Departamento de Química Orgánica e Inorgánica

Máster Universitario en Química y Desarrollo Sostenible

Reacciones de perhidrólisis catalizadas por lipasas para la oxidación de cetonas cíclicas. Desarrollo de procesos oxidativos en cascada.

Trabajo Fin de Máster

Julio 2014

Daniel González Martínez

DANIEL GONZÁLEZ MARTÍNEZ, estudiante del Máster Universitario "Química y Desarrollo Sostenible", organizado por el Centro Internacional de Postgrado de la Universidad de Oviedo

PRESENTA

El trabajo titulado **"Reacciones de perhidrólisis catalizadas por lipasas para la oxidación de cetonas cíclicas. Desarrollo de procesos oxidativos en cascada."**, que ha sido realizado en el Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo.

Este trabajo de investigación se ha llevado a cabo bajo la tutela de la Profesora Titular Francisca Rebolledo Vicente, y la supervisión del Profesor Titular Vicente Gotor Fernández, todos ellos miembros del Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo, los cuales autorizan su presentación para que sea calificado como Proyecto Fin de Máster.

Oviedo, 9 de Julio 2014

Firmado por:

Vicente Gotor Fernández Francisca Rebolledo Vicente

Daniel González Martínez

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Ac	Acilo
AcOH	Ácido acético
AcOEt	Acetato de etilo
Ar	Arilo
Asp	Ácido aspártico
Bn	Bencilo
BVMO	Bayer-Villiger Monooxigenasas
ºC	Grados Celsius
CAL-B	Lipasa de *Candida antarctica* de tipo B
CG	Cromatografía gaseosa
cm^{-1}	Ciclos por centímetro
CMC	Concentración micelar crítica
CRL	Lipasa de *Candida rugosa*
d	Doblete
Da	Dalton
dd	Doble doblete
ddd	Doble doblete de dobletes
DEPT	Aumento de distorsión por transferencia de polarización (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*)
DMF	*N*,*N*-Dimetilformamida
dt	Doble triplete
E	Enzima
EC	Enzyme Commission (Comisión Enzimática)
ee	Exceso enantiomérico

EM	Espectrometría de masas
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
ES	Complejo enzima-sustrato
ESI^+	Ionización por electrospray en modo positivo
Et	Etilo
EtOH	Etanol
Et_2O	Dietil éter
g	Gramos
Glu	Ácido glutámico
h	Horas
His	Histidina
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
Hz	Hertzios
IR	Infrarrojo
IUN	Definición de unidades (*Interesterification Unit Novo*)
IT	Intermedio tetraédrico
J	Constante de acoplamiento
k	Constante de velocidad (reacción no catalizada)
k_{cat}	Constante de velocidad de la reacción enzimática
K_{ET}	Constante de equilibrio del estado de transición
K_M	Constante de Michaelis-Menten
L	Litros
m	*meta*
m	Metros

m	Multiplete
Me	Metilo
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
MCPBA	Ácido *meta*-cloroperbenzoíco
min	Minutos
mM	Milimolar
mmol	Milimol
m/z	Relación masa/carga
NAD^+	Dinucleótido de nicotinamida-adenina
NADH	Dinucleótido de nicotinamida-adenina reducido
$NADP^+$	Dinucleótido fosfato de nicotinamida-adenina
NADPH	Dinucleótido fosfato de nicotinamida-adenina reducido
Nu	Nucléofilo
o	*orto*
p	*para*
ppm	Partes por millón
Ph	Fenilo
PLU/g	Definición de unidades (1 μmol laurato de propilo formado por minuto/g enzima inmobilizado a 40 °C y pH 7.5)
PSL-SD	Lipasa de *Pseudomonas cepacia* soportada en diatomita
q	Cuatriplete
rdto	Rendimiento
R_f	Factor de retención
RML	Lipasa de *Rhizomucor miehei*

RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
s	Singulete
S	Sustrato
Ser	Serina
sp.	*species*
t	Triplete
T	Temperatura
t.a.	Temperatura ambiente
TBME	*terc*-butilmetil éter
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía de capa fina (*Thin Layer Chromatography*)
t_R	Tiempo de retención
U	Unidades de actividad enzimática
U/g	Unidades enzimáticas/gramo de proteína
UHP	Complejo urea-peróxido de hidrógeno
uma	Unidades de masa atómica
UV	Ultravioleta
δ	Desplazamiento químico
ν	Frecuencia

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN **1**

1.1. QUÍMICA SOSTENIBLE Y BIOCATÁLISIS **3**

1.1.1. Tipos de biocatalizadores **7**

1.1.2. Catálisis enzimática **10**

1.2. HIDROLASAS **13**

1.2.1. Lipasas **13**

1.2.1.1. Activación interfacial **14**

1.2.1.2. Mecanismo de las serin-hidrolasas **15**

1.2.1.3. Reacciones no convencionales catalizadas por hidrolasas **19**

1.2.1.4. La lipasa de *Candida antarctica* tipo B **20**

ANTECEDENTES **23**

2.1. OXIDACIONES MEDIADAS POR HIDROLASAS **26**

2.2. TRANSFORMACIONES OXIDATIVAS CON LIPASAS **30**

2.2.1. Epoxidación mediada por lipasas **31**

2.2.2. Reacción de Baeyer-Villiger mediada por lipasas **36**

OBJETIVOS **41**

RESULTADOS Y DISCUSIÓN **45**

4.1. REACCIÓN DE BAEYER VILLIGER DE LA CICLOBUTANONA **49**

4.2. SÍNTESIS Y REACCIÓN DE BAEYER VILLIGER DE DISTINTAS CICLOBUTANONAS SUSTITUIDAS EN LA POSICIÓN 3 ..... **52**

4.2.1. Síntesis de las ciclobutanonas 1b-i **52**

4.2.2. Oxidaciones de Baeyer Villiger de las ciclobutanonas 1b-l mediadas por la CAL-B **55**

4.3. REACCIONES DE BAEYER VILLIGER DE DERIVADOS DE CICLOPENTANONA Y CICLOHEXANONA **57**

CONCLUSIONES **59**

PARTE EXPERIMENTAL **63**

6.1. DISOLVENTES Y REACTIVOS GENERALES **65**

6.2. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS **66**

6.2.1. Cromatografía en gel de sílice **66**

6.2.2. Resonancia magnética nuclear (RMN) **66**

6.2.3. Espectroscopía infrarroja (IR) **67**

6.2.4. Puntos de fusión **67**

6.2.5. Espectrometría de masas (EM) **67**

6.2.6. Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) **67**

6.2.7. Cromatografía de gases (CG) **67**

6.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES **70**

6.3.1. Síntesis química de la 3-metil-3-fenilciclobutanona (1b) **70**

6.3.2. Síntesis química de las ciclobutanonas 1c-g **71**

6.3.3. Síntesis química del 3-oxociclobutanocarboxilato de etilo (1h) **72**

6.3.4. Síntesis química del 3-oxociclobutanocarboxilato de bencilo (1i) **73**

6.3.5. Síntesis química de lactonas con ácido *m*-cloroperbenzoico **73**

6.3.6. Procedimiento general para la síntesis quimioenzimática de lactonas utilizando ácido láurico **73**

6.3.7. Procedimiento general para la síntesis de lactonas empleando la CAL-B en AcOEt **74**

6.4. DATOS EXPERIMENTALES: CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL **75**

REFERENCIAS **95**

APÉNDICE DE ESPECTROS **103**

INTRODUCCIÓN

1.1. QUÍMICA SOSTENIBLE Y BIOCATÁLISIS

El desarrollo científico y tecnológico ha experimentado un crecimiento exponencial en las últimas décadas en muy diversas áreas, concretamente en la química moderna, que ha permitido incrementar en gran medida la calidad de vida de los seres humanos. Sin embargo, los efectos secundarios de este progreso, debidos a la explotación indiscriminada de los recursos naturales y la contaminación asociada a los residuos generados, han causado graves problemas en el medioambiente y en la salud de la población global.[1] Por ello, la necesidad de alcanzar un desarrollo sostenible que asegure unas condiciones sociales, medioambientales y económicas adecuadas para las futuras generaciones es un aspecto crítico en diferentes ámbitos científicos, tecnológicos y políticos.

