 = Me$ γ^3 , (\pm)- 10b : $R_2 = R_4 = H$; $R_3 = Me$ γ^2 , (\pm)- 10c : $R_3 = R_4 = H$; $R_2 = Me$	
(\pm) - 8a : $R_2 = R_3 = H$; $R_4 = Me$ (\pm) - 8b : $R_2 = R_4 = H$; $R_3 = Me$ (\pm) - 8c : $R_3 = R_4 = H$; $R_2 = Me$		
Sustrato	Producto	Conversión (%) ^a
(\pm) - 8a	(\pm) - 10a	70
(\pm) - 8b	(\pm) - 10b	65
(\pm) - 8c	(\pm) - 10c	60

^a Conversión calculada como producto aislado

4.5.2. Resolución enzimática de γ^4 -, γ^3 - y γ^2 -Amino ésteres *N*-*tert*-butoxicarbonil protegidos (\pm)-**10a-c** catalizada por CaL-B.

La enantioselectividad de CaL-B frente a los γ -amino ésteres (\pm)-**10a-c** se evaluó por hidrólisis en 2M2B. Los experimentos se llevaron a cabo a 45 ° C y a temperatura ambiente (t. a.); además del experimento de control, en ausencia de enzima. La conversión de la reacción se determinó por RMN-¹H. El valor del *ee* para los ésteres remanentes **11a-c**, se midió por cromatografía de gases utilizando una columna quiral (CG-Quiral), mientras que para los productos hidrolizados **12a-c** fue necesario derivarlos nuevamente a sus ésteres metílicos **13a-c**, antes de su análisis por CG-Quiral. Las configuraciones absolutas de los ésteres remanentes así como de los productos hidrolizados se determinaron por correlación de las mediciones de rotación óptica y los datos reportados en la literatura para los productos **12a**,⁸⁵ **14a**,⁸⁶ **12b** y **12c**⁸⁷ (Esquema 21).

⁸⁵ Hintermann, T.; Gademann, K.; Bernhard Jaun, B.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta.* **1998**, *81*, 983–1002.

⁸⁶ Otsuka, M.; Masuda, T.; Haupt, A.; Ohno, M.; Shiraki, T.; Sugiura, Y.; Maeda, K. Man-Designed Bleomycin with Altered Sequence Specificity in DNA Cleavage. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 838-845.

⁸⁷ Brenner, M.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta.* **1999**, *82*, 2365–2379.

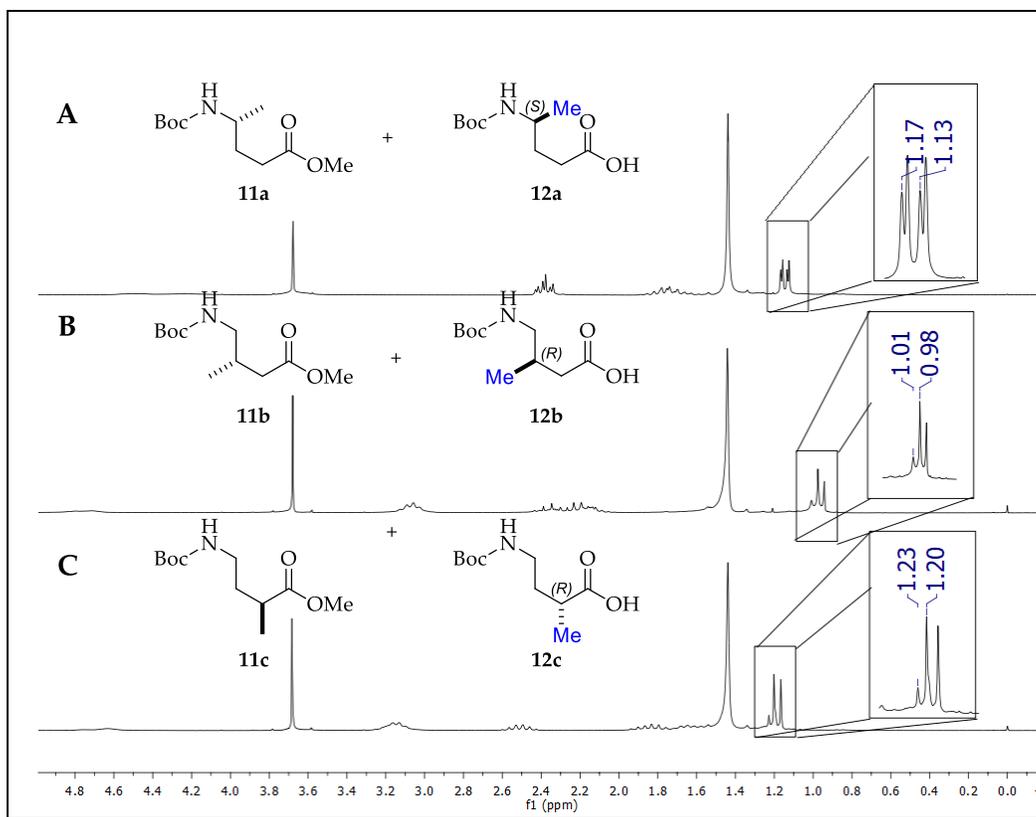


Figura 17. RMN-¹H del crudo de reacción de 45 ° C: (±)-**10a** a 4.5 h (A); (±)-**10b** a 6 h (B) y (±)-**10c** a 24 h (C).

Tabla 4. Resolución de γ -amino ácidos (\pm)-**10a-c**.

(\pm)- 10a : R ₂ = R ₃ = H, R ₄ = Me (\pm)- 10b : R ₂ = R ₄ = H, R ₃ = Me (\pm)- 10c : R ₃ = R ₄ = H, R ₂ = Me	11a : R ₂ = R ₃ = H, R ₄ = Me 11b : R ₂ = R ₄ = H, R ₃ = Me 11c : R ₃ = R ₄ = H, R ₂ = Me	12a : R ₂ = R ₃ = H, R ₄ = Me 12b : R ₂ = R ₄ = H, R ₃ = Me 12c : R ₃ = R ₄ = H, R ₂ = Me	13a : R ₂ = R ₃ = H, R ₄ = Me 13b : R ₂ = R ₄ = H, R ₃ = Me 13c : R ₃ = R ₄ = H, R ₂ = Me
--	---	---	---

Ent. ^a	Enzima	Sustrato	T (°C)	t (h)	Conversión ^a					[α] _D ^b	<i>ee</i> ^c	R/S ^d	[α] _D ^b	<i>ee</i> ^{c,e}	R/S	<i>E</i> ^g
						11		12/13	12							
1	Control		45	4.5	0	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2	CaL-B	(\pm)- 10a	45	4.5	48	+2	60.3	R	+3.5 ^c / ⁻ 2.33 ^h	64.1 ^g	S			S	8	
3	CaL-B		t. a.	20	54	+1.6	47.2	R	+3.1/ ⁻ 1.7	40.6	S			S	4	
4	Control		45	6	0	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
5	CaL-B	(\pm)- 10b	45	6	31	+0.16	30.9	S	+2.7/ ⁻ 0.96	69.9	R			R	8	
6	CaL-B		t. a.	23	41	+0.45	40.6	S	+2.6/ ⁻ 0.6	57.2	R			R	5	
7	Control		45	24	0	0	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
8	CaL-B	(\pm)- 10c	45	24	31	+3.1	16.2	S	-7.6/ ⁻ 9.87	35.6	R			R	2	
9	CaL-B		t. a.	72	29	+3.6	18.6	S	-8.80/ ⁻ 10.5	44.17	R			R	3	

^a Calculado de la expresión: $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$

^b (c 1, CHCl₃), t. a.

^c Determinado por CG-MS Quiral. CYCLOSIL– B. Tiempo de retención: (R)-**11a**, (R)-**13a**: 17.62 min, (S)-**11a**, (S)-**13a**: 17.77 min; (R)-**11b**, (R)-**13b**: 20.35 min, (S)-**11b**, (S)-**13b**: 20.50 min; (R)-**11c**, (R)-**13c**: 21.51 min, (S)-**11c**, (S)-**13c**: 21.66 min.

^d Las configuraciones absolutas se obtuvieron a través de mediciones de rotación óptica y comparaciones de datos reportados en la literatura.

^e Determinado a partir de los ésteres metílicos derivados del ácido correspondiente.

^f Calculado de la expresión: $E = \ln [1 - c(1 + ee_p)] / \ln [1 - c(1 - ee_p)]$

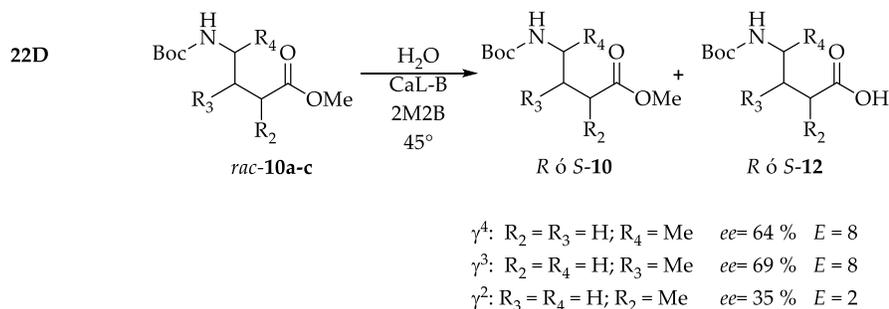
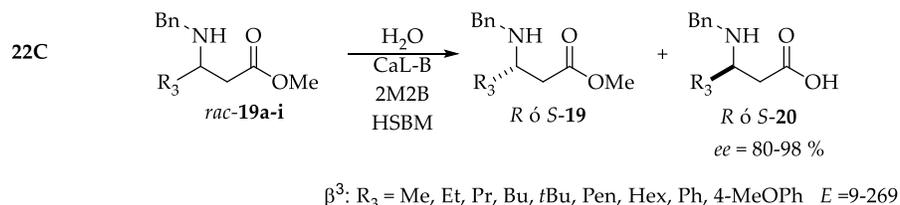
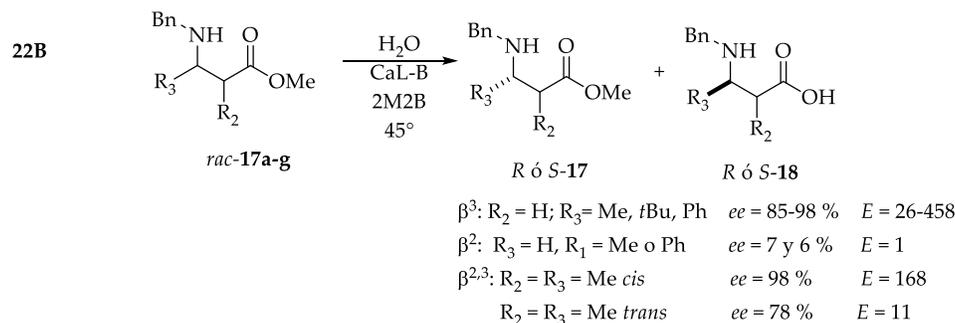
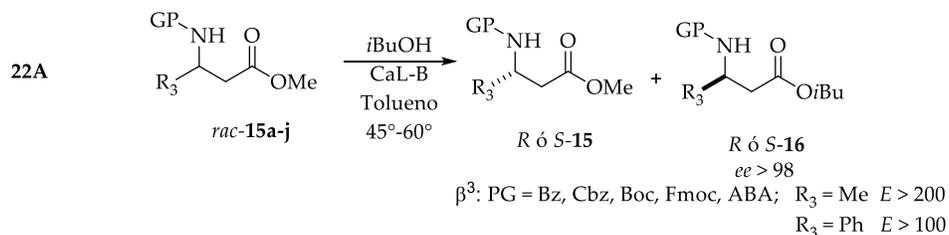
^g (c 0.68, CHCl₃), t. a.

Cuando el sustituyente alquilo está en la posición tres, el producto hidrolizado por CaL-B fue aquel que tiene el sustituyente hacia delante, (R)-(+)-**12b** (entrada 5, Tabla 4), de la misma manera que en la resolución de β^3 -aminoésteres *N*-protegidos y *N*-bencilados,^{69, 70, 74} sin embargo el proceso ocurre con baja selectividad ($E = 8$), a diferencia de sus análogos β^3 -aminoésteres *N*-protegidos y *N*-bencilados ($E > 200$). Se observó la misma enantioselectividad ($E = 8$) y preferencia por el producto hidrolizado con el sustituyente metilo en la posición cuatro [(S)-(+)-**12a**] (entrada 2, Tabla 4). Estos resultados están de acuerdo con la baja enantioselectividad mostrada por CaL-B en la resolución de derivados de ácido carboxílico con γ -stereocentros reportados en la literatura.⁴⁴ Por otro lado, para el producto hidrolizado (R)-(-)-**12c** (entrada 8, Tabla 4), con el sustituyente en la posición dos, la enantioselectividad es aún más baja ($E = 2$), de la misma manera que se observa para sus análogos β^2 -amino

ésteres *N*-bencilados ($E = 1$),⁶⁹ sin embargo con la preferencia espacial contraria, es decir hacia el enantiómero con el sustituyente metilo hacia atrás.

Estos resultados muestran que el proceso es menos resolutivo para el γ^3 -amino éster metílico *N*-Boc protegido, en comparación con los β^3 -amino ésteres metílicos *N*-protegidos y *N*-bencilados, aun cumpliendo con el requerimiento espacial del sustituyente en la posición tres. Con base en lo anterior, se infiere que, adicional al requerimiento espacial del grupo alquílico, la posición del grupo amino también es indispensable en la enantiodiscriminación.

La enantioselectividad en los procesos resolutivos de β^3 -amino ésteres metílicos *N*-protegidos, β^3 -, β^2 - y $\beta^{2,3}$ -amino ésteres metílicos *N*-bencilados y γ^4 -, γ^3 -, γ^2 -amino ésteres metílicos *N*-*tert*-butoxicarbonil, fue medida en términos del *ee* y de la razón enantiomérica (*E*) (**Esquema 22**).



Esquema 22. Resoluciones cinéticas catalizadas por CaL-B en: β^3 -amino ésteres metílicos *N*-protegidos (22A); β^3 -, β^2 -y $\beta^{2,3}$ -amino ésteres metílicos *N*-bencilados (22B); β^3 -amino ésteres metílicos *N*-bencilados (22C); γ^4 -, γ^3 -, γ^2 -amino ésteres metílicos *N*-*tert*-butoxicarbonil protegidos (22D).

4.5.3. Estudios computacionales

Basados en los resultados experimentales de este trabajo en la resolución cinética por CaL-B en γ^4 -, γ^3 -, γ^2 -amino ésteres metílicos *N*-*tert*-butoxicarbonil protegidos y los reportes descritos en la literatura para los β^3 -amino ésteres metílicos *N*-protegidos⁷⁰ y β^3 -, β^2 -, y $\beta^{3,2}$ -amino ésteres metílicos *N*-bencilados,^{69, 74} (**Anexos, Tabla 8**) se desarrollaron estudios de docking molecular que justificaron los requerimientos

espaciales en la región del acilo de la enzima, mediante una descripción de las interacciones no covalentes enzima-sustrato para las conformaciones más próximas al ataque nucleofílico.

Los cálculos de acoplamiento molecular se realizaron en Molegro Virtual Docker (MVD). MVD es un entorno integrado para estudiar y predecir cómo los ligandos interactúan con las macromoléculas. La identificación de los modos de unión al ligando se realiza mediante la evaluación iterativa de varias soluciones candidatas (conformaciones de ligando) y el cálculo de la energía de sus interacciones con la macromolécula. Las soluciones de mayor puntuación se devuelven para su posterior análisis. MVD requiere una estructura tridimensional tanto de proteína como de ligando (generalmente derivada de experimentos de rayos X / RMN o modelos de homología). MVD realiza un acoplamiento flexible del ligando, por lo que la geometría óptima del ligando se determinará durante el acoplamiento.

4.5.3.1. Preparación de las moléculas (ligandos y proteína).

4.5.3.1.1. Preparación de los ligandos

Las estructuras *rac-15a-j*, *17a-g*, *19a-i* y *10a-c* fueron construidas en Spartan'14. Estas moléculas fueron sometidas a un análisis conformacional mediante cálculos basados en la teoría de la mecánica molecular con un campo de fuerzas MMFF; obteniendo los confórmeros de mínima energía para cada par de enantiómeros. Los confórmeros de mínima energía fueron optimizados, a nivel de la Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT) utilizando el funcional híbrido B3LYP y el conjunto de base 6-31 *G. Todas las frecuencias vibracionales fueron positivas, asegurando que todas las estructuras son el mínimo en la superficie de su potencial energético (**Figura 18**) (**Anexos, Tabla 8**).

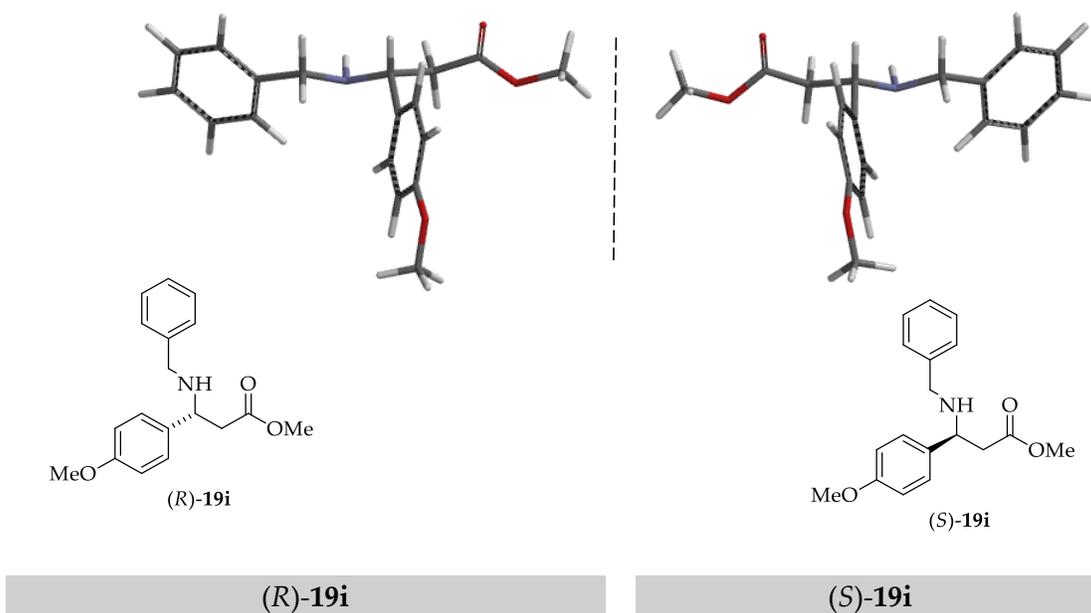


Figura 18. Estructura optimizadas el par de enantiómeros (R)-19i y (S)-19i.

4.5.3.1.2. Análisis estructural de CaL-B.

Se eligió la estructura cristalina de CaL-B código PDB: 1LBS con una resolución de 2.6 Å la cual fue tomada del Banco de Datos de Proteínas PDB por sus siglas en inglés (*Protein Data Bank*). Esta estructura contiene un inhibidor fosfonato que imita el estado de transición y forma enlaces de hidrógeno con tres de los cuatro residuos que han sido bien identificados y definidos como indispensables para considerar a una conformación como catalíticamente productiva en una reacción catalizada por lipasas (Thr y Gln de la cavidad oxianiónica y el residuos catalíticos de Ser e His)^{12d} (Figura 19).

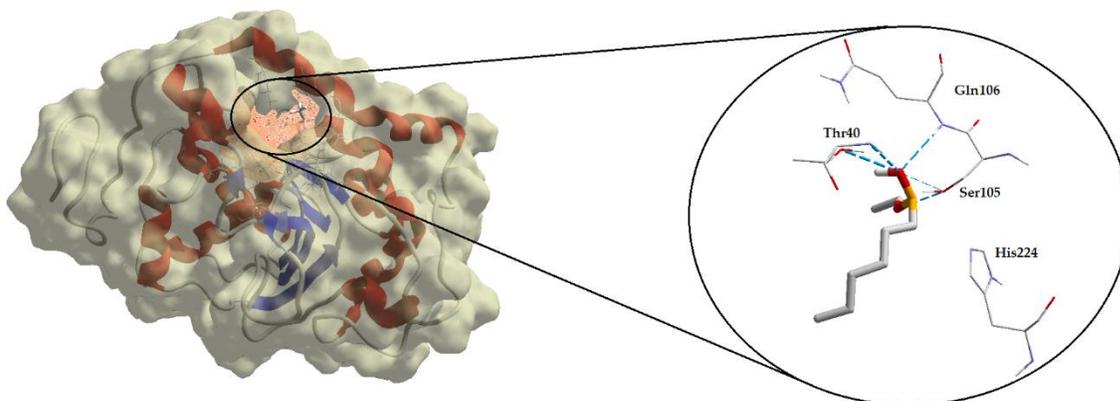


Figura 19. Estructura de CaL-B código PDB: 1LBS; ligando experimental en la cavidad representado en bastones, cavidad en naranja.

Se determinó la variación de la estructura terciaria en 1LBS utilizando Virtual Molecular Dynamics (VMD), mediante un alineamiento estructural tomando como referencia a la estructura de CaL-B de mayor resolución (1.55 Å) con código PDB: 1TCA, pero sin ligando en la cavidad; usando la desviación cuadrática media de las posiciones atómicas de las proteínas superpuestas conocido como RMSD por sus siglas en inglés (*Root Mean Square Deviation*). Con el valor de $\text{RMSD} = 0.335$ se determinó que la cadena principal de la proteína en la estructura 1LBS no sufre modificaciones importantes ocasionadas por el efecto inductivo del ligando en su cavidad (**Figura 20**).

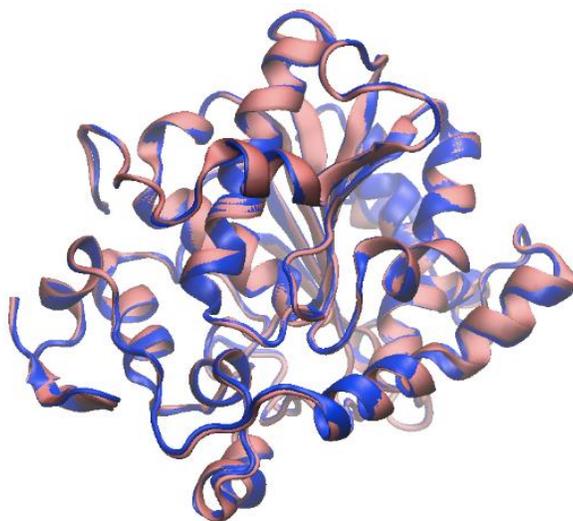


Figura 20. Alineamiento estructural. CaL-B código PDB: 1LBS en azul ($\text{RMSD}=0.335$), estructura de referencia CaL-B código PDB: 1TCA en rojo.

4.5.3.1.3. Detección de la cavidad catalítica

Para la detección de las cavidades se hizo uso de Molegro Virtual Docker (MVD) mediante el método de superficie molecular. Las cavidades detectadas durante el proceso de búsqueda permitieron una identificación de posibles modos de unión (conformación calculada). MVD detecta una cavidad de 194.05 \AA^3 para la estructura 1TCA sin ligando (**Figura 21A**) y de 212.48 \AA^3 para la estructura 1LBS con el inhibidor de fosfonato (**Figura 21B**).

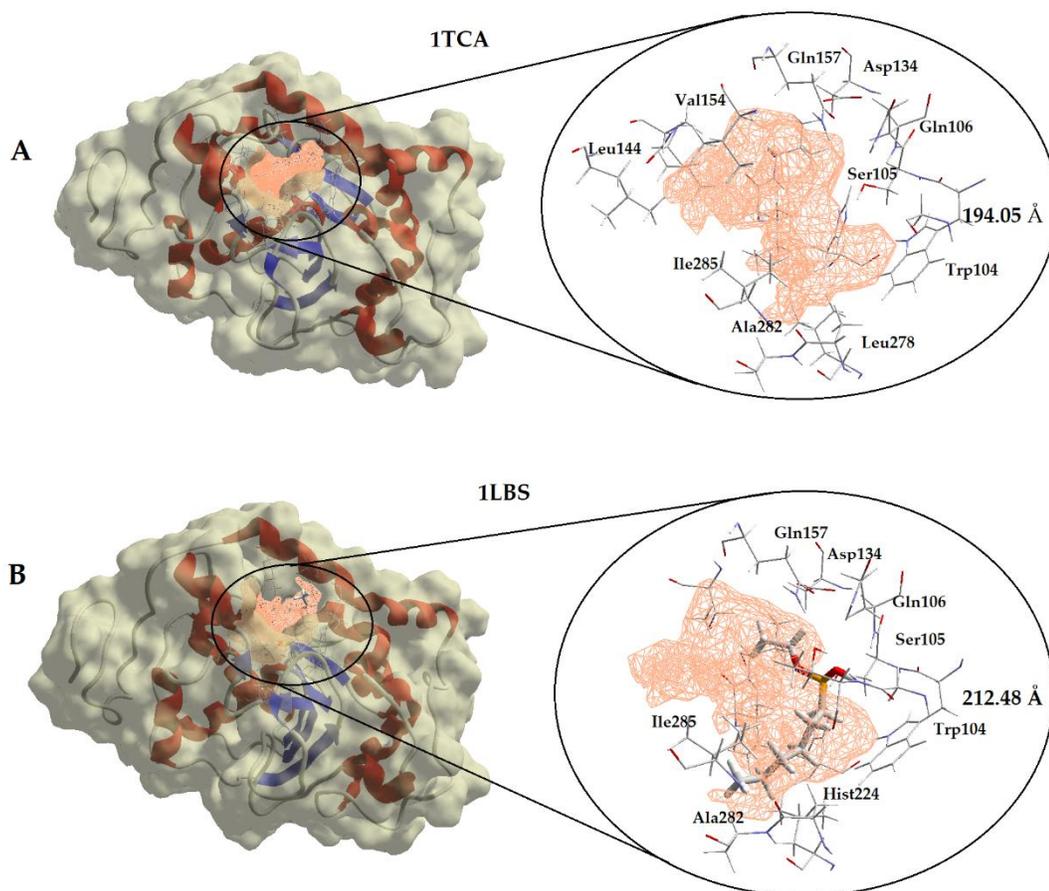


Figura 21. Cavidad de CaL-B: código PDB: 1TCA (A); código PDB: 1LBS (B).

4.5.3.1.4. Validación del Acoplamiento Molecular "Docking".

Como habíamos descrito anteriormente, la cavidad catalítica de CaL-B se puede considerar formada por dos regiones, la región del acilo y la región del alcohol conocida también como región del nucleófilo. Las dos regiones se encuentran separadas por varios residuos hidrofóbicos con la triada catalítica situada al fondo de la cavidad. Cabe mencionar que, en el reporte del cual fue obtenida la estructura de rayos X 1LBS, los autores hacen referencia a la obtención de una mezcla de conformaciones del ligando en la regiones del acilo y del nucleófilo. Sin embargo, la densidad observada mostró que la enzima fue inhibida principalmente por el enantiómero cuyo metoxilo se encuentra orientado hacia la región del acilo. Por tanto no forma el enlace de hidrógeno con la His224, el cual es indispensable para una conformación catalíticamente productiva (Figura 22).

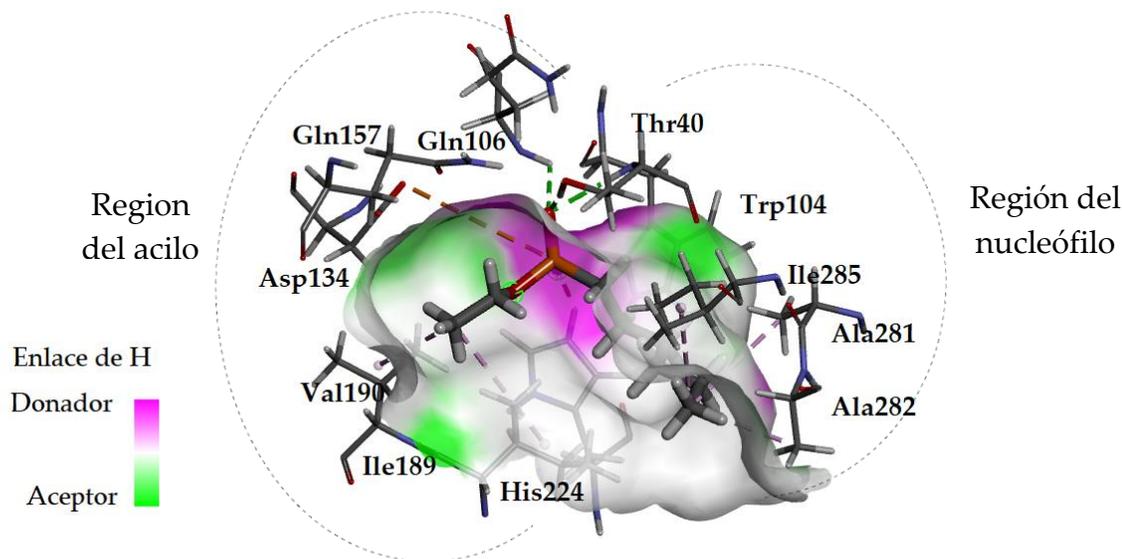


Figura 22. Cavidad catalítica de CaL-B código PDB: 1LBS con ligando experimental representado en bastones.

Se analizaron diferentes algoritmos de búsqueda y algunos parámetros tales como los pasos de minimización por residuo y por corrida, número de corridas e iteraciones, y tamaño de la población, fueron probados y evaluados según su capacidad para reproducir la estructura del ligando experimental en 1LBS. Adicionalmente, se probaron tres esquemas de cargas parciales: cargas parciales internas de Mulliken, electrostática y Molegro; siendo las cargas de Mulliken las que mostraron los mejores resultados al reproducir la conformación del ligando en el

crystal. El algoritmo de búsqueda fue MolDock SE (Simplex Evolution) con los siguientes parámetros: un total de 15 corridas con un máximo de 2,000 iteraciones utilizando una población de 50 individuos, 2,000 pasos de minimización para cada residuo flexible, y 2,000 pasos de minimización global por corrida. Las conformaciones calculadas fueron evaluadas en términos de la energía de interacción enzima-sustrato, mediante la función de puntaje que utiliza Molegro® (MolDoc Score); la cual está dada en kcal/mol y es el resultado de la energía de intermolecular enzima-ligando y la contribución de la energía interna del ligando. La función de puntaje para calcular el valor de energía del acoplamiento fue MolDock Score [GRID]. Se estableció en una rejilla 0.2 Å y una la esfera de búsqueda 10 Å de radio alrededor de la cavidad. Para el análisis de energía del ligando se consideraron las interacciones electrostáticas internas, enlaces de hidrógeno internos y las torsiones Sp²-Sp².

El ligando experimental (conformación catalíticamente no productiva) en la cavidad de 1LBS, fue reproducido por una conformación calculada con un valor de RMSD = 1.1133 (**Figura 23A**). Adicionalmente se obtuvo una conformación calculada catalíticamente productiva, en la que podemos observar al metoxilo del ligando orientado hacia la región del nucleófilo, formando el enlace de débil de hidrógeno con el residuo de His224 (**Figura 23B**).

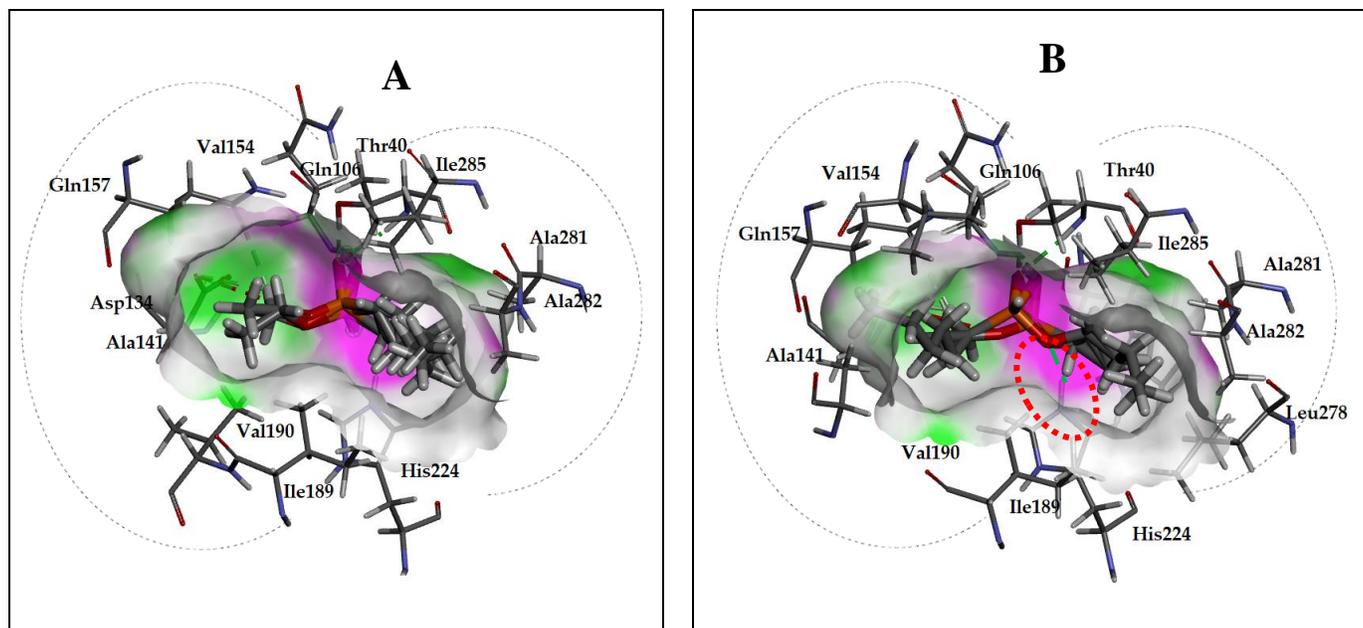
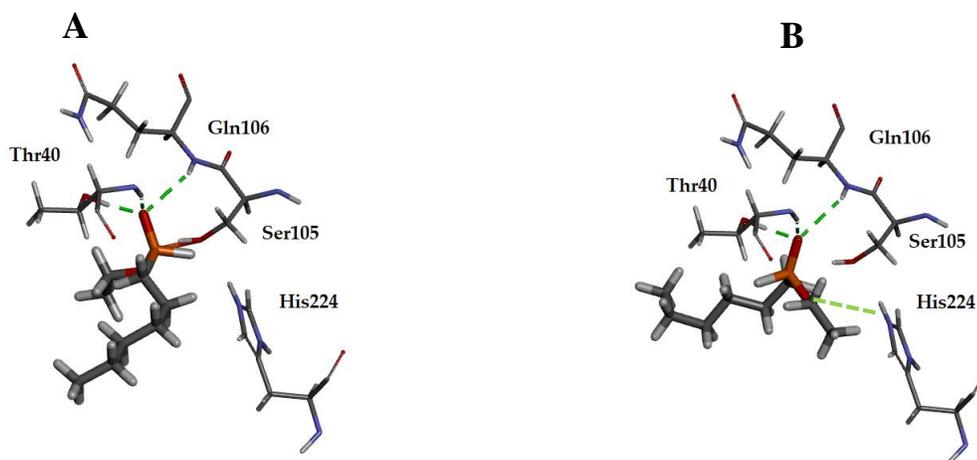


Figura 23. Ligando experimental en la cavidad de CaL-B código PDB: 1LBS y conformación calculada representados en bastones (A) (RMSD= 1.1133). El ligando experimental en la cavidad de CaL-B código PDB: 1LBS y conformación calculada para una conformación catalíticamente productiva con un enlace de hidrógeno a His224 en representados en bastones (B).

Una comparación de las dos conformaciones calculadas muestra que la conformación calculada que reproduce al ligando obtenido experimentalmente (A), posee una mejor energía interna, sin embargo la conformación calculada para una pose catalíticamente productiva (B) posee una mejor energía de interacción ligando-proteína, además se observan que solo la pose B forman todos los enlaces de hidrógeno necesarios para una conformación catalíticamente productiva (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de las dos conformaciones calculadas en el proceso de validación

Ligando	MolDock Score ^a	Interna ^a	Interacción ^a	Enlaces de hidrógeno	Distancia enlaces de hidrógeno (Å) ^b				
					Thr40	Gln106	Ser105	His224	
					NH--- O=P	OH--- O=P	NH--- O=P	O-H--- Omet	NH--- Omet
A	-72.597	-2.031	-70.566	-6.7	3.06	2.06	3.07	2.6	----
B	-77.465	-1.292	-76.173	-7.8	3.1	2.59	3.16	2.75	3.55

^a Los valores de energía en kcal/mol

^b Distancia entre átomos que no son de hidrógeno (N-O, O-O y N-O). Las distancias de 2.7- 3.2 Å son consistentes con un enlace de hidrógeno.

4.5.3.2. Análisis de la interacción ligando-proteína de las moléculas de interés.

Las conformaciones calculadas se eligieron según los siguientes criterios:

1. La parte del acilo debe orientarse hacia la región del acilo de la cavidad (residuos de Asp134 y Gln157) (**Figura 24-1**).
2. Se debe observar la parte del metoxilo del sustrato en la región del nucleófilo delimitado por el residuo de Trp104 (**Figura 24-2**).
3. Una interacción por puentes de hidrógeno entre los residuos de Ser105 e His224 con el metoxilo del ligando (**Figura 24-3**).

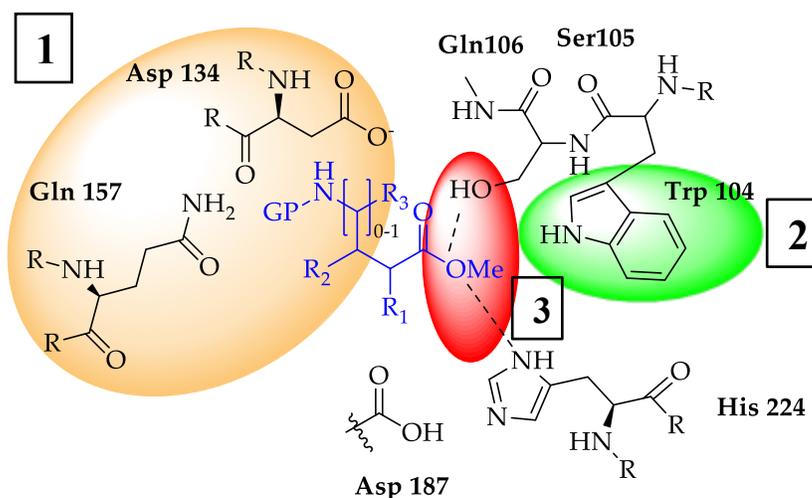


Figura 24. Criterios para evaluar las conformaciones calculadas en el acoplamiento molecular.

Para evaluar las conformaciones calculadas se consideraron: la energía de interacción enzima-ligando, la energía por enlaces de hidrógeno y las interacciones por residuo para las parejas enantioméricas (**Anexos, Tabla 9**). Estas se dividieron en tres grupos: el grupo de residuos de interacción en la cavidad catalítica, el grupo de interacciones estéricas y el grupo de la región del acilo (**Tabla 6**).

Tabla 6. Grupo de residuos usados para evaluar a las conformaciones calculadas.