Dentro del marco del desarrollo sostenible, la química es uno de los campos relevantes debido a la gran variedad y cantidad de sustancias químicas producidas industrialmente, y que se utilizan como materias primas en otros procesos o bien con aplicación directa. En algunos casos estas sustancias provocan un gran impacto medioambiental y riesgos en la salud, afectando a la seguridad de los trabajadores. La Química Sostenible trata de cambiar la forma convencional de llevar a cabo estos procesos, diseñando procedimientos y productos químicos que eliminen o reduzcan la formación de sustancias peligrosas. Con este fin e introducidos por Anastas a través de la EPA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos), se definieron los 12

[1] (a) Anastas, P; Eghbali, N., *Chem. Soc. Rev*. **2010**, *39*, 301. (b) Li, C-J.; Anastas, P., *Chem. Soc. Rev*. **2012**, *41*, 1413.

Principios de la Química Verde en el año 1998,[2] cuyas iniciales forman la palabra PRODUCTIVELY que resume el objetivo de las políticas sostenibles:[3]

1.- ***P****revent wastes*: prevenir la formación de residuos en lugar de tratarlos o limpiarlos posteriormente.

2.- ***R****enewable materials*: emplear materias primas y fuentes de energía renovables.

3.- ***O****mit derivatization steps*: acortar las rutas sintéticas evitando pasos de reacción innecesarios.

4.- ***D****egradable chemical products*: diseñar compuestos que se degraden en sustancias inocuas una vez cumplida su función.

5.- ***U****se safe synthetic methods*: utilizar metodologías que utilicen y generen sustancias con la mínima toxicidad para la salud y el medioambiente.

6.- ***C****atalytic reagents*: emplear reactivos catalíticos con la mayor selectividad posible.

7.- ***T****emperature and pressure ambient*: utilizar condiciones de reacción suaves que requieran menor aporte energético.

8.- ***I****n-process monitoring*: emplear metodologías analíticas que permitan monitorizar y controlar los procesos a tiempo real.

9.- **V**ery *few auxiliary substances*: evitar el empleo de sustancias no implicadas directamente en la reacción o, en caso de ser necesarias, elegir aquellas que sean inocuas.

10.- ***E****-factor, maximise feed in product*: desarrollar métodos sintéticos que maximicen la incorporación de los átomos de los reactivos en los productos.

---

[2] Anastas, P.; Warner, J. C., *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: New York, 1998.

[3] (a) Wenda, S.; Illner, S.; Mell, A.; Kragl, U., *Green Chem.* **2011**, *130*, 3007; (b) Ran, N.; Zhao, L.; Chen, Z.; Tao, J., *Green Chem.* **2008**, *10*, 361.

11.- ***L****ow toxicity of chemical products*: diseñar los productos de forma que se reduzca su toxicidad preservando su función

12.- ***Y****es, it is safe*: elegir sustancias y procedimientos que minimicen los riesgos de accidentes.

Desde el nivel básico de la investigación, estudiando nuevas reacciones y rutas sintéticas acordes con los principios, hasta llegar a la innovación y adaptación de metodologías para su implantación a escala industrial, deben desarrollarse nuevas alternativas y aspectos prácticos de la síntesis orgánica con el fin de lograr la sostenibilidad. En definitiva, se deben realizar esfuerzos con el objeto de beneficiar al medioambiente mediante el uso de sustancias menos tóxicas, reciclables o biodegradables y evitando la generación de residuos.[4]

En este contexto, y de forma paralela al fomento del desarrollo sostenible, la Biocatálisis ha experimentando un crecimiento exponencial en los últimos treinta años. Esto ha sido posible gracias al desarrollo de las técnicas de ingeniería genética y evolución dirigida, así como la modelización molecular y los cálculos computacionales, permitiendo el diseño de nuevos catalizadores para su aplicación en nuevas transformaciones sintéticas, o bien para la explicación y mejora de los resultados existentes. El número de publicaciones relacionadas con la Biocatálisis (Figura 1) y los procesos industriales que cuentan con algún paso de reacción catalizado por enzimas aumenta continuamente hoy en día, estando presentes tanto en industrias de base (conversión de materias primas en otros intermedios como la producción de plásticos) o en la industria de transformación o *química fina*, especialmente en la producción de fármacos enantioméricamente puros.[5]

[4] (a) Poliakoff, M.; Licence, P., *Nature* **2007**, *450*, 810; (b) Tang, S. Y.; Bourne, R. A.; Smith, R. L.; Poliakoff, M., *Green Chem.* **2008**, *10*, 268.
[5] (a) Gotor, V., *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6*, 420; (b) Sutton, P. W.; Adams, J. P.; Archer, I.; Auriol, D.; Avi, M.; Branneby, C.; Collis, A. J.; Dumas, B.; Eckrich, T.; Fotheringham, I.;

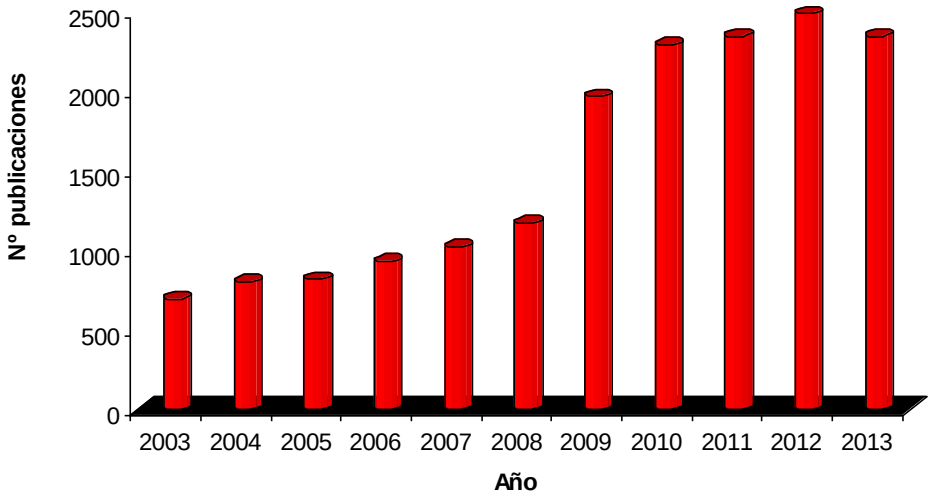


Figura 1. Número de publicaciones mostradas en la base de datos *SciFinder* al buscar el concepto "Biocatálisis" en la última década.

El término biotransformación aglutina todas aquellas transformaciones de compuestos químicos llevadas a cabo por la acción de un sistema biológico, que pueden ser células enteras de microorganismos, o bien enzimas aislados. El interés suscitado por este tipo de procesos se atribuye a dos motivos principales: las aplicaciones sintéticas que presentan este tipo de catalizadores por su elevada eficacia y selectividad y, por otro lado, su perfecta adaptación a los objetivos y principios de la Química Verde al ser procesos benignos con el medio ambiente.