Grupo de residuos	Residuos
Catalíticos	Ser105, His224, Thr40, Gln106
Interacciones estéricas	Val190, Ile189
Región del acilo	Asp134, Gln106, Val154

Los estudios de Docking molecular se analizaron de acuerdo a las siguientes series: β^3 - y γ^3 -amino ésteres con β estereocentros (Series 1A-C), $\beta^{2,3}$ -amino ésteres con β y α estereocentros (Serie 2), β^2 - y γ^2 -amino ésteres con α estereocentros (Series 3A y 3B), y al γ^4 -amino éster con γ estereocentro (**Figura 25**); y se dividieron en tres secciones. En la primera sección se analizó el efecto del tamaño y posición del sustituyente, en la segunda el efecto de exclusión estérica de la cavidad catalítica y en la tercera el modo de unión de los ligandos.

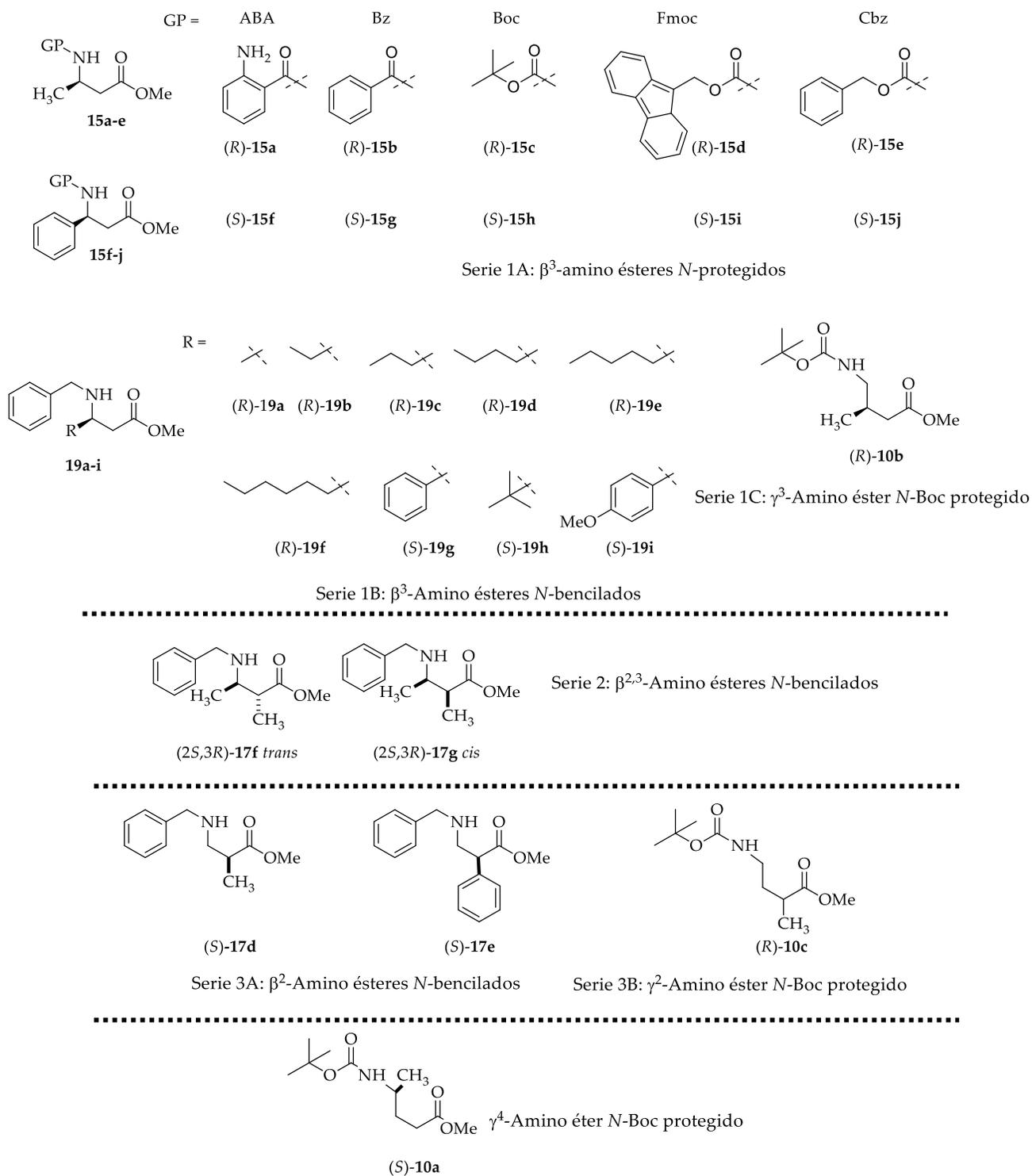


Figura 25. β^3 - y γ^3 -amino ésteres con β estereocentros (Series 1). $\beta^{2,3}$ -amino ésteres con β y α estereocentros (Serie 2). β^2 - y γ^2 -amino ésteres con α estereocentros (Series 3), γ^4 -amino éster con γ estereocentro.

4.5.3.3. Acoplamiento Molecular "Docking"

Las mejores energías de interacción ligando-proteína, se obtuvieron para los sustratos activos experimentalmente (**Anexos, Tabla 9**).

4.5.3.3.1. El efecto del tamaño y posición del sustituyente

Las energías de interacción de las moléculas *rac*-**15a-j**, **17a-g**, **19a-i** y **10a-c** con los residuos catalíticos; no muestran una tendencia clara en relación a la enantioselectividad (**Anexos, Tabla 9**). Sin embargo, si muestran una relación con el tamaño y la posición del sustituyente.

Las energías de las conformaciones calculadas para los sustratos con β estereocentros (Serie 1A), con los residuos catalíticos (Ser105/Hist224/Thr40/Gln106), muestran una relación con el tamaño del grupo protector y del sustituyente, de tal manera que el cambio en el sustituyentes más voluminosos obliga a la molécula a acomodarse en toda la cavidad catalítica generando choques estéricos con los residuos de Ser105 y Thr40, por tanto, la capacidad de los ligandos para acomodarse en la cavidad es un factor determinante en la velocidad de la reacción la cual es mayor para los sustratos con sustituyente más voluminosos como fenilo (**Figura 26**).

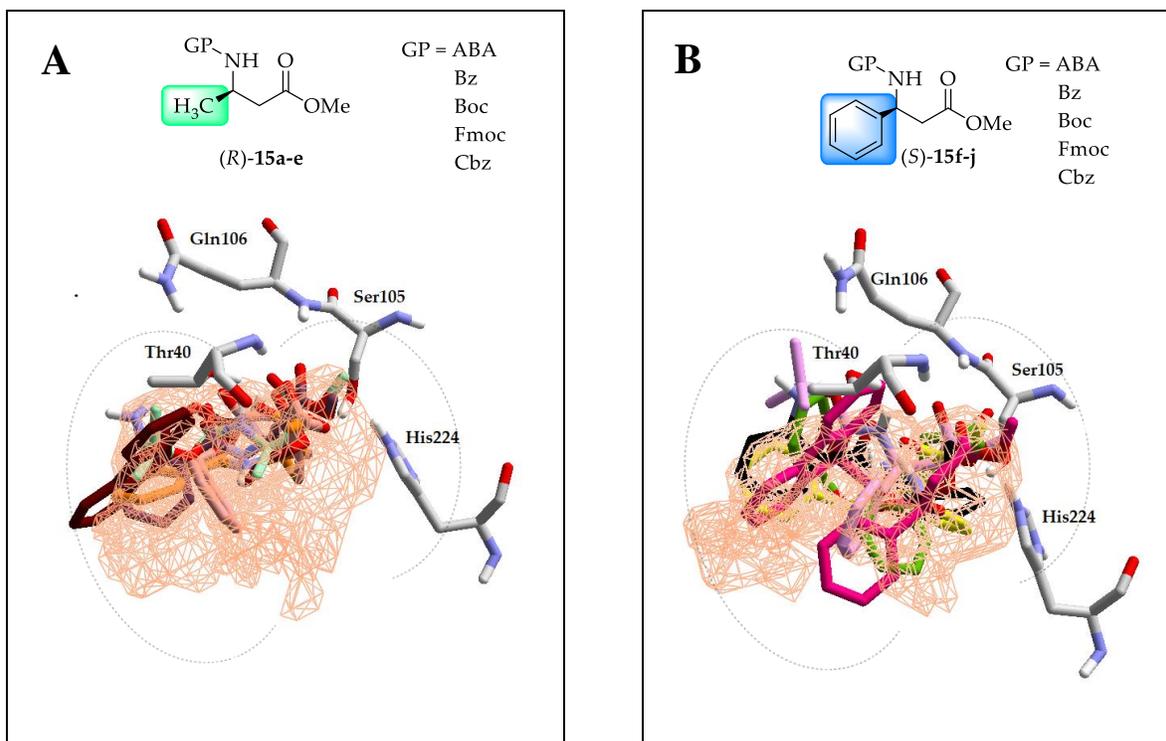


Figura 26. Conformaciones calculadas para los sustratos β^3 -amino ésteres metílicos *N*-protegidos y residuos catalíticos en representación de bastones cavidad catalítica en naranja. (A) Ligandos (*R*)-15a-e. (B) Ligandos (*S*)-15f-j.

Las conformaciones calculadas para los sustratos con α estereocentros (Serie 3A y 3B) muestran que el sustituyente en la posición α también genera choques estéricos con la Ser105 catalítica (**Figura 27**). Estos fueron minimizados mediante una optimización del acoplamiento molecular (**Anexos, Tabla 9**). Sin embargo a nivel experimental los sustratos con sustituyentes en la posición α muestran bajas conversiones y tiempos prolongados de reacción.

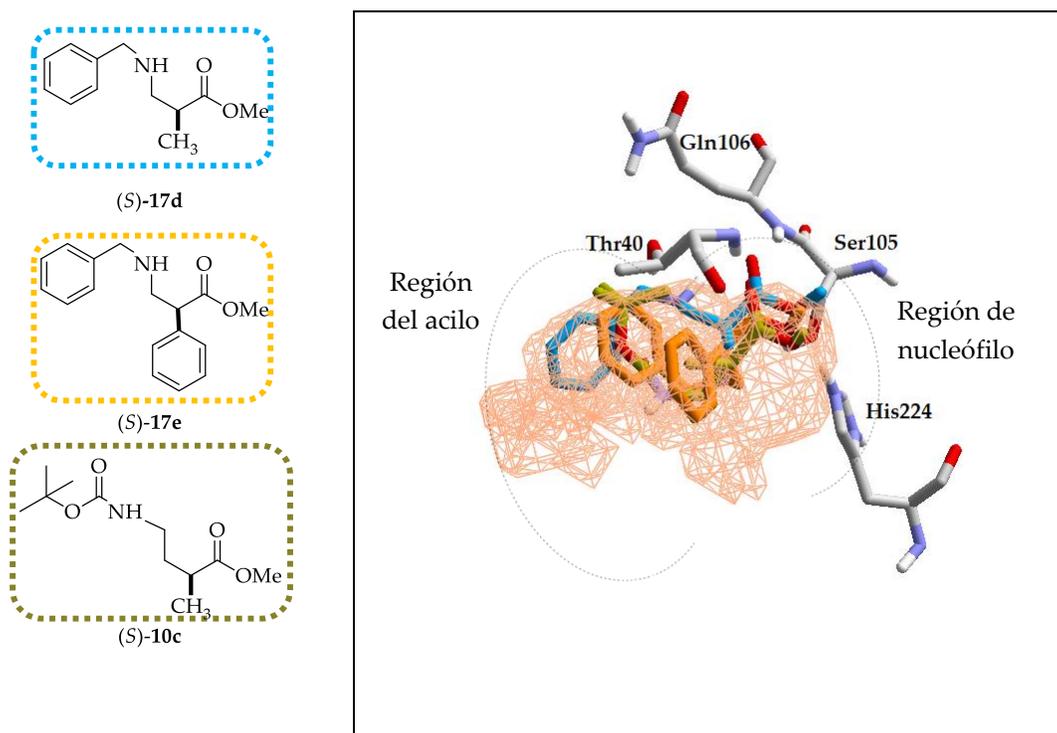


Figura 27. Conformaciones calculadas para los sustratos con α estereocentros (*S*)-17d, (*S*)-17e y (*S*)-10c en representación de bastones y residuos catalíticos en representación de bastones, cavidad catalítica en naranja.

Aunque las interacciones con los residuos catalíticos no son contundentes en la enantioselectividad del proceso de resolución si tiene relación con la velocidad de la reacción y se ve influenciada por el grupo protector así como de la posición y tamaño del sustituyente.

4.5.3.3.2. El efecto de exclusión estérica de la cavidad catalítica

La estructura tridimensional de la cavidad catalítica puede restringir la orientación del sustituyente en el estereocentro del sustrato a través de un efecto de exclusión estérica. Para determinar que interacciones generan la exclusión se dockearon todos los sustratos (*rac*-15a-j, 17a-g, 19a-i y 10a-c). Las interacciones con los residuos de Val190 e Ile189 muestran que los ligando activos orientan al sustituyente hacia afuera de la cavidad minimizando las interacciones estéricas (**Figura 28A**). Por el contrario las moléculas no activas experimentalmente tienen choques estéricos con estos residuos y mostraron una mayor distorsión conformacional en la cavidad catalítica, por tanto, son consideradas conformaciones no productivas (**Figura 28B**).

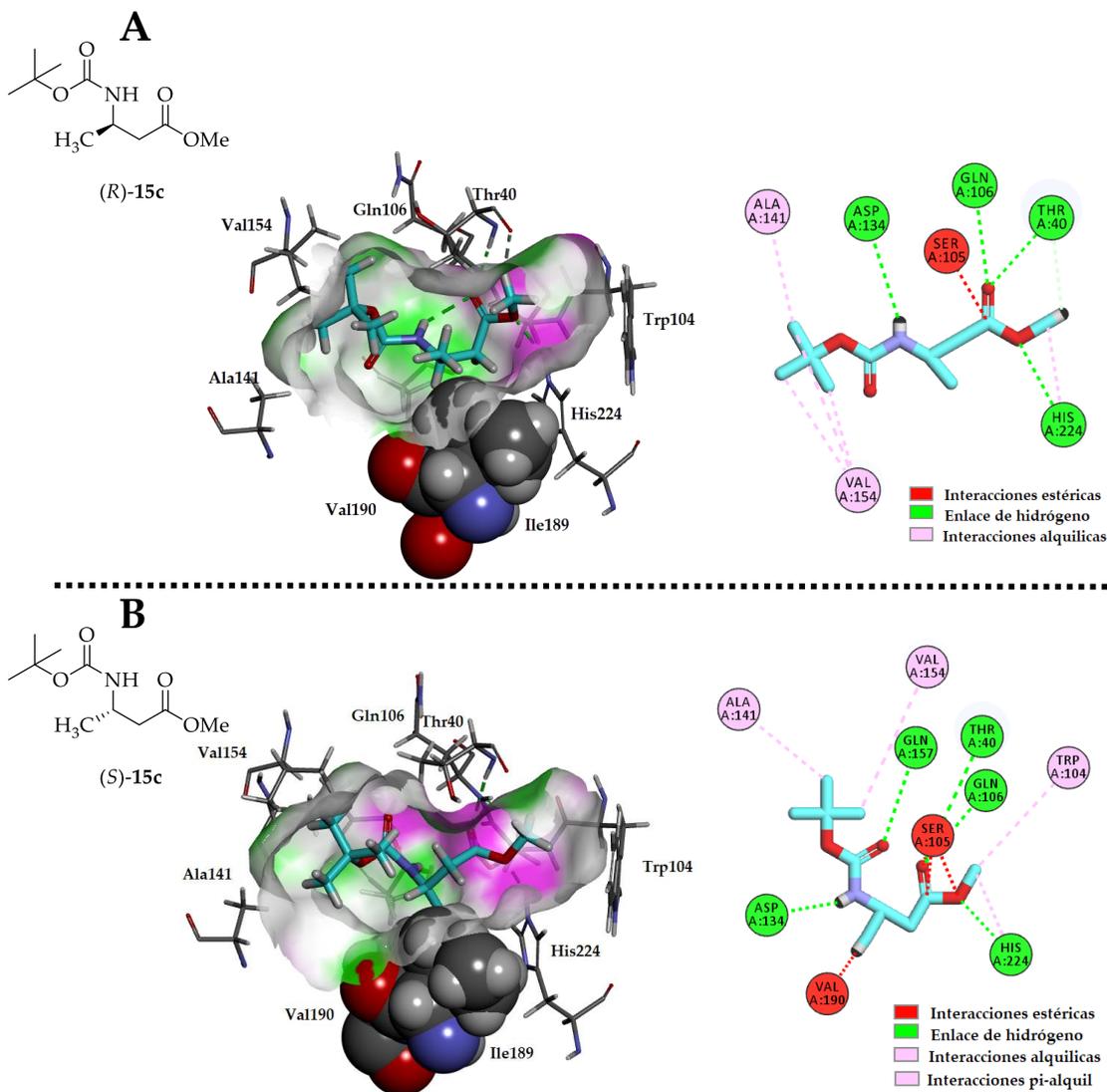
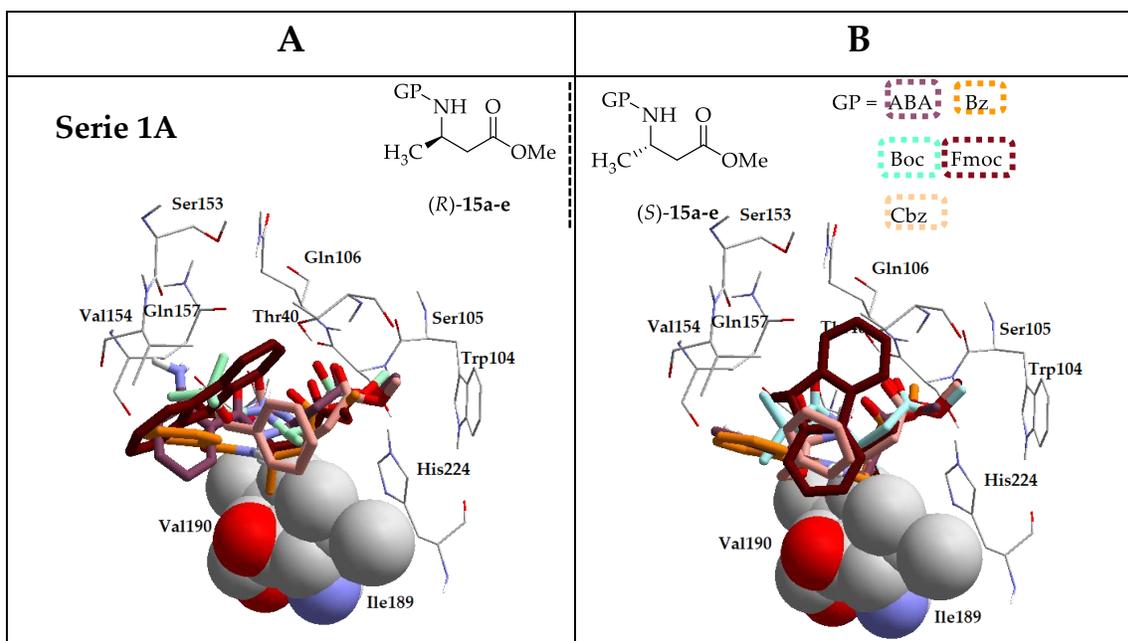
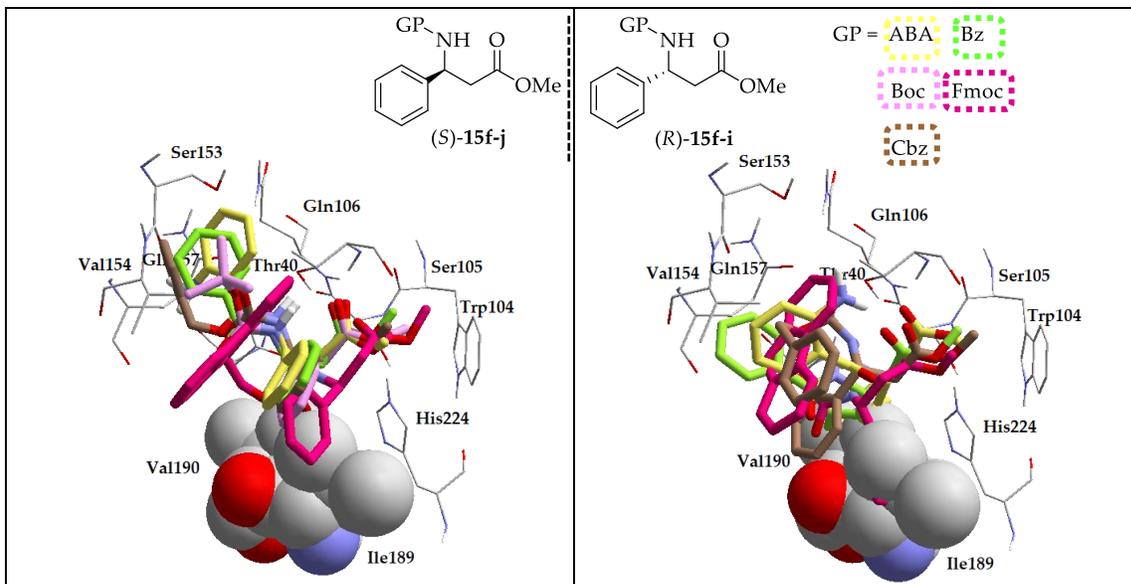


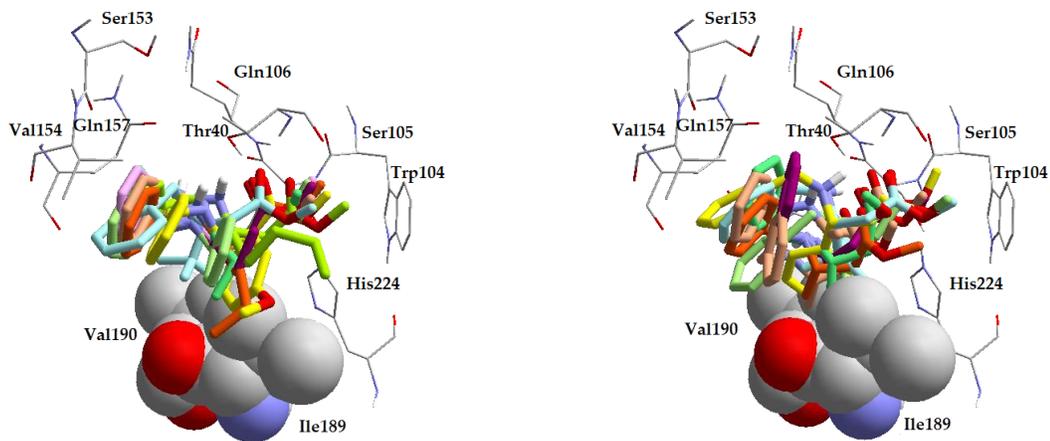
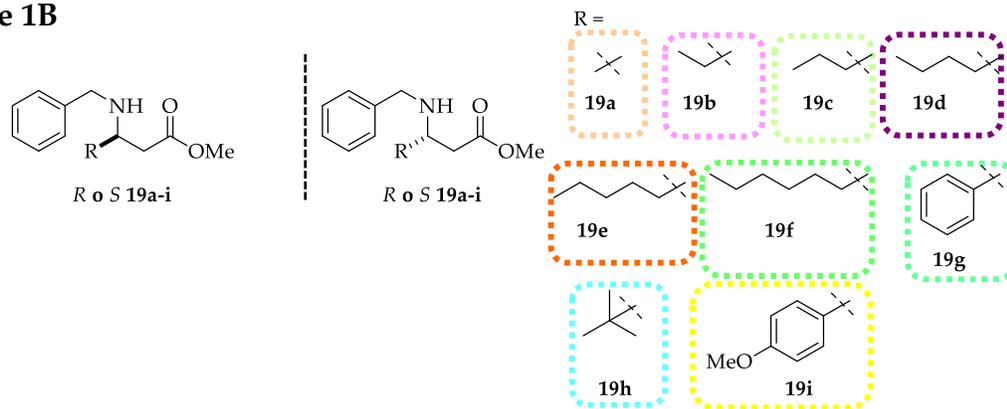
Figura 28. Efecto de exclusión estérica y representación 2D para las conformaciones calculadas de los β^3 -amino ésteres: (*R*)-15c (A) y (*S*)-15c (B). Residuos Val190 e Ile189 en representación de relleno espacial.

El análisis de las moléculas de β^3 -amino ácidos con beta estereocentros (Serie 1A-C) muestra que el sustituyente en la posición β genera el mayor choque con los residuos de Val190 e Ile189 (Serie 1A y 1B, Figura 29). Sin embargo, el γ^3 -amino éster (*R*)-10b con beta estereocentro no muestra exclusión estérica en la cavidad catalítica con los residuos de Val 190 o Ile189 (Serie 1C, Figura 29). Estos resultados concuerdan con lo observado experimentalmente para la pérdida de selectividad del γ^3 -amino éster (*R*)-10b ($E = 8$).





Serie 1B



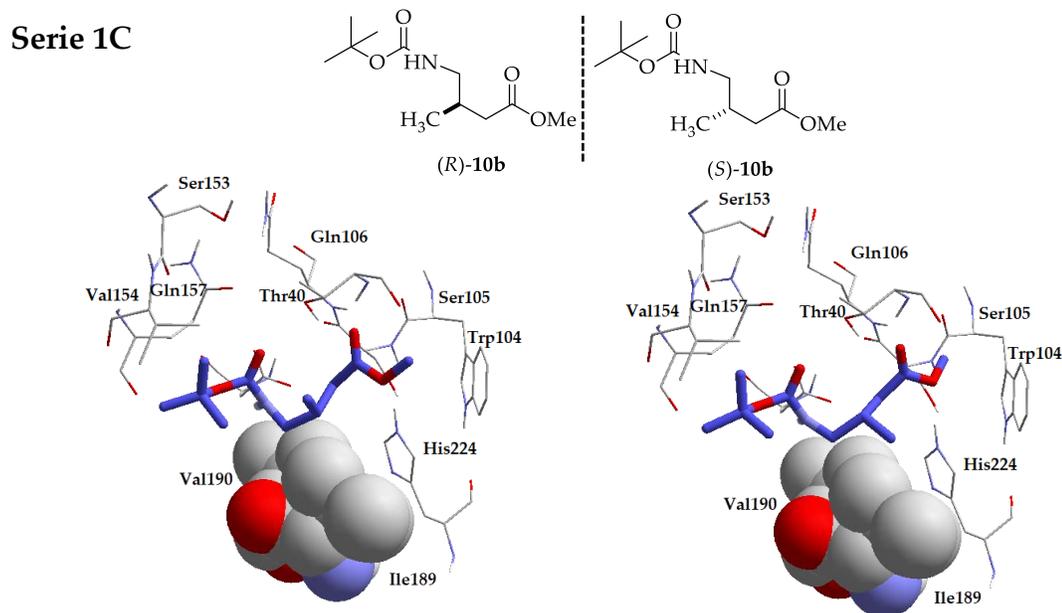


Figura 29. Efecto de exclusión estérica para las conformaciones calculadas de la serie uno con β estereocentros. Enantiómeros de rápida reacción (A), enantiómeros de lenta reacción (B). Residuos Val190 e Ile189 en representación de relleno espacial.

La exclusión estérica generada por los residuos de Val190 e Ile189 también se observa para $\beta^{2,3}$ -amino ésteres metílicos *N*-bencilados **17f** *trans* y **17g** *cis* con α y β estereocentros (**Serie 2, Figura 30**). Se observa que el diastereoisómero de rápida reacción (*2R,3R*)-**17f** *trans* orienta al sustituyente en la posición β hacia afuera de la cavidad, mientras que el sustituyente en la posición dos se orienta hacia el fondo de la cavidad generando una ligera repulsión estérica con el residuo de Val190 obligando a la molécula a flexionarse. El enantiómero *trans* de menor velocidad de reacción (*2S,3S*)-**17f** posó la misma flexión hacia adelante, que su diastereoisómero (*2R,3R*)-**17f** permitiendo acomodar al metilo de la posición tres orientado hacia al fondo de la cavidad, por lo que se observaría una pérdida de selectividad que coincide con los resultados obtenidos experimentalmente ($E = 11$).

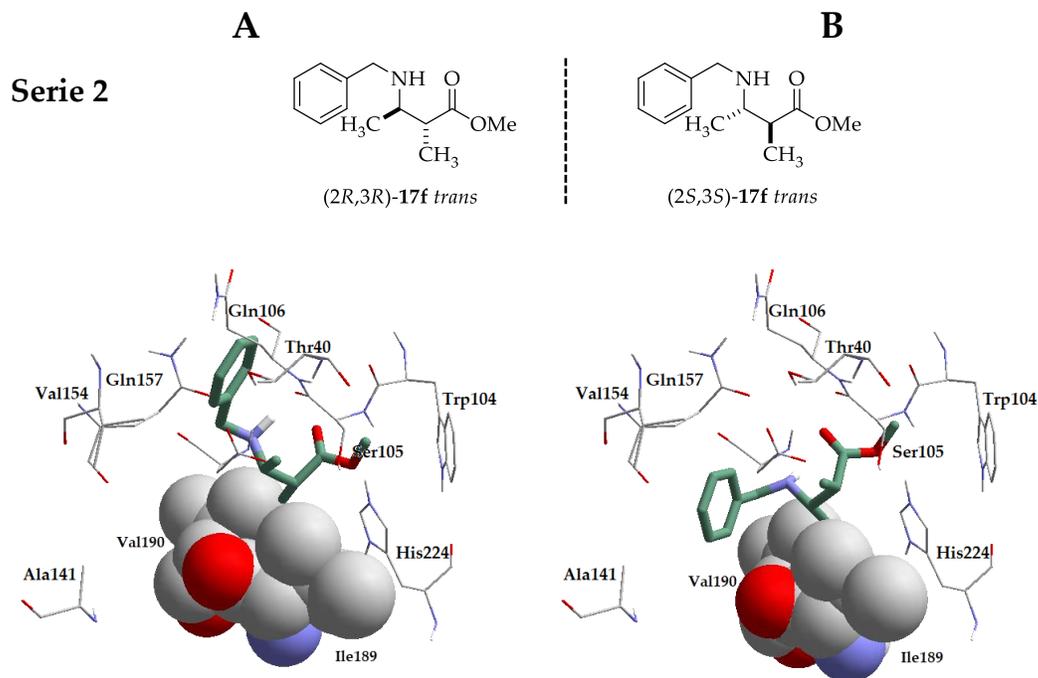


Figura 30. Efecto de exclusión estérica para las conformaciones calculadas para los enantiómeros **17f** *trans* de la serie dos con α y β estereocentros. Enantiómero de rápida reacción (**A**), enantiómero de lenta reacción (**B**). Residuos Val190 e Ile189 en representación de relleno espacial.

Por otro lado, la selectividad observada experimentalmente para los diastereoisómeros disustituidos en *cis* (*2S,3R*)-**17g** y (*2R,3S*)-**17g**; muestra que la enzima tiene enantioselectividad exclusivamente por el diastereoisómero (*2S,3R*)-**17g** ($E > 100$), las conformaciones calculadas (**Figura 31**) muestran que el diastereoisómero activo experimentalmente no muestra exclusión estérica de los residuos de Ile189 y Val190 ya que orienta a los sustituyentes metilo hacia afuera de la cavidad (**Figura 28A**), por el contrario el diastereoisómero (*2R,3S*)-**17f** orienta los ambos sustituyentes metilo hacia adentro de la cavidad generando choques estéricos con los residuos de Ile189 y Val190 (**Figura 28B**).

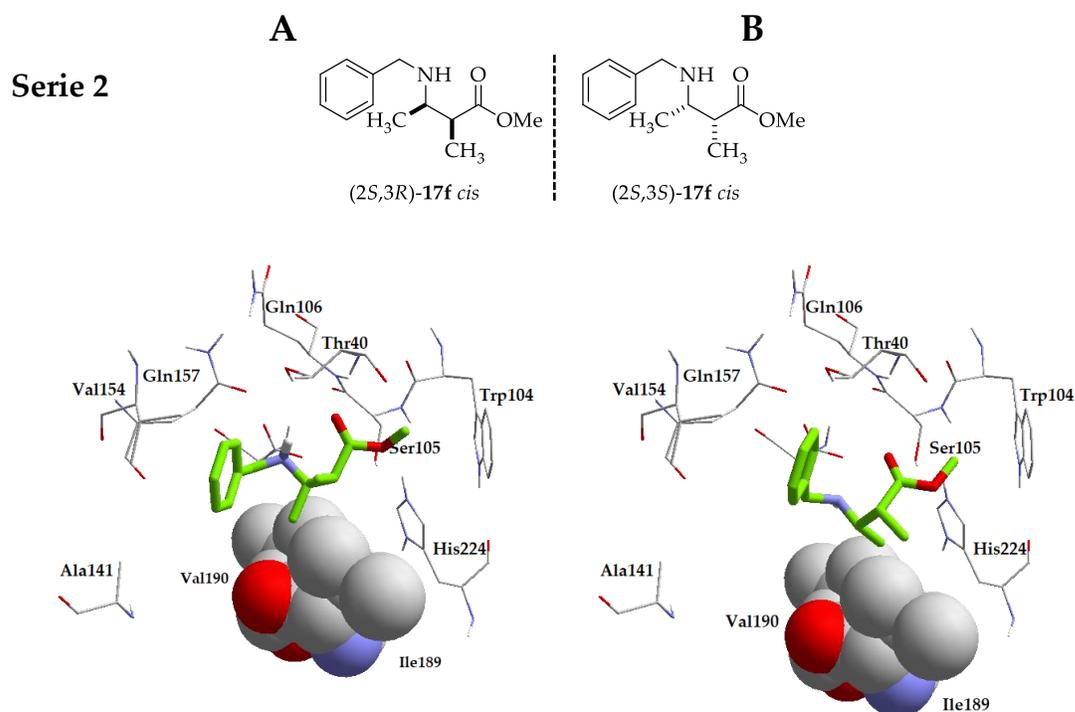


Figura 31. Efecto de exclusión estérica para las conformaciones calculadas para los enantiómeros **17f** *trans* de la serie dos con α y β estereocentros. Enantiómero de rápida reacción (**A**), enantiómero de lenta reacción (**B**). Residuos Val190 e Ile189 en representación de relleno espacial.

A diferencia del sustituyente en la posición β de los β^3 - y $\beta^{2,3}$ -amino ésteres, el sustituyente en α de los β^2 y γ^2 -amino ésteres no muestran repulsiones estéricas con los residuos de Ile189 y Val190 (**Figura 32**), por lo que la enzima puede reconocer a ambos enantiómeros dando como resultado la pérdida de enantioselectividad observada ($E = 1-2$).

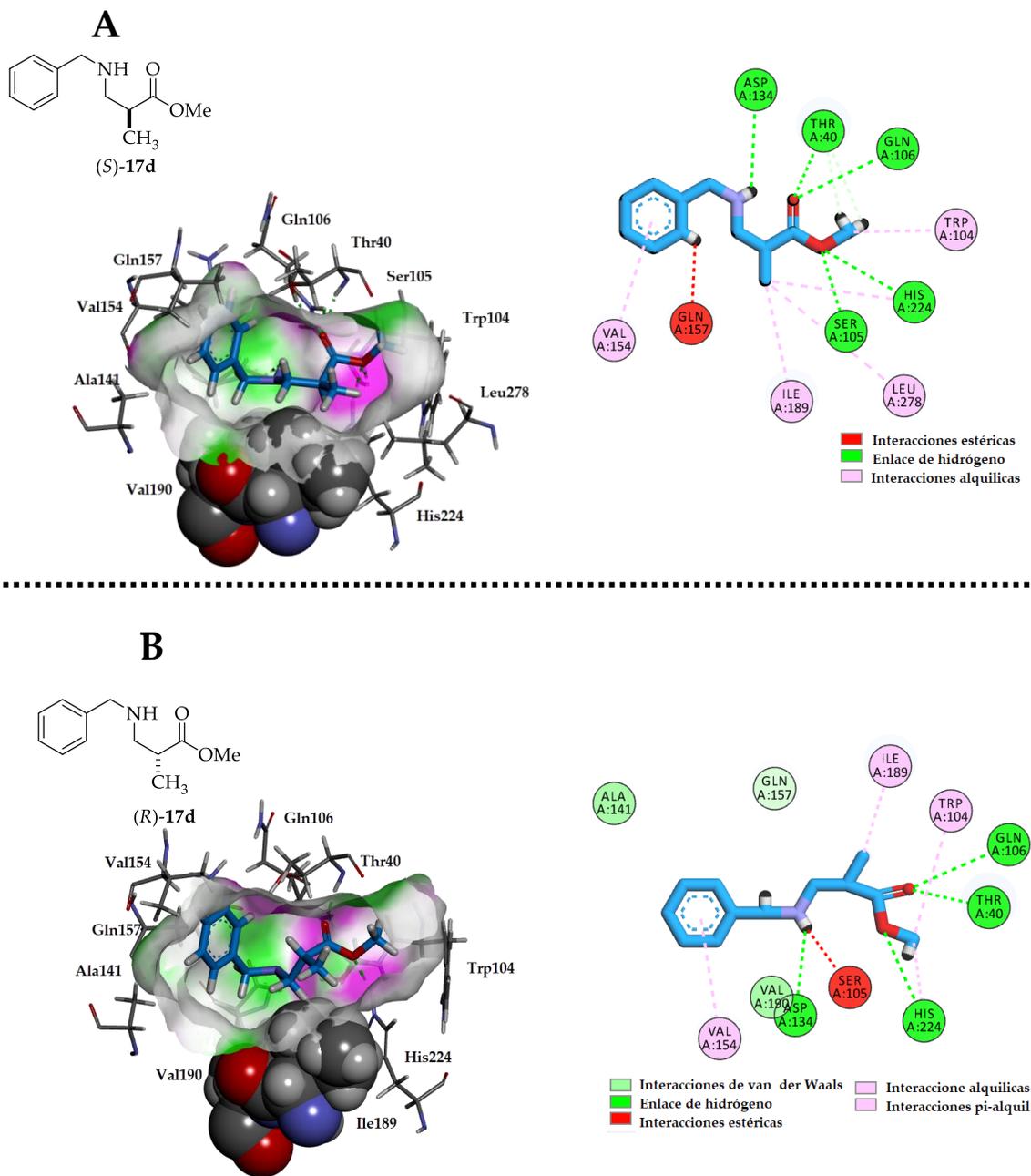


Figura 32. Efecto de exclusión estérica y representación 2D para las conformaciones calculadas de los β^2 -amino ésteres: (S)-17d (A) y (R)-17d (B).Residuos Val190 e Ile189 en representación de relleno espacial.

Las conformaciones calculadas para los amino ésteres con α estereocentros 17d, 17e y 10c (Serie 3A y 3B, Figura 33) muestran que al igual que se observó en las conformaciones calculadas para los $\beta^{2,3}$ -amino ésteres metílicos *N*-bencilados, el sustituyente en α obliga a la molécula a flexionarse hacia adelante. Esta flexión

genera choques estéricos con la Ser105 catalítica los cuales fueron minimizados mediante una optimización del acoplamiento molecular (**Anexos, Tabla 9**).