Muestra de la gran importancia de la Biocatálisis en el contexto de la Química Verde es la gran cantidad de investigadores o industrias premiadas por la EPA, con los galardones conocidos como *Presidential Green Chemistry Challenge Award*, por el

Halle, R.; Hanlon, S.; Hansen, M.; Holt-Tiffin, K. E.; Howard, R. M.; Huisman, G. W.; Iding, H.; Kiewel, K.; Kittelmann, M.; Kupfer, E.; Laumen, K.; Lefèvre, F.; Luetz, S.; Mangan, D. P.; Martin, V. A.; Meyer, H.-P.; Moody, T. S.; Osorio-Lozada, A.; Robins, K.; Snajdrova, R.; Truppo, M. D.; Wells, A.; Wirz, B.; Wong, J. W., *Biocatalysis in the Fine Chemical and Pharmaceutical Industries, in Practical Methods for Biocatalysis and Biotransformations 2*, John Wiley & Sons: Chichester, 2012.

desarrollo o implementación de nuevos procesos biocatalíticos y rutas sintéticas quimioenzimáticas, que mejoran otras síntesis anteriores.[6]

1.1.1. Tipos de biocatalizadores

Las reacciones químicas en los organismos vivos están catalizadas por los enzimas, macromoléculas constituidas por cadenas polipeptídicas formadas a partir de los veinte α-aminoácidos naturales, que poseen estructuras estabilizadas gracias a la formación de diferentes enlaces intramoleculares (enlaces de hidrógeno entre los restos polares y moléculas de agua, fuerzas de dispersión de London entre las cadenas hidrófobas o π-π *stacking* entre sistemas aromáticos). La catálisis ocurre en una pequeña zona de la proteína denominada centro activo, en el que participan unos pocos aminoácidos y, en algunos casos, intervienen también átomos metálicos. Algunos tipos de enzimas necesitan otras especies no proteicas denominadas cofactores para ser operativas y actúan directamente sobre los sustratos en el centro activo, siendo los verdaderos reactivos en las reacciones de oxidación-reducción, transferencia, etc. Por ejemplo, la nicotinamida adenina dinucleótido (fosfato) [$NAD(P)^+$] es la verdadera especie reductora en todos los procesos enzimáticos redox que implican la adición de hidrógeno.

Para llevar a cabo una biotransformación se puede utilizar el catalizador de dos formas: emplear células enteras de microorganismos o, alternativamente, usar enzimas aislados y purificados. Dependiendo del tipo y las características del proceso enzimático a desarrollar se elige un método u otro. Cuando los enzimas necesitan cofactor es interesante utilizar células enteras que ya los contienen en su interior, y además poseen los mecanismos necesarios para llevar a cabo su reciclaje, pudiendo catalizar varios

[6] U. T. Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K., *Nature* **2012**, *485*, 185.

procesos secuencialmente si poseen enzimas con diferentes actividades. Esta a priori ventaja del método biocatálitico, puede ser a su vez un inconveniente al poder ocurrir reacciones laterales y generar mezclas de productos.

Por el contrario, si bien el aislamiento y la purificación de los enzimas aislados suele ser un proceso caro, su empleo resulta más sencillo, presentando estos una mayor selectividad en la reacción, así como una mayor tolerancia a las condiciones de reacción. De esta manera, se ha demostrado la estabilidad de algunos biocatalizadores en disolventes distintos al agua, que es el medio natural de los enzimas.

Con el fin de aumentar la estabilidad de las proteínas frente a la desnaturalización y facilitar el reciclaje de los biocatalizadores, estos se suelen inmovilizar sobre un soporte sólido inerte e inmiscible en el medio de reacción,[7] lo que permite su aplicación a nivel industrial. Así, es posible inmovilizar tanto enzimas como células enteras y existen diversas técnicas y soportes que se pueden emplear, teniendo una gran influencia sobre la estabilidad de las enzimas frente a los disolventes orgánicos, la temperatura o el pH. Los métodos más empleados en la inmovilización de enzimas aislados son: (i) inmovilización por enlace covalente entre moléculas del enzima un soporte, que puede ser de distintos materiales poliméricos, cerámicos o vítreos, (ii) inmovilización por enlaces cruzados o autoinmovilización, formando partículas sólidas compuestas por agregados del biocatalizador, (iii) inmovilización con sistema de membranas, reteniendo el enzima en un espacio limitado por una membrana semipermeable.[8]

Actualmente se conocen cerca de 4000 enzimas, aunque solo es una pequeña parte de las que hay presentes en la naturaleza, y cientos de ellas presentan utilidad sintética y

[7] (a) Palomo, J. M., *Curr. Org. Synth.* **2009**, *6*, 1; (b) Tran, D. N.; Balkus, Jr., K. J., *ACS Catal.* **2011**, *1*, 956; (c) Garcia-Galan, C.; Berenguer-Murcia, A.; Fernandez-Lafuente, R.; Rodrigues, R. C. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2885; (d) Stepankova, V.; Bidmanova, S.; Koudelakova, T.; Prokop, Z.; Chaloupkova, R.; Damborsky, J., *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2823.
[8] Woodward, J., *J. Microbiol. Meth*. **1988**, *8*, 91.

se encuentran disponibles comercialmente. Tradicionalmente, la clasificación de los enzimas se basa en el tipo de reacción que catalizan de forma natural y se dividen en seis grandes grupos (Tabla 1).[9]

Tabla 1. Clasificación enzimática en función del tipo de reacción que catalizan.

Clasificación	Tipo de reacción catalizada
EC 1.Oxidorreductasas	Reacciones de oxidación-reducción, como la eliminación-adición de hidrógeno y la oxigenación de enlaces C-H, C-C y C=C.
EC 2. Transferasas	Transferencia de grupos acilo, fosforilo, metilo o amino, entre otros.
EC 3. Hidrolasas	Hidrólisis de ésteres, amidas, nitrilos, epóxidos, anhídridos, glicósidos y halogenuros de alquilo.
EC 4. Liasas	Adición de moléculas pequeñas a enlaces múltiples C=C, C=N y C=O, formación enlaces C-C.
EC 5. Isomerasas	Reacciones de isomerización, como racemización, epimerización o reordenamientos.
EC 6. Ligasas	Formación de enlaces C-O, C-N, C-S y C-P

Sin embargo, se ha descubierto que algunos enzimas presentan "promiscuidad catalítica",[10] es decir, son capaces de llevar a cabo transformaciones químicas diferentes a las de su función natural, especialmente en el grupo de las hidrolasas.[11] Además, mediante modificaciones genéticas que alteran su secuencia peptídica, se han logrado enzimas con mutaciones en su secuencia de aminoácidos que poseen propiedades catalíticas mejoradas a las de su cepa natural e incluso pueden catalizar otros procesos.[12]

Actualmente, alrededor de un 60% de las biotransformaciones publicadas, así como la mayor parte de las aplicaciones industriales, se realizan con el empleo de

[9] Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer: Berlin, 2011.
[10] Kazlauskas, R. J., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 195.
[11] Busto, E.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V., *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504.
[12] Reetz, M. T., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12480.

hidrolasas. Este tipo de enzimas no requieren la presencia de cofactores para su correcto funcionamiento, presentan una elevada estabilidad incluso en medios no acuosos, y aceptan una gran variedad de sustratos en su centro catalítico.

Las oxidorreductasas, seguidas de las transferasas, son las siguientes enzimas más utilizadas y cada vez tienen mayor implantación en procesos industriales para la obtención de compuestos enantioméricamente puros, especialmente en el ámbito de la química médica.[13]

1.1.2. Catálisis enzimática

Los enzimas, como cualquier otro catalizador, aceleran la cinética de la reacción sin afectar al equilibrio termodinámico. La estabilización del estado de transición en los procesos biocatalíticos se traduce en incrementos de las velocidades de reacción en ordenes de entre 10^8 a 10^{15} respecto a la reacción no catalizada, mucho mayores que los obtenidos mediante otro tipo de catálisis, demostrando la elevada eficacia de este tipo de catalizadores.

El comportamiento cinético de la mayoría de las reacciones enzimáticas se puede expresar mediante la ecuación de Michaelis-Menten, y se representa gráficamente relacionando la velocidad de reacción frente a la concentración de sustrato (Figura 2), donde la constante cinética se representa como k_{cat} y la constante K_M corresponde con la concentración necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima, siendo un valor inverso a la afinidad enzima-sustrato. Aunque los mecanismos de las reacciones enzimáticas suelen ser complejos y tener varios pasos de reacción, es posible simplificar las ecuaciones cinéticas, teniendo en cuenta el paso de reacción limitante y aplicando la teoría del estado estacionario a cada uno de los estados de transición, llegando a una

[13] Wandrey, C.; Liese, A.; Kihumbu, D., *Org. Process Rev. Dev.* **2000**, *4*, 286.

ecuación tipo Michaelis-Menten en la que los términos k_{cat} y K_M son función de las constantes cinéticas de cada etapa individual.

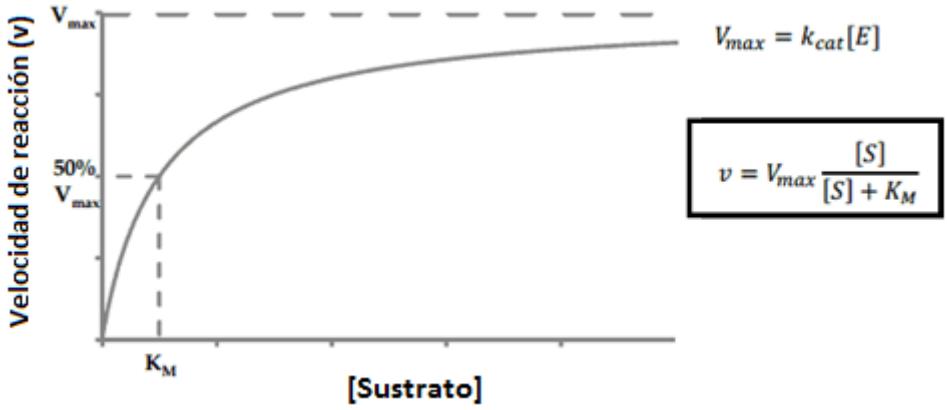
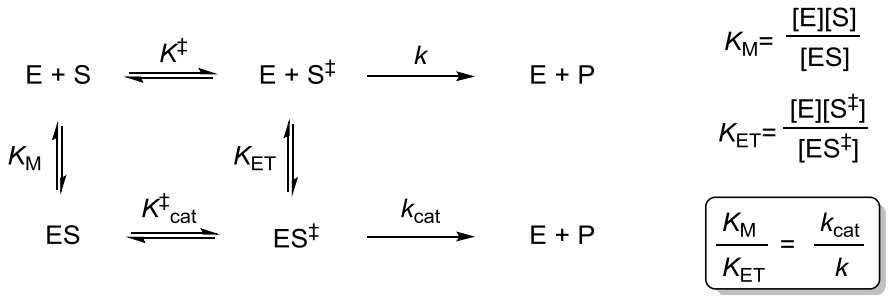


Figura 2. Ecuación y representación gráfica de un comportamiento cinético de Michaelis-Menten.[14]

Si se relacionan las constantes cinéticas con el ciclo termodinámico, según la teoría del estado de transición desarrollada por Eyring (Esquema 1), representando la constante de disociación del enzima y sustrato en el estado de transición como K_{ET}, y la constante cinética de la reacción no catalizada como k; se observa que K_M es mayor que K_{ET} en un factor igual al grado de aceleración de la reacción catalizada (k_{cat}/k). Esto indica que el enzima establece interacciones más favorables con el estado de transición que en su unión con el sustrato, es decir, estabiliza más a $S^{‡}$ que a S.



Esquema 1. Ciclo termodinámico de un proceso enzimático.

[14] Walsh, R., *Alternative Perspectives of Enzyme Kinetic Modeling, Medicinal Chemistry and Drug Design*, InTech, 2012.

La estabilización del estado de transición concuerda con el mecanismo del ajuste inducido, según el cual la conformación del enzima es flexible y, en presencia del sustrato, va cambiando hasta adaptarse a $S^{\ddagger}$. Por lo tanto, la conformación activa del enzima es la complementaria a la estructura del estado de transición. La estabilización global se debe a dos factores: uno entálpico, debido a la formación de interacciones intermoleculares con los aminoácidos del centro activo más fuertes con el estado de transición, y otro entrópico, ya que la reacción se convierte en intramolecular cuando el sustrato se encuentra en el interior del centro activo. El factor entrópico es una de las causas más importantes de la catálisis enzimática ya que provoca un enorme incremento de la concentración efectiva respecto a la reacción intermolecular.

La elevada selectividad de los enzimas también se explica atendiendo a la estabilización del estado de transición, al establecerse las interacciones en el centro activo entre los aminoácidos y un determinado sustrato siempre habrá una conformación de este último que se amolde mejor, es decir, tenga una menor energía. Como el centro activo posee un entorno quiral, al estar formado por aminoácidos naturales, también las interacciones entre dos enantiómeros de una mezcla racémica con el centro activo tendrán distintas energías y el proceso será enantioselectivo. En este aspecto, la predicción de la selectividad se ha tratado de racionalizar y existen algunas reglas experimentales, como la de Kazlauskas[15] o la de Prelog,[16] así como cálculos computacionales, cada vez más precisos, que permiten simular las energías de estabilización de las distintas conformaciones de los sustratos por las interacciones con los aminoácidos del centro activo.[17]

[15] Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A.N.E.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A., *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656.
[16] Prelog, V., *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*, 119
[17] Kiss, G.; Çelebi-Ölçüm, N.; Moretti, R.; Baker, D.; Houk, K. N., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *22*, 5700.

1.2. HIDROLASAS

Teniendo en cuenta su aplicabilidad, las hidrolasas son el grupo de enzimas más importante debido a la elevada estabilidad y eficiencia catalítica que presentan, sin requerir cofactores para su funcionamiento, y su capacidad de transformar una gran variedad de sustratos. Además, presentan actividad en medios no acuosos y son capaces de catalizar reacciones muy distintas a su función natural.[11]

Las hidrolasas se dividen en varias categorías según el tipo de enlace que hidrolizan, siendo las más utilizadas con fines sintéticas las esterasas (hidrólisis de ésteres), las proteasas (hidrólisis de enlaces peptídicos) y las lipasas (hidrólisis de triglicéridos), siendo estas últimas las más versátiles.

1.2.1. Lipasas

Las lipasas, o triacilglicerol hidrolasas, tienen como función natural la hidrólisis de ésteres insolubles en agua, como aceites y grasas, catalizando la formación de ácidos grasos, digliceroles, monoglicerol y glicerol. Estos biocatalizadores están presentes en microorganismos, plantas y animales como enzimas digestivas que facilitan el transporte, deposición y movilización de las grasas.[18] Muchas de ellas están disponibles comercialmente y son ampliamente empleadas en la producción de compuestos ópticamente activos, además de tener utilidad en otras áreas, como la alimentación o la higiene, gracias a su biodegradabilidad y baja toxicidad. Entre sus aplicaciones se incluyen procesos quimio-, regio-, y estereoselectivos, como la resolución cinética de alcoholes, ésteres, aminas y amidas racémicas, o la desimetrización de compuestos *meso* o proquirales.[19]

[18] Schmid, R. D.; Verger, R.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608.
[19] Gotor-Fernández, V.; Busto, E.; Gotor, V., *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 797.

1.2.1.1. Activación interfacial

La velocidad en las reacciones catalizadas por lipasas aumenta de forma espectacular cuando la concentración de sustrato, un lípido, excede los límites de solubilidad (concentración micelar crítica, CMC), es decir, cuando aparecen dos fases. Es precisamente en la interfase acuosa-orgánica donde el enzima cataliza la hidrólisis, lo que las diferencia del resto de las hidrolasas, y provoca una desviación del comportamiento cinético típico. En la Figura 3 se puede observar la diferente actividad entre una lipasa y una esterasa, que actúa sobre el sustrato en disolución y sigue un comportamiento cinético de Michaelis-Menten, en la hidrólisis de un éster[20].