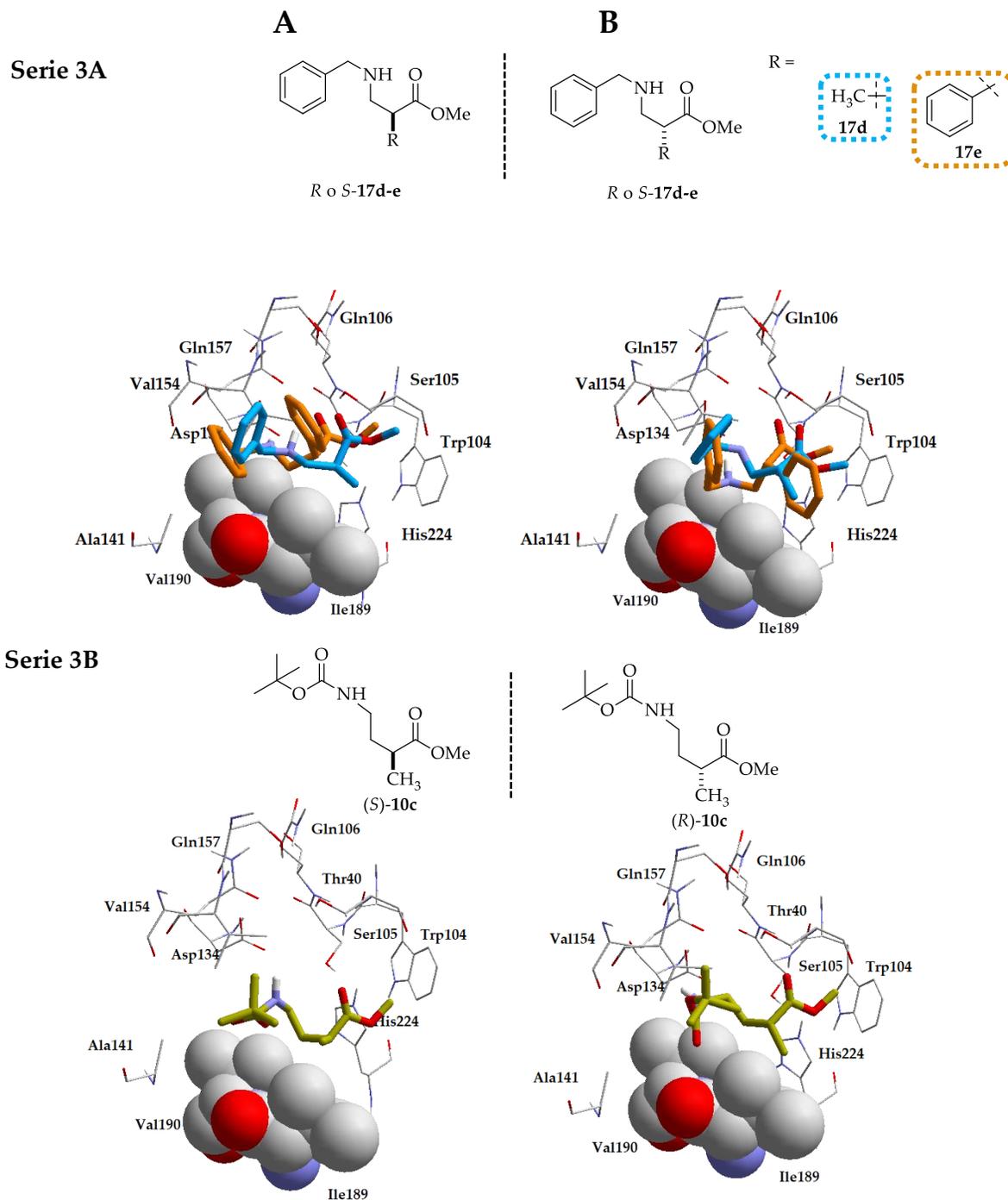


Figura 33. Efecto de exclusión estérica para las conformaciones calculadas para los enantiómeros **17d**, **17e** y **10c** de la serie dos con α estereocentros. Enantiómero con sustituyente hacia adelante (**A**), enantiómero con el sustituyente hacia atrás (**B**). Residuos Val190 e Ile189 en representación de relleno espacial.

El análisis de los γ^4 -amino ésteres con γ estereocentros (**Serie 4, Figura 34**) muestra que el sustituyente en la posición γ no genera grandes choques con Val190 e Ile189.

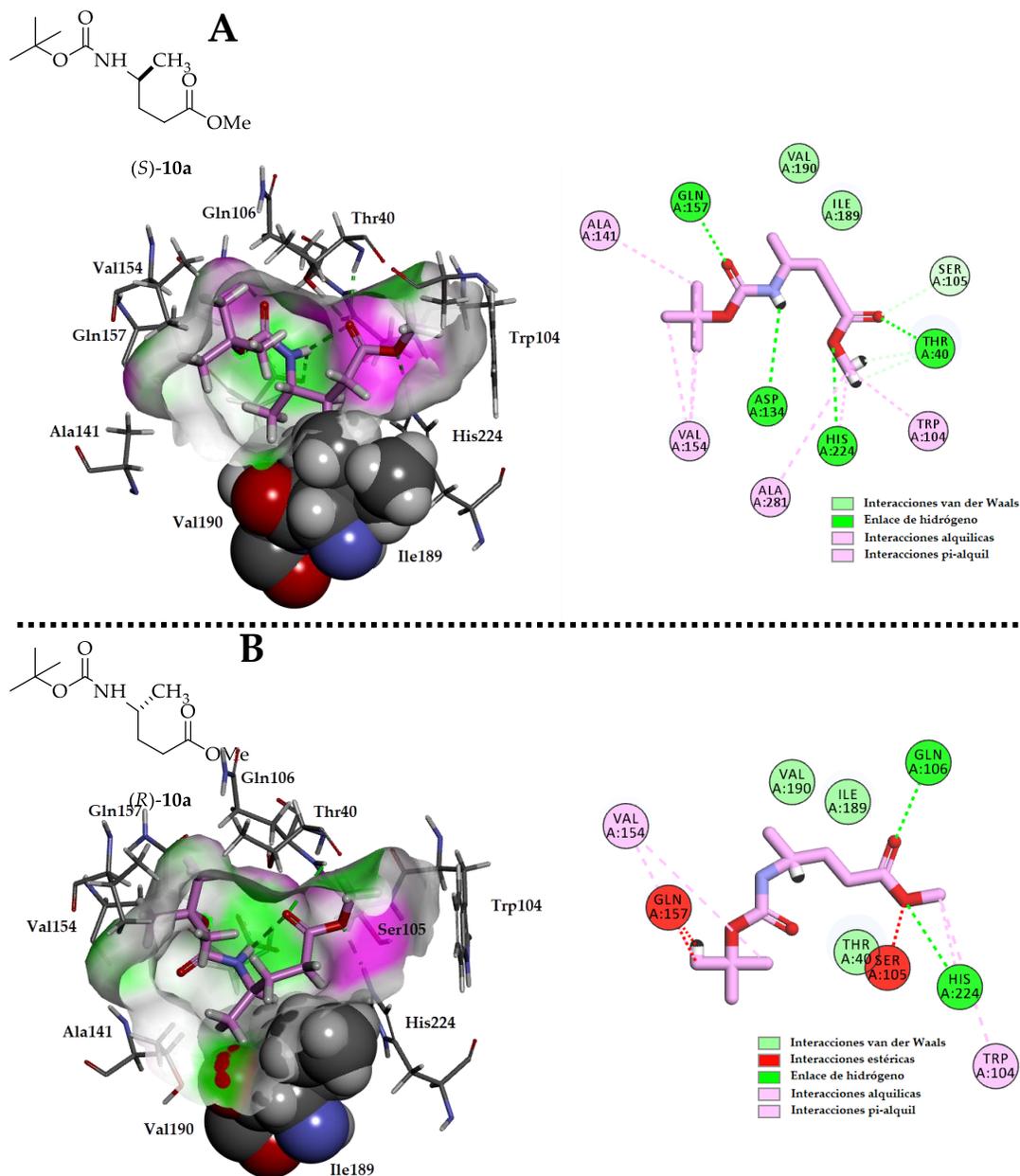


Figura 34. Efecto de exclusión estérica y representación 2D para las conformaciones calculadas de los γ^4 -amino ésteres: (S)-10a (A) y (S)-10b (B). Residuos Val190 e Ile189 en representación de relleno espacial.

Si bien el efecto de exclusión estérica justifica el requerimiento espacial de los β^3 - y

$\beta^{2,3}$ -amino ésteres con β estereocentros no justifica la pérdida de selectividad observada en el γ^3 -amino éster con β estereocentro. Sin embargo, durante el análisis de las conformaciones calculadas se observó que el grupo amino de la moléculas presenta interacción por enlace de hidrógeno con el residuo de Asp134, esta interacción está bien conservada en la mayoría de los β -amino ésteres mientras que en los γ -amino ésteres la interacción se pierde, ya que estos muestran una mayor diversidad conformacional.

4.5.3.3.3. *Modo de unión de los ligandos*

A través de los acoplamientos moleculares entre los ligandos *N*-protegidos de la Serie 1A y con sustituyente metilo en la posición tres (*R*)-**15a-e**, se determinaron dos posible modos de unión la proteína. La pareja de ligandos (*R*)-**15a** y (*R*)-**15b** con grupos protectores ABA y Bz, colocan al amino apuntando hacia afuera de la cavidad. Los sustratos (*R*)-**15a** poseen un grupo protector ABA el cual presenta un donador de enlace de hidrógeno que interactúa en la región del acilo con residuos de Ser153 y Val154; mientras que el grupo Bz de los sustratos (*R*)-**15b** presenta interacciones alquil-aromáticas entre anillo y los residuos de Ala141 y Val154 (**Figura 35A**). Por el contrario, los sustratos (*R*)-**15c**, (*R*)-**15d** y (*R*)-**15e** con grupos protectores Boc, Fmoc y Cbz respectivamente, orientan al amino apuntando hacia adentro de la cavidad ya que presentan interacción del grupo amino con el residuo de Asp134 (**Figura 35B**). Cabe mencionar que en los resultados experimentales los sustratos que orientan al amino hacia afuera de la cavidad [(*R*)-**15a** y (*R*)-**15b**] mostraron los tiempos más prolongados de reacción (7 y 9 h respectivamente) comparados con los sustratos que orientan al metilo hacia adentro de la cavidad ((*R*)-**15c**, (*R*)-**15d** y (*R*)-**15e**) (0.75 h). Las conformaciones calculadas para los β^3 -amino ésteres *N*-bencilados con β estereocentros (Serie 1B) comparten el modo de unión de los β^3 -amino ésteres metílicos *N*-protegidos **15c-e**, ya que muestran una interacción por enlace de hidrógeno entre el amino y la cadena lateral del residuo de Asp134 (**Figura 36**). Cabe resaltar que el efecto de exclusión estérica para el enantiómero de lenta reacción generado por los residuos de Val190 e Ile189 se observó para ambos modos de unión.

Serie 1^a

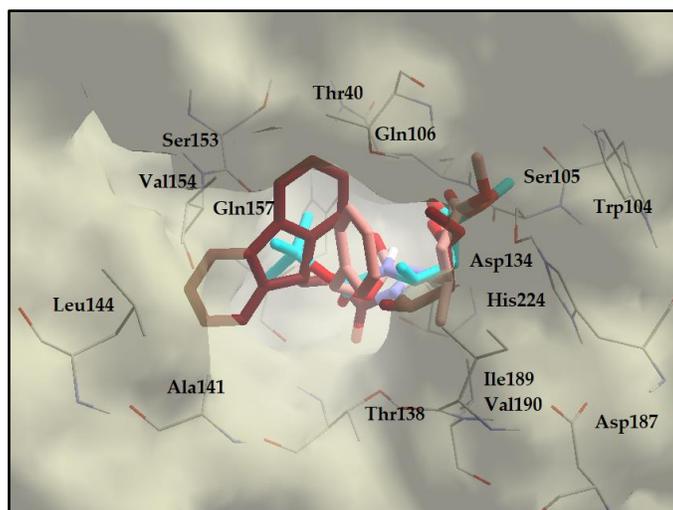
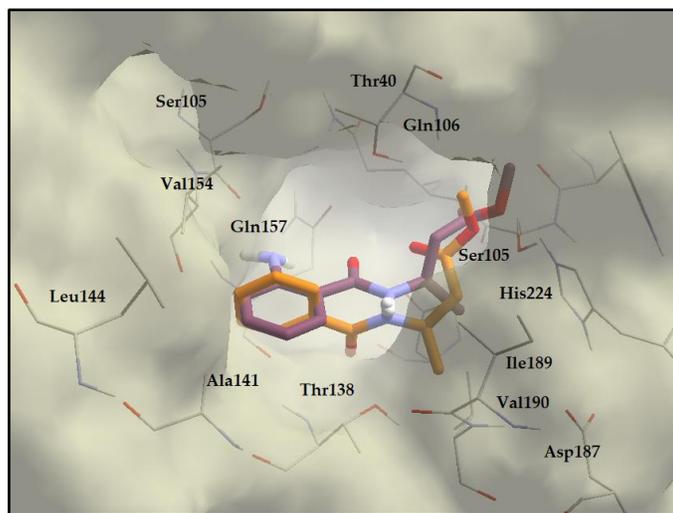
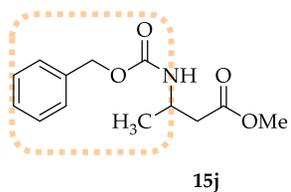
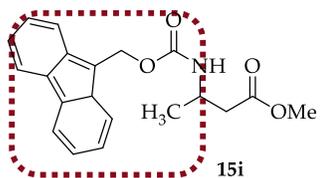
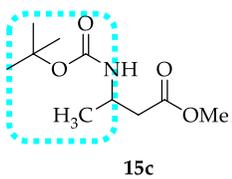
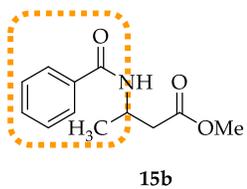
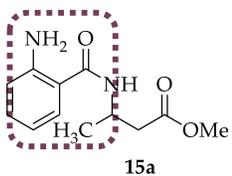


Figura 35. Modo de unión para los β^3 -amino ésteres metílicos *N*-protegidos (Serie 1A).

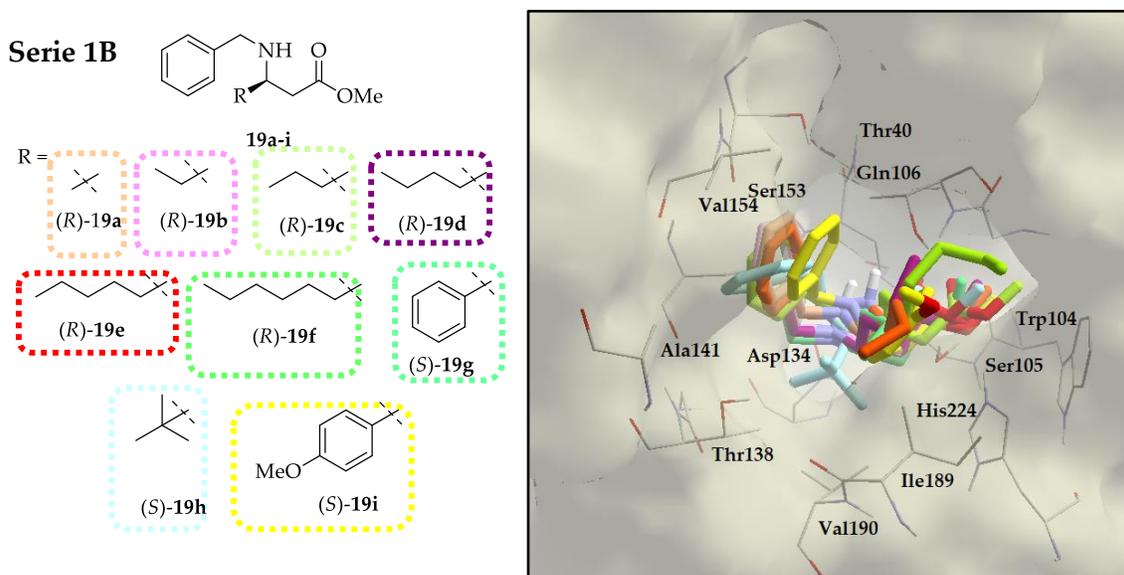


Figura 36. Modo de unión para los β^3 -amino ésteres metílicos *N*-bencilados (Serie 1B).

A diferencia de los β^3 -amino ésteres (Series 1A y 1B) el γ^3 -amino éster (R)-10b, mostró dos modos de unión (**Serie 1C, Figura 37**). El primer modo de unión concuerda con lo observado para los β^3 -amino ésteres ubicando al amino hacia adentro de la cavidad, debida a la intención por enlace de hidrógeno entre el amino y el residuo de Asp134 (2.71 Å) (**Figura 37-A**). Esta interacción obliga a la molécula a plegarse, orientando al carbono dos hacia fuera de la cavidad mientras que los carbonos tres y cuatro se orientan hacia adentro, lo que genera choques estéricos entre el sustituyente en la posición tres y la cadena lateral del residuo de Ile189 como se observa en la representación en dos dimensiones (**Figura 37-B**). El segundo modo de unión muestra conformación extendida predominante, con una distancia de 3.37 Å del nitrógeno del amino al oxígeno de la cadena lateral del residuo de Asp134 (**Figura 37-C**). Esta distancia supera la distancia para un enlace de hidrógeno, sin embargo, la conformación minimiza las repulsiones estéricas con el residuo de Ile189 (**Figura 37-D**).

Serie 1C

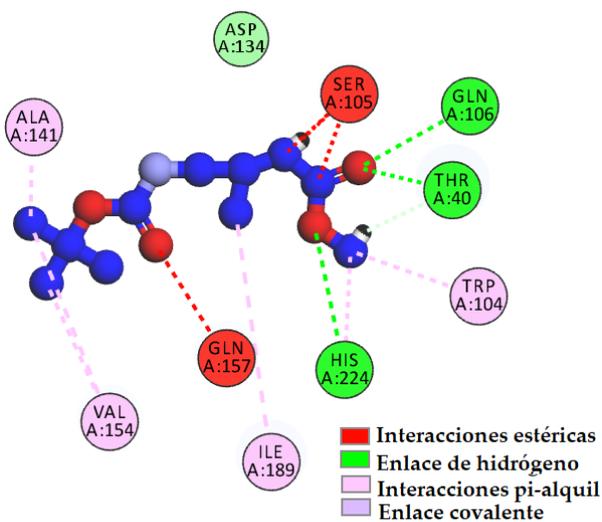
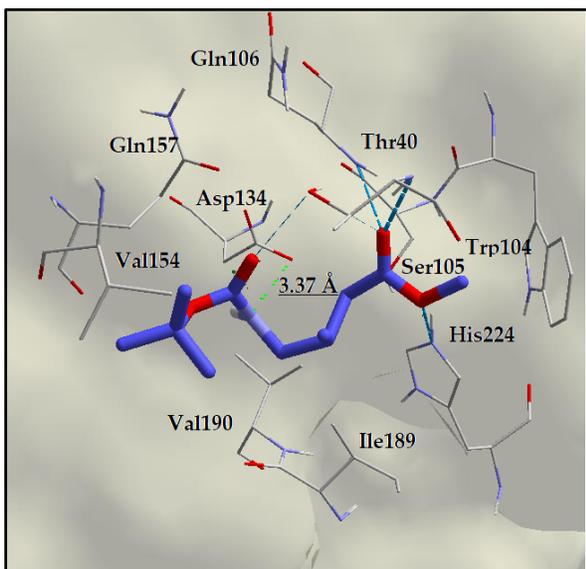
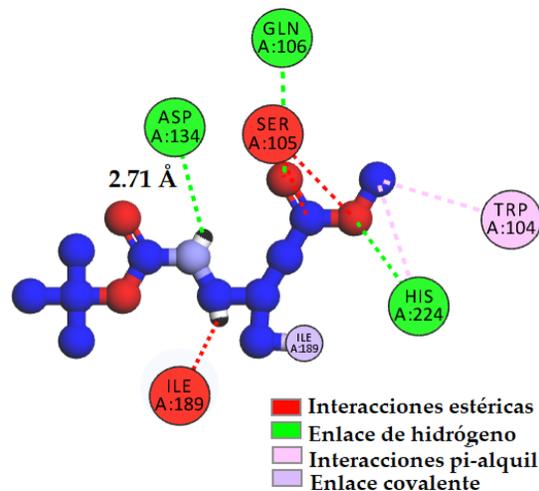
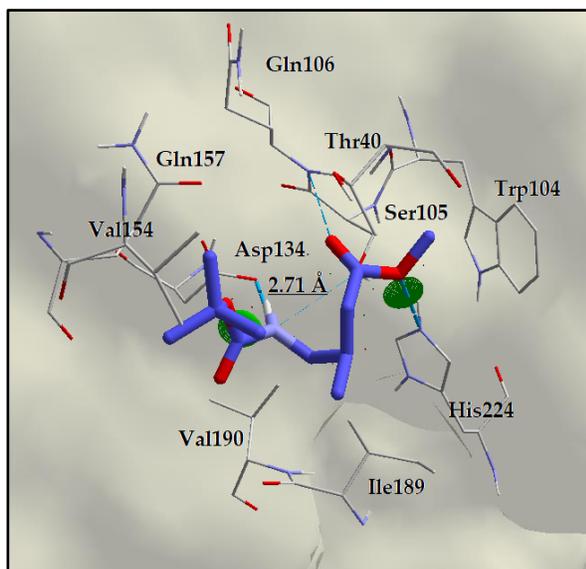
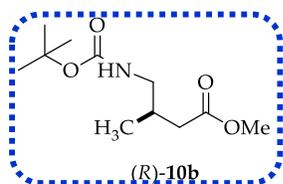


Figura 37. Conformación plegada (A) y representación 2D (B) para el enantiómero de reacción rápida (R)-10b. Conformación extendida (C) y representación 2D (D) para el enantiómero de reacción rápida (R)-10b.

Contrario a sus análogos β^3 -amino ésteres el γ^3 -amino éster de reacción lenta (*S*)-**10b** puede generar conformaciones más extendidas que minimizarían el efecto estérico con los residuos de Val190 e Iso189 como se muestra en la **Figura 38**, por tanto, estas conformaciones pueden ser catalíticamente productivas y generar la pérdida de selectividad observada experimentalmente. Este resultado muestra la complementriedad de la posición del sustituyente y de la posición del grupo amino en la resolución.

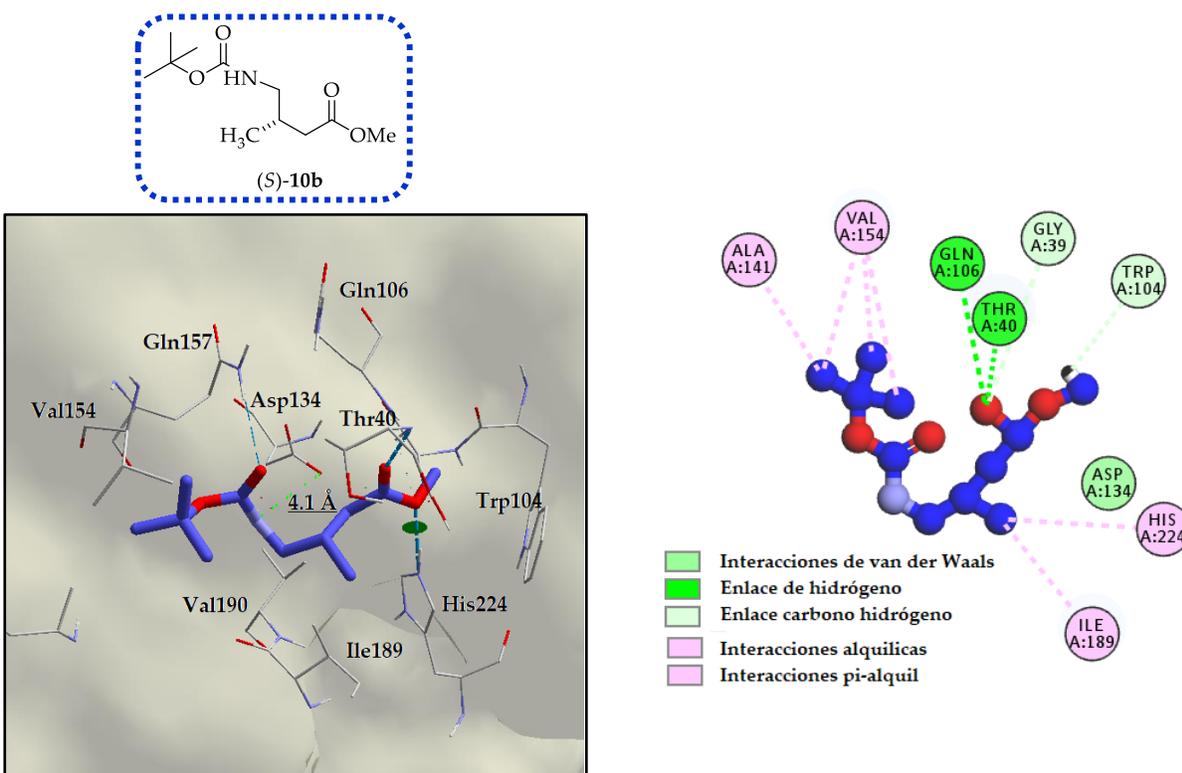


Figura 38. Conformación calculada y representación 2D para el enantiómero de reacción lenta. β^3 : γ^3 : (*S*)-**10b**.

Los $\beta^{2,3}$ -amino ésteres de rápida reacción con α y β estéreocentros (Serie 2) mostraron la interacción con el residuo de Asp134 (**Figura 39**), y el efecto de exclusión estérica generado por los residuos de Ile189 y Val190 para el enantiómero de reacción lenta.

Serie 2

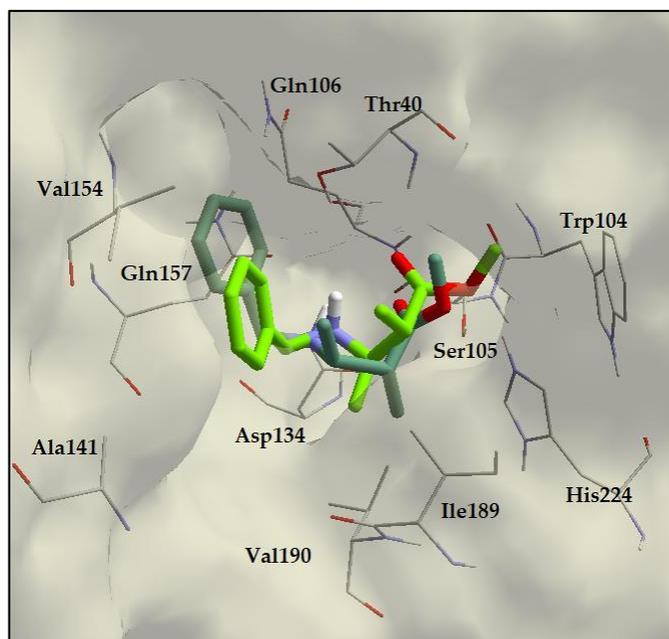
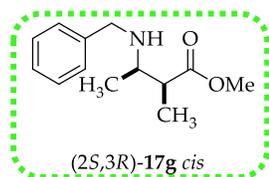
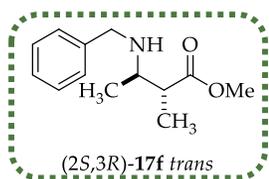
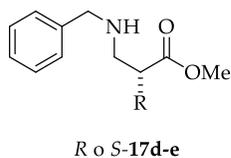


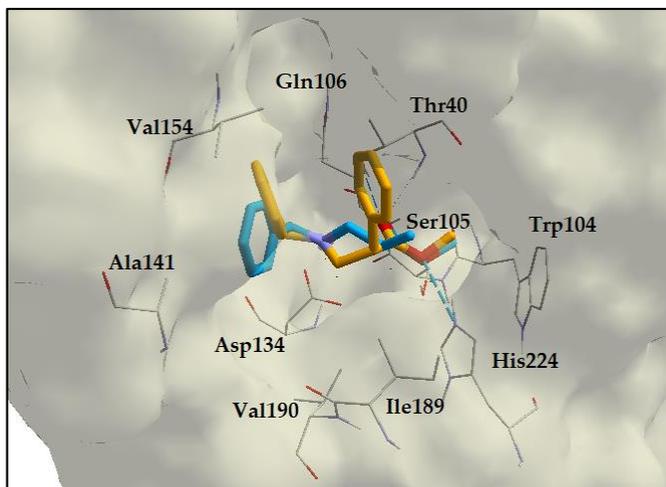
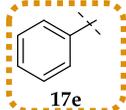
Figura 39. Modo de unión para los $\beta^{2,3}$ -amino ésteres metílicos *N*-bencilados (Serie 2).

Para los β^2 - y γ^2 -amino ésteres con α estéreocentros (Serie 3) se encontraron las mismas observaciones. Es decir, los β^2 -amino ésteres *N*-bencilados (*S*)-**17d** y (*S*)-**17e** (Serie 3A), mostraron la interacción del amino con el residuo de Asp134 (**Figura 40-A**), mientras que para el γ^2 -amino éster (*R*)-**10c** (Serie 3B) existe una mayor diversidad de conformaciones las cuales puede o no tener la interacción con Asp134 (**Figura 40-B**). Independiente mente del modo de unión el estereocentro en α no muestra efecto de exclusión ésterica.

Serie 3A



R =



Serie 3B

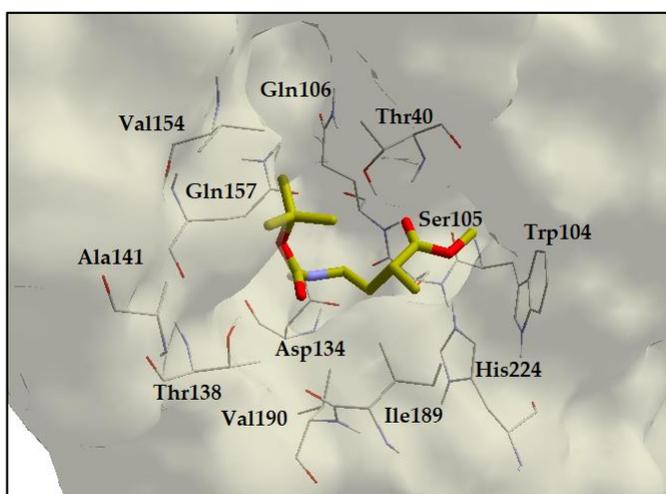
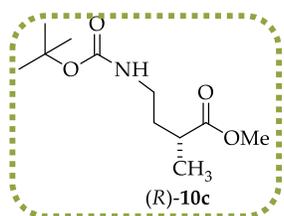


Figura 40. Modo de unión par: los β^2 -amino ésteres metílicos (Serie 3A) (A), y γ^2 -amino ésteres metílicos (Serie 3B) (B).

El γ^4 -amino éster (*S*)-10a, muestra la preferencia por conformaciones plegadas. A diferencia de su análogo γ^3 las conformaciones plegadas del γ^4 -amino éster (*S*)-10a no muestran interacciones estéricas del sustituyente con los residuos de Val190 o Ile189.

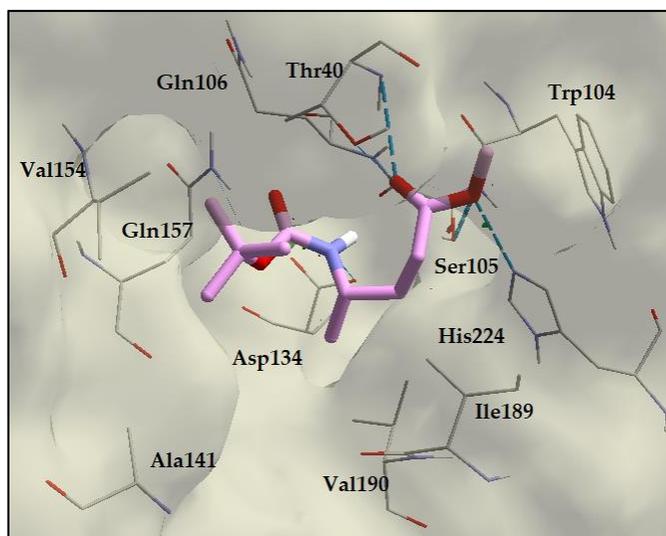
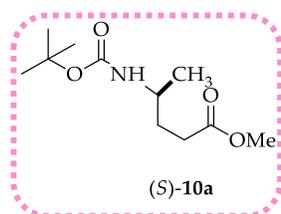
γ^4 -amino éster

Figura 41. Conformación plegada para el enantiómero de rápida reacción (S)-10a.

En base a los resultado experimentales y de acoplamiento molecular de este trabajo, se identificaron dos nuevas regiones en la cavidad catalítica de CaL-B: la región de unión del amino y la región de exclusión estérica; las cuales parecen ser las responsables de la alta selectividad en la resolución de derivados de ácidos carboxílicos con β estereocentros (**Figura 42**).

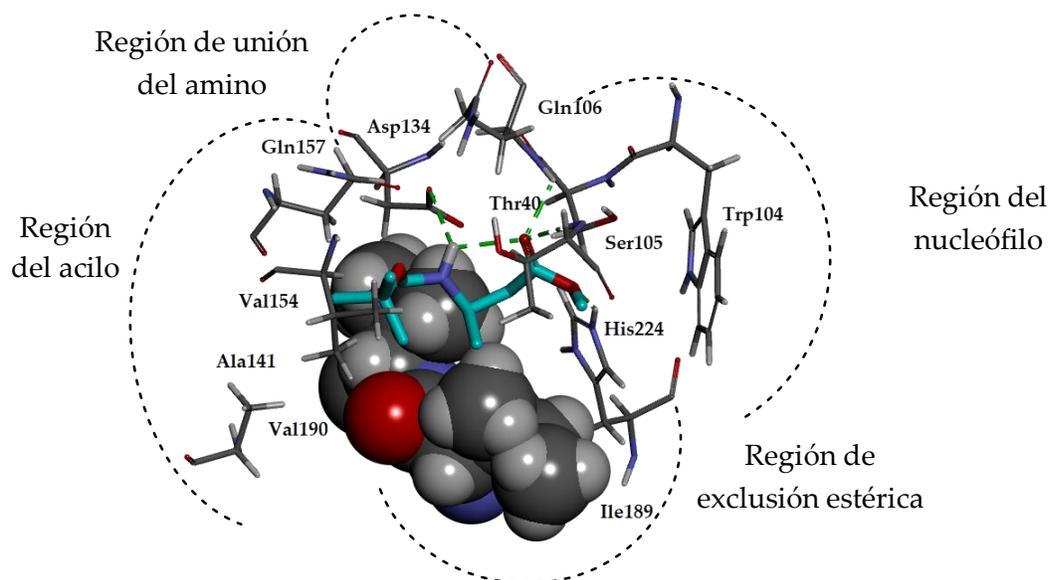


Figura 42. Nuevas regiones propuestas en la cavidad catalítica de CaL-B, ligando (R)-15c representado en bastones, residuos de Ile189 y Val190 en representación de relleno espacial.

4.6. CONCLUSIONES

La hidrólisis enzimática catalizada por CaL-B de γ^4 -, γ^3 - y γ^2 -amino ésteres *N*-*tert*-butoxicarbonilo protegidos permite obtener γ^4 -, γ^3 - y γ^2 -amino ácidos enantioenriquecidos con rendimientos moderados.

A diferencia de los resultados previamente reportados para la resolución enzimática catalizada por CaL-B de β^3 -amino ésteres metílicos *N*-protegidos **15a-j** y *N*-bencilados y **19a-i** ($E > 200$), la resolución del γ^3 -amino ésteres metílico **10b** mostró pérdida de enantioselectividad ($E = 8$), aun con el requerimiento espacial del sustituyente en la posición tres. Aunque se observa la misma preferencia por el enantiómero con el sustituyente en la posición tres apuntando hacia el lector (*R*)-**10b**.

La resolución por hidrólisis enzimática catalizada por CaL-B del γ^4 -amino éster metílico **10a** mostró la misma preferencia por el enantiómero con el sustituyente metilo apuntando hacia el lector (*S*)-**10a** y la misma selectividad que su análogo γ^3 -amino éster metílico ($E= 8$).

La resolución por hidrólisis enzimática catalizada por CaL-B del γ^2 -amino éster metílico **10c** mostró una menor selectividad ($E = 2$) y una preferencia por el enantiómero con el sustituyente hacia atrás contrario a lo análogos γ^4 y γ^3 . Sin embargo la selectividad mejoró con respecto a los β^2 -amino éster *N*-bencilados **17d** y **17e** ($E < 1$) aunque con el requerimiento espacial contrario.

Se desarrollaron estudios de acoplamiento molecular entre la estructura de CaL-B código PDB: 1LBS y las parejas enantioméricas de β^3 -amino ésteres metílicos *N*-protegidos **15a-j**; β^3 , β^2 - y $\beta^{2,3}$ -amino ésteres metílicos *N*-Bencilados **17a-c**, **19a-i**, y **17d-g** y γ^4 -, γ^3 -, γ^2 -amino ésteres metílicos *N*-*tert*-Butoxicarbonil protegidos **10a-c**.

Los acoplamientos moleculares entre la estructura mostraron las mejores energías de interacción para los enantiómeros activos experimentalmente: (*R*)-**15a-e**, (*S*)-**15f-j**, (*R*)-**17a**, (*S*)-**17b-c**, (*S*)-**17d-e**, (*2R,3R*)-**17f**, (*2S,3R*)-**17g**, (*R*)-**19a-f**, (*S*)-**19g-i**, (*S*)-**10a**, (*R*)-**10b**, (*R*)-**10c**.

Se identificaron tres grupos de interacciones no covalentes ligando proteína: el grupo de interacciones con los residuos catalíticos compuestos por Ser105, His224, Thr40 y Gln106; el grupo de interacciones estéricas que incluye a los residuos de Val190 e Ile189 y el grupo de la región del acilo Asp134, Gln157 y Val154.

Las interacciones con los residuos catalíticos no son contundentes en la selectividad del proceso de resolución sin embargo, la interacción con estos residuos si tiene relación con la velocidad de la reacción y se ve influenciada por el grupo protector así como de la posición y tamaño del sustituyente. De tal manera que el cambio en el sustituyente de metilo a fenilo en los sustratos **15a-e** obliga a la molécula a acomodar el grupo protector en toda la región del acilo, generando choques estéricos con los residuos de Ser105 y Thr40. Por tanto, la capacidad de los ligandos para acomodarse en la cavidad catalítica es un factor determinante en la velocidad de la reacción la cual es mayor para los sustratos con sustituyente más voluminoso como fenilo. Esta misma observación se encontró en los beta amino ésteres *N*-bencilados y gamma amino ésteres *N*-*tert*-butoxicarbonil protegidos **17d-g** y **10a** con sustituyente en la posición α ; el sustituyente en la posición dos genera choques del éster con los residuos de Ser105 y Thr40 disminuyendo la velocidad de la reacción.