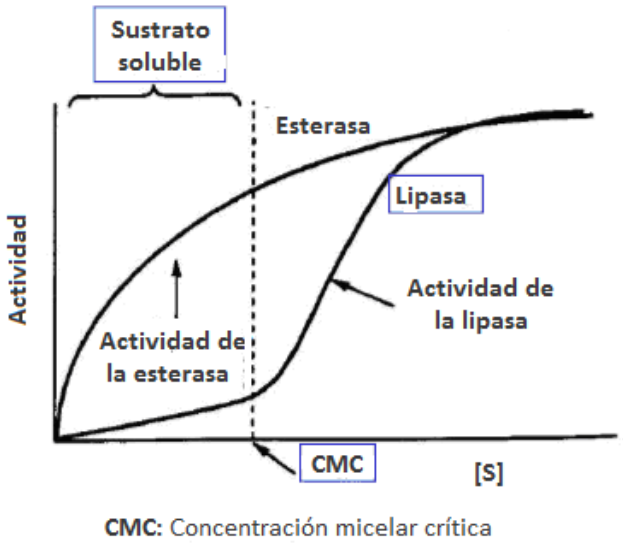


Figura 3. Diferencia en las actividades de una lipasa y una esterasa en función de la concentración de sustrato. Figura modificada de referencia 20.

La explicación de esta activación interfacial radica en un proceso de reorganización estructural del enzima, el cual presenta una forma inactiva cuando está en disolución acuosa al tener el centro activo bloqueado por un segmento de la cadena polipeptídica. Cuando la lipasa se sitúa en la interfase agua/lípido se activa al producirse

[20] Wong, C-H.; Whitesides, G. M.; *Tetrahedron Organic Chemistry Series. Volume 12, Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Elsevier Science: Oxford, 1994.

un cambio conformacional que libera el acceso al centro activo (Figura 4).[21] Este tipo de mecanismo se ha asociado con la especial actividad catalítica que muestran las lipasas en disolventes orgánicos.

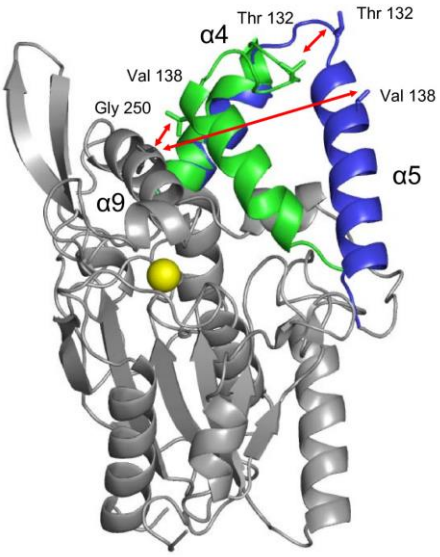


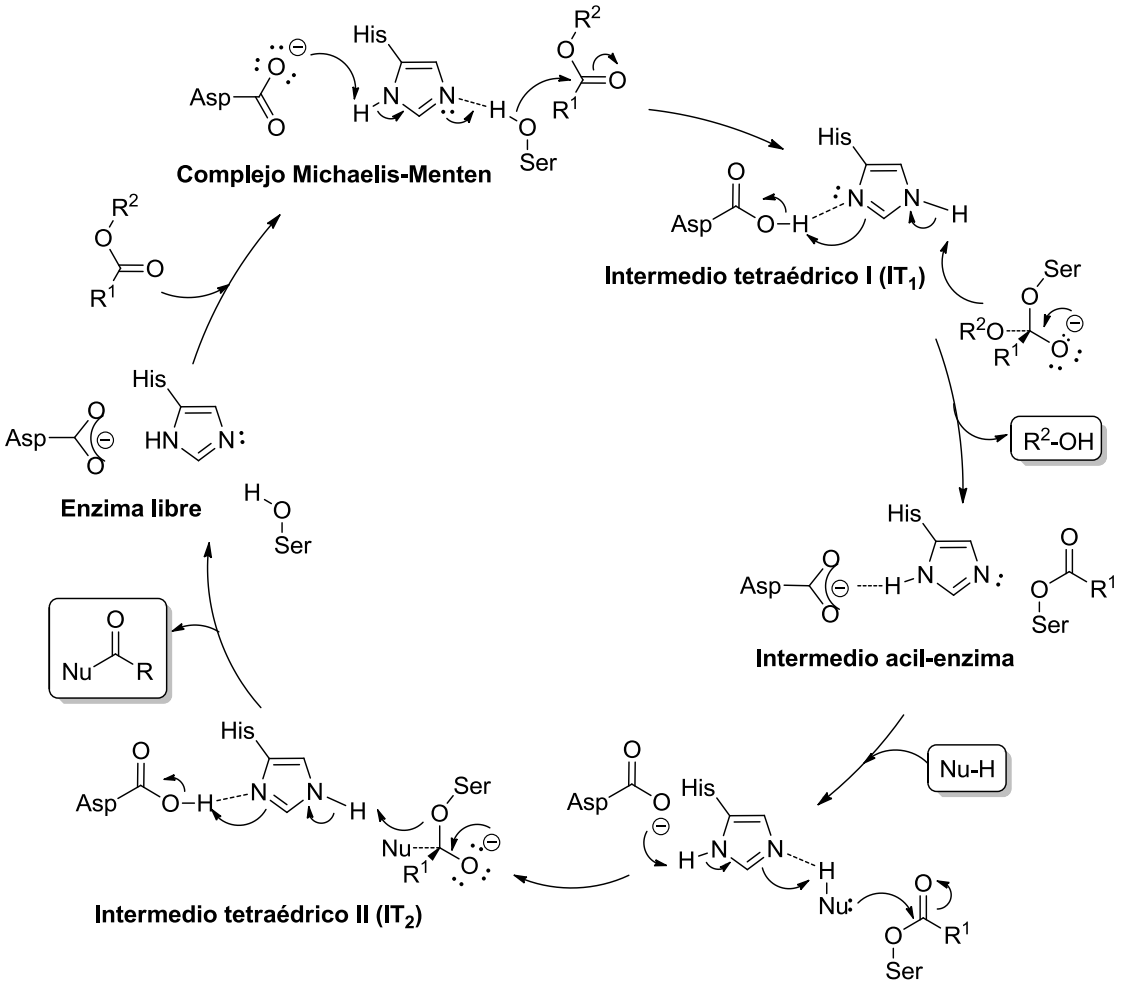
Figura 4. Diferencia entre la conformación cerrada (azul), en medio acuoso, y abierta, (verde), en la interfase, de la lipasa de *Pseudomonas cepacia*, también conocida como *Burkholderia cepacia*. Estructura tomada del trabajo de Pleiss y colaboradores. [22]

1.2.1.2. Mecanismo de las serin-hidrolasas

La catálisis en el centro activo de las lipasas se debe a la interacción entre las cadenas laterales de un conjunto de tres aminoácidos, denominado tríada catalítica: ácido aspártico (Asp) o ácido glutámico (Glu), histidina (His) y serina (Ser). [23] Este último resto es clave para la reactividad ya que se enlaza de forma covalente a los sustratos y, por ello, las lipasas pertenecen al grupo de las hidrolasas serínicas, cuyo mecanismo se muestra en el Esquema 2.[24] Los tres aminoácidos actúan sinérgicamente:

[21] Klibanov, A. M., *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 141.
[22] Trodler, P.; Schmid, R. D.; Pleiss, J., *BMC Struct. Biol.* **2009**, *9*, 38.
[23] Brady, L.; Brzozowski, Z. S.; Derewenda, Z. S.; Dodson, E.; Dodson, D.; Tolley, S.; Turkenburg, J. P.; Christiansen, L.; Huge-Jensen, B.; Norskov, L.; Thim, L.; Menge, U., *Nature* **1990**, *343*, 767.
[24] Hedstrom, L.; *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501.

el carboxilato del aspartato incrementa la basicidad del imidazol de la histidina y este aumenta la nucleofilia del grupo hidroxilo de la serina.



Esquema 2. Mecanismo de actuación de las serín-hidrolasas sobre un éster genérico.