Las interacciones repulsivas entre los enantiómeros no activos, con los residuos de Ile189 y Val190 de la proteína, sugieren que estos dos residuos son los responsables del requerimiento espacial en los procesos resolutivos de β^3 -amino ésteres metílicos *N*-protegidos **15a-j**; β^3 -, β^2 - y $\beta^{2,3}$ -amino ésteres metílicos *N*-bencilados **17a-c**, **19a-i**, y **17d-g** y γ^4 -, γ^3 -, γ^2 -amino ésteres metílicos *N*-*tert*-Butoxicarbonil protegidos **10a-c**.

Las interacciones con los residuos de Val190 e Ile189 muestran que los ligando activos (*R*)-**15a-e**, (*S*)-**15f-j**, (*R*)-**17a**, (*S*)-**17b-c**, (*S*)-**17d-e**, (*2R,3R*)-**17f**, (*2S,3R*)-**17g**, (*R*)-**19a-f**, (*S*)-**19g-i**, (*S*)-**10a**, (*R*)-**10b**, (*R*)-**10c** tienden a orientar al sustituyente hacia afuera de la cavidad minimizando las interacciones estéricas con dichos residuos, por el contrario las moléculas no activas experimentalmente tienen choques estéricos con estos residuos por lo que son consideradas conformaciones no productivas.

En todos los casos las interacciones en la región del acilo con los residuos de Gln157 y Val154 no son contundentes sin embargo, representan una medida de la facilidad con la que el sustrato entra en la cavidad catalítica.

La interacción con el residuo de Asp134 es una interacción favorable, mostrando en la mayoría de las conformaciones un interacción por enlace de hidrógeno entre el oxígeno de la cadena lateral de Asp134 con el hidrógeno del grupo amino del amino éster. Esta interacción está bien conservada para β -amino ésteres sin embargo los γ -amino ésteres muestran una mayor diversidad conformacional por lo que la

interacción se ve disminuida lo que sugiere es la causa de la pérdida de la enantioselectividad.

Se identificaron dos nuevas regiones en la cavidad catalítica de CaL-B: la región de unión del amino y la región de exclusión estérica; los cuales parecen ser los responsables de la alta selectividad en la resolución de derivados de ácidos carboxílicos con β estereocentros.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Información general

Disolventes y reactivos

Lipasa B de *Candida antarctica* (CaL-B) fue obtenida como Novozym® 435 de Novozymes México. La bencilamina (**1**), acrilato de metilo (**6a**), crotonato de metilo (**6b**), metil metacrilato (**6c**), nitometano (**7a**), nitroetano (**7b**), 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), 1,1,3,3-Tetrametilguanidina (TMG) y (Trimetilsilil)-diazometano (TMS-CHN₂) fueron comprados a SIGMA-ALDRICH® y usados sin otra purificación. Los disolventes de grado analítico se adquirieron de TECROM GROUP.

5.2. Métodos analíticos

Cromatografía en columna y cromatografía en capa fina

La cromatografía en columna (CC) se realizó sobre gel de sílice MERCK® 60 (0.040-0.063 mm). La cromatografía en capa fina (TLC) se realizó empleando como fase estacionaria gel de sílice MERCK® 60 F₂₅₄; empleando luz ultravioleta y una solución de KMnO₄ para detección. Los disolventes para CC y TLC fueron previamente destilados.

Espectros de resonancia magnética nuclear

Los espectros RMN-¹H y ¹³C se obtuvieron en equipos Varian Gemini 200, Varian Mercury 400 o Bruker 500 MHz empleando como disolventes cloroformo deuterado (CDCl₃) y metanol deuterado (CD₃OD). Los desplazamientos químicos están reportados en partes por millón (ppm), a partir de la referencia interna de Tetrametilsilano (TMS) (δ = 0.0 ppm) o calibrados contra la porción residual de CDCl₃ (δ = 7.26 ppm) y CD₃OD (δ = 3.31 ppm). Las constantes de acoplamiento (*J*) están reportadas en Hz. Para la multiplicidad de la señales se utilizaron las siguientes abreviaturas: (br s) señal ancha, (d) señal doble o doblete, (t) señal triplete, (q) cuarteto, y (m) señal multiplete. Las señales complejas se indican utilizando dos o más de estas abreviaturas. En los casos en los que no se pudo determinar la multiplicidad de la señal se reporta el intervalo de desplazamiento químico en el que aparecen.

Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

La cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-MS) se realizaron en un equipo Agilent CG serie 6890 acoplado a un detector selectivo de masas Agilent 5973N.

Las proporciones de los compuestos **1**, **3**, **4** y **5**, se hicieron mediante CG-MS. Columna HP-5ms: 30 m de longitud, tamaño interno 0.25 mm, espesor de película 0.25 μm . Relación de división 5:1. Método: 40 °C-1 min, 5 °C/min-250 °C-1 min, 10 °C/min-285 °C- 10 min. Tiempos de retención (min): **1** = 10.34, **4** = 25.4, **3** = 28.03 y **5** = 42.8.

Los excesos enantioméricos para los compuestos *rac*-**10a-c**, **11a-c** y **13a-c** se determinaron mediante CG-MS Quiral. Los γ -aminoácidos *N*-Boc protegidos (**6a-c**) se convirtieron en sus ésteres metílicos (**13a-c**) correspondientes antes del análisis por CG-Quiral. Columna CYCLOSIL-B: 30 m de longitud, tamaño interno 0.25 mm, espesor de la película 0.25 μm , Sin división. Método: 120 °C -0 min, 2 °C/min-180 °C- 1 min. Tiempos de retención: (*R*)-**10a**, (*R*)-**11a** y (*R*)-**13a** = 17.62 min; (*S*)-**10a** (*S*)-**11a** y (*S*)-**13a** = 17.77 min; (*R*)-**10b**, (*R*)-**11b** y (*R*)-**13b** = 20.35 min; (*S*)-**10b**, (*S*)-**11b** y (*S*)-**13b** = 20.50 min; (*R*)-**10c**, (*R*)-**11c** y (*R*)-**13c** = 21.51 min; (*S*)-**10c**, (*S*)-**11c** y (*S*)-**13c** = 21.66 min.

Cromatografía de líquidos

Los excesos enantioméricos para los compuestos **3** y **5** se determinaron mediante HPLC-Quiral. Compuesto **3**: Chiracel OD-H, hexano:*i*PrOH, 98:02; 0.8 mL min⁻¹; UV-VIS 210 nm. Timpos de retención: (*R*)-**3** = 11 min, (*S*)-**3** = 13 min. Compuesto **5**: CHIRALPAK® AS-H, hexano/*i*-PrOH 80:20, 1 mL min⁻¹, UV-VIS 210 nm. Tiempos de retención: (*S*)-**5**= 20.4 min, (*R*)-**5** = 29.4 min.

Cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas

Los análisis de masas fueron realizados por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (CL-MS), utilizando un espectrómetro Agilent modelo 6545 acoplado a un analizador de cuadrupolo tiempo de vuelo (Q-TOF), mediante ionización por electro spray (ESI).

Reacciones en microondas

Las reacciones de microondas se realizaron en recipientes sellados en un aparato de microondas monomodal marca CEM Discover ®.

Rotaciones específicas

Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer 341 utilizando celdas de 10 cm de longitud y 1 mL de volumen; la lámpara de Na/Hal (589 nm) a temperatura ambiente.

Punto de fusión

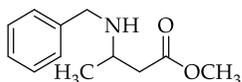
Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Melt-temp Electrothermal en capilar abierto y no están corregidas.

5.3. Síntesis y resolución *one pot* de (R)-(-)-N-Bencil-3-(bencilamino) butanamida catalizada por CaL-B. El efecto de la polaridad de solvente.

5.3.1. Síntesis química

(±)-3-(Bencilamino)butanoato de metilo, *rac*-3

El compuesto *rac*-3 se preparó de acuerdo al procedimiento reportado en la literatura.⁸² En vial de 10 mL para reacción de microondas provisto de una barra de agitación magnética se añadieron bencilamina (0.10 g, 1 mmol), crotonato de metilo (0.10 g, 1 mmol) y 3 mL de metanol. El recipiente de reacción se selló con una tapa y luego se colocó en la cavidad del microondas. La reacción se calentó a 150 °C y 40 psi durante 1 h en sistema cerrado. Al término del tiempo de reacción el recipiente se enfrió a 50 °C, usando un flujo de aire comprimido; el disolvente se evaporó al vacío y el crudo de reacción se purificó por CC AcOEt/DCM, 98:02 a 60:40. El producto fue obtenido como un aceite amarillo con un rendimiento de 62%. Los datos espectrales de RMN-¹H y ¹³C corresponden a los reportados en la literatura.⁸²



rac-3

Aspecto: Aceite

amarillo

Fórmula: C₁₂H₁₇NO₂

R_f = 0.48

(AcOEt:MeOH/95:05)

NMR-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ: 1.16 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CH₃CH); 1.75 (br s, 1H, NH); 2.38 (dd, ²*J* = 15.3 Hz, ³*J* = 6.1 Hz, 1H, CH₂ACO); 2.51 (dd, *J* = 15.3 Hz, *J* = 6.7 Hz, 1H, CH₂BCO); 3.06–3.26 (m, 1H, CH₃CH); 3.67 (s, 3H, OCH₃); 3.75 (d, *J* = 12.9, 1H, CH₂APh); 3.84 (d, *J* = 12.9, 1H, CH₂BPh); 7.19–7.41 (m, 5H, Ph).

NMR-¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ: 20.6 (CH₃CH), 41.6 (CH₂CO), 49.9 (CH), 51.4 (CH₂Ph), 51.7 (OCH₃), 127.1 (CH), 128.3 (CH), 128.6 (CH), 140.5 (C), 173.0 (CO).

5.3.2. Reacciones enzimáticas

Adición de bencilamina a crotonato de metilo catalizada por CaL-B en diferentes disolventes. Procedimiento general 1 (PG1).

Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo en viales de vidrio con taparosca provistos de una barra de agitación magnética. La reacción consistió en la preparación de una solución de bencilamina (**1**, 0.375 g, 3.5 mmol), crotonato de metilo (**2**, 0.525 g, 1.5 eq), CaL-B (10 mg/ mL) y 0.01 g de malla molecular en 7 mL de disolvente (*n*-hexano, 100 %; 2M2B, 100 %; *n*-hexano/2M2B, 50:50; *n*-hexano/2M2B, 90:10). La mezcla de reacción se agitó en un baño de agua termostatzado a 65 °C durante 72 h. Después de completado el tiempo de reacción la enzima se separó por filtración se lavó con DCM y luego con metanol. El disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo de la reacción se purificó por CC usando AcOEt/DCM (98:02 a 60:40) y luego AcOEt/MeOH (90:10 a 50:50). Los productos fueron caracterizados por RMN-¹H y ¹³C, y comparados con los datos reportados en la literatura. Las proporciones de los productos **3**, **4** y **5** en la mezcla de reacción se determinaron por CG-MS, el rendimiento fue determinado como producto aislado en base al consumo de bencilamina (Tabla 7).

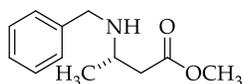
Tabla 7. Proporciones de los productos **3**, **4** y **5**.

Disolvente	Conversión	Proporción (%) 3 / 4 / 5	<i>aza</i> -Michael 3		Doble adición 5	
			[α] _D (c 1.0, CHCl ₃)	<i>ee</i> (%)	[α] _D (c 1.0, CHCl ₃)	<i>ee</i> (%)
<i>n</i> -hexano, 100%	64	81/7/12	+0.3	1.1	-1.4	3.4
2M2B, 100%	59	29/48/23	+15.6	96	-19.2	67
<i>n</i> -hexano/2M2B, 50:50	67	29/48/23	+11.6	79.8	-20.8	67.8
<i>n</i> -hexano/2M2B, 90:10	84	28/25/47	+7.7	75	-21	72

3-(Bencilamino)butanoato de metilo, **3**

Aspecto: Aceite amarillo
Fórmula: C₁₂H₁₇NO₂
R_f = 0.48

RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.16 (d, ³J = 6.4 Hz, 3H, CH₃CH); 1.85 (br s, 1H, NH); 2.39 (dd, ²J = 15.3 Hz, ³J = 5.9 Hz, 1H,

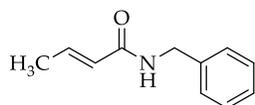


(AcOEt:MeOH, 95:05)
 $[\alpha]_D = +15.6$ (c 1.0, CHCl_3)
 $ee = 96\%$

CH_2ACO); 2.50 (dd, $^2J = 15.3$ Hz, $^3J = 6.9$ Hz, 1H, CH_2BCO); 3.04-3.25 (m, 1H, CH_3CH); 3.67 (s, 3H, OCH_3); 3.76 (d, $J = 12.9$, 1H, CH_2APh); 3.83 (d, $J = 12.9$, 1H, CH_2BPh); 7.12-7.54 (m, 5H, **Ph**).

RMN- ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 20.6 (CH_3CH), 41.6 (CH_2CO), 49.9 (CH_3CH), 51.4 (CH_2Ph), 51.7 (OCH_3); 127.1, 128.3, 128.6 (**Ph**); 140.5 (**C**), 173.0 (**CO**). Los espectros coinciden con los reportados para *rac*-3.

N-Bencilcrotonamida, **4**

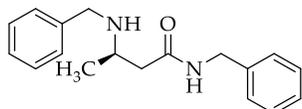


Aspecto: Sólido blanco
 Fórmula: $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}$
 p. f. = 114-116 °C
 lit p. f. = 113-115 °C
 $R_f = 0.77$ (AcOEt:MeOH, 95:05)

RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ : 1.84 (dd, $^3J = 6.9$ Hz, $^4J = 1.7$ Hz, 3H, CH_3); 4.47 (d, $^3J = 5.8$ Hz, 2H, CH_2Ph); 5.82 (dq, $^3J = 15.2$, $^4J = 1.7$, 1H, CHCO); 5.96 (br s, 1H, **NH**); 6.86 (dq, $^3J = 15.1$, $^3J = 6.9$, 1H, CH_3CH); 7.12-7.41 (m, 5H, **Ph**).

NMR- ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 17.9 (CH_3CH), 43.7 (CH_2Ph); 125.0 (CHCO); 127.6, 128.0, 128.8 (**Ph**); 138.5 (**C**); 140.4 (CH_3CH); 166.1 (**CO**). Los datos espectrales de RMN- ^1H - y ^{13}C corresponden a los reportados en la literatura.⁸⁸

N-Bencil-3-(bencilamino)-butanamida, **5**



Resina Amarilla
 Fórmula: $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$
 $R_f = 0.16$
 (AcOEt:MeOH, 95:05)
 $[\alpha]_D = -19.2$ (c 1.0, CHCl_3)
 $ee = 67\%$

RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ : 1.20 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, CH_3CH); 1.82 (br s, 1H, **NH**); 2.27 (dd, $J = 15.9$ Hz, $J = 7.5$ Hz, 1H, CH_2ACO); 2.47 (dd, $J = 15.9$ Hz, $J = 3.7$ Hz, 1H, CH_2BCO); 3.10 (m, 1H, CH_3CH); 3.69 (d, $J = 12.6$, 1H, PhCH_2A); 3.80 (d, $J = 12.6$, 1H, PhCH_2B); 4.43 (d, $J = 5.5$, 2H, CONHCH_2); 7.08-7.37 (m, 10H, **2Ph**); 8.43 (br s, 1H, **CONH**).

RMN- ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) δ : 20.3 (CH_3CH); 41.8 (CH_2CO); 43.5 (CONHCH_2); 50.4 (CH_3CH); 51.0 (PhCH_2NH); 127.35, 127.41, 127.9, 128.3, 128.6, 128.7 (**2Ph**); 138.7 (**C**); 139.33 (**C**); 171.8 (**CO**). Los datos espectrales de RMN- ^1H corresponden a los reportados en la literatura.⁸⁹

⁸⁸ Puertas, S.; Brieva, R.; Rebolledo, F.; Gotor, V. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 4007-4014.

⁸⁹ Strompen, S.; Weiß, M.; Ingram, T.; Smirnova, I.; Gröger, H.; Hilterhaus, L.; Liese, A. *Biotech. Bioeng.*

5.4. El efecto del sustituyente y la posición del grupo amino en la resolución γ -amino ésteres *N*-*tert*-butoxicarbonil protegidos catalizada por CaL-B.

5.4.1 Síntesis química

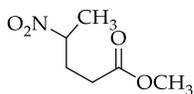
Síntesis de nitro ésteres metílicos mediante irradiación con microondas. Procedimiento General 2 (GP2).

En una ampollita de vidrio con tapa de rosca para microondas, provista con una barra de agitación magnética, se sumergió en baño de hielo. Se adicionó el éster α,β -insaturado (**6a–c**) y el correspondiente nitroalcano (**7a** ó **7b**); la mezcla se colocó en agitación por 15 min, posteriormente se adicionó la base, gota a gota; el recipiente se cerró y se colocó en la cavidad del microondas en sistema abierto, de acuerdo con las condiciones de temperatura y potencia deseadas. En caso necesario se aplicó una corriente de aire comprimido para regular la potencia. Después de completado el tiempo de reacción el recipiente se enfrió a 50 °C con un flujo de aire comprimido. La reacción se monitoreó mediante TLC (hexano/AcOEt, 70:30). El crudo de reacción se purificó por CC sin ningún tratamiento previo. Los productos fueron caracterizados por RMN-¹H y ¹³C, y comparados con los datos reportados en la literatura.⁹⁰ El rendimiento fue determinado como producto aislado en base al consumo del sustrato α,β -insaturado.

(±)-4-Nitropentanoato de metilo (±)-**8a** y 4-Metil-4-nitroheptadionato de dimetilo **9a**

Preparado a partir de acrilato de metilo (**6a**, 1.722 g, 20 mmol), nitroetano (**7b**, 1.877 g, 25 mmol) y TMG (1.267 g, 0.55 eq) como base. El equipo de microondas se programó a 60 °C y una potencia de 50 watts durante 5 min, de acuerdo al PG2. El crudo de reacción se purificó por CC (hexano/AcOEt, 90:10). Los productos (±)-**8a** y **9a** se aislaron con un rendimiento del 65% en una proporción de 58:48 respectivamente.

(±)-4-Nitropentanoato de metilo, (±)-**8a**



Aspecto: Aceite
inoloro
Rendimiento: 37.7%
Fórmula: C₆H₁₁NO₄

RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : 1.57 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃CH); 2.05-2.14 (m, 1H, CHCH_{2A}); 2.23-2.35 (m, 1H, CHCH_{2B}); 2.38-2.47 (m, 2H, CH₂CO); 3.70 (s, 3H, OCH₃); 4.62-4.67 (m, 1H, NO₂CH).

2012, 109, 1479–1489.

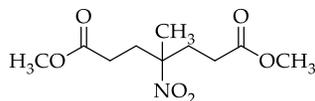
⁹⁰ Escalante, J.; Diaz-Coutiño F. D. *Molecules* **2009**, *14*, 1595-1604.

$R_f = 0.58$

(hex:AcOEt/70:30)

RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ : 19.5 (CH₃CH); 30.0 (CHCH₂); 30.1 (CH₂CO); 52.1 (OCH₃); 82.6 (NO₂CH); 172.6 (CO).

4-Metil-4-nitroheptadionato de dimetilo, 9a



Aspecto: Aceite incoloro

Rendimiento: 27.3 %

Fórmula: C₁₀H₁₇NO₆

$R_f = 0.45$

(hex:AcOEt/70:30)

RMN-¹H (400 MHz,

CDCl₃) δ : 1.55 (s, 3H,

CH₃C); 2.12-2.23 (m, 2H,

CH₂AC); 2.27-2.43 (m, 6H,

CH₂BC+CH₂); 3.69 (s, 6H,

OCH₃).

RMN-¹³C (100 MHz,

CDCl₃) δ : 21.9 (CH₃C);

28.9 (CH₂CO); 34.3

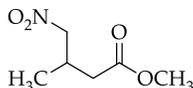
(CCH₂); 52.2 (OCH₃); 89.8

(CNO₂); 172.6 (CO).

3-Metil-4nitrobutanoato de metilo (±)-8b y 3,5-Dimetil-4-nitroheptadionato de metilo 9b

Preparado a partir de crotonato de metilo (**6b**, 3.504 g, 35 mmol), nitrometano (**7a**, 5.341 g, 87.5 mmol) y DBU (0.266 g, 0.05 eq). El equipo de microondas se programó a 60 °C y una potencia de 50 watts durante 15 min, de acuerdo al PG2. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 98:02 a 90:10). Los productos (**±**)-**8b** y **9b** fueron aislados como aceites incoloros, con un rendimiento del 58% en una proporción de 98:2 respectivamente.

3-Metil-4nitrobutanoato de metilo, (±)-8b



Aspecto: Aceite incoloro

Rendimiento: 56.8 %

Fórmula: C₆H₁₁NO₄

$R_f = 0.58$

(hex:AcOEt/70:30)

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ : 1.10

(d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃CH); 2.35 (dd,

² $J = 16.3$ Hz, ³ $J = 6.6$ Hz, 1H, CH₂ACO);

2.47 (dd, ² $J = 16.3$ Hz, ³ $J = 7.1$ Hz, 1H,

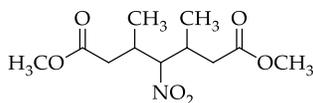
CH₂BCO); 2.67-2.90 (m, 1H, CH); 3.69

(s, 3H, OCH₃); 4.34 (dd, ² $J = 12.1$ Hz,

³ $J = 7$ Hz, 1H, NO₂CH₂A); 4.48 (dd, ² $J = 12.1$ Hz, ³ $J = 6.3$ Hz, 1H, NO₂CH₂B).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ: 17.3 (CH₃CH); 29.5 (CH₃CH); 37.7 (CH₂CO); 51.8 (OCH₃); 80.3 (NO₂CH₂); 171.8 (CO).

3,5-Dimetil-4-nitroheptadionato de metilo, 9b



Aspecto: Aceite

inoloro

Rendimiento: 1.2 %

Fórmula:

C₁₁H₁₉NO₆

R_f = 0.57

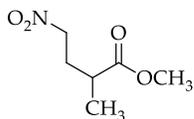
(hex:AcOEt/70:30)

El compuesto 3b se obtuvo como una mezcla inseparable de diastereómeros (Espectros 13 y 14).

(±)-2-Metil-4-nitrobutanoato de metilo (±)-8c y 2,4-Dimetil-4-nitroheptadionato de metilo 9c

Preparado a partir de metacrilato de metilo (6c, 2.002 g, 20 mmol), nitrometano (7a, 1.526 g, 25 mmol) y TMG (1.152 g, 0.5 eq). La unidad de microondas se programó a 60 °C y una potencia de 50 watts durante 20 min, de acuerdo al PG2. El crudo de reacción se purificó por CC (hexano/AcOEt, 98:02). Los productos (±)-2c y 3c se aislaron en forma de aceites incoloros, con un rendimiento del 66% en una proporción de 65:35 respectivamente.

(±)-2-Metil-4-nitrobutanoato de metilo, (±)-8c



Aspecto: Aceite

inoloro

Rendimiento: 42.9 %

Fórmula: C₆H₁₁NO₄

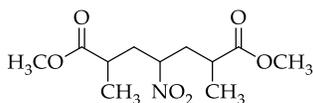
R_f = 0.58

(hex:AcOEt/70:30)

RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.19 (d, J = 7.1 Hz, 3H, CH₃CH); 2.06-2.14 (m, 1H, CH_{2A}CH); 2.23-2.32 (m, 1H, CH_{2B}CH); 2.50-2.58 (m, 1H, CH₃CH); 3.65 (s, 3H, OCH₃); 4.35-4.46 (m, 2H, NO₂CH₂).

RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ: 17.1 (CH₃CH); 30.7 (CH₂CH); 36.6 (CH₃CH); 52.0 (OCH₃); 73.5 (NO₂CH₂); 175.3 (CO).

2,4-Dimetil-4-nitroheptadionato de metilo, 9c



Aspecto: Aceite
incolore
Rendimiento: 23.1
%
Fórmula:
 $C_{11}H_{19}NO_6$
 $R_f = 0.58$
(hex:AcOEt/70:30)

RMN- 1H (200 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.19 (d, $J = 7.1$ Hz, 6H, CH_3CH); 1.91-2.19 (m, 4H, $CHCH_2CH$); 2.35- 2.53 (m, 2H, $CHCO$); 3.69 (s, 6H, OCH_3); 4.56-4.69 (m, 1H, NO_2CH).

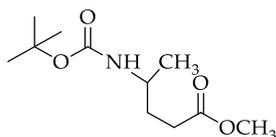
RMN- ^{13}C (50 MHz, $CDCl_3$) δ : 18.0 (CH_3); 36.4 ($CHCH_2CH$); 37.7 ($CHCO$); 52.2 (OCH_3); 85.6 ($CHNO_2$); 175.6 (CO).

Síntesis de los γ -amino ésteres metílicos *N-tert*-butoxicarbonil protegidos. Procedimiento general 3 (GP3).

Las reacciones de hidrogenación se llevaron a cabo en un aparato de hidrogenación Shaker. En el matraz de hidrogenación se colocó el nitro éster correspondiente (**8a-c**), el cual se disolvió en MeOH (10 mL/2 mmol), posteriormente se adicionaron $(Boc)_2O$ (1.1 eq) y Ni-Raney (10% en masa). El matraz de reacción se colocó en el aparato de hidrogenación y se purgo con hidrógeno molecular a 60 psi, la reacción se monitoreó por TLC hasta la desaparición de la materia prima (alrededor de las seis horas). El catalizador se separó por filtración y el disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo de reacción se purificó por CC.

4-(tert-Butoxicarbonil)amino-pentanoato de metilo, (\pm)-10a

Preparado a partir de nitro éster (\pm)-**8a** (0.50 g, 3.1 mmol), Boc_2O (0.74 g, 1.1 eq), Ni-Raney (0.05 g, 10% en masa) y 15.5 mL de MeOH de acuerdo al PG3. El crudo de reacción se purificó por CC (hexano/AcOEt, 95:05). El producto se aisló como un sólido blanco de bajo punto de fusión.



Aspecto: Sólido
blanco
Rendimiento: 75 %
p. f. = 24-25 °C
Fórmula :
 $C_{11}H_{21}NO_4$

LC-HRMS (ESI-QTOF)
Calculado para: $[C_{11}H_{21}NO_4]^+$
Esperado: 231.1471
Encontrado: 231.1468

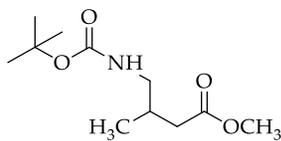
$R_f = 0.44$
(hex:AcOEt/70:30)

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ : 1.14 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH₃CH); 1.44 (s, 9H, [(CH₃)₃C]); 1.64-1.89 (m, 2H, CHCH₂); 2.38 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, CH₂CO); 3.68 (s, 4H, CH₃CH+OCH₃), 4.47 (br s, 1H, NH).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ : 21.5 (CH₃CH); 28.5 [(CH₃)₃C]; 31.0 (CH₂CO); 32.3 (CHCH₂); 46.4 (CH₃CH); 51.7 (OCH₃); 79.3 [(CH₃)₃C]; 155.5 (CONH); 174.1 (COOCH₃). Los datos espectrales de RMN-¹H- y ¹³C corresponden a los reportados en la literatura.⁹¹

4-(tert-Butoxicarbonil)amino-3-metilbutanoato de metilo, (\pm)-**10b**

Preparado a partir de nitro éster (\pm)-**8b** (0.50 g, 3.1 mmol), Boc₂O (0.74 g, 1.1 eq), Ni-Raney (0.05 g, 10% en masa) y 15.5 mL de MeOH, de acuerdo PG3. El crudo de reacción se purificó por CC (hexano/AcOEt, 90:10). El producto se aisló como un aceite incoloro.



Aspecto: Aceite incoloro

Rendimiento: 65 %

Fórmula : C₁₁H₂₁NO₄

$R_f = 0.47$

(hex:AcOEt,70:30)

LC-HRMS (ESI-QTOF)

Calculado para:[C₁₁H₂₁NO₄]⁺

Esperado: 231.1471

Encontrado: 231.147

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ : 0.96 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, CH₃CH); 1.44 (s, 9H, [(CH₃)₃C]); 2.05–2.23 (m, 2H, CH_{2A}CO+CH); 2.30–2.44 (m, 1H, CH_{2B}CO); 3.05 (pseudo t, $J = 5.8$ Hz, 2H, CHCH₂); 3.68 (s, 3H, OCH₃); 4.74 (br s, 1H, NH).

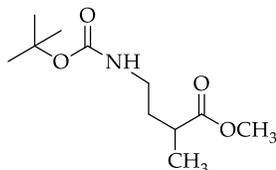
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ : 17.9 (CH₃CH); 28.6[(CH₃)₃C]; 31.4 (CH₃CH); 39.0 (CH₂CO); 46.2 (CH₂NH); 51.7 (OCH₃); 79.4 [(CH₃)₃C]; 156.2 (CONH); 173.5 (COCH₃). Los datos espectrales de RMN-¹H corresponden a los reportados en la literatura.⁹²

⁹¹ Yamamoto, S; Nakatani, S.; Ikura, M.; Sugiura, T.; Nishita, Y.; Itadani, S.; Ogawa, K.; Ohno H.; Takahashi, K.; Nakai, H.; Toda, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6383-6403.

⁹² Chang-Seok, L.; Jong Sung, K.; Ki Dong, K.; Geun Tae, K.; Kyoung-Hee K.; Sang Yong, H.; Sungsub, K.; Min-Jung, K.; Hyeon Joo, Y.; Dongchul, L.; Hye Jin, K.; Hee Oon, H.; Seong Cheol, B.; Oh Hwan, K.; Ho Sung, K.; Gwong-Cheung, H.; Ji Young, K.; Zi-Ho, Y.; Dong-Jun, Y. *PCT Int. Appl.* **2006**, 197 CODEN:PIXXD2; WO2006104356.

4-(*tert*-Butoxicarbonil)amino-2-metilbutanoato de metilo, (±)-**10c**

Preparado a partir de nitro éster (±)-**8c** (0.50 g, 3.1 mmol), Boc₂O (0.74 g, 1.1 eq), Ni-Raney (0.05 g, 10% en masa) y 15.5 mL de MeOH, de acuerdo al PG3. El crudo de reacción se purificó por CC (hexano/AcOEt, 90:10). El producto se aisló como un aceite incoloro.



Aspecto: Aceite
inoloro

Rendimiento: 60 %

Fórmula : C₁₁H₂₁NO₄

R_f = 0.47

(hex:AcOEt, 70:30)

LC-HRMS (ESI-QTOF)

Calculado para:[C₁₁H₂₁NO₄]⁺

Esperado: 231.1471

Encontrado: 231.1468

RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃) δ: δ 1.18 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃CH); 1.44 (s, 9H, [(CH₃)₃C]); 1.59–1.67 (m, 1H, CH_{2A}CH); 1.84 (m, 1H, CH_{2B}CH); 2.51 (m, 1H, CH₃CH); 3.15 (m, 2H, CH₂NH); 3.68 (s, 3H, OCH₃); 4.72 (br s, 1H, NH).

RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ: 17.2 (CH₃CH); 28.5 [(CH₃)₃C]; 33.9 (CH₂CH); 37.2 (CH); 38.7 (CH₂NH); 51.8 (OCH₃); 79.3 [(CH₃)₃C]; 156.0 (CONH); 176.8 (COOCH₃). Los datos espectrales de RMN-¹H- y ¹³C corresponden a los reportados en la literatura.⁹³

5.4.2. Reacciones enzimáticas

Procedimiento general (PG4). Hidrólisis enzimática de γ -amino ésteres *N*-(*tert*-butoxicarbonil) protegidos.

Las reacciones de hidrólisis enzimática se llevaron a cabo en viales de vidrio con tapa de rosca. Las reacciones consistieron en la preparación de la solución de los correspondientes γ -aminoésteres (±)-**10a-c** (0.20 g, 0.86 mmol), 20 mg mL⁻¹ de CaL-B (Novozym® 435), 2 equivalentes de agua (31 μ L) en 4.32 mL de 2M2B anhidro, como disolvente (0.2 M). Las mezclas de reacción se agitaron en un baño de agua termostaticado a 45 °C. La reacción fue monitoreada por TLC hasta observar un avance de alrededor del 50 %. La enzima se separó por filtración, se lavó con DCM y después MeOH. El disolvente se evaporó a presión reducida. Las proporciones del éster remanente (**7a-c**) y el producto hidrolizado (**12a-c**) se determinaron por RMN-¹H. Los productos se purificaron por CC (hexano/AcOEt, 90:10 a 60:40).

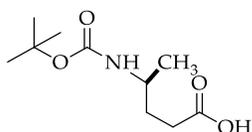
⁹³ Miyazawa, K.; Koike T.; Akita, M. *Adv. Synth. Catal.* **2014**, 356, 2749–2755.

(*R*)-(+)-4-(*tert*-Butoxicarbonil)amino-pentanoato de metilo [(*R*)-(+)-**11a**]. Remanete: 52%. Sólido blanco de bajo punto de fusión (p. f. = 24-25 ° C), $[\alpha]_D = +2$ (c 1.0, CHCl₃); 60.3 % *ee*. Los datos de RMN-¹H y ¹³C están de acuerdo con los reportados para **10a**.

(*S*)-(+)-4-(*tert*-Butoxicarbonil)amino-3-metilbutanoato de metilo [(*S*)-(+)-**11b**]. Remanete: 69%. Aceite incoloro. $[\alpha]_D = +0.16$ (c 1.0, CHCl₃); 30.9 % *ee*. Los datos de RMN-¹H y ¹³C están de acuerdo con los reportados para **10b**.

(*S*)-(+)-4-(*tert*-butoxicarbonil)amino-2-metilbutanoato de metilo [(*S*)-(+)-**11c**]. Remanete: 69%. Aceite incoloro. $[\alpha]_D = +3.1$ (c 1.0, CHCl₃); 16.2 % *ee*. Los datos de RMN-¹H y ¹³C están de acuerdo con los reportados para **10c**.

Ácido (*S*)-(+)-4-(*tert*-Butoxicarbonil)amino-pentanoico, (*S*)-(+)-**12a**



Aspecto: Sólido blanco

p. f. = 75-78 °C

lit.^[95] (*S*)-**6a**: 75-78 °C

Rendimiento: 48 %

Fórmula : C₁₀H₁₉NO₄

R_f = 0.10

(hexano:AcOEt, 70:30)

$[\alpha]_D = +3.5$ (c 1.0, CHCl₃)

ee = 64.1 %

{lit.^[94] (*S*)-**6a**; $[\alpha]_D = +2.4$ (c 4, EtOH)}

LC-HRMS (ESI-QTOF)

Calculado

para: [C₁₀H₁₉NO₄]⁺

Esperado: 217.1314

Encontrado: 217.1326

RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ : 1.13 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃CH); 1.42 (s, 9H, [(CH₃)₃C]); 1.58-1.88 (m, 2H, CHCH₂); 2.38 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, CH₂CO); 3.72 (m, 1H, CHCH₃), 4.47 (br s, NH), 9.46 (br s, 1H, OH).

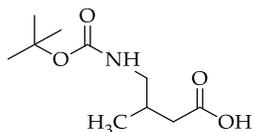
RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ : 21.5 (CH₃), 28.6 [(CH₃)₃C], 31.2 (CH₂O), 32.3 (CHCH₂), 46.4 (CH), 79.7 [(CH₃)₃C], 155.9 (COONH), 178.6 (COOCH).

Los datos espectrales de RMN-¹H- y ¹³C corresponden a los reportados en la literatura.^[95]

^[94] Hintermann, T.; Gademann, K.; Bernhard Jaun, B.; Seebach, D*Helv. Chim. Acta.* **1998**, *81*, 983-1002.

^[95] García, J.M.; Maestro, M.A.; Oiarbide, M.; Odriozola, J.M.; Razkin, J.; Palomo, C. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3826-3829

Ácido (R)-(+)-4-(tert-Butoxicarbonil)amino-3-metilbutanoico, (R)-(+)-**12b**



Aspecto: Resina incolora

Rendimiento: 31 %

Fórmula : C₁₀H₁₉NO₄

R_f = 0.10

(hexano:AcOEt, 70:30)

[α]_D²⁰ = +2.7 (c 1.0, CHCl₃)

ee = 69.9 %

lit.⁹⁶ (R)-**6b**: [α]_D²⁰ = +4.3 (c 1.05, CHCl₃)

LC-HRMS (ESI-QTOF)

Calculado

para:[C₁₀H₁₉NO₄]⁺

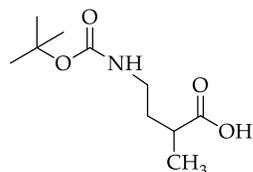
Esperado: 217.1314

Encontrado: 217.1324

RMN-¹H (200 MHz, CD₃OD) δ: 0.94 (d, J = 6.4 Hz, 3H, CH₃CH); 1.44 (s, 9H, [(CH₃)₃C]); 1.98-2.16 (m, 2H, CH₂ACO + CH); 2.29-2.43 (m, 1H, CH₂BCO); 2.96 (d, J = 6.4 Hz, 2H, CH₂NH).

RMN-¹³C (50 MHz, CD₃OD) δ: 17.8 (CH₃CH), 28.8 [(CH₃)₃C], 32.4 (CH), 39.8 (CH₂CO), 46.9 (CH₂NH), 79.9 [(CH₃)₃C], 158.6 (CONH), 176.6 (COOCH₃). Los datos espectrales son consistentes con lo reportado en la literatura.⁹⁶

Ácido (R)-(-)-4-(tert-Butoxicarbonil)amino-2-metilbutanoico, (R)-(-)-**12c**



Aspecto: Resina incolora

Rendimiento: 31 %

Fórmula : C₁₀H₁₉NO₄

R_f = 0.10

(hexano:AcOEt, 70:30)

[α]_D²⁰ = -7.6 (c 1, CHCl₃); 35.6 %

ee

{lit. ⁹⁶ (R)-[α]_D²⁰ = -15.5 (c 1.04, CHCl₃)},

LC-HRMS (ESI-QTOF)

Calculado

para:[C₁₀H₁₉NO₄]⁺

Esperado: 217.1314

Encontrado: 217.1323

⁹⁶ Brenner, M.; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta.* **1999**, 82, 2365–2379.

RMN-¹H (200 MHz, CD₃OD) δ: 1.16 (d, *J* = 7 Hz, 3H, CH₃CH); 1.43 (s, 9H, [(CH₃)₃C]); 1.41-1.62 (m, 1H, CHCH₂A); 1.74-1.92 (m, 1H, CHCH₂B); 2.36-2.53 (m, 1H, CH); 3.08 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, CH₂NH).

RMN-¹³C (50 MHz, CD₃OD) δ: 17.5 (CH₃), 28.8 [(CH₃)₃C], 34.8 (CH₂CH), 38.1(CH), 39.4 (CH₂NH), 79.9 [(CH₃)₃C], 158.5 (CONH), 180.1 (COOCH₃). Los datos espectrales son consistentes con lo reportado en la literatura.⁹⁶

Procedimiento general para la esterificación de γ -amino ácidos *N*-(*tert*-butoxicarbonil) protegidos. Procedimiento General 5 (PG5).

En un matraz de bola 10 mL se colocó el γ -amino ácido *N*-Boc protegido (**12a-c**), el cual se disolvió con una solución de MeOH/tolueno, 3:2 (8 mL mmol⁻¹); el matraz de reacción se acondicionó con un tapón y atmósfera de nitrógeno para colocarse en baño de hielo y agitación por 15 min. Pasado este tiempo se agregaron gota a gota, vía jeringa 2 eq de TMS-CHN₂ (2 M en hexanos), la reacción se monitoreó por TLC hasta observar la formación del producto deseado y la desaparición de la materia prima. Una vez completada la reacción, el disolvente se evaporó a presión reducida. El crudo de la reacción se purificó por CC (hexano/AcOEt, 90:10-60:40). Los productos se aislaron en forma de aceites incoloros.

(S)-(-)-4-(*tert*-Butoxicarbonil)amino-pentanoato de metilo, *(S)*-(-)-**13a**

Preparado a partir de **6a** (0.06 g, 0.27 mmol), MeOH / tolueno 3: 2 (2.2) mL) y TMS-CHN₂ 2M en hexanos (0.27 mL, 2 eq) de acuerdo con PG5. La mezcla el crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna (hexano:AcOEt, 90:10-40:60), el producto se aisló como un sólido blanco de bajo punto de fusión con un rendimiento: 92%. [α]_D = -2.33 (*c* 0.68, CHCl₃); 64.1 % *ee*. Los datos de ¹H y ¹³C están de acuerdo con los reportados para **10a**

(R)-(-)-4-(*tert*-Butoxicarbonil)amino-3-metilbutanoato de metilo, *(R)*-(-)-**13b**.

Preparado a partir de **6b** (0.09 g, 0.08 mmol), MeOH/tolueno 3:2 (0.680 mL) y TMS-CHN₂ 2M en hexanos (0.085 mL, 2 eq) de acuerdo con PG5. El crudo de reacción se purificó por cromatografía en columna (hexano/AcOEt, 90:10-40:60), el producto se aisló como un aceite incoloro con un rendimiento de 71%. [α]_D = -0.96 (*c* 1.04, CHCl₃); 69.9 % *ee*. Los datos de ¹H y ¹³C están de acuerdo con los reportados para **10b**.

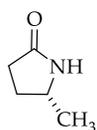
(R)-(-)-4-(*tert*-Butoxicarbonil)amino-2-metilbutanoato de metilo, *(R)*-(-)-**13c**.

Preparado a partir de **6c** (0.03 g, 1.33 mmol), MeOH/tolueno, 3: 2 (1 mL) y TMS-CHN₂ 2M en hexanos (0.13 mL, 2 eq) de acuerdo con PG5. El crudo de reacción se purificó por CC (hexano/AcOEt, 90:10 a 40:60), el producto se aisló como un aceite incoloro con un rendimiento del 77%. $[\alpha]_D = -9.87$ (*c* 1.04, CHCl₃); 35.6 % de *ee*. Los datos de RMN-¹H y ¹³C están de acuerdo con los reportados para **10c**.

(R)-(+)-5-Metil-2-pirrolidinona, *(R)*-(+)-**14a**:

En un matraz de bola 10 mL provisto con una barra de agitación magnética se colocó el amino éster remanente *(R)*-(+)-**11a** (0.18 g, 0.77 mmol) el cual se disolvió con DCM, el matraz de reacción se colocó en agitación en baño de hielo; posteriormente se le adicionó gota a gota una solución de 5.4 mL de TFA/DCM, 1: 2 (1 mL de TFA/100 mg de muestra); reacción se monitoreó mediante TLC, hasta la desaparición de la materia prima. La mezcla de reacción se diluyó con hexano para arrastrar el TFA y luego se evaporó a presión reducida. El crudo de reacción se redisolvió en tolueno y reflujo para obtener *(R)*-(+)-**14a**. El compuesto fue obtenido como un líquido incoloro. Los datos de RMN-¹H concuerdan con lo reportado en la literatura.⁹⁷

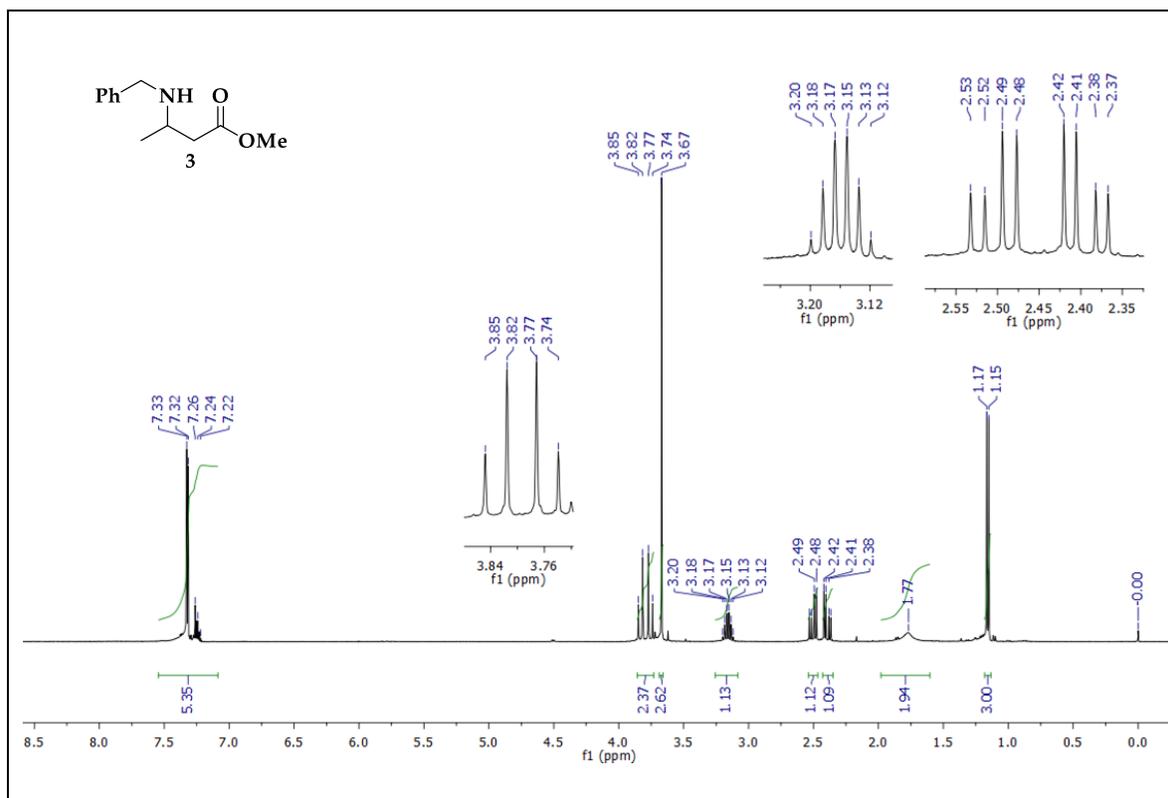
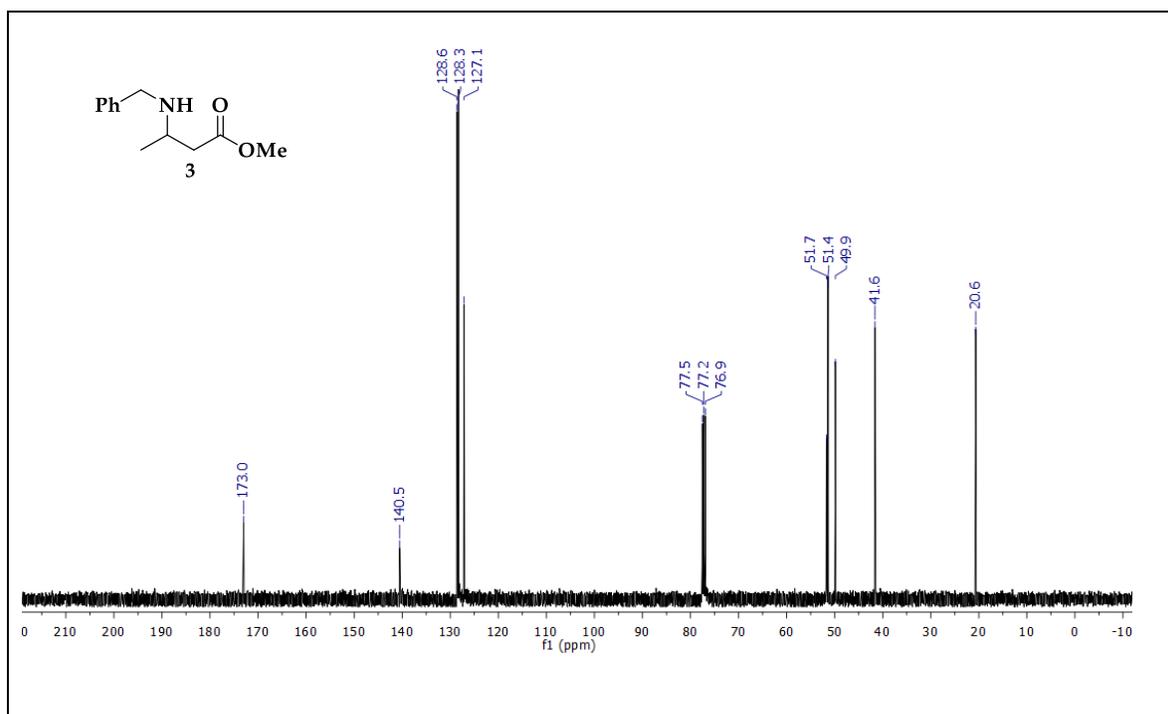
(R)-(+)-5-Metil-2-pirrolidinona, *(R)*-(+)-**14a**

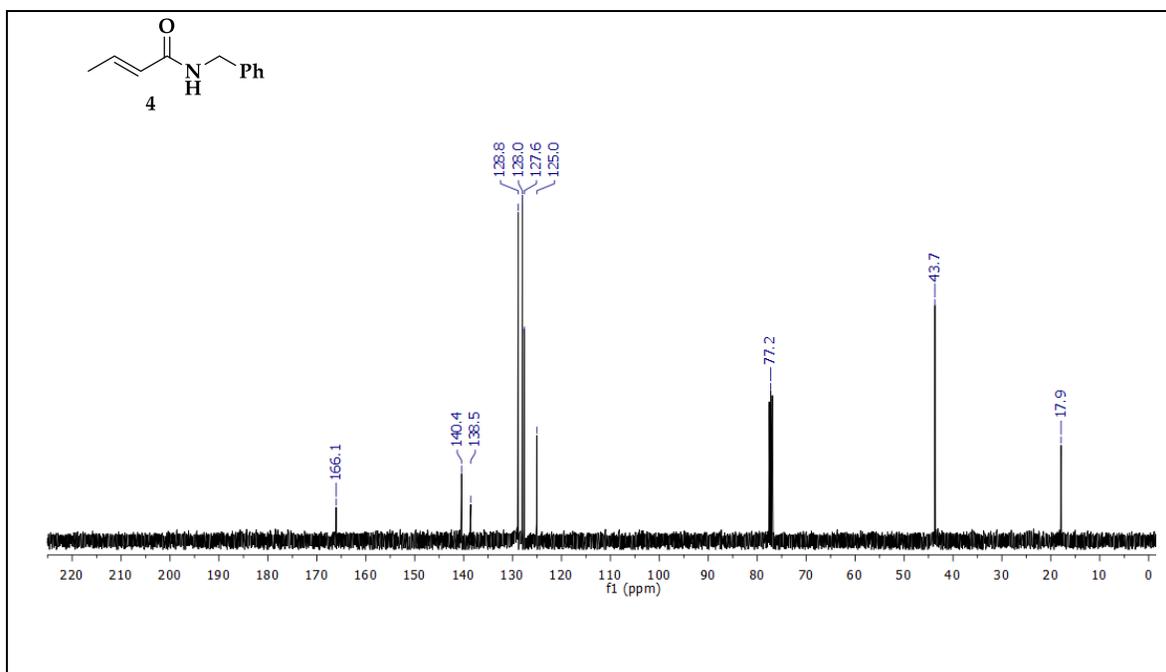
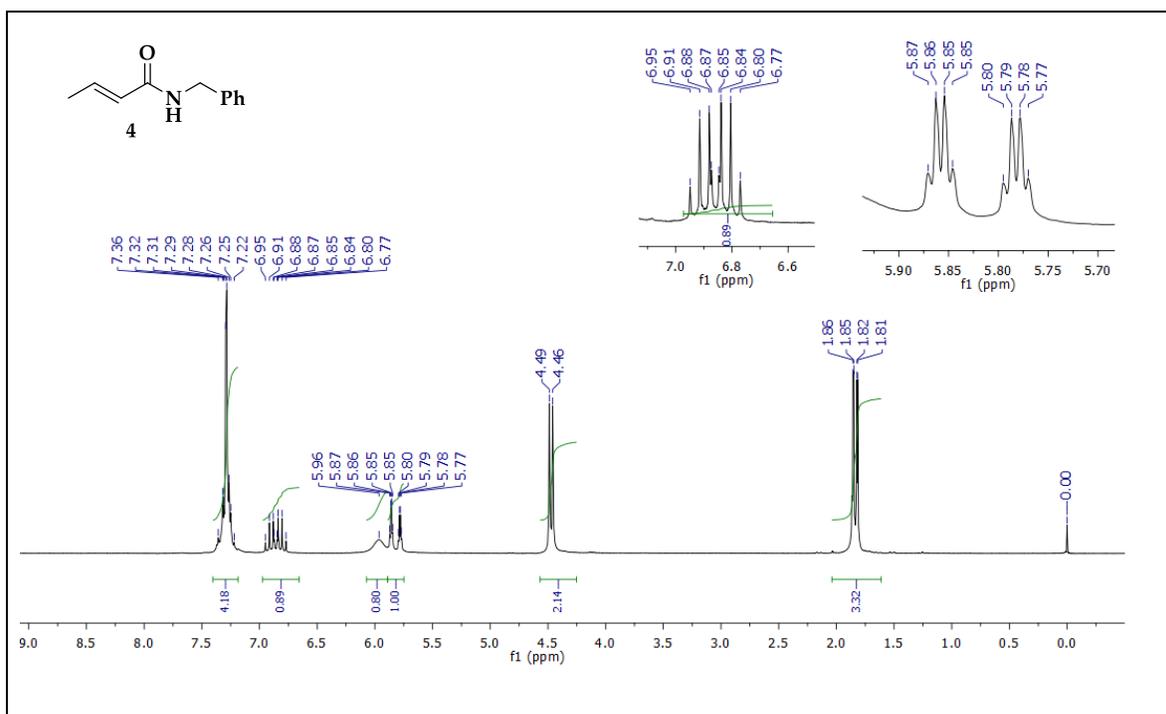


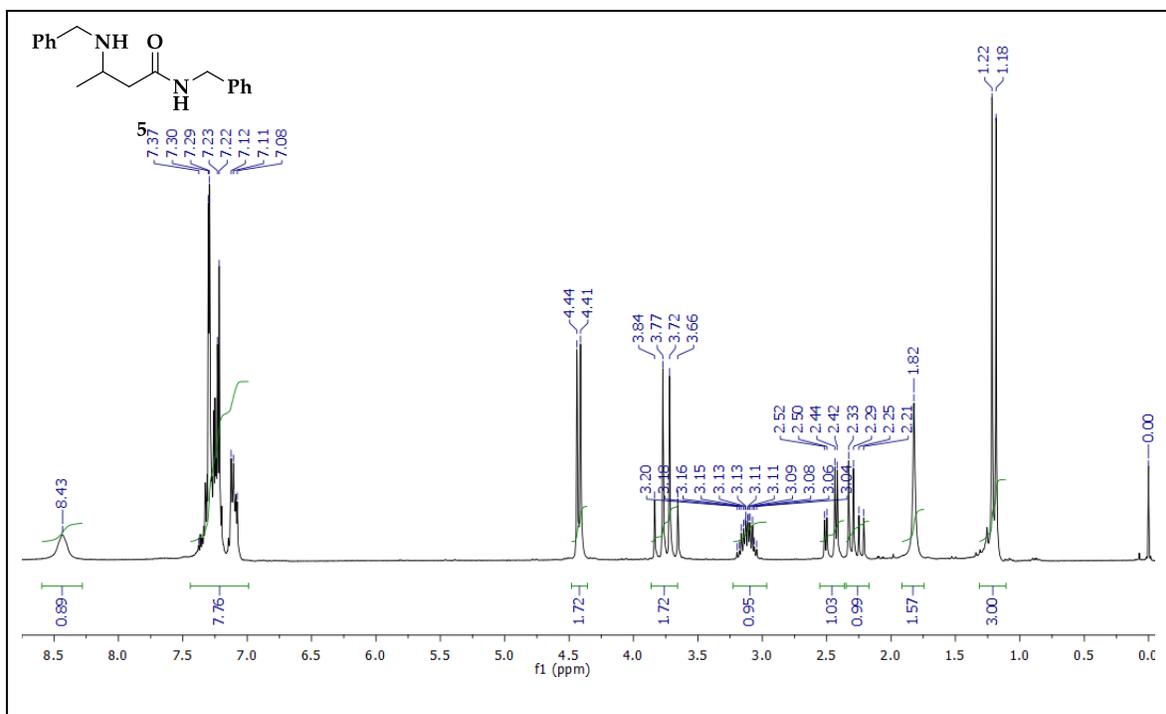
Aspecto: Aceite incoloro	RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) δ: 1.22 (d, <i>J</i> = 6.3 Hz, 3H, CH ₃ CH); 1.56-1.73 (m, 1H, CH _{2A} CH);
Rendimiento total: 11 %	2.17 -2.4 (m, 3H, CH _{2B} CH+CH ₂ CO); 3.70-3.86 (m, 1H, CH ₃ CH); 6.27 (br s, 1H, NH).
Fórmula: C ₅ H ₉ NO	
R _f = 0.38 (AcOEt:MeOH, 95:05)	RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ: 22.3 (CH ₃ CH), 29.4 (CH ₂ CH), 30.7 (CH ₂ CO), 50.4 (CHCH ₃), 178.6 (CONH).
$[\alpha]_D = +4$ (<i>c</i> 1.0, EtOH)	
lit. ⁹⁷ (<i>R</i>): $[\alpha]_D = +17.2$ (<i>c</i> 1.02, EtOH)	

⁹⁷ Otsuka, M.; Masuda, T.; Haupt, A.; Ohno, M.; Shiraki, T.; Sugiura, Y.; Maeda, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 838-845.

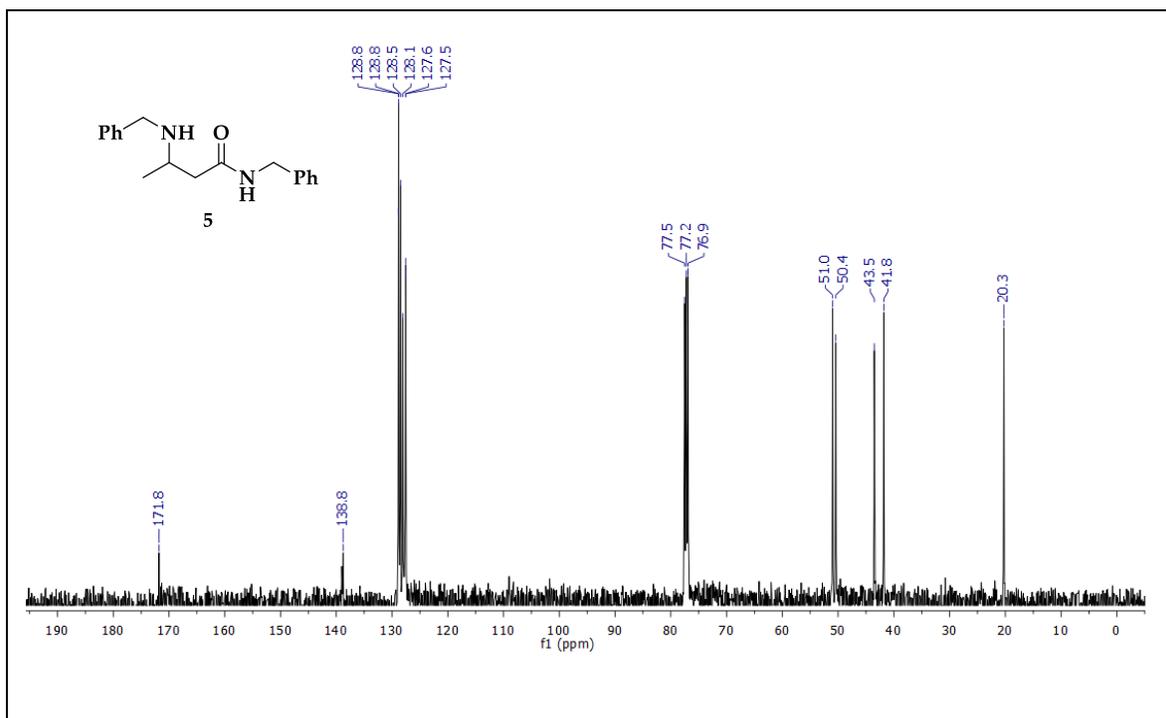
6. ESPECTROS

Espectro 1. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) (±)-3-(Bencilamino)butanoato de metilo, rac-3Espectro 2. RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃) (±)-3-(Bencilamino)butanoato de metilo, rac-3

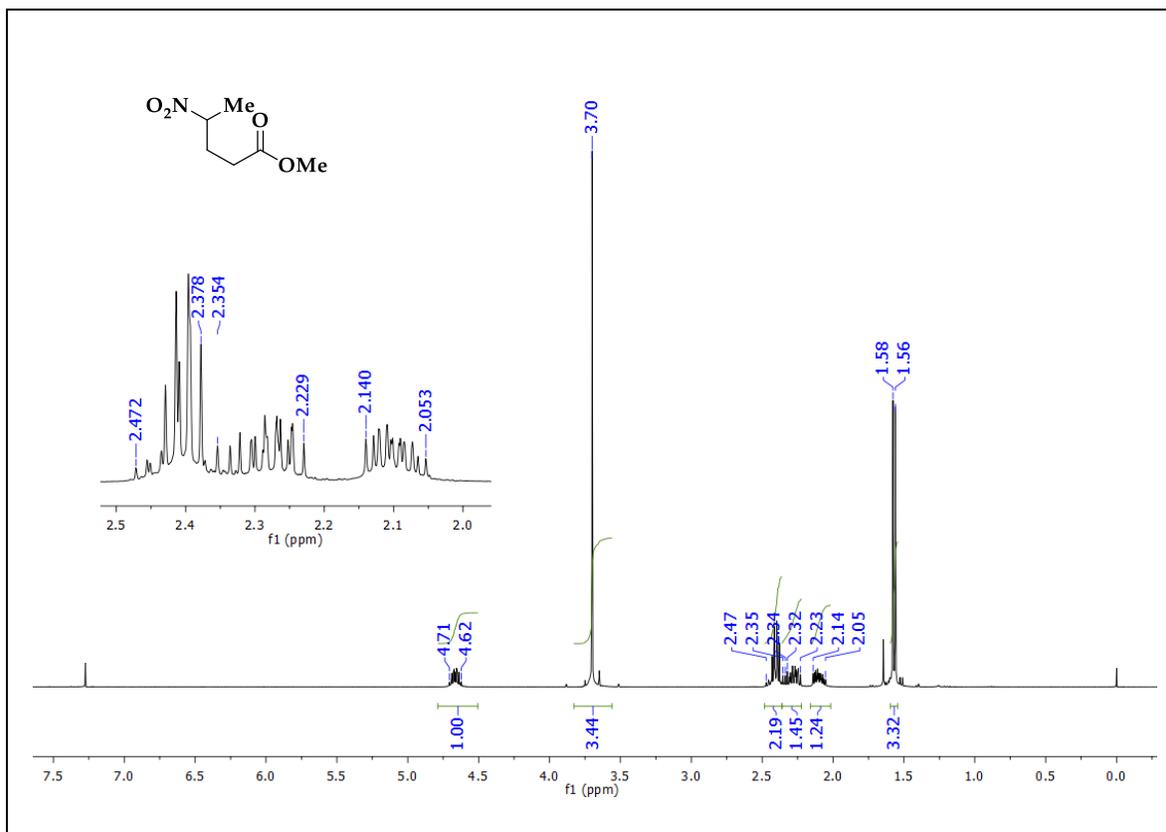




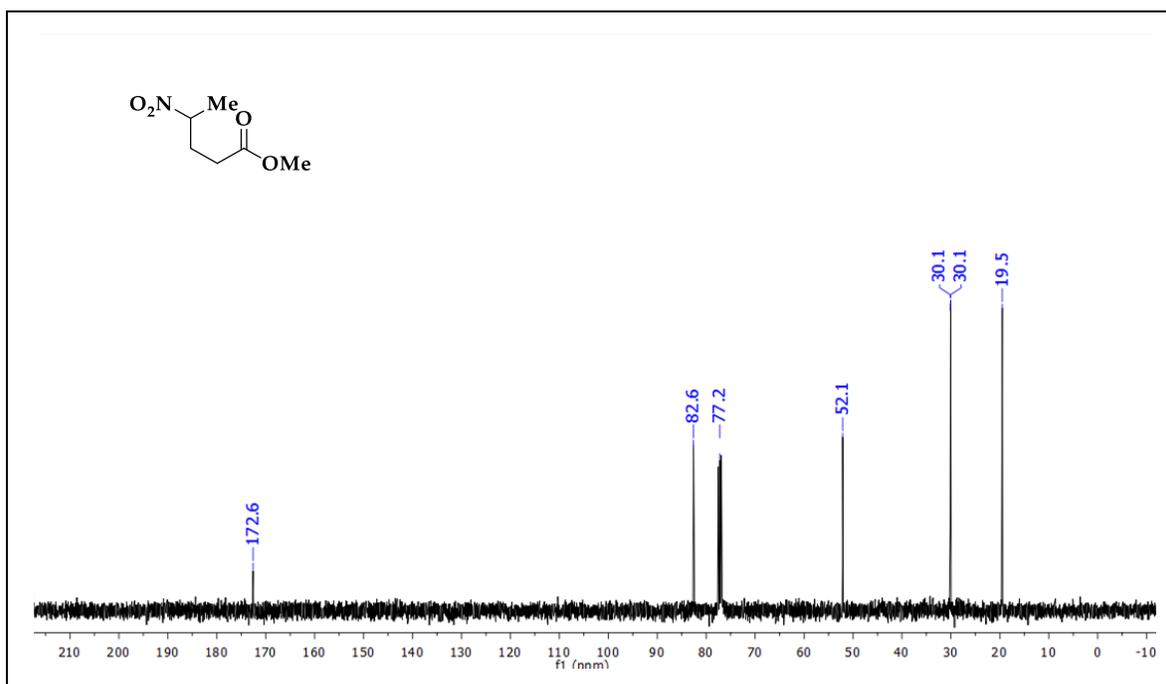
Espectro 5. RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) *N*-Bencil-3-(bencilamino)-butanamida, **5**



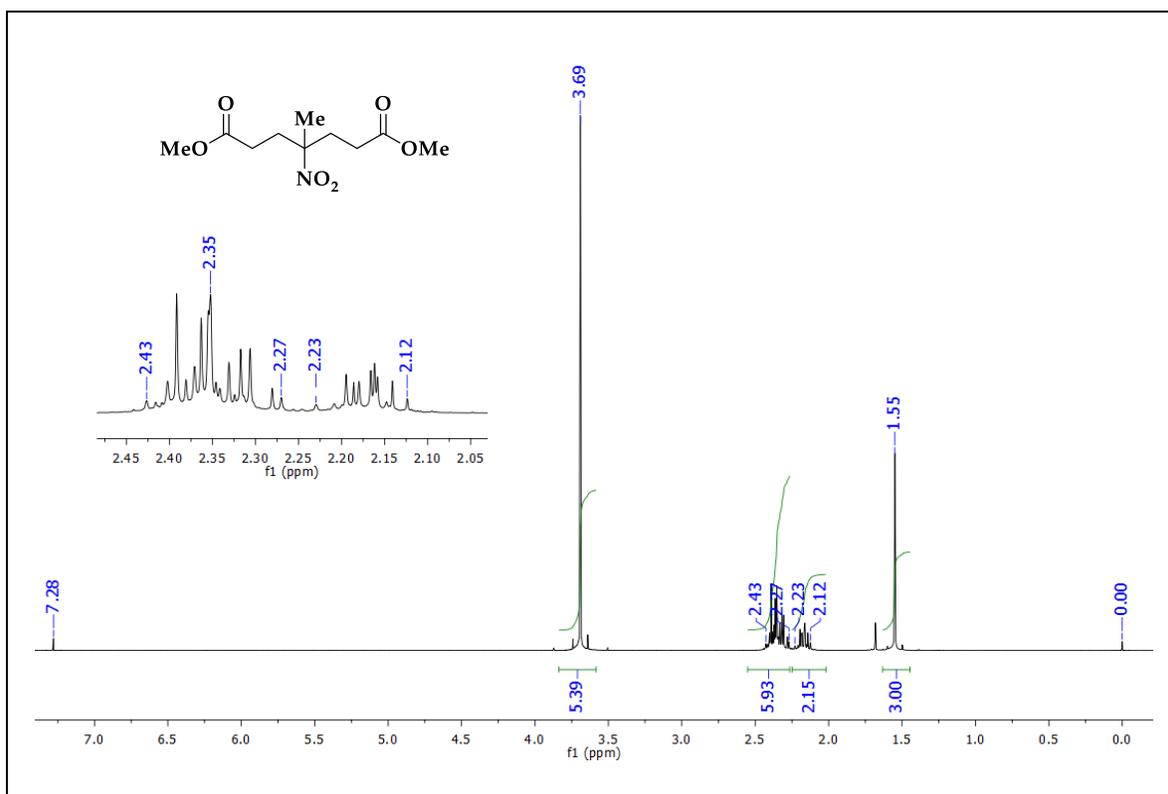
Espectro 6. RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) *N*-Bencil-3-(bencilamino)-butanamida, **5**



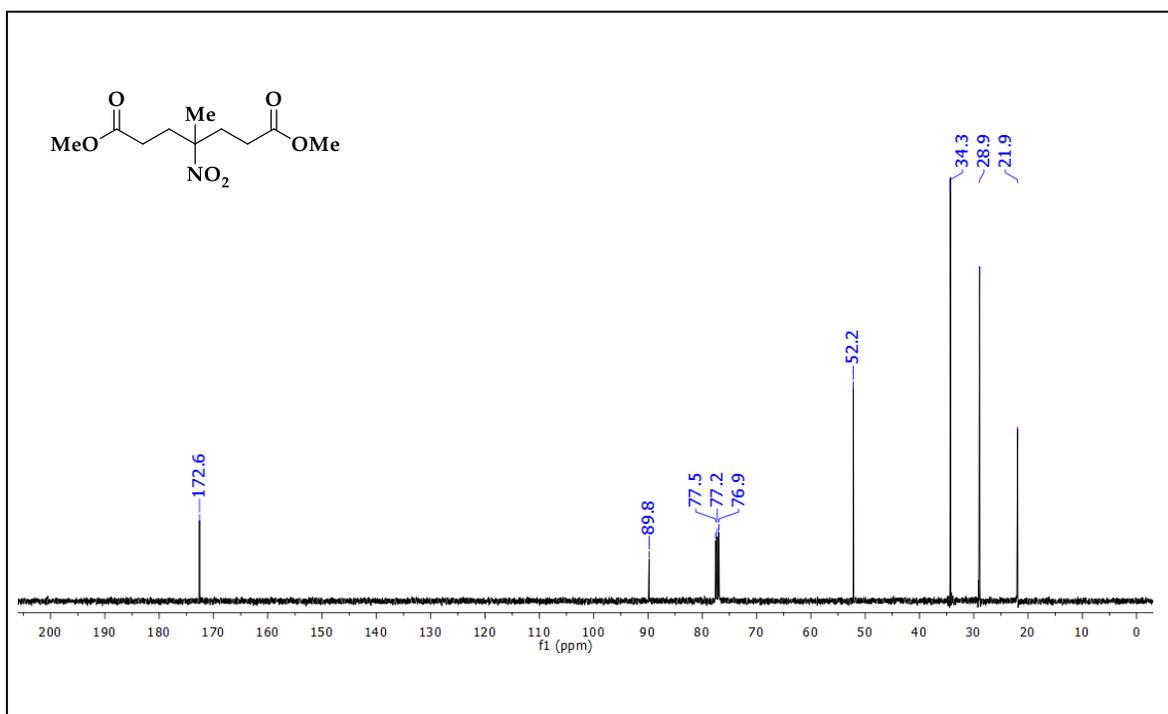
Espectro 7. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) (±)-4-Nitropentanoato de metilo (±)-8a



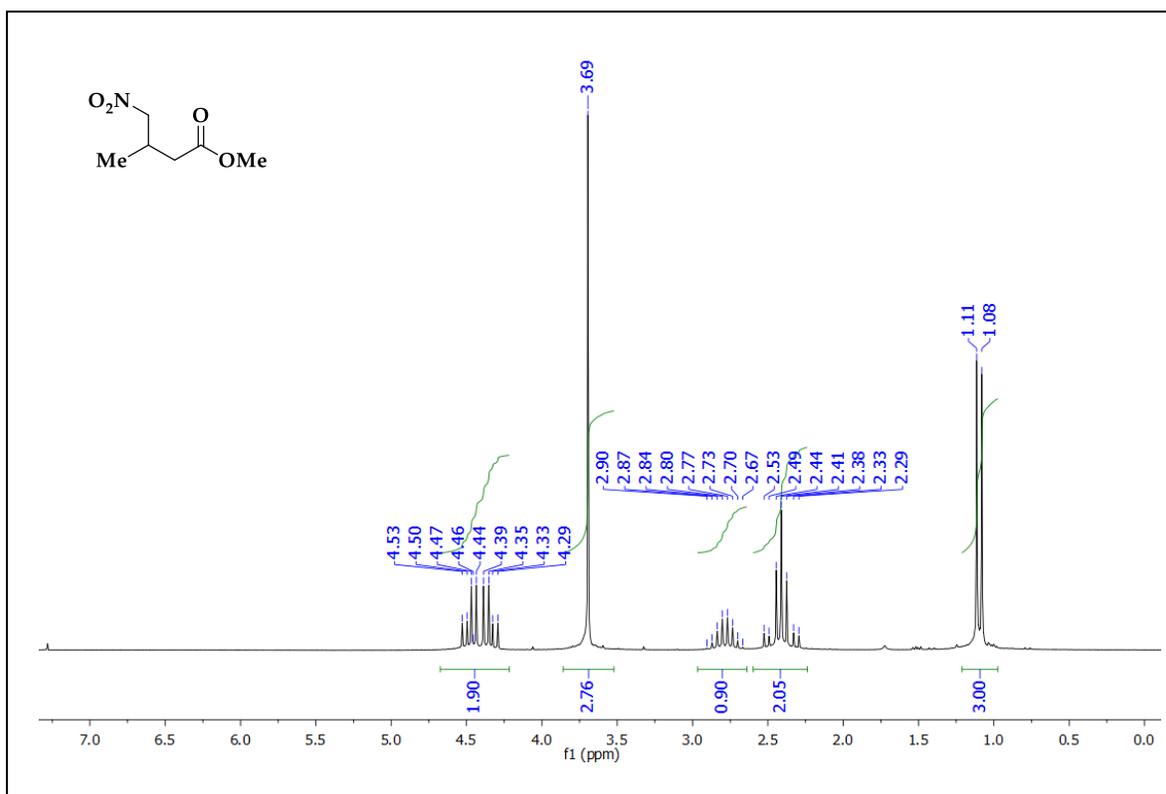
Espectro 8. RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃) (±)-4-Nitropentanoato de metilo (±)-8a



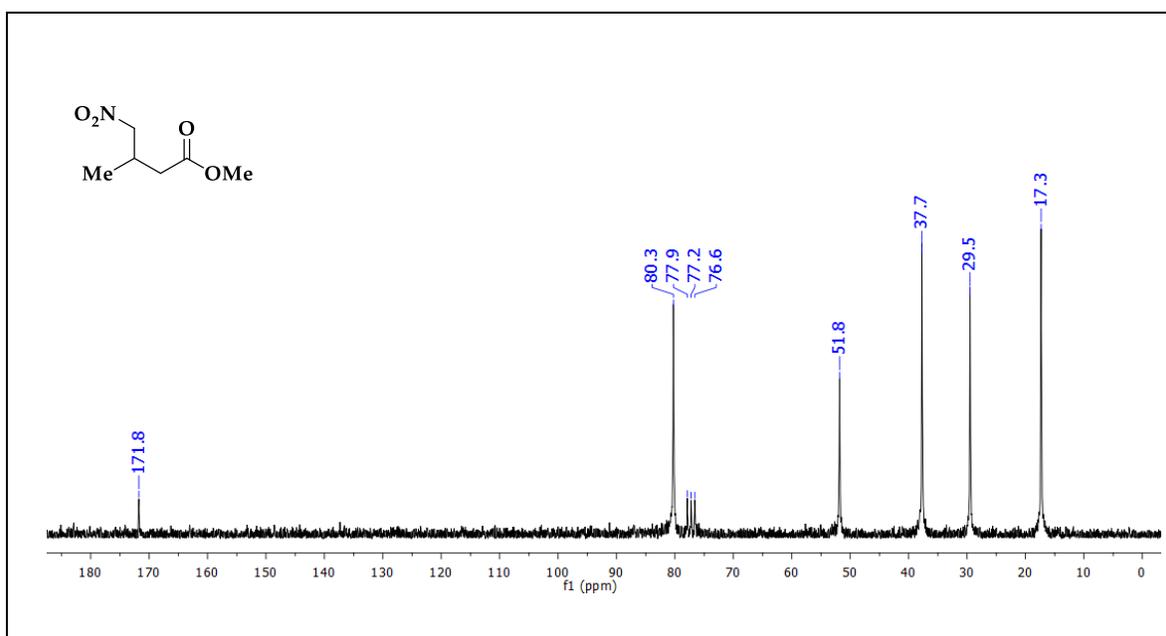
Espectro 9. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) 4-Metil-4-nitroheptadionato de dimetilo, **9a**