El primer paso es la formación del complejo enzima-sustrato (ES) de Michaelis-Menten, en el cual la triada catalítica debe estar correctamente orientada para que se produzca la transferencia de protón desde la serina al imidazol de la histidina. Por otra parte, se establecen enlaces de hidrógeno entre los grupos N-H de sendos enlaces peptídicos de la enzima y el oxígeno carbonílico del sustrato, aumentando la electrofilia del carbono carbonílico. El ataque nucleófilo del hidroxilo de la serina sobre el carbonilo genera el primer intermedio tetraédrico (IT_1), cuya carga negativa también está estabilizada por los enlaces de hidrógeno. A continuación, se produce la

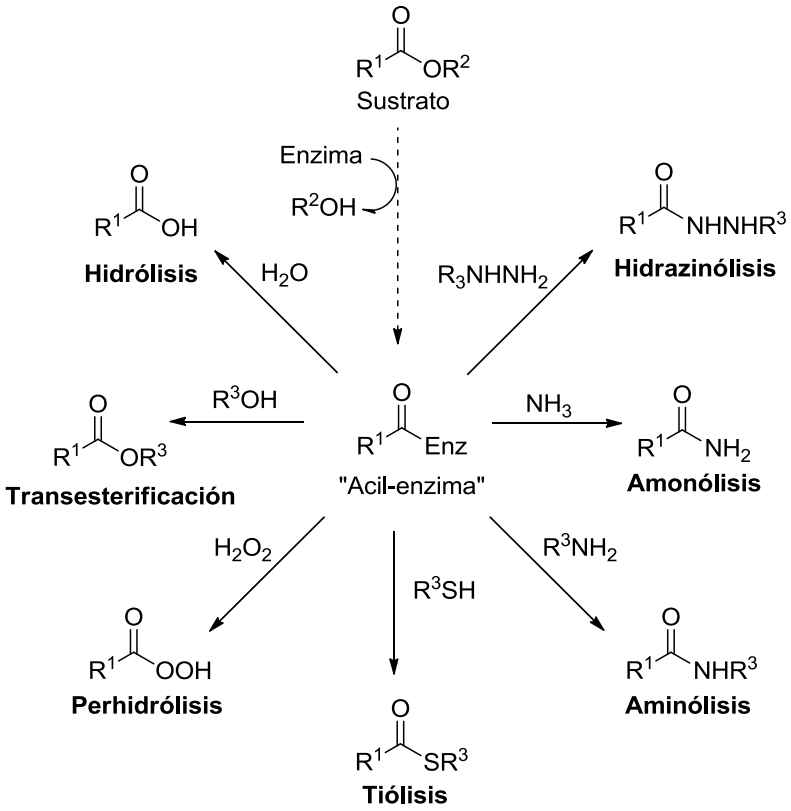
eliminación del grupo saliente, facilitada por el grupo imidazol protonado que actúa como catalizador ácido, y se libera el alcohol formándose el intermedio covalente acil-enzima. Seguidamente, el imidazol vuelve a actuar como base exaltando la nucleofilia del agua (si es la reacción natural de hidrólisis Nu-H= HO-H), que ataca al complejo acil-enzima y forma un segundo intermedio tetraédrico (IT_2). Por último, el ciclo catalítico se cierra al formarse el producto, que sale del centro activo y se recupera la enzima libre.

Además de la tríada catalítica, que se encuentra en una cavidad conocida como hueco hidrofóbico de la enzima, existen otros aminoácidos en el centro activo que, aunque no intervienen directamente en el mecanismo, determinan el entorno específico responsable de la selectividad. Generalmente, ésta se manifiesta en el intermedio tetraédrico II y el paso selectivo es el ataque del nucleófilo al complejo acil-enzima, al encontrarse diferenciados un hueco para el nucleófilo y otro para el acilo dentro del sitio activo.

A pesar de que hasta 1985, solo se conocían ejemplos de la reactividad de las lipasas en procesos catalíticos, hoy en día es bien conocida su especial reactividad en disolventes orgánicos, debida a la activación interfacial, que permite que puedan llevar a cabo otro tipo de reacciones al favorecer el desplazamiento de los equilibrios en el sentido de la síntesis en lugar de la hidrólisis (Esquema 3).

La utilización de disolventes orgánicos resulta muy beneficiosa para la aplicación de los procesos a escala industrial cuando los sustratos presentan escala solubilidad en agua, además de favorecer la recuperación de productos y el reciclado de las enzimas y minimizar la formación de productos secundarios, así como la inhibición o desnaturalización de los biocatalizadores.[25]

[25] Hernáiz, M. J.; Alcántara, A. R.; García, J. I.; Sinisterra, J. V., *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 9422.



Esquema 3. Transformaciones catalizadas por lipasas.

Como se deduce del mecanismo de actuación de las lipasas (ver Esquema 2), el intermedio acil-enzima es susceptible del ataque de cualquier nucleófilo que se sitúe en el centro activo. Cuando el disolvente es agua, su elevada concentración favorece la reacción de hidrólisis sobre cualquier otra transformación pero, al utilizar disolventes orgánicos anhidros, se pueden emplear otros reactivos, como alcoholes o aminas, que actúan como nucleófilos, dándose las reacciones de transesterificación o aminólisis respectivamente.[26] Alternativamente, cuando se emplea amoníaco, las lipasas y en especial la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B) catalizan reacciones de amonólisis, pudiendo emplear otros nucleófilos como agua oxigenada, hidracinas o tioles.

[26] Entre otros: (a) Gotor, V., *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2189; (b) García-Urdiales, E.; Rebolledo, F.; Gotor, V.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 721; (c) Roberts, S. M.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2001**, 1475; (d) Carboni-Oerlemans, C.; Domínguez de María, P.; Tuin, B.; Bargeman, G.; van der Meer, A.; van Gemert, R., *J. Biotechnol.* **2006**, *126*, 140.

1.2.1.3. Reacciones no convencionales catalizadas por hidrolasas

Como se ha comentado anteriormente, las lipasas, y otros tipos de hidrolasas, son capaces de llevar a cabo transformaciones que difieren a su función natural, lo que se conoce como promiscuidad biocatalítica, y se pueden clasificar en varios niveles según su alcance:[27]

- El empleo de diferentes sustratos para una misma enzima, es el caso más común de promiscuidad observado en las biotransformaciones y muchas enzimas son capaces de aceptar un amplio espectro de sustratos, mejorando su aplicabilidad en síntesis orgánica.
- Utilización de condiciones diferentes a las naturales, como el uso de medios anhidros o grandes cambios en parámetros como la temperatura o el pH.
- La capacidad del centro activo de catalizar otro tipo de reacciones completamente diferentes a la que desempeñan de forma natural, ya sea empleando los mismos aminoácidos que actúan sobre los sustratos en la catálisis convencional u otros distintos localizados en el sitio activo.

Generalmente, es a esta última condición a la que se hace referencia cuando se habla de promiscuidad, y puede darse en los enzimas naturales o modificados genéticamente, de modo que la alteración genética es una herramienta para introducir o mejorar estos comportamientos catalíticos anómalos.[11,28] Mediante la comprensión de los mecanismos moleculares que operan en la promiscuidad biocatalítica y la racionalización de la evolución dirigida, es probable que en los próximos años se desarrollen nuevos biocatalizadores con actividades promiscuas optimizadas.[29]

[27] Hult, K.; Berglund, P.; *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231.
[28] (a) Park, H-S.; Nam, S-H.; Lee, J. K.; Yoon, C. N.; Mannervik, B.; Benkovic, S. J.; Kim, H-S.; *Science* **2006**, *311*, 535. (b) Jochens, H.; Stiba, K.; Savile, C.; Fujii, R.; Yu, J-G.; Gerassenkov, T.; Kazlauskas, R. J.; Bornscheuer, U. T., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3532. (c) Turner, N. J.; *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 567.
[29] Khersonsky, O.; Tawfik, D-S., *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 471.