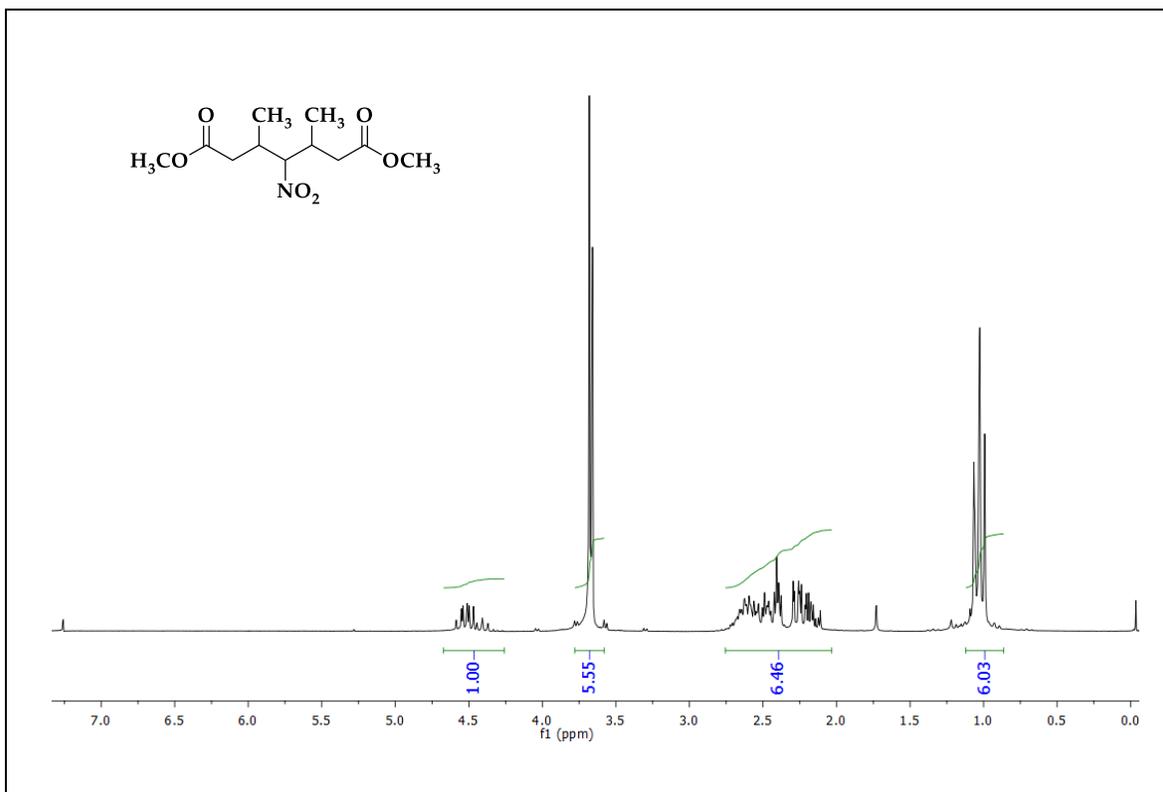
Espectro 10. RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃) 4-Metil-4-nitroheptadionato de dimetilo, **9a**



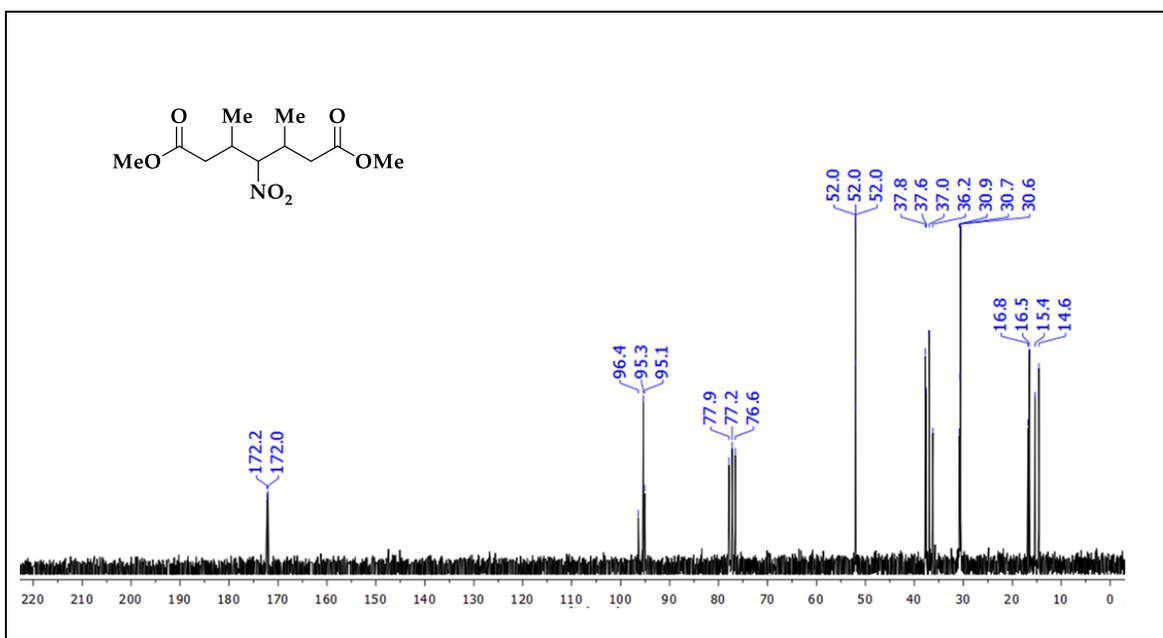
Espectro 11. RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) 3-Metil-4-nitrobutanoato de metilo, (\pm)-8b



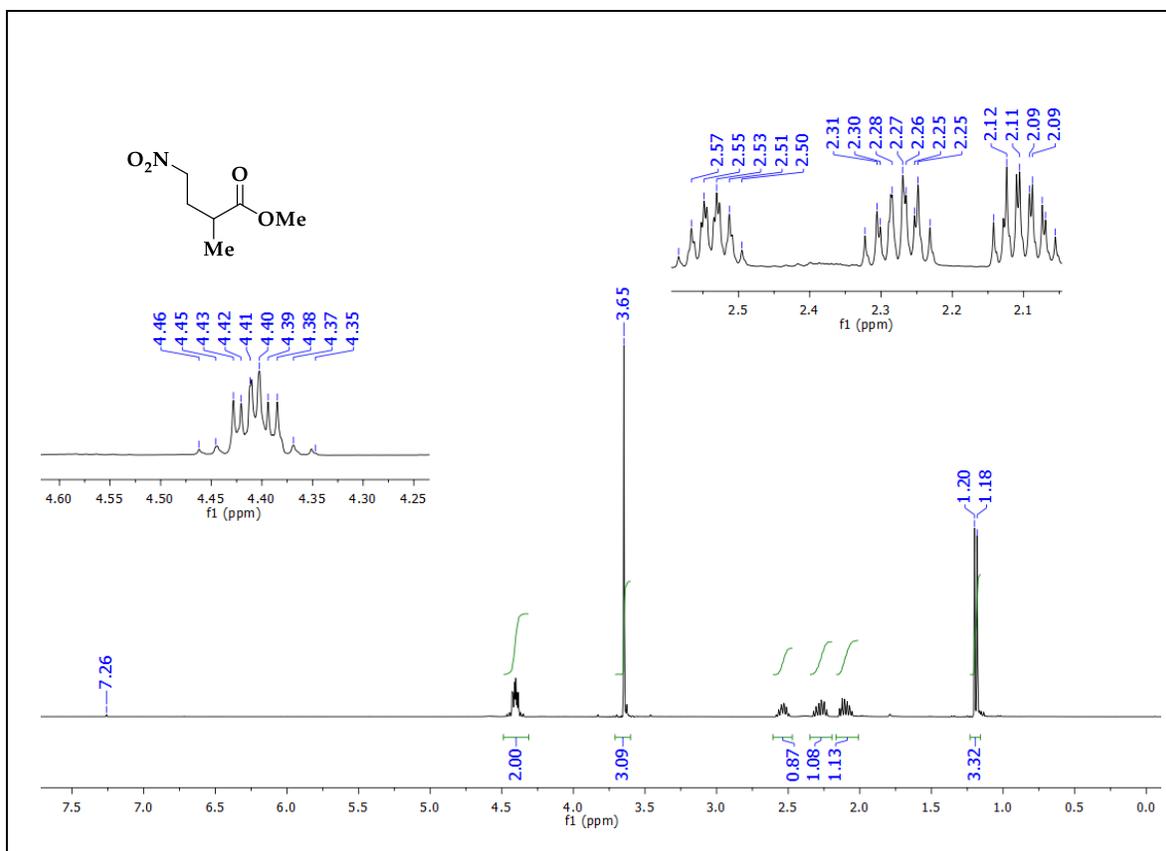
Espectro 12. RMN- ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) 3-Metil-4-nitrobutanoato de metilo, (\pm)-8b



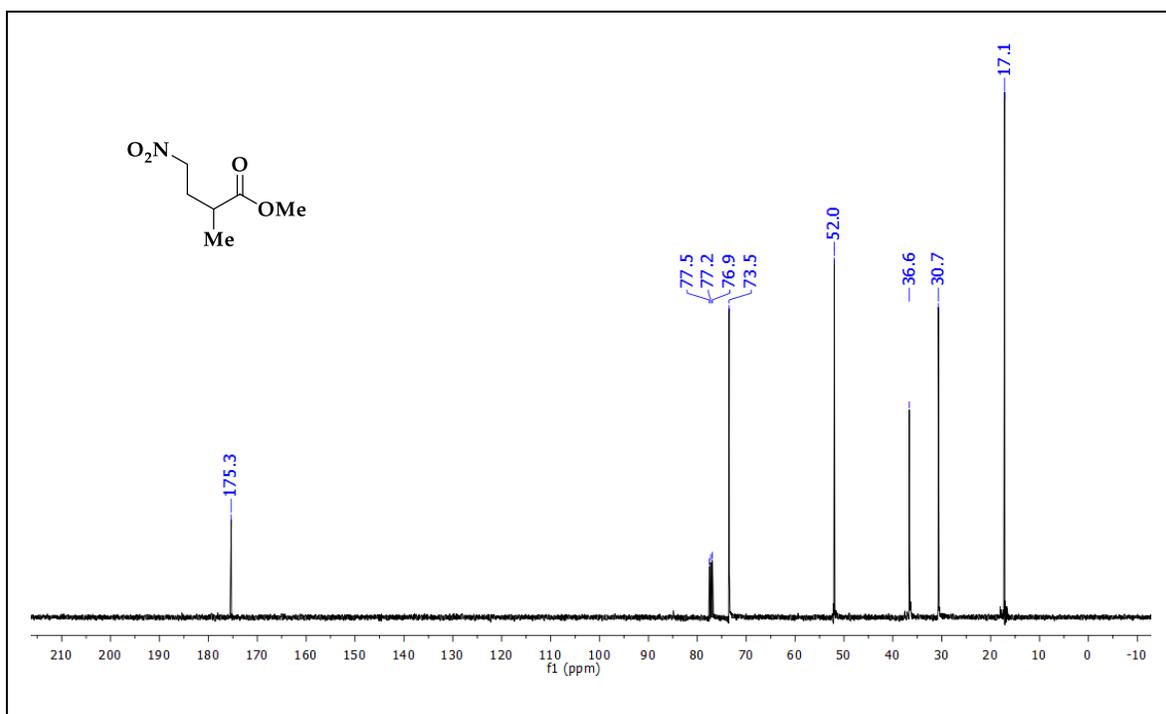
Espectro 13. RMN- ^1H (200 MHz, CDCl_3) 3,5-Dimetil-4-nitroheptadionato de metilo, **9b**



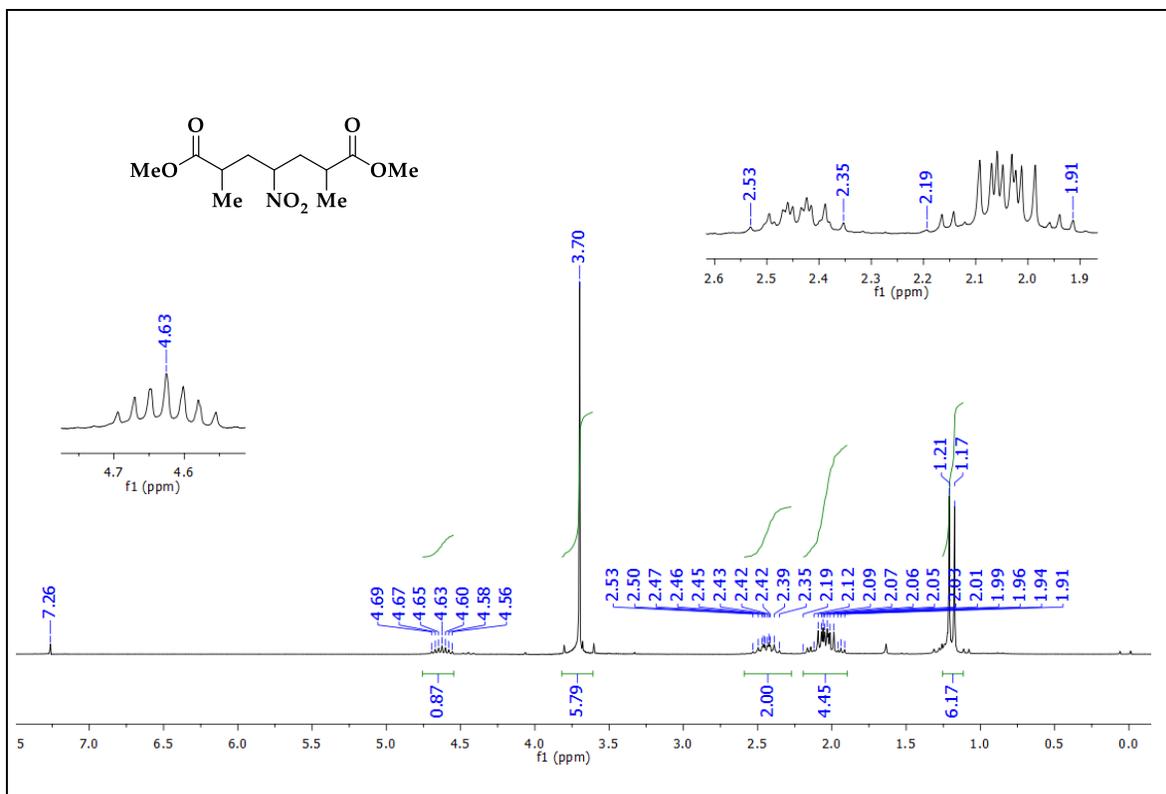
Espectro 14. RMN- ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) 3,5-Dimetil-4-nitroheptadionato de metilo, **9b**



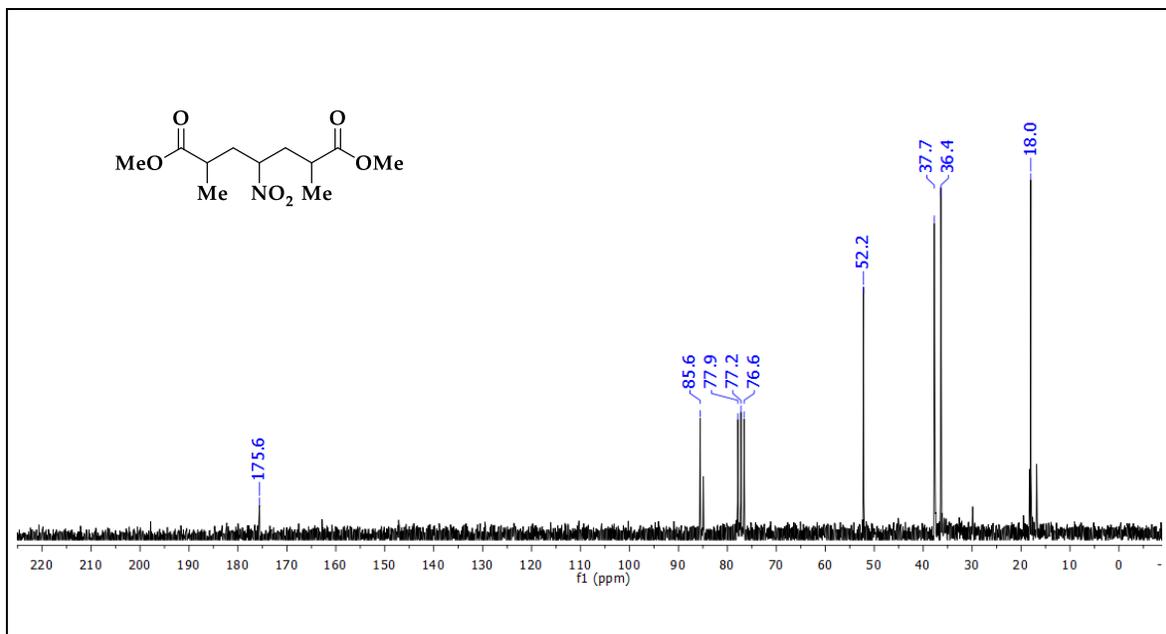
Espectro 15. RMN-¹H (400 MHz, CDCl₃) (±)-2-Metil-4-nitrobutanoato de metilo, (±)-8c



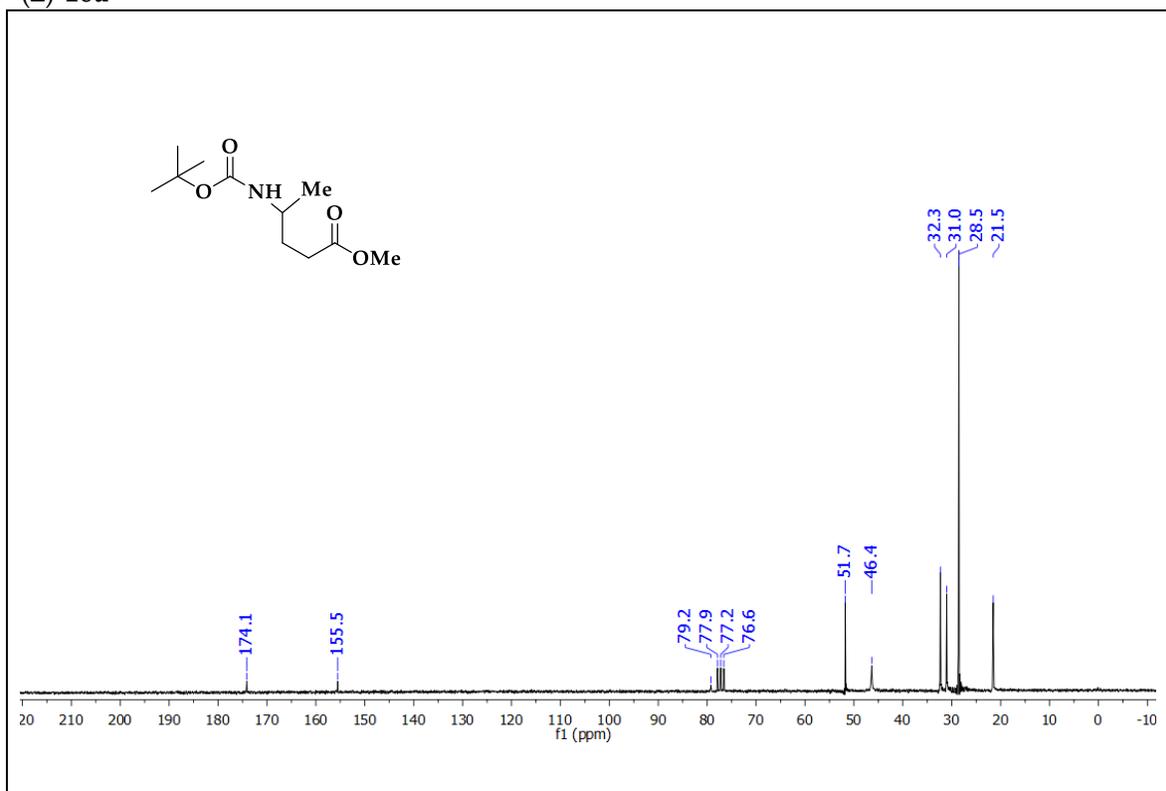
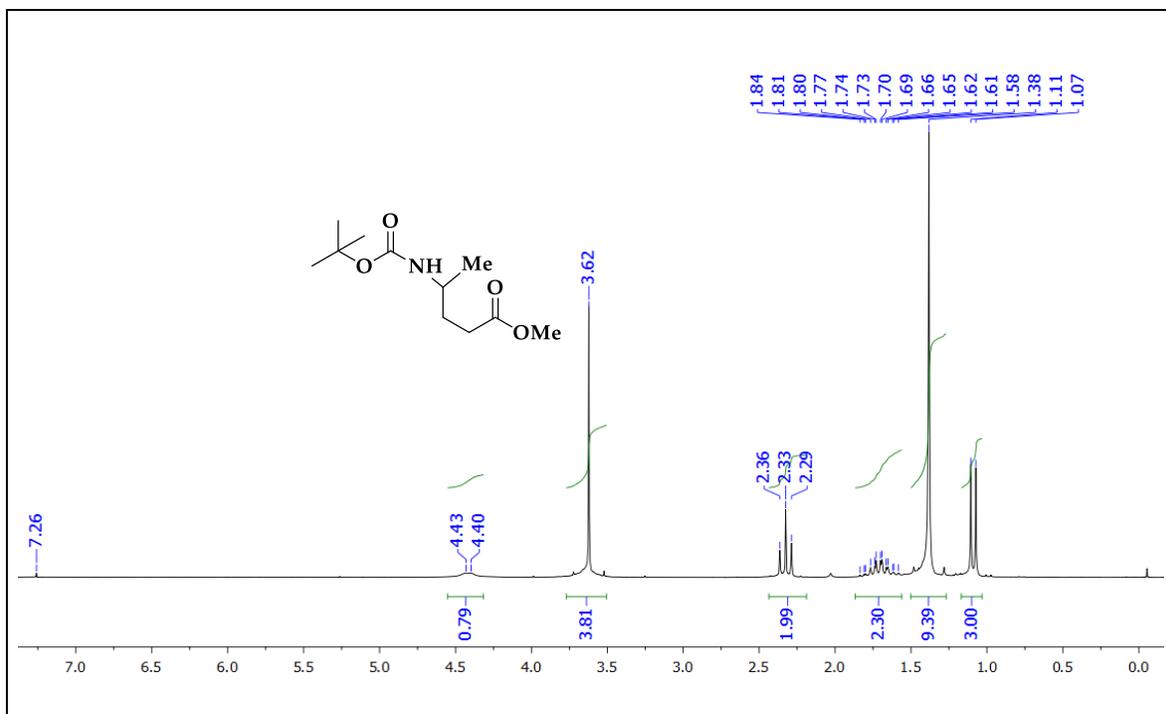
Espectro 16. RMN-¹³C (100 MHz, CDCl₃) (±)-2-Metil-4-nitrobutanoato de metilo, (±)-8c

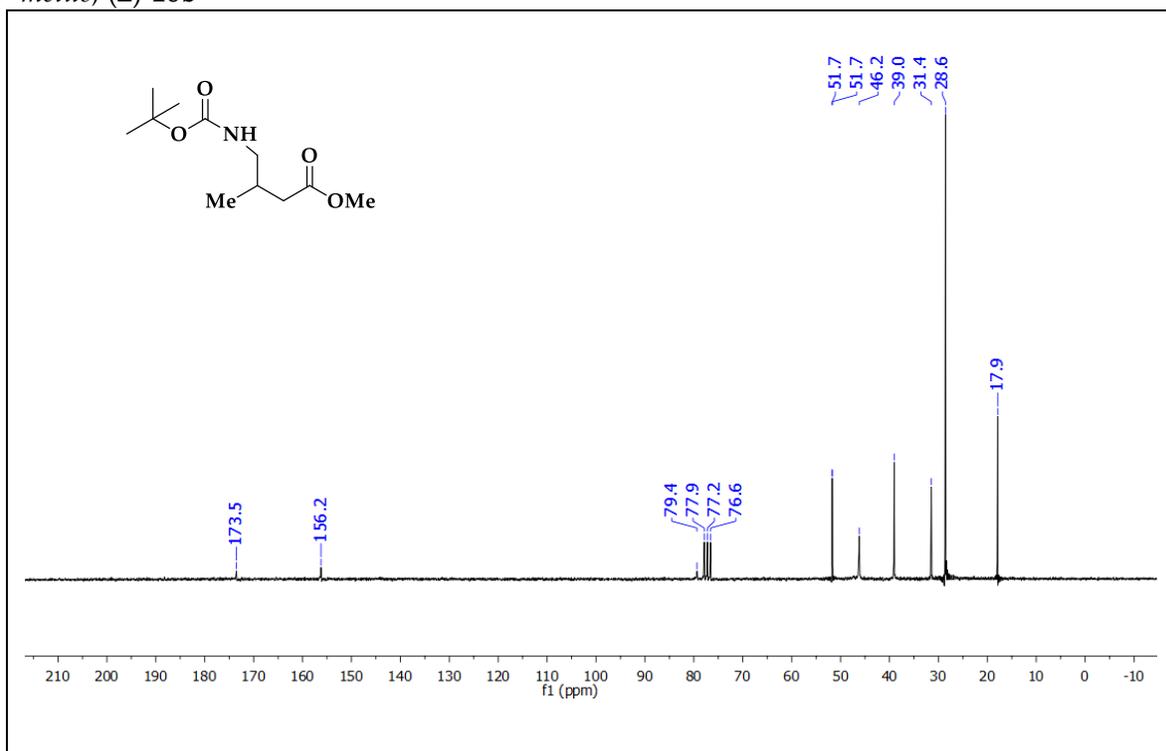
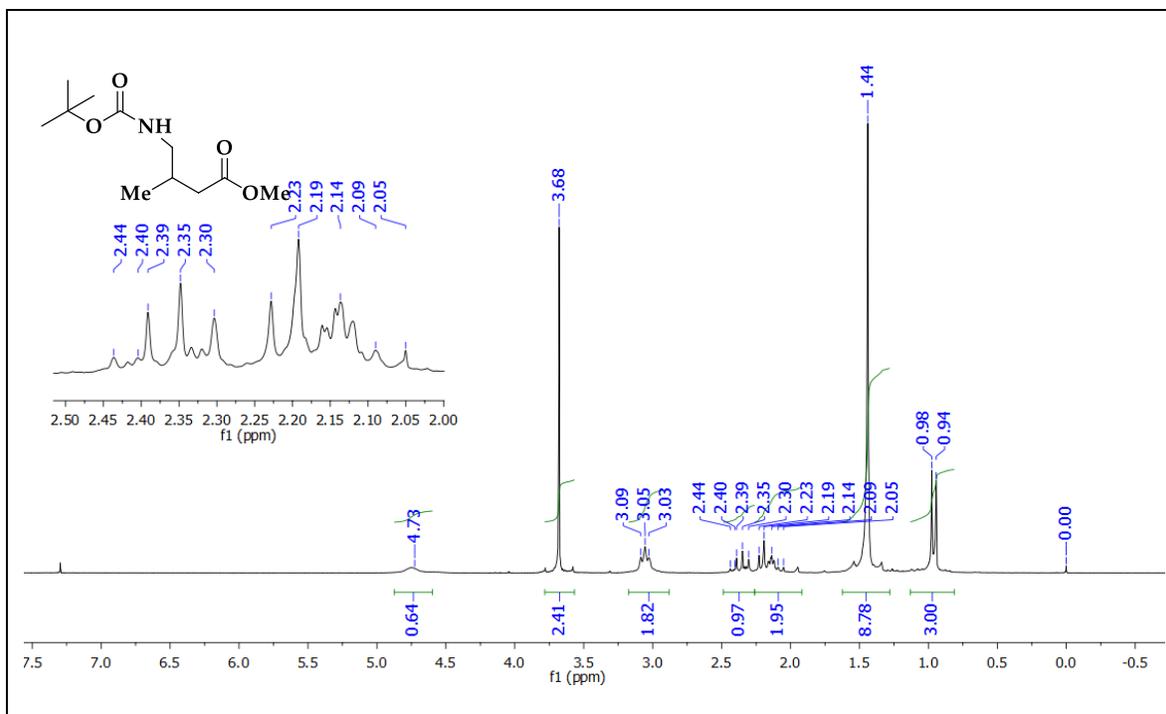


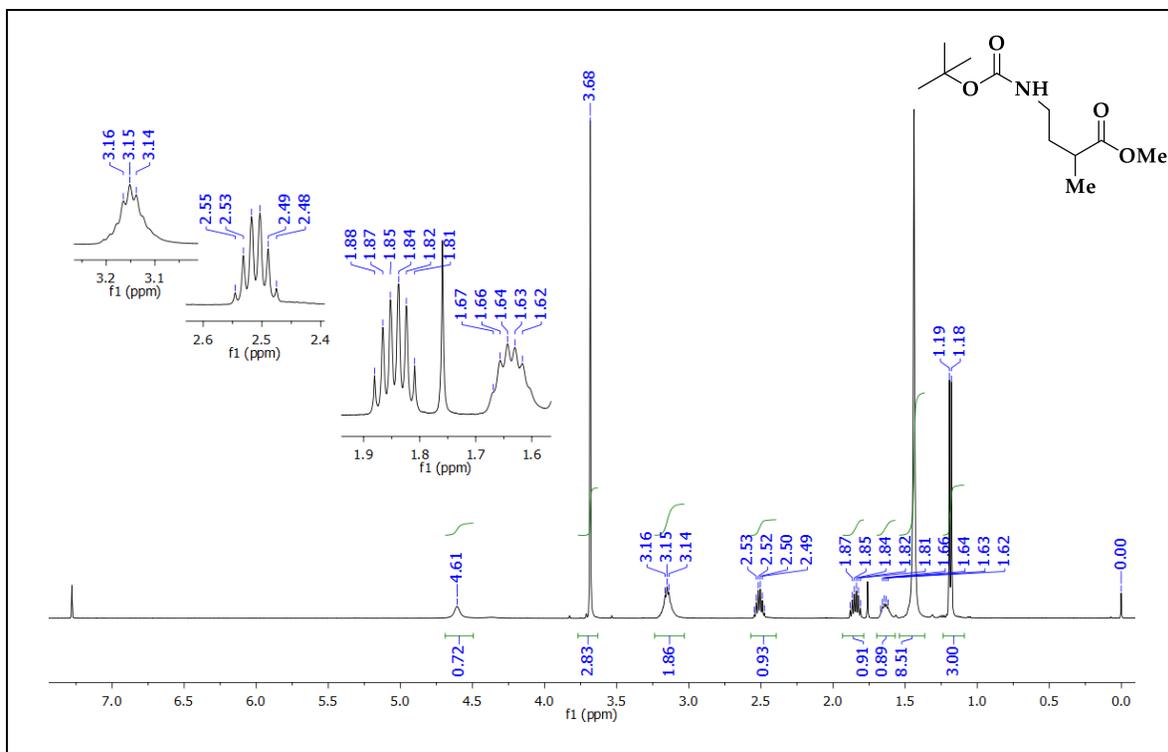
Espectro 17. RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) 2,4-Dimetil-4-nitroheptadionato de metilo, **9c**



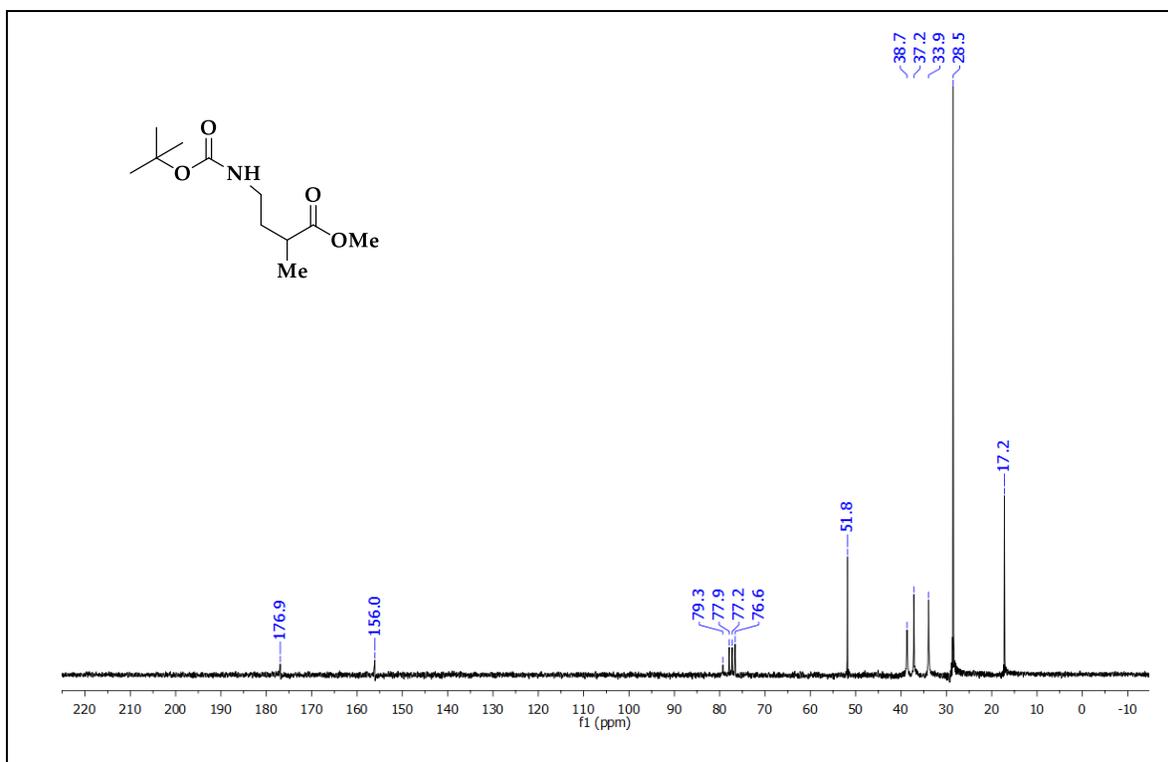
Espectro 18. RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) 2,4-Dimetil-4-nitroheptadionato de metilo, **9c**



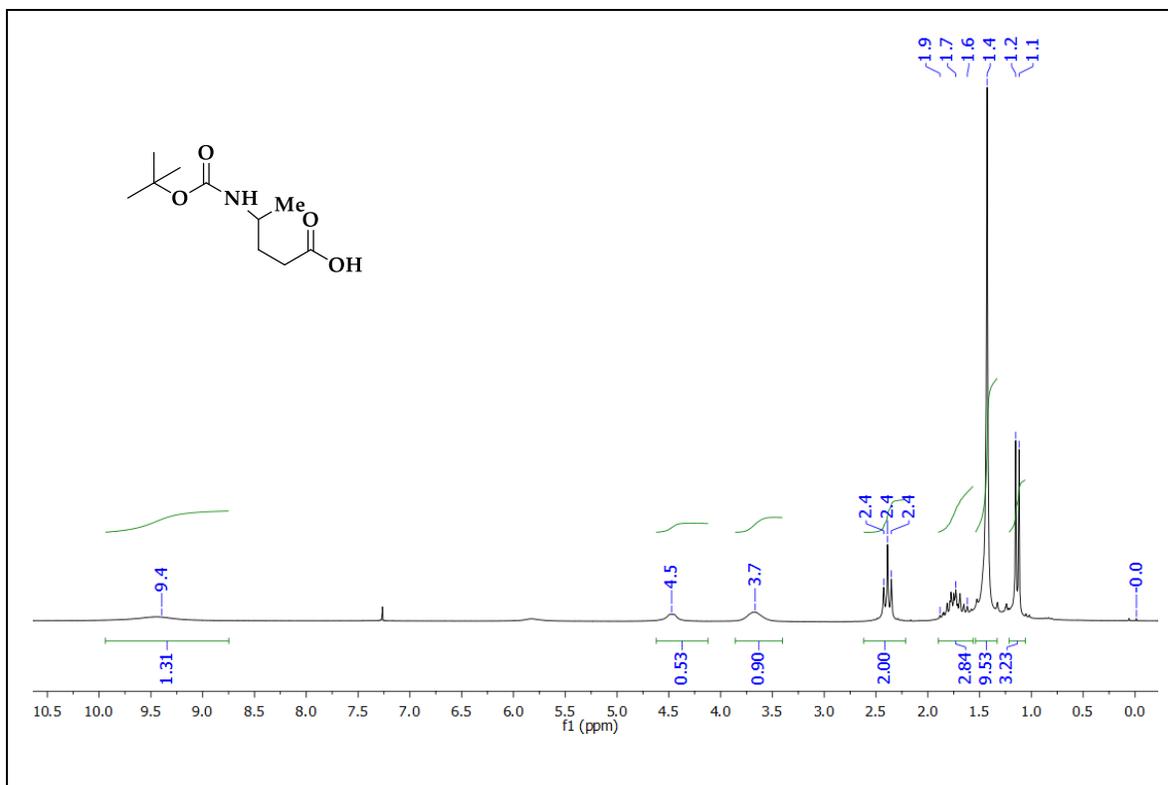




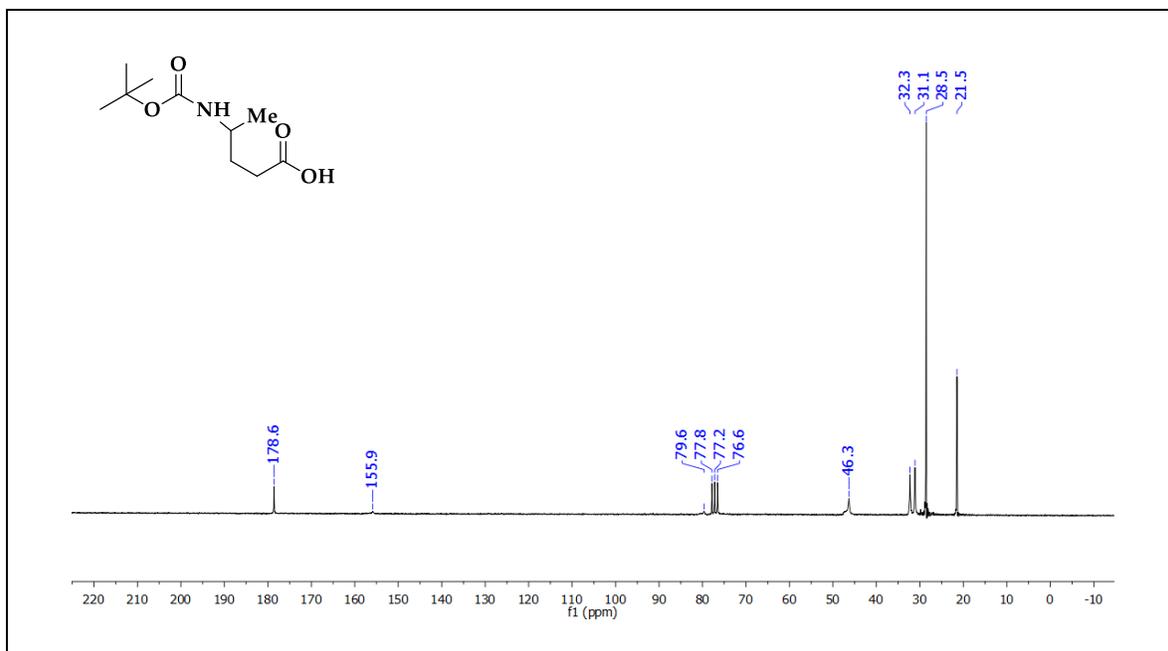
Espectro 23. RMN-¹H (500 MHz, CDCl₃) 4-(*tert*-Butoxycarbonyl)amino-2-metilbutanoato de metilo, (±)-10c