Por otro lado, las lipasas también han mostrado actividad en la formación de enlaces carbono-carbono (en adiciones aldólicas, reacciones de Henry, reacciones Baylis-Hillman o reacciones de Mannich) y carbono-heteroátomo (adiciones tipo Michael), procesos oxidativos y nuevas reacciones hidrolíticas.

1.2.1.4. La lipasa de *Candida antarctica* tipo B

Una de las lipasas más versátiles y comúnmente empleadas en el campo de las biotransformaciones es la lipasa de *Candida antarctica* tipo B (CAL-B).[19] Este enzima fue aislado en la Antártida en la búsqueda de biocatalizadores capaces de trabajar en condiciones extremas y ha sido obtenida en forma pura a través de procesos de clonación y sobreexpresión en *Aspergillus oryzae*. Su estructura tridimensional ha sido resuelta mediante difracción de rayos X (Figura 5), tanto en su forma libre como asociada a diversos inhibidores.[30]

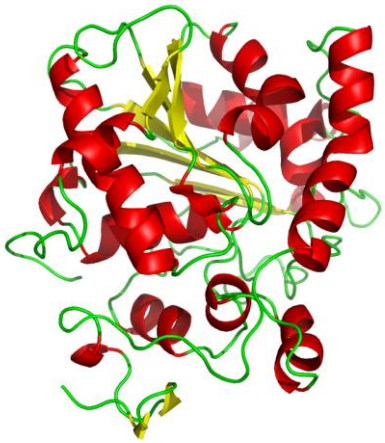


Figura 5. Estructura tridimensional de la CAL-B.

La CAL-B está constituida por 317 aminoácidos, no requiere metales para su funcionamiento y su peso molecular es de 33 kDa. Posee una estructura tridimensional de pliegues α/β, típica de las hidrolasas, y no presenta activación interfacial

[30] Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S.; Jones, T. A., *Structure* **1994**, *2*, 293.

significativa, al no tener el fragmento proteico que bloquea el acceso al centro activo.[31] Este, sin embargo, está semicubierto por dos pequeñas hélices α flexibles que actúan como tapa y elemento activador, respectivamente, responsables de las conformaciones abierta y cerrada.[32]

Como todas las hidrolasas serínicas, posee en el centro activo la tríada catalítica Asp187-His224-Ser105 y, orientada de izquierda a derecha, presenta un hueco hidrofóbico grande por encima, donde se sitúa el acilo, y un hueco mediano por debajo, donde se introduce el nucleófilo o el grupo saliente. El tamaño restringido, sumado a las interacciones fuertes entre los aminoácidos de la enzima y los sustratos, explican la elevada selectividad que muestra frente a alcoholes secundarios[33] u otros nucleófilos, siendo una de sus principales aplicaciones la preparación de aminas o amidas mediante procesos de aminólisis y amonólisis enzimática.[19]

Recientemente, se han desarrollado nuevas variantes de la CAL-B mediante diversas modificaciones estructurales de la proteína, utilizando la ingeniería genética, con el fin de mejorar su selectividad y crear nuevas aplicaciones sintéticas.[11,34]

[31] Martinelle, M; Holmquist, M.; Hult, K., *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1258*, 272.
[32] Skjot, M.; De María, L.; Chatterjee, R.; Svendsen, A.; Patkar, S.; *ChemBioChem* **2009**, *10*, 520.
[33] Gotor, V.; *Biocatal. Biotransform.* **2000**, *18*, 87.
[34] (a) Svendendahl, M.; Hult, K.; Berglund, P., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17988; (b) Ferrario, V.; Ebert, C.; Svendsen, A.; Besenmatter, W.; Gardossi, L., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2014**, *101*, 7.

ANTECEDENTES

En la introducción de este Trabajo Fin de Master se ha resaltado el papel que desempeña la Biocatálisis en el progreso de la Química Sostenible, centrando la atención en la elevada eficiencia con la que actúan las lipasas y, concretamente, la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B). Este enzima, ha demostrado su aplicación en un gran número de procesos tanto sintéticos (trasesterificación, aminólisis y amonólisis especialmente) como hidrolíticos,[19] si bien en los últimos años se ha descrito su versatilidad en reacciones poco convencionales que pueden ser catalizados por esta y otras hidrolasas.[11] En este contexto, este Trabajo Fin de Máster se centra en el diseño de protocolos oxidativos eficientes y ecológicos, donde el empleo de hidrolasas como mediadores ofrece alternativas prometedoras, poco tóxicas y limpias con respecto a los métodos tradicionales de oxidación.

A continuación, se describen brevemente distintas estrategias descritas en la bibliografía, basadas en la capacidad que poseen las hidrolasas para catalizar la producción *in situ* de perácidos, y el uso de estos sistemas como oxidantes de distintas familias de moléculas orgánicas Se prestará especial atención a las metodologías desarrolladas mediante el empleo de lipasas para la epoxidación de olefinas, así como la oxidación de cetonas, que será el objeto de estudio principal en este trabajo de investigación.

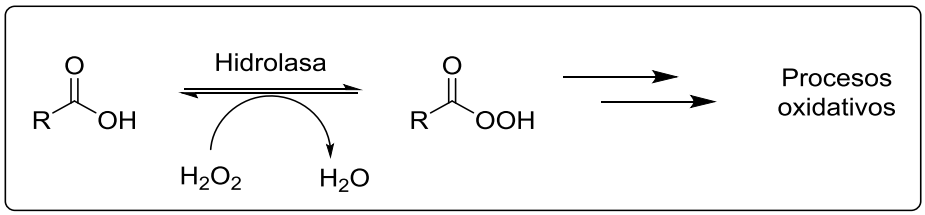
2.1. OXIDACIONES MEDIADAS POR HIDROLASAS

En la naturaleza existe una clase de enzimas, las oxidorreductasas, que catalizan procesos de oxidación-reducción. El empleo de este tipo de biocatalizadores ha sido objeto de un amplio estudio, ya que pueden admitir diferentes sustratos y suelen catalizar las reacciones de forma selectiva y eficiente. Así, en la actualidad existen una gran variedad de procesos industriales que se basan en el empleo de estas enzimas. Dentro de este tipo de catalizadores, las alcohol deshidrogenasas han alcanzado sin duda un mayor desarrollo ya que permiten la reducción enantioselectiva de grupos carbonilo, si bien otros grupos de biocatalizadores como las enoatoreductasas, que catalizan la reducción estereoselectiva de olefinas empobrecidas electrónicamente, también son hoy en día ampliamente empleadas.[35]

Algunas enzimas hidrolíticas también son capaces de promover procesos oxidativos cuando se utilizan bajo determinadas condiciones de reacción. Así, las lipasas han demostrado ser eficientes catalizadores de procesos secuenciales, destacando aquellos en los que se aprovecha su actividad perhidrolítica para transformar ácidos carboxílicos u otros derivados activados, como puedan ser principalmente los ésteres, en perácidos empleando agua oxígenada (H_2O_2) como nucleófilo (Esquema 4).[36] La formación del correspondiente perácido *in situ* y su empleo como oxidante en diversas aplicaciones, como la formación de epóxidos o lactonas, presenta un gran atractivo desde el punto de vista práctico. De esta manera, su generación en el medio de reacción y en bajas concentraciones permite evitar su almacenamiento y transporte, así como la

[35] Gamenara, D.; Seoane, G. A.; Saenz-Méndez, P.; Domínguez de María, P., *Redox Biocatalysis: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons: Hoboken, 2013.
[36] (a) Björkling, F.; Godtfredsen, S. E.; Kirk, O., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1301; (b) Björkling, F.; Frykman, H.; Godtfredsen, S. E.; Kirk, O., *Tetrahedron* **1992**, *48*, 4587 (c) Kirk, O.; Christensen, M. W.; Dambus, T.; Godtfredsen, S. E., *Biocatalysis* **1994**, *11*, 65.

manipulación de disoluciones muy concentradas con el consiguiente riesgo de explosión.