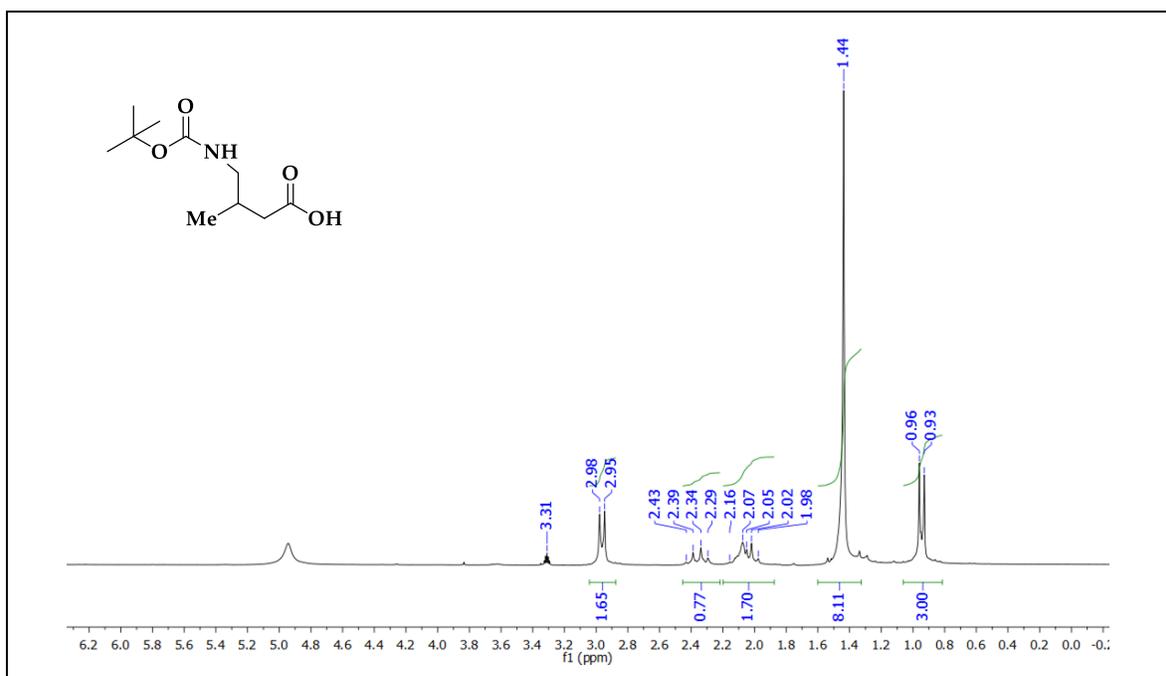
Espectro 24. RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) 4-(*tert*-Butoxycarbonyl)amino-2-metilbutanoato de metilo, (±)-10c



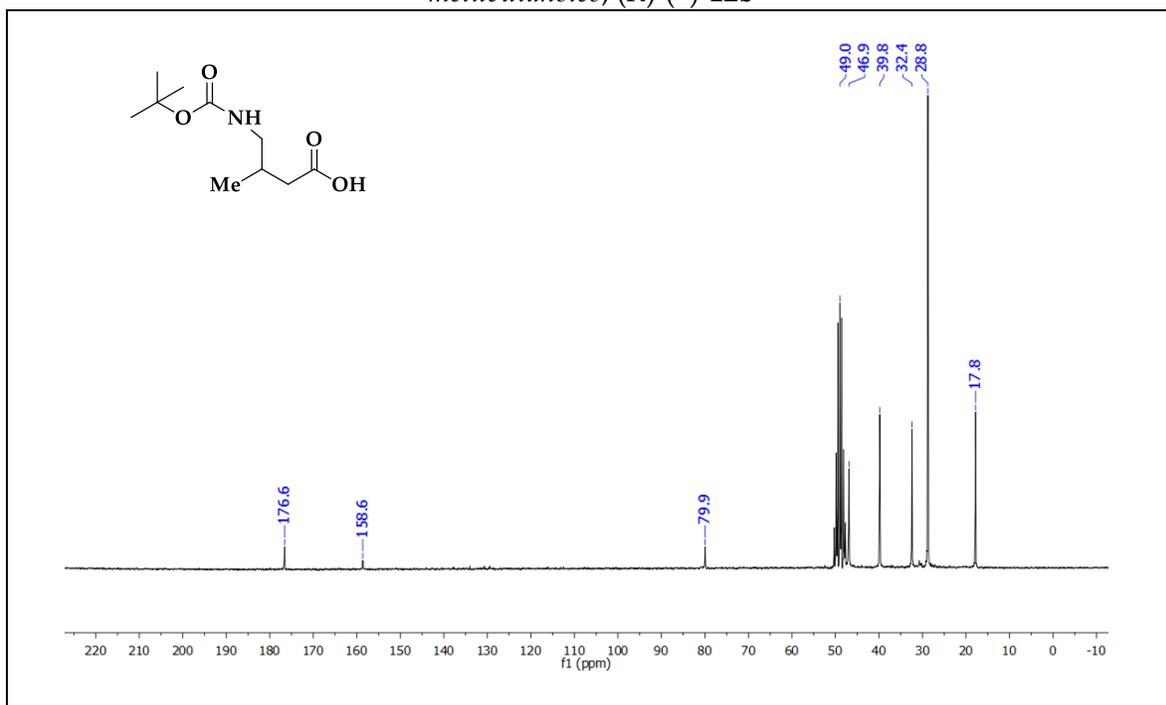
Espectro 25. RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) Ácido (S)-(+)-4-(tert-Butoxicarbonyl)amino-pentanoico, (S)-(+)-**12a**



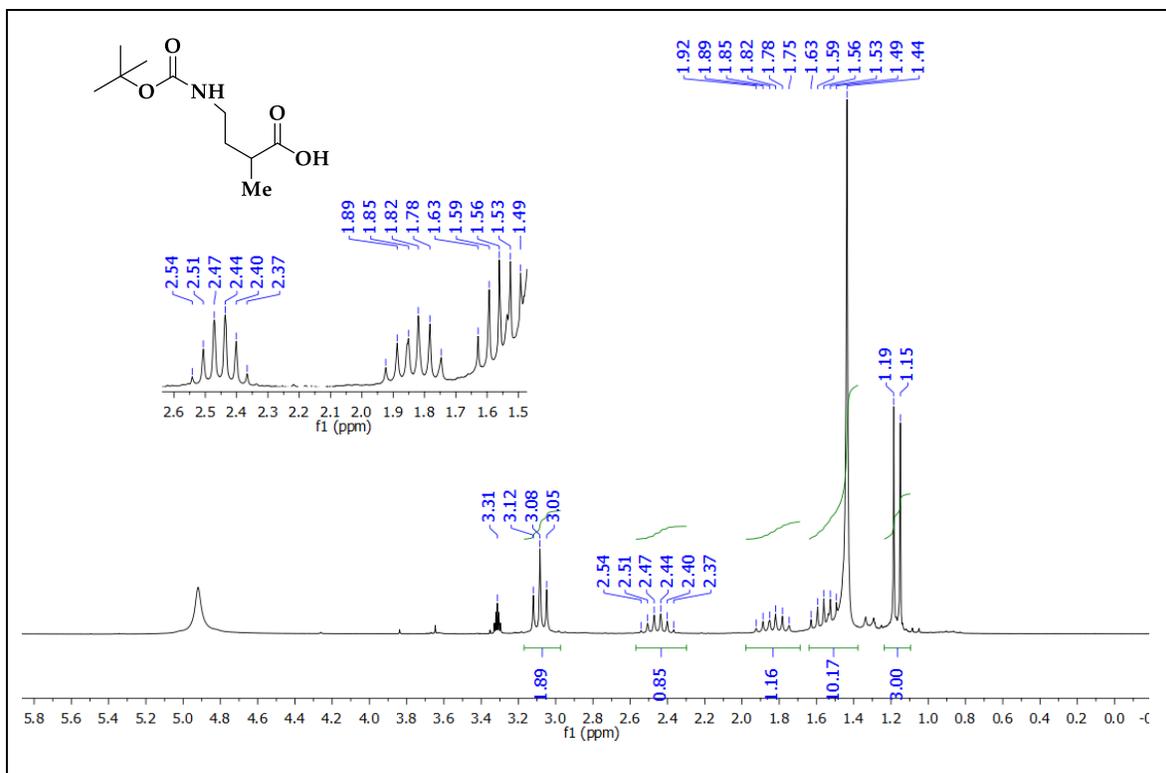
Espectro 26. RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) Ácido (S)-(+)-4-(tert-Butoxicarbonyl)amino-pentanoico, (S)-(+)-**12a**



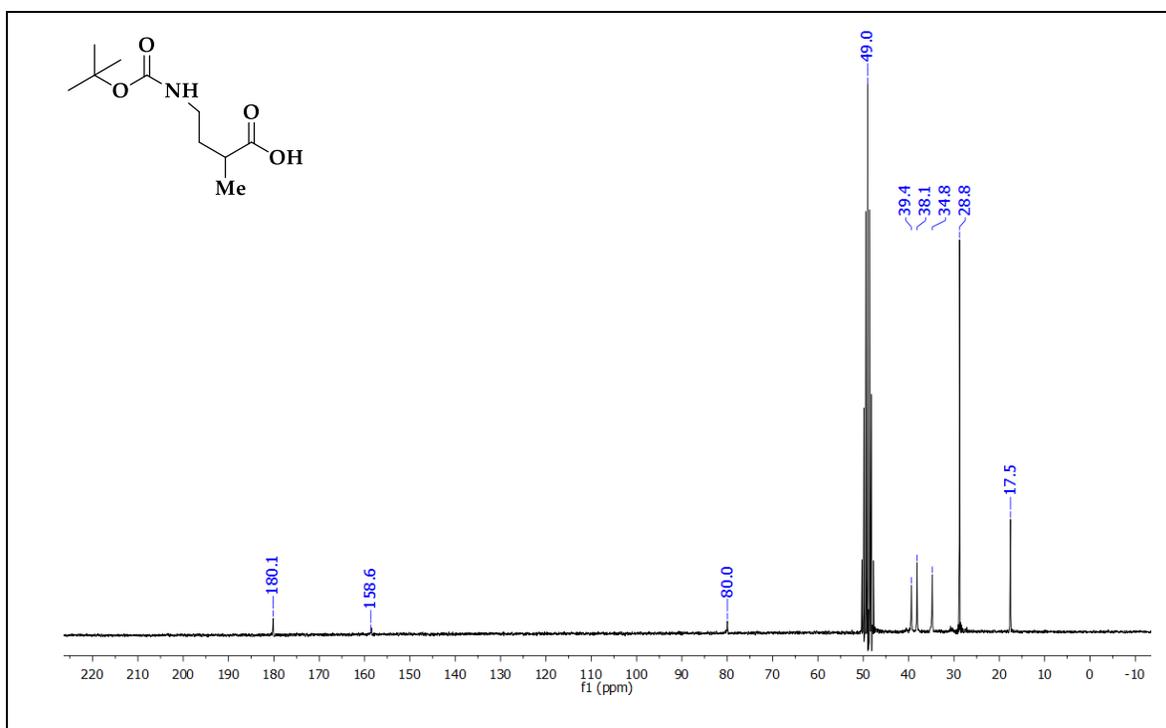
Espectro 27. RMN-¹H (200 MHz, CD₃OD) Ácido (R)-(+)-4-(*tert*-Butoxicarbonil)amino-3-metilbutanoico, (R)-(+)-**12b**



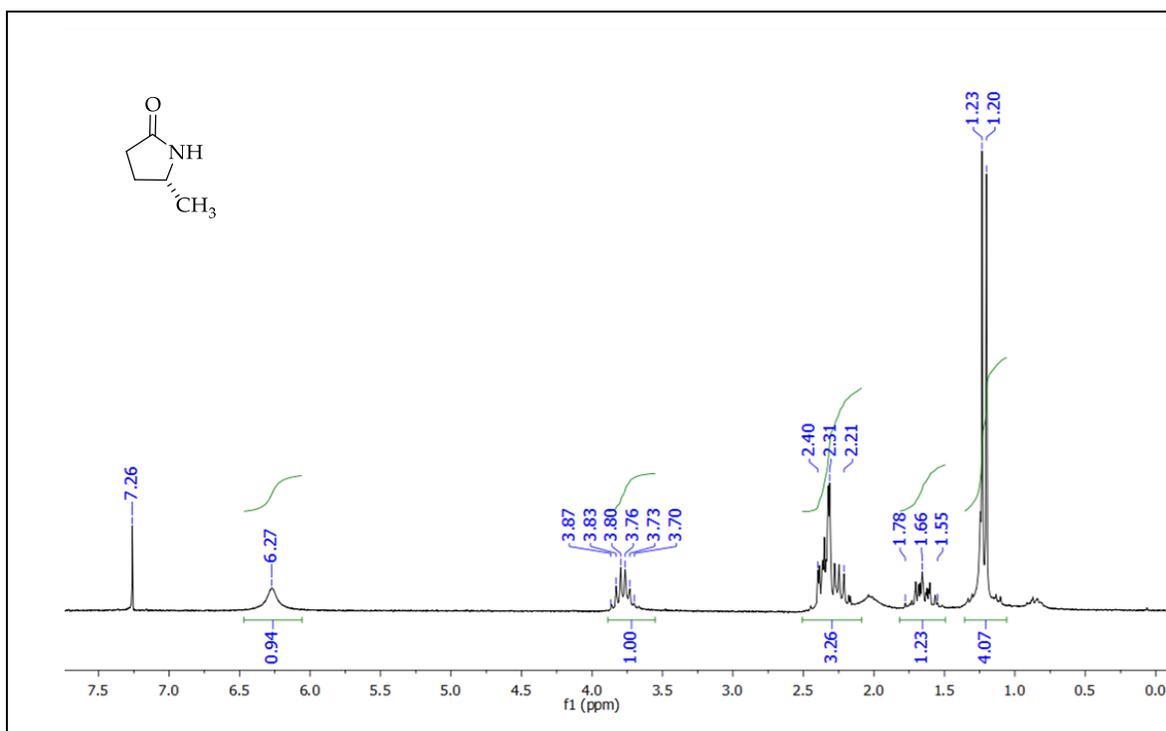
Espectro 28. RMN-¹³C (50 MHz, CD₃OD) Ácido (R)-(+)-4-(*tert*-Butoxicarbonil)amino-3-metilbutanoico, (R)-(+)-**12b**



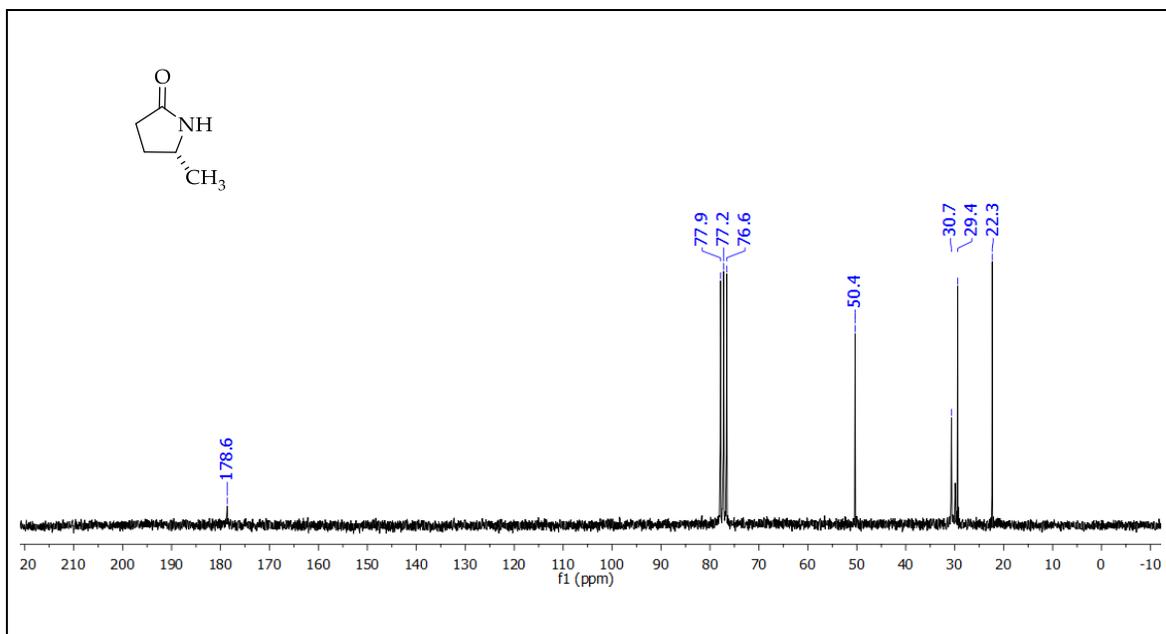
Espectro 29. RMN-¹H (200 MHz, CD₃OD) Ácido (R)-(-)-4-(*tert*-Butoxicarbonil)amino-2-metilbutanoico, (R)-(-)-**12c**



Espectro 30. RMN-¹³C (50 MHz, CD₃OD) Ácido (R)-(-)-4-(*tert*-Butoxicarbonil)amino-2-metilbutanoico, (R)-(-)-**12c**



Espectro 31. RMN-¹H (200 MHz, CDCl₃) (R)-(+)-5-Metil-2-pirrolidinona, (R)-(+)-14a



Espectro 32. RMN-¹³C (50 MHz, CDCl₃) (R)-(+)-5-Metil-2-pirrolidinona, (R)-(+)-14a

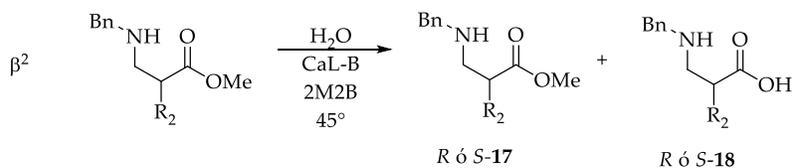
7. ANEXOS

Tabla 8. Resultados experimentales en la resolución de β^3 -, β^2 -, $\beta^{2,3}$ - γ^4 -, γ^3 -, γ^2 amino ésteres *N*-protegidos.

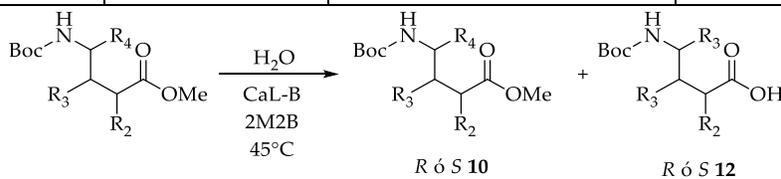
Entrada	<i>rac</i>	GP	Producto ^a	R ₃	c ^b	ee _s	ee _p	E ^c
1	15a	ABA	(<i>R</i>)-16a		50	nd	98	458.21
2	15b	Bz	(<i>R</i>)-16b		50	nd	98	458.21
3	15c	Boc	(<i>R</i>)-16c	CH ₃ -	50	nd	98	458.21
4	15d	Fmoc	(<i>R</i>)-16d		50	nd	98	458.21
5	15e	Cbz	(<i>R</i>)-16e		50	nd	98	458.21
6	15f	ABA	(<i>S</i>)-16f		32	nd	98	156.38
7	15g	Bz	(<i>S</i>)-16g		30	nd	98	149.78
8	15h	Boc	(<i>S</i>)-16h	Ph-	43	nd	98	220.73
9	15i	Fmoc	(<i>S</i>)-16i		14	nd	98	115.77
10	15j	Cbz	(<i>S</i>)-16j		28	nd	98	143.94

Entrada	<i>rac</i>	GP	Producto ^a	R ₂	c ^b	ee _s	ee _p	E ^c
11 ^d	17a		(<i>R</i>)-18a	CH ₃ -	45	nd	85	25.57
12 ^d	17b		(<i>S</i>)-18b	Ph-	23	nd	98	131.81
13 ^e	17c		(<i>S</i>)-18c	<i>t</i> Bu-	50	nd	98	458.21
14 ^f	19a		(<i>R</i>)-20a	CH ₃ -	51	98	95	179.68
15 ^f	19b		(<i>R</i>)-20b	CH ₃ CH ₂ -	48	91	97	209.85
16 ^f	19c		(<i>R</i>)-20c	CH ₃ (CH ₂) ₂ -	46	84	98	264.36
17 ^f	19d	Bn	(<i>R</i>)-20d	CH ₃ (CH ₂) ₃ -	20	23	94	40.48
18 ^f	19e		(<i>R</i>)-20e	CH ₃ (CH ₂) ₄ -	15	16	94	37.82
19 ^f	19f		(<i>R</i>)-20f	CH ₃ (CH ₂) ₅ -	13	13	91	24.11
20 ^f	19g		(<i>S</i>)-20g	Ph-	18	18	83	12.83
21 ^f	19h		(<i>S</i>)-20h	<i>t</i> Bu-	4	4	94	33.64
22 ^f	19i		(<i>S</i>)-20i	4-MeOPh-	1	1	80	9.09

Entrada	<i>rac</i>	GP	Producto ^a	R ₂	R ₃	c ^b	ee _s	ee _p	E ^c
23	17f	Bn	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-18f <i>trans</i>	CH ₃ -	CH ₃ -	29	nd	78	11.01
24	17g	Bn	(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-18g <i>cis</i>	CH ₃ -	CH ₃ -	35	nd	98	168.11



Entrada	rac	GP	Producto ^a	R ₂	c ^b	ee _s	ee _p	E ^c	
26	17d	Bn	(S)-18d	CH ₃ -	---	31	nd	7	1.19
	17e		(S)-18e	Ph	---	22	nd	6	1.15



Entrada	rac	GP	Producto ^a	R ₂	R ₃	R ₄	c ^b	ee _s	ee _p	E ^c
27	10a	Boc	(S)-6a	---	---	CH ₃ -	48	60	64	8.16
28	10b	Boc	(R)-6a	---	CH ₃ -	---	31	31	70	7.69
29	10c	Boc	(R)-6c	CH ₃ -	---	---	31	16	36	2.48

^a La configuración absoluta fue determinada con base a en datos experimentales reportados en la literatura

^b Calculado de la expresión $c = ee_s / (ee_s + ee_p)$

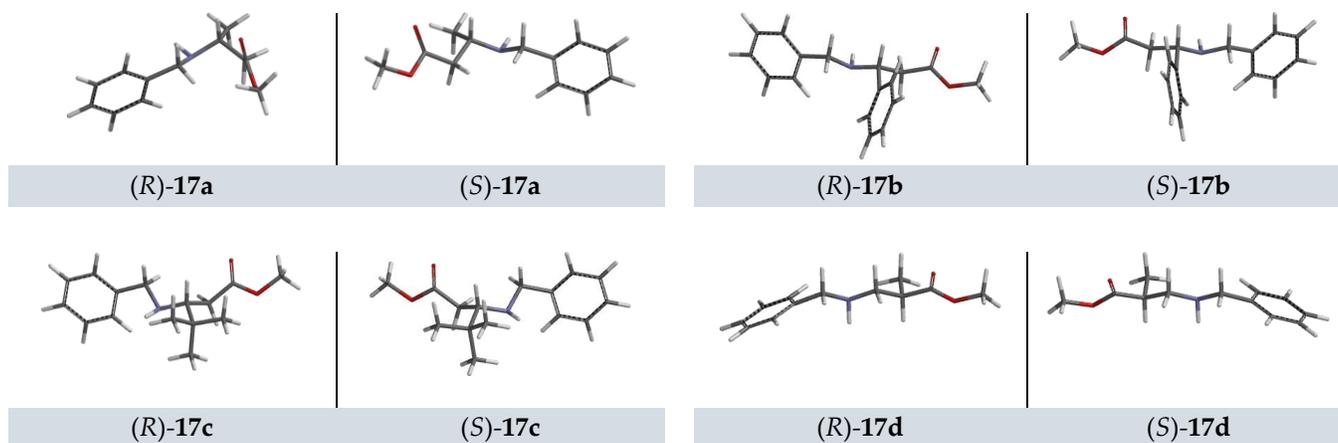
^c Calculado a partir de la expresión $E = \ln [1 - c(1 + ee_p)] / \ln [1 - c(1 - ee_p)]$

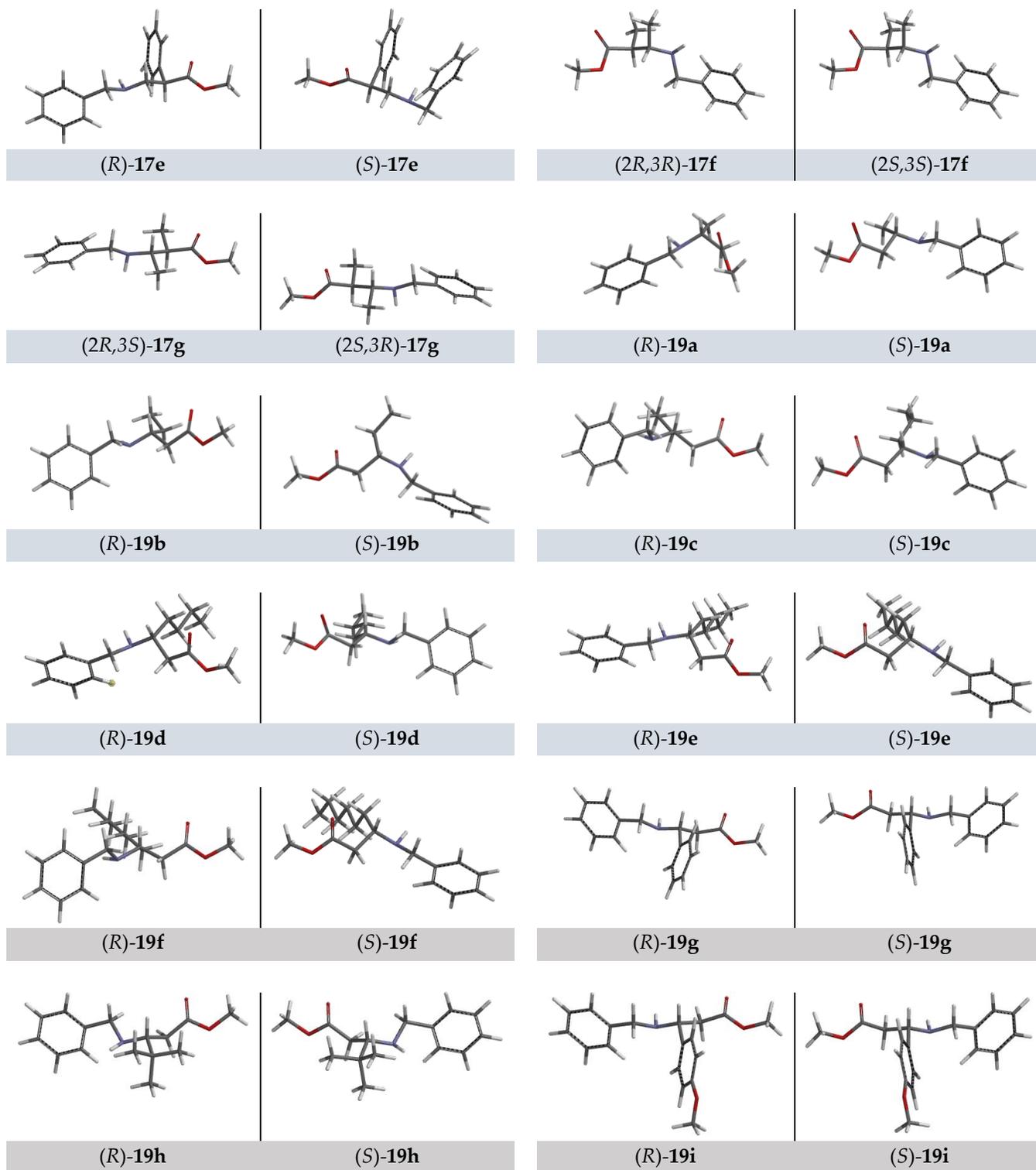
^d Reacción en hexano

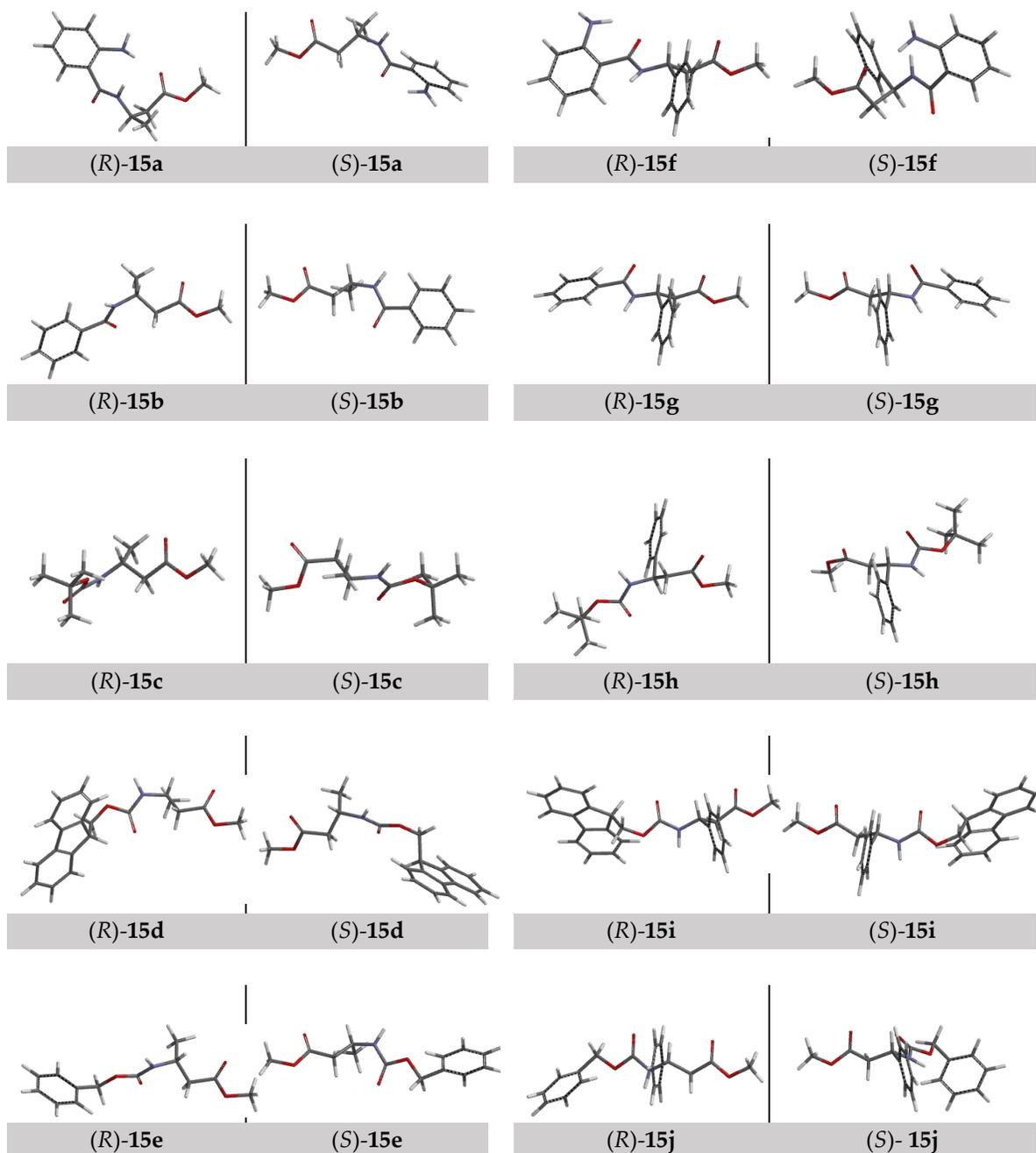
^e Reacción en HSBM

Figura 43. Estructuras optimizadas de:

β^3 -, β^2 -, $\beta^{2,3}$ -amino ésteres metílicos *N*-bencilados 17a-g y 19a-i





β^3 -amino ésteres metílicos *N*-protegidos 15a-j

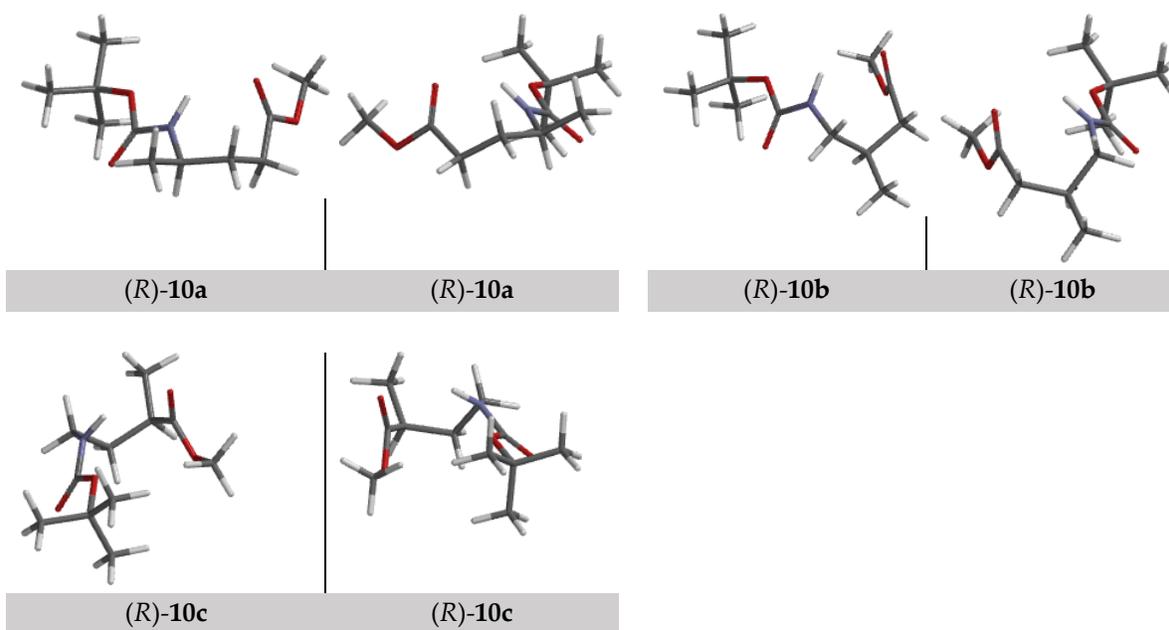
γ^4 -, γ^3 -, γ^2 -amino ésteres metálicos *N*-*tert*-butoxicarbonil protegidos **10a-c**

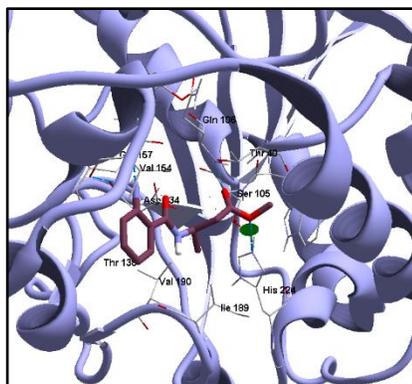
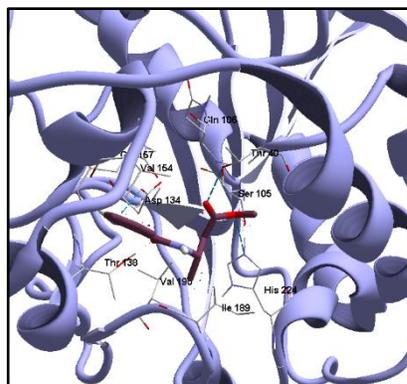
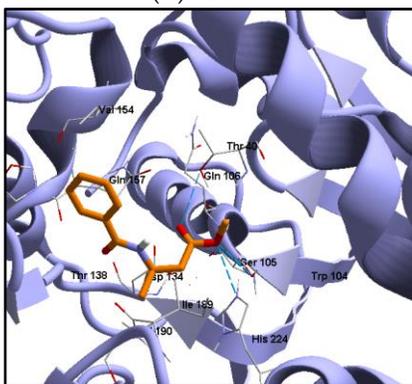
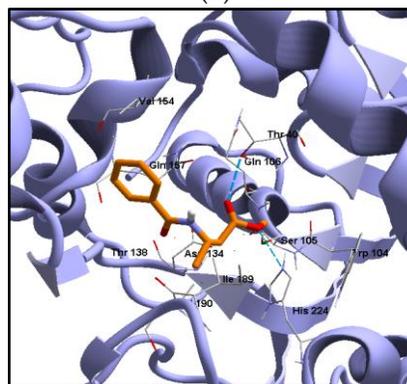
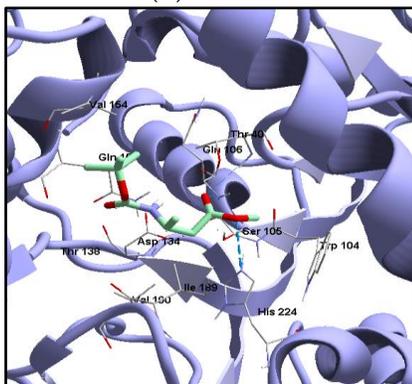
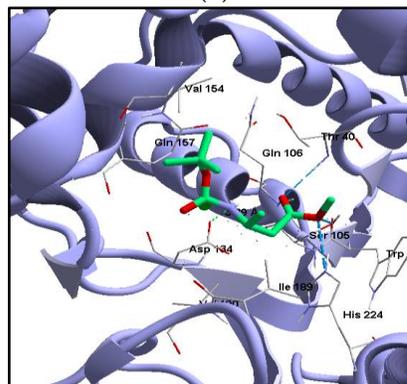
Tabla 9. Acoplamiento Molecular para los ligandos y CaL-B-1LBS en Kcal/mol.

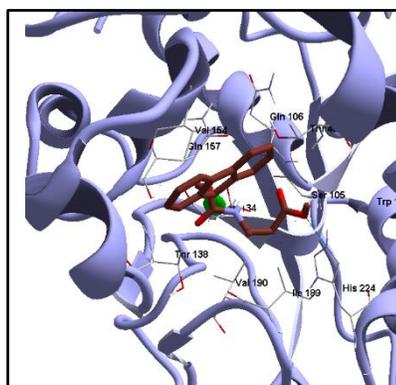
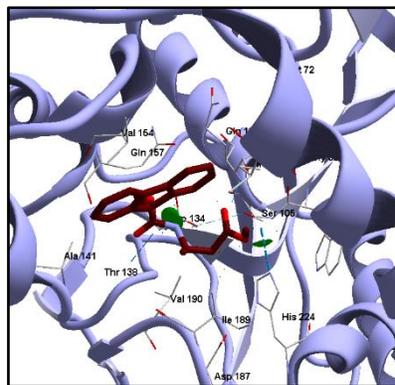
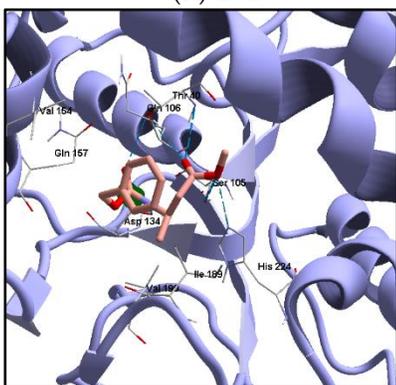
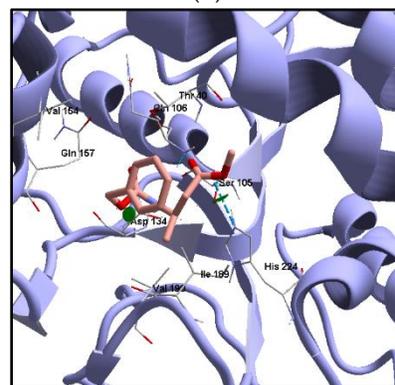
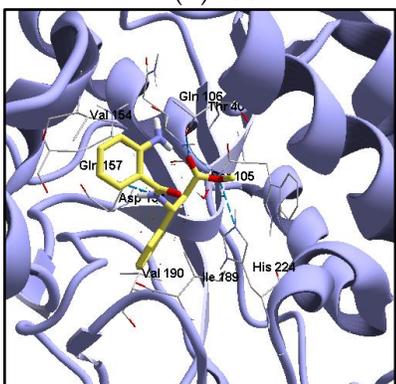
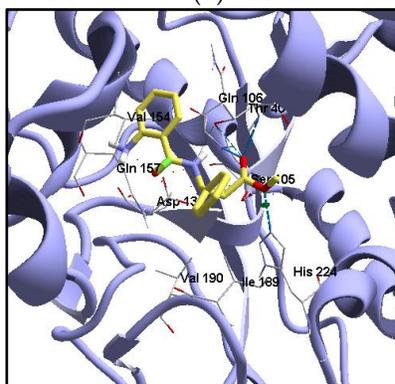
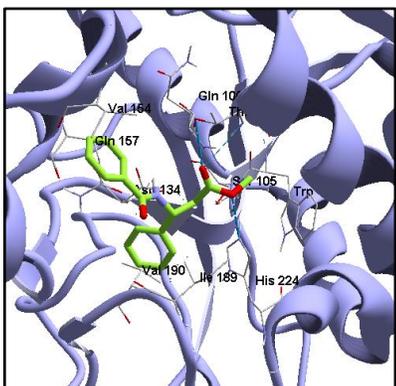
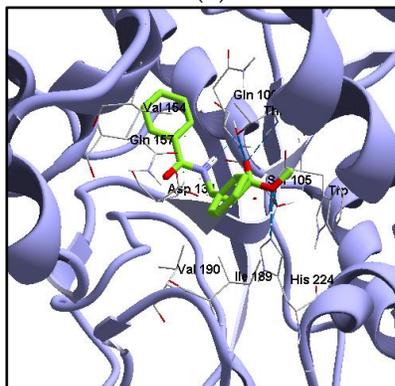
Ent.	Ligando	MolDock Score	E interacción	E interna	E enlaces de H	Amino ácidos relacionados								
						Residuos catalíticos				Interacciones estéricas		Región del acilo		
						Ser105	Hist224	Thr40	Gln106	Val190	Ile189	Asp134	Gln157	Val154
1	(R)-15a	-42.6	-58.0	15.4	-5.9	25.3	-11.6	-9.2	-5.0	0.4	-5.0	-7.9	-8.0	-7.8
2	(S)-15a	-4.5	-25.4	21.0	-3.0	-0.5	-10.2	-7.9	-2.6	1.1	30.3	-8.7	10.0	-5.1
3	(R)-15b	-8.3	-24.1	15.8	-5.0	-5.3	-9.2	-6.2	-2.2	19.7	3.0	-10.2	-10.4	-4.6
4	(S)-15b	63.5	46.1	17.4	5.0	54.4	-10.4	-6.2	2.0	-0.6	45.8	-8.6	-10.0	-2.4
5	(R)-15c	-63.5	-72.3	8.8	-7.9	5.2	-9.1	-13.7	-6.3	-3.2	-3.5	-9.6	-8.4	-5.5
6	(S)-15c	-32.9	-41.8	8.8	0.9	36.2	-11.7	-13.4	-7.6	0.5	-2.5	-10.2	-7.3	-6.4
7	(R)-15d	9.2	11.0	-1.8	-3.6	3.1	-7.8	35.1	-3.3	-4.9	-2.7	-10.2	-0.8	29.8
8	(S)-15d	105.3	107.8	-2.2	9.8	49.2	-11.6	149.5	-11.8	-1.6	-6.8	-10.1	-3.2	-7.2
9	(R)-15e	-59.4	-67.0	7.6	-10.5	2.9	-10.8	-17.2	-5.5	-2.1	2.8	-9.6	-7.0	-1.2
10	(S)-15e	-33.8	-45.7	12.0	2.1	26.9	-10.0	-10.6	-4.7	-2.8	-8.1	-10.0	-6.1	-5.9
11	(R)-15f	185.1	166.3	18.8	10.4	109.4	-12.5	0.3	-2.1	130.6	-10.0	-26.8	30.2	-8.1
12	(S)-15f	-16.0	-32.3	16.4	-12.1	22.8	-8.7	-20.9	-8.6	1.3	-6.7	-15.3	44.3	-0.6
13	(R)-15g	294.8	275.2	19.6	-3.8	18.6	-14.0	-11.1	-5.4	124.9	+0.6	-15.5	228.1	-0.9
14	(S)-15g	54.0	33.5	20.4	-9.6	17.5	-8.5	-17.3	-0.5	-1.8	-10.8	-12.6	96.1	-3.2
15	(R)-15h	185.1	180.4	4.7	-2.1	38.2	-15.2	-8.9	6.5	9.7	150.0	-16.1	-8.1	-1.0
16	(S)-15h	3.7	-9.2	12.9	-16.7	16.3	-9.0	-15.1	-14.4	-2.2	-13.3	-8.8	46.7	-7.0
17	(R)-15i	175.7	179.8	-4.1	1.1	12.3	-12.9	6.7	-1.3	-14.0	219.0	-11.4	46.0	-11.3
18	(S)-15i	14.8	21.1	-6.3	-6.9	-1.6	-16.2	35.0	-7.5	1.8	29.8	-11.6	33.2	-11.9
19	(R)-15j	105.6	94.5	11.2	-4.3	8.8	-9.3	0.7	-8.6	-12.3	15.8	-14.4	119.6	-11.0
20	(S)-15j	44.5	24.0	20.5	-7.6	34.9	-9.0	-20.1	-21.7	-1.6	-12.1	-15.9	99.5	-4.1
21	(R)-17a	-48.4	-62.4	13.9	-8.3	12.7	-9.0	-18.0	-6.7	-1.5	-4.1	-7.2	-13.0	7.5
22	(S)-17a	-12.4	-19.7	7.3	-1.5	-5.7	-7.9	-8.0	-1.2	35.1	-2.7	-8.3	-6.9	-4.4
23	(R)-17b	-2.2	-4.5	2.3	-6.8	14.3	-16.1	-13.7	-4.5	-9.2	49.5	-8.5	-6.5	-0.5
24	(S)-17b	-68.8	-79.4	10.6	-8.2	5.9	-9.1	-13.4	-5.7	-3.9	-5.9	-7.5	-12.6	-5.2
25	(R)-17c	-5.7	-21.7	16.1	-6.7	9.2	-13.9	-12.6	-5.0	3.2	50.0	-9.9	-12.2	-4.3
26	(S)-17c	72.1	53.7	18.3	15.1	101.0	-13.8	4.7	0.6	-3.2	10.0	-12.5	-5.9	-5.6
27	(R)-17d	8.0	-7.7	15.7	1.7	45.8	10.3	-9.3	-8.6	-1.8	-2.6	-10.3	13.8	-6.0
28 ^a		-73.5	-92.5	19.1	-13.0	-5.2	-9.0	-20.1	-6.1	-1.7	-4.5	-6.6	-9.3	-7.2
29	(S)-17d	25.6	11.0	14.6	8.1	61.2	13.2	-11.8	5.7	-0.8	-2.4	-9.2	-13.2	-8.5

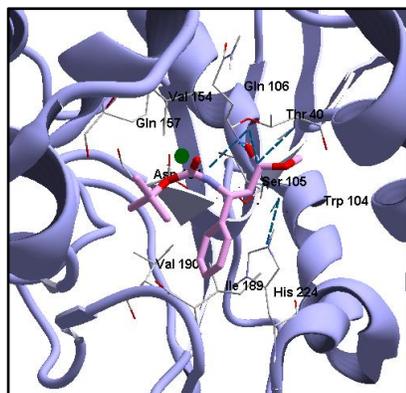
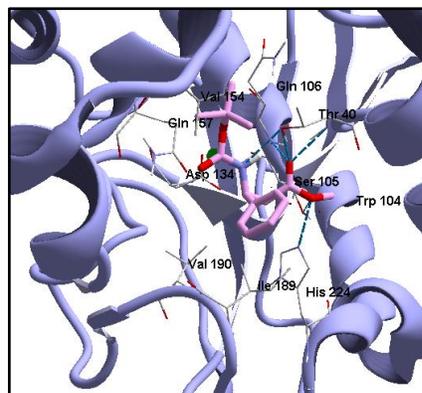
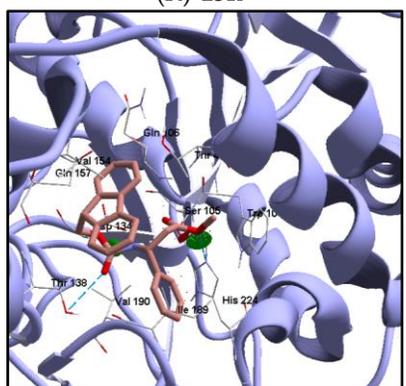
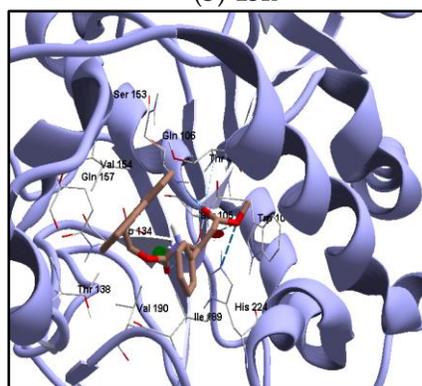
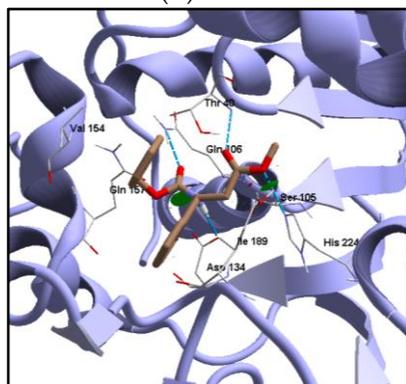
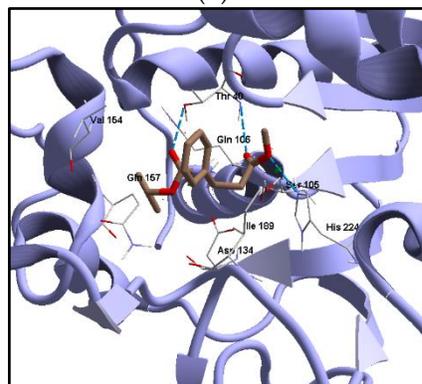
30 ^a		-73.0	-88.6	15.6	-9.1	-4.7	-10.9	-18.6	-3.8	-3.2	-5.8	-5.8	-4.3	-8.0
31	(R)-17e	12.3	3.0	9.3	3.4	49.7	-14.1	13.2	-4.2	2.7	-2.3	-12.8	0.6	-4.5
32 ^a		-99.1	-113.0	14.0	-10.9	-4.2	-10.0	-26.2	-5.3	-3.7	-6.3	-6.1	-12.7	-8.5
33	(S)-17e	23.9	11.0	12.9	0.0	26.9	-7.4	19.6	-7.4	-1.2	-3.9	-8.5	-0.6	20.0
34 ^a		-105.6	-112.2	6.6	-8.4	-7.2	-10.6	-22.4	-3.1	-3.7	-7.4	-6.8	-16.5	-8.4
35	(2R,3R)-17f	-0.2	-17.2	17.0	-3.1	-1.7	-9.7	-5.6	-8.7	1.4	-1.4	-8.2	17.3	0.4
36	(2S,3S)-17f	-18.6	-34.5	15.9	6.4	41.4	-12.3	-8.7	-4.3	---	-2.5	-10.0	-13.8	-6.1
37	(2S,3R)-17g	-56.1	-78.1	22.0	-5.0	11.2	-12.1	-17.4	-5.2	-2.7	-2.7	-7.3	-13.1	-7.7
38	(2R,3S)-17g	1.1	-16.6	17.7	-8.8	17.4	-11.8	27.9	-10.8	----	1.7	-9.0	0.6	-6.6
39	(R)-19a	-48.4	-62.4	13.9	-8.3	12.7	-9.0	-18.0	-6.7	-1.5	-4.1	-7.2	-13.0	7.5
40	(S)-19a	-12.4	-19.7	7.3	-1.5	-5.7	-7.9	-8.0	-1.2	35.1	-2.7	-8.3	-6.9	-4.4
41	(R)-19b	-38.1	-50.8	12.7	-7.5	13.2	-9.5	-11.7	-6.4	-2.9	-2.4	-7.4	-8.1	3.1
42	(S)-19b	-27.8	-38.7	10.9	-8.0	0.5	-11.2	-11.8	-3.8	3.9	13.8	-7.0	-2.9	-0.8
43	(R)-19c	-42.7	-54.0	11.3	-6.4	10.2	-9.3	-11.4	-6.3	-4.6	1.1	-7.2	-2.1	-3.3
44	(S)-19c	0.2	-7.4	7.5	-3.5	-5.6	-10.6	-3.1	-5.5	30.9	28.5	-10.8	-1.2	-8.6
45	(R)-19d	-76.0	-81.5	5.6	-9.1	2.7	-9.4	-17.2	-6.1	-3.3	-4.4	-7.1	-13.9	---
46	(S)-19d	13.8	5.9	7.4	-2.5	7.4	-15.2	15.7	-6.8	78.1	-8.9	-13.1	-10.3	-6.5
47	(R)-19e	-50.2	-58.1	7.8	-7.0	30.9	-9.6	-17.4	-7.3	-1.8	-7.5	-7.3	-12.4	-3.8
48	(S)-19e	-17.8	-26.1	8.3	-5.0	-5.0	-11.1	-11.0	-0.7	65.2	3.1	-16.9	-14.6	-6.9
49	(R)-19f	-107.4	-116.9	9.5	-7.1	-3.1	-5.7	-29.0	-5.6	-1.0	-7.7	-5.4	-15.7	-5.8
50	(S)-19f	115.7	106.5	9.2	1.9	43.3	-16.3	-10.7	-6.2	99.6	-7.1	-16.5	12.4	---
51	(R)-19g	-2.2	-4.5	2.3	-6.8	14.3	-16.1	-13.7	-4.5	-9.2	49.5	-8.5	-6.5	-0.5
52	(S)-19g	-68.8	-79.4	10.6	-8.2	5.9	-9.1	-13.4	-5.7	-3.9	-5.9	-7.5	-12.6	-5.2
53	(R)-19h	-5.7	-21.7	16.1	-6.7	9.2	-13.9	-12.6	-5.0	3.2	50.0	-9.9	12.2	-4.3
54	(S)-19h	72.1	53.7	18.3	15.1	101.0	-13.8	4.7	0.6	-3.2	10.0	-12.5	-5.9	-5.6
55	(R)-19i	196.1	173.5	22.6	1.4	25.9	-14.3	-10.5	-9.0	127.6	24.4	-17.8	84.2	-8.7
56	(S)-19i	-63.5	-70.3	6.9	-9.6	13.8	-11.5	-23.1	-6.4	-2.3	2.9	-5.5	-5.8	-7.0
57	(R)-10a	29.1	13.7	15.3	-2.6	22.8	-13.8	-5.2	-4.1	7.6	12.3	-11.9	---	-0.4
58	(S)-10a	-26.8	-34.6	7.8	1.1	43.4	-11.4	-9.7	-7.2	-0.9	-6.4	-9.7	-2.3	-3.2
59 ^b	(R)-10b	-20.0	-29.0	9.0	-1.3	25.3	-13.9	-11.5	-4.9	-2.9	13.6	-11.4	-1.5	-5.0
60 ^c	(R)-10b	-50.2	-61.2	11.0	-7.2	11.4	-9.7	-4.1	-5.5	-2.6	-2.1	-7.7	-13.1	-5.4
61	(S)-10b	-35.2	-45.7	10.5	-2.8	23.4	-11.9	-13.2	-7.4	-3.4	5.9	-7.5	-2.2	-5.2
62	(R)-10c	-32.3	-43.2	10.9	-7.6	24.6	-12.7	-11.7	-5.0	-2.1	0.9	-7.7	-6.3	-2.8
63	(S)-10c	-28.7	-36.7	8.0	-1.5	13.6	-11.5	-8.8	-4.6	-1.3	-5.6	-9.7	10.1	-4.5

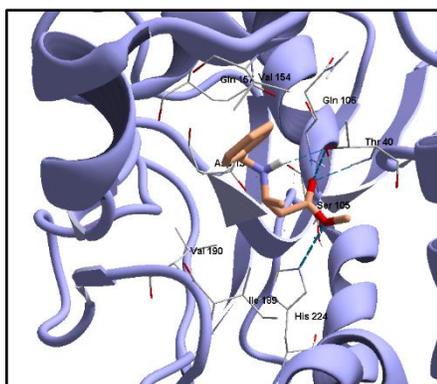
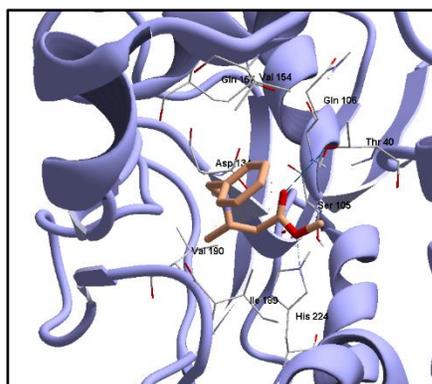
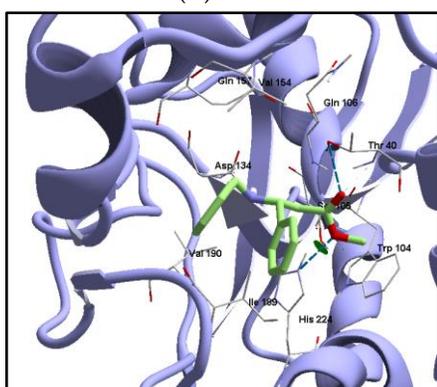
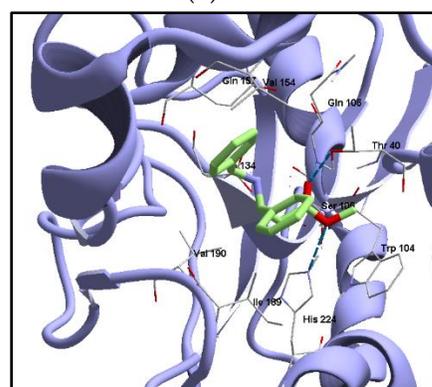
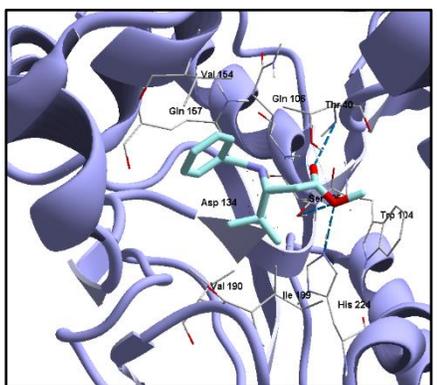
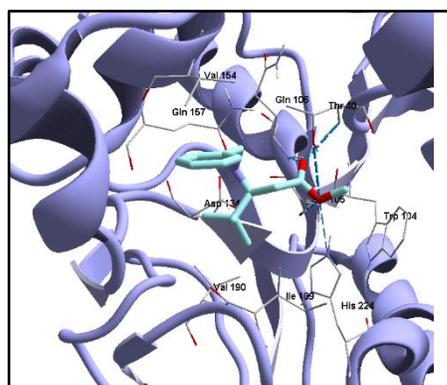
a. Reoptimización del acoplamiento molecular. b. Conformación plegada. c. Conformación extendida

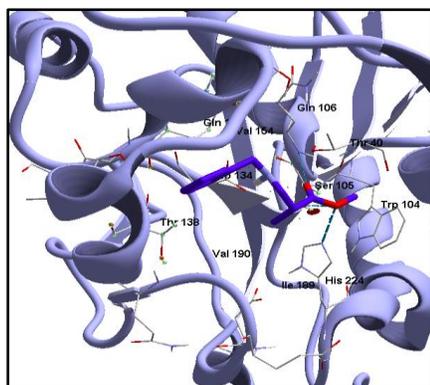
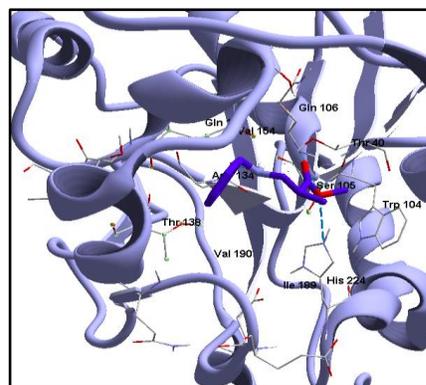
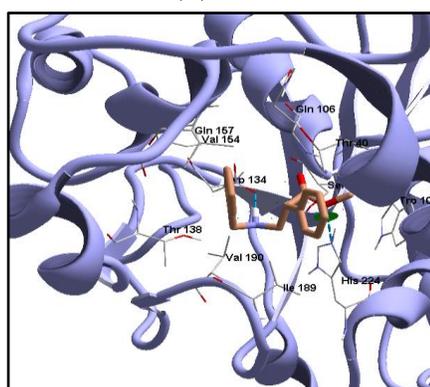
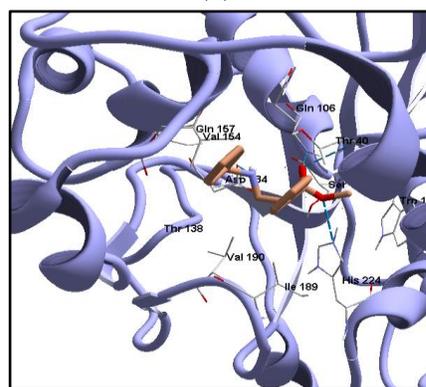
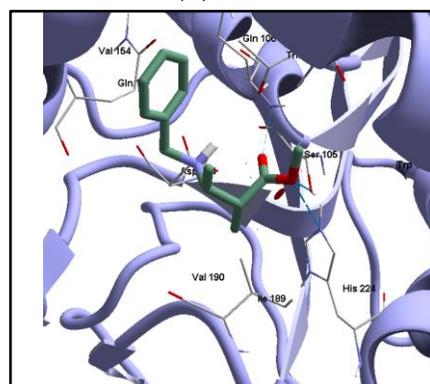
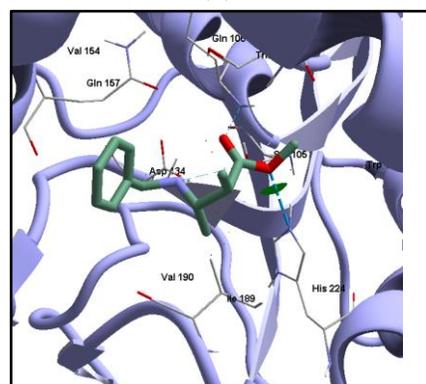
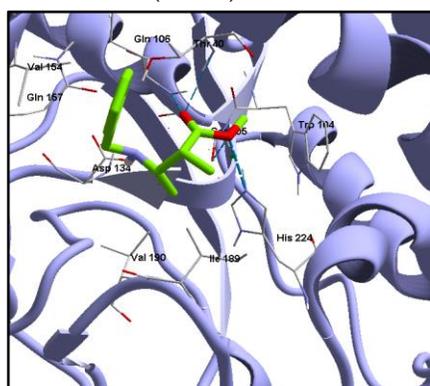
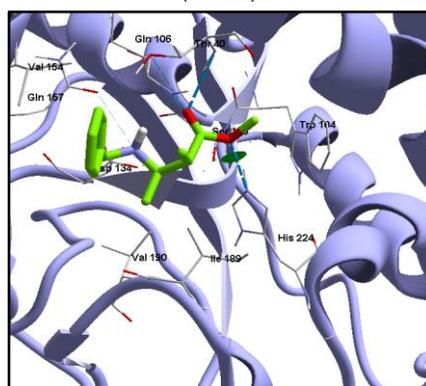
IMÁGENES DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR

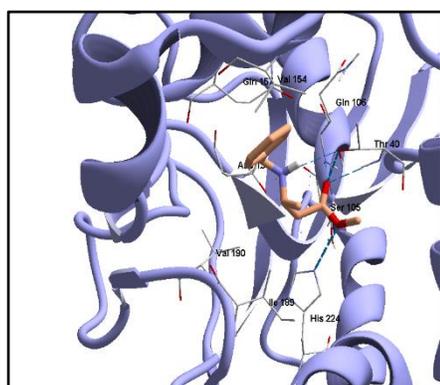
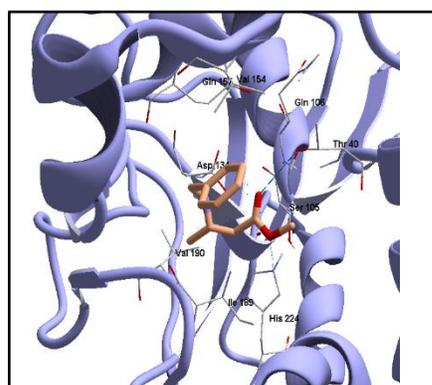
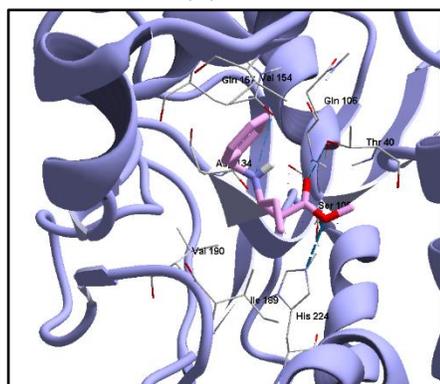
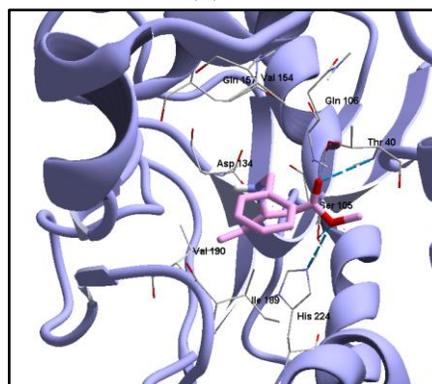
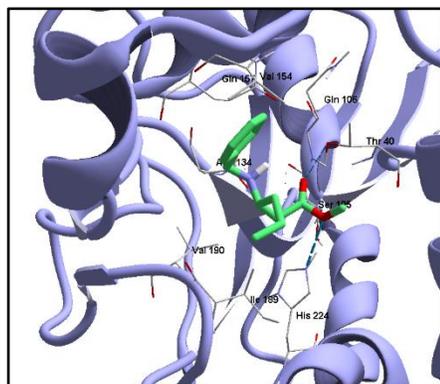
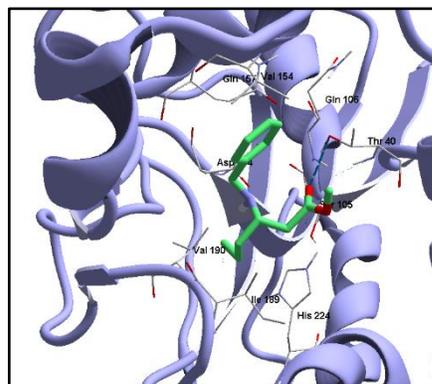
 β^3 -amino ésteres metílicos *N*-protegidos **15a-j***(R)*-15a*(S)*-15a*(R)*-15b*(S)*-15b*(R)*-15c*(S)*-15c

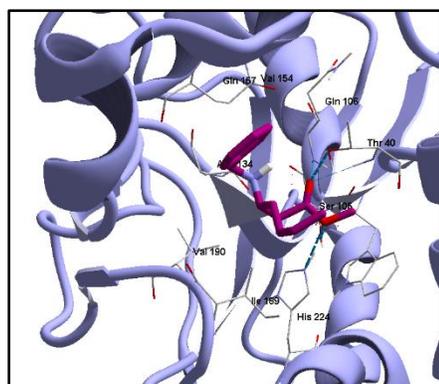
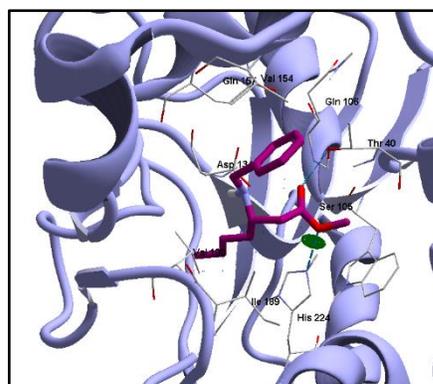
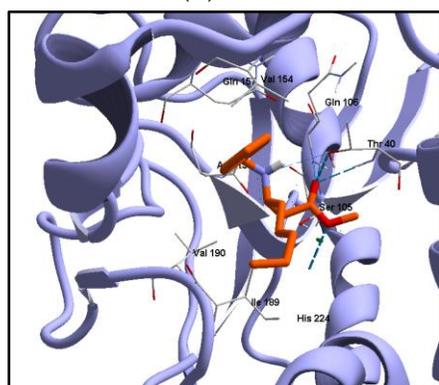
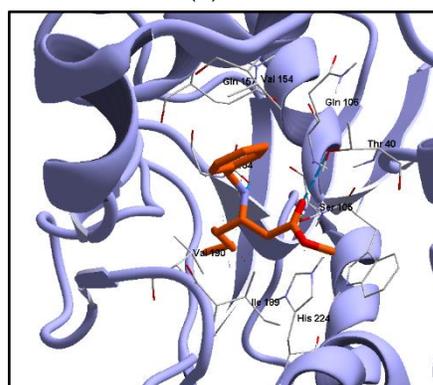
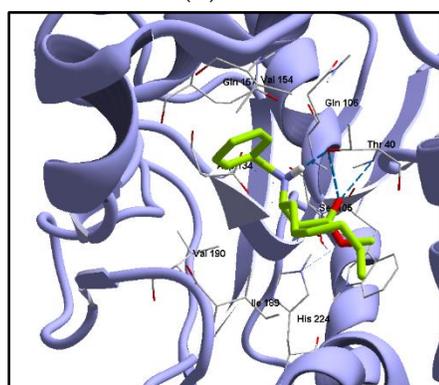
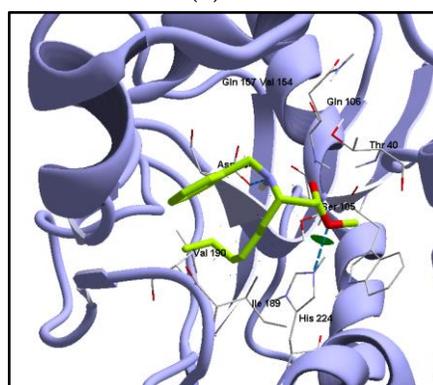
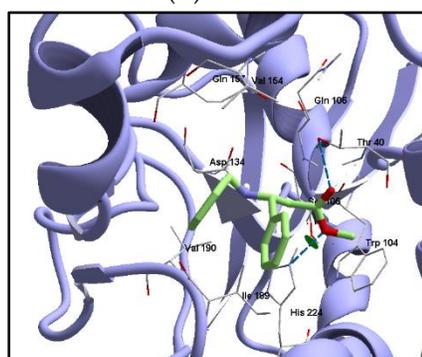
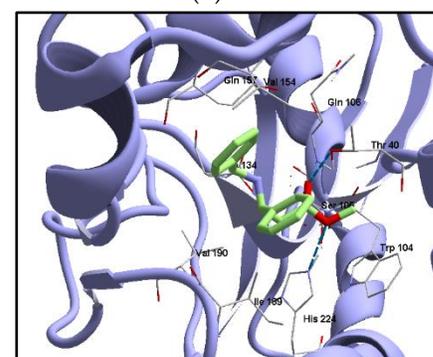
**(R)-15d****(S)-15d****(R)-15e****(S)-15e****(R)-15f****(S)-15f****(R)-15g****(S)-15g**

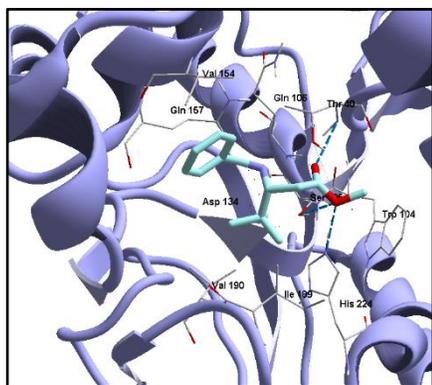
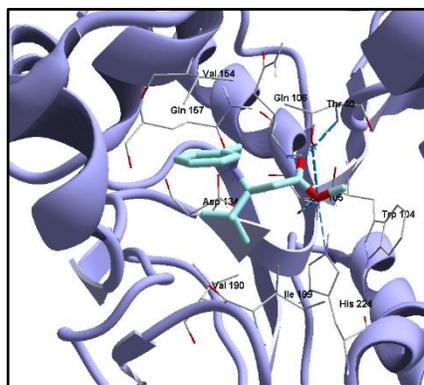
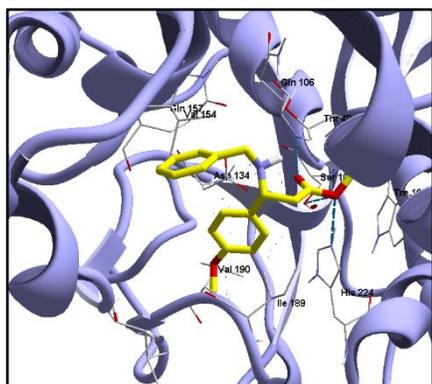
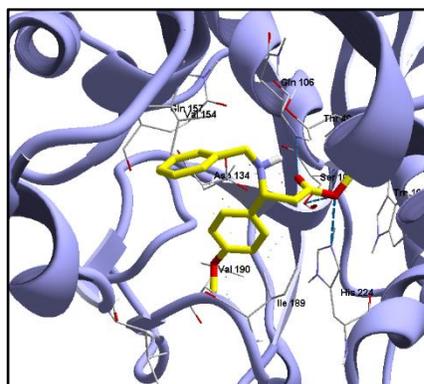
**(R)-15h****(S)-15h****(R)-15i****(S)-15i****(R)-15j****(S)-15j**

β^3 -, β^2 -, $\beta^{2,3}$ -amino ésteres metílicos *N*-bencilados **17a-g** y **19a-i****(R)-17a****(S)-17a****(R)-17b****(S)-17b****(R)-17c****(S)-17c**

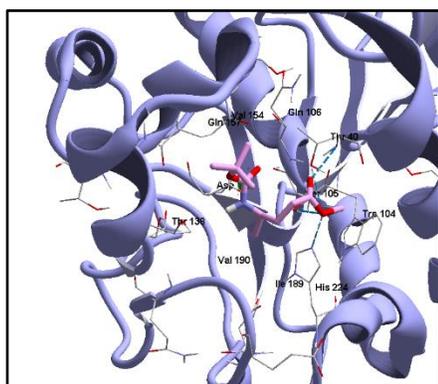
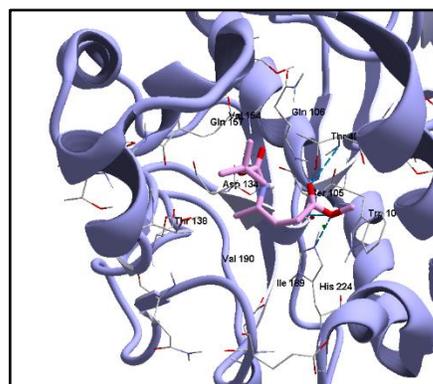
**(R)-17d****(S)-17d****(R)-17e****(S)-17e****(2R,3R)-17f****(2S,3S)-17f****(2R,3S)-17g****(2S,3S)-17g**

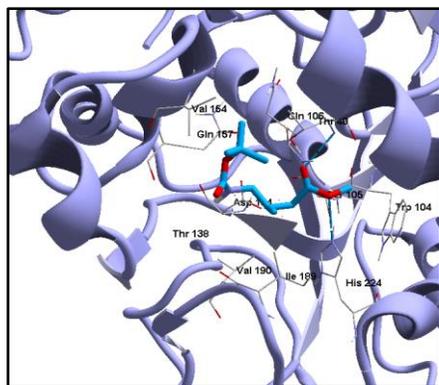
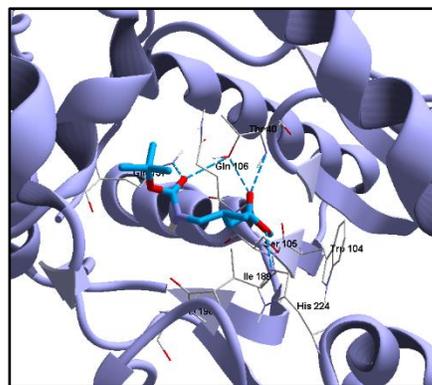
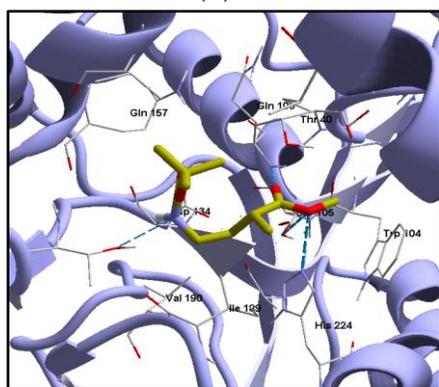
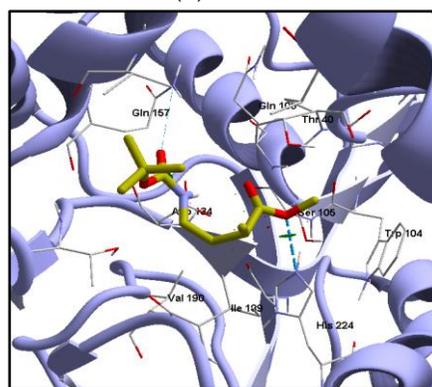
**(R)-19a****(S)-19a****(R)-19b****(S)-19b****(R)-19c****(S)-19c**

**(R)-19d****(S)-19d****(R)-19e****(S)-19e****(R)-19f****(S)-19f****(R)-19g****(S)-19g**

**(R)-19h****(S)-13h****(R)-19i****(S)-19i**

γ^4 -, γ^3 -, γ^2 -amino ésteres metálicos *N*-*tert*-butoxicarbonil protegidos 10a-c.

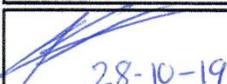
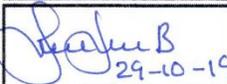
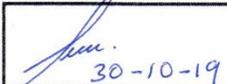
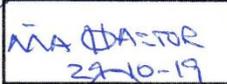
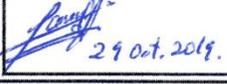
**(R)-10a****(S)-10a**

**(R)-10b****(S)-10b****(R)-10c****(S)-10c**

**DR. VICTOR BARBA LÓPEZ
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE**

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada "Síntesis y resolución de β - y γ -amino ésteres catalizada por CaL-B" que presenta la alumna **Marina Argelia Ortega Rojas (5620120501)** para obtener el título de **Doctor en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dr. Enrique Rudiño Piñera IBT-UNAM	Aprobado	 28-10-19
Dra. Laura Patricia Álvarez Berber CIQ-UAEM	APROBADO	 29-10-19
Dr. Héctor Manuel Luna Contla UAM-Xochimilco	Aprobado	 30-10-19
Dra. Carmen Nina Pastor Colón CIDC-UAEM	Aprobado	 29-10-19
Dr. Ismael León Rivera CIQ-UAEM	Aprobado	 29 oct 2019
Dr. Edmundo Castillo Rosales IBT-UNAM	APROBADO	 23.10.2019
Dr. Jaime Escalante García CIQ-UAEM	Aprobado	 29 Oct. 2019.