Esquema 4. Reacción de perhidrólisis catalizada por hidrolasas.

El descubrimiento de este tipo de actividad perhidrolítica surgió a raíz del estudio mecanístico de las haloperoxidasas no dependientes del grupo prostético hemo, un tipo de oxidorreductasas que utilizan H_2O_2 como sustrato. En el centro activo de estos enzimas se encuentra una tríada catalítica Ser-Asp-His, análoga a la de las hidrolasas serínicas, lo que permite entender fácilmente que las haloperoxidasas sean capaces de catalizar reacciones promiscuas de hidrólisis.[26d] Los dos tipos de enzimas, tanto lipasas como haloperoxidasas, comparten por lo tanto el mismo mecanismo catalítico en el que el perácido se forma inicialmente, por acción del enzima, y es el responsable de la oxidación posterior, que ocurre estrictamente de forma química. Este hecho es confirmado por la ausencia de enantioselectividad observada en este tipo de oxidaciones, prueba de que el entorno quiral del centro activo del enzima no está involucrado en el paso final de oxidación.[37] Por este motivo, este tipo de reacciones se suelen considerar como oxidaciones mediadas por enzimas, en lugar de catalizadas, ya que las hidrolasas no actúan directamente sobre el sustrato.

Numerosas investigaciones recientes, basadas en el estudio del mecanismo de actuación de las hidrolasas, buscan incrementar la actividad perhidrolítica sobre la natural mediante modificaciones estratégicas de los aminoácidos localizados en el

[37] Kirk, O.; Conrad, L. S., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 977.

centro activo.[38] Por ejemplo, la modificación de un único aminoácido de la esterasa de *Pseudomonas fluorescens* permite la formación de un nuevo enlace de hidrógeno entre el enzima y el peróxido de hidrógeno en el estado de transición, lo cual provoca un incremento de dos órdenes de magnitud en la constante específica del enzima para la formación de ácido peracético (Figura 6).[39]

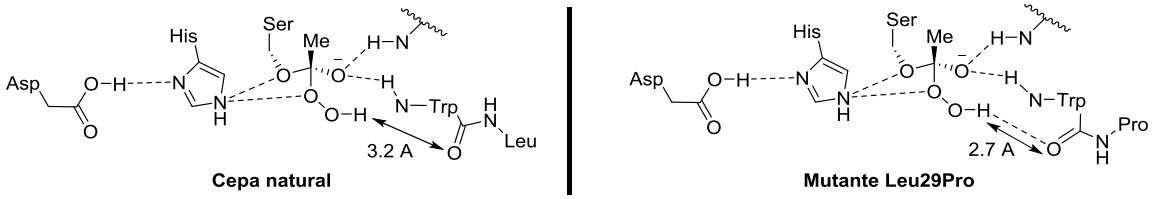


Figura 6. Diferencias estructurales que explican el incremento en la actividad perhidrolítica de la esterasa de *Pseudomonas fluorescens* mutada en la posición 29.

Las aplicaciones de la generación *in situ* de perácidos no están restringidas a transformaciones sintéticas oxidativas, sino que poseen un gran potencial como desinfectantes o esterilizantes de superficies, instrumental o equipos en el ámbito médico o en el procesamiento de comida, así como en diversos procesos textiles o de lavandería industrial.

Los perácidos, y concretamente el ácido peracético, han demostrado ser mucho más eficientes que el peróxido de hidrógeno en este tipo de aplicaciones y su descomposición en productos no tóxicos les hacen especialmente atractivos desde el punto de vista sostenible.[40] En los últimos años, varias patentes han puesto de manifiesto la elevada actividad perhidrolítica de ciertas hidrolasas, obtenidas mediante mutaciones de la cepa natural, o bien inmovilizadas en diversos soportes.[41]

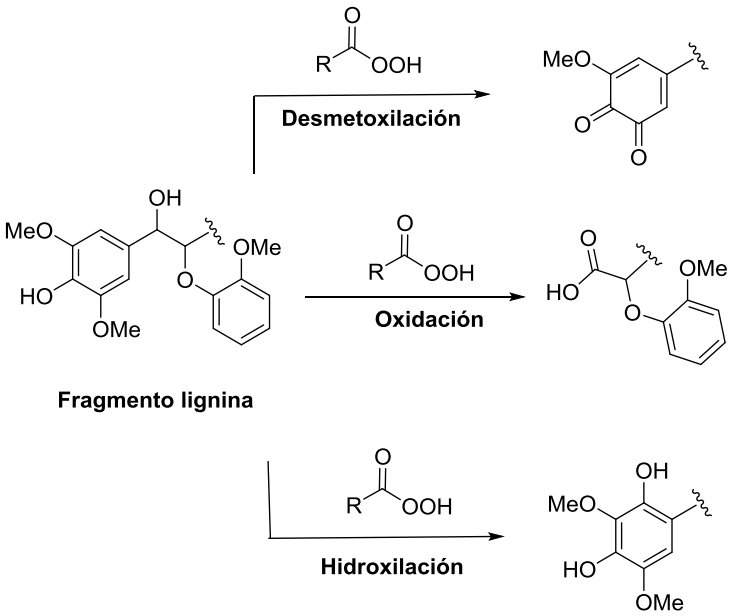
[38] Yin, D. L.; Bernhardt, P.; Morley, K. L.; Jiang, Y.; Cheeseman, J. D.; Purpero, V.; Schrag, J. D.; Kazlauskas, R. J., *Biochemistry* **2010**, *49*, 1931.
[39] Bernhardt, P.; Hult, K.; Kazlauskas, R. J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2742.
[40] Dinu, C. Z.; Zhu, G.; Bale, S. S.; Anand, G.; Reeder, P. J.; Sanford, K.; Whited, G.; Kane, R. S.; Dordick, J. S., *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 392.
[41] Entre otros: (a) Bott, R. R.; Hua, L.; Qian, Z.; Rife, C. L.; Shetty, J. K.; Tang, Z.; Yu, Z.; Zhang, B., *WO 2014081622*; (b) Dicosimo, R.; Payne, M. S.; Gavagan, J. E., *WO 20140113966*;

Un objetivo de elevado interés actual es el aprovechamiento de la biomasa como materia prima para la obtención tanto de productos químicos como de energía. El empleo del ácido peracético para oxidar la lignocelulosa, obtenida de la madera y que posee una estructura compleja principalmente compuesta por lignina, hemicelulosa y celulosa, ha demostrado ser un tratamiento eficaz en la degradación de la lignina (Esquema 5). Además de reducir la complejidad molecular, el tratamiento con perácidos permite esterilizar el material e incrementar el rendimiento de pasos subsiguientes de fermentación enzimática de la hemicelulosa y celulosa, para la obtención sostenible de productos con interés industrial.[42] La generación de ácido peracético mediante perhidrólisis enzimática resulta una alternativa adecuada, al formarse *in situ* bajo unas condiciones suaves de reacción. Esto evita la degradación de la lignocelulosa, y se produce un aumento significativo en la actividad de las celulasas sobre los materiales procesados.[43]

(c) Graycar, T. P.; Pricelius, S.; Poulose, A. J.; Estell, D. A., *WO 2014059360*; (d) Bastigkeit, T.; Benda, K.; Mussmann, N:; Eiting, T.; Hellmuth, H., *DE 102012215624*.

[42] (a) Kamm, B.; Grubber, P. R.; Kamm, M., *Biorefineries- Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions*, Wiley-VCH: Weinheim, 2010. (b) Domínguez de María, P., *ChemSusChem*, **2011**, *4*, 327.

[43] Duncan, S.; Jing, Q.; Katona, A.; Kazlauskas, R. J.; Schilling, J.; Tschirner, U.; Aldajani, W. W., *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *160*, 1637.



Esquema 5. Rutas propuestas para la degradación de la lignina mediante oxidación con perácidos.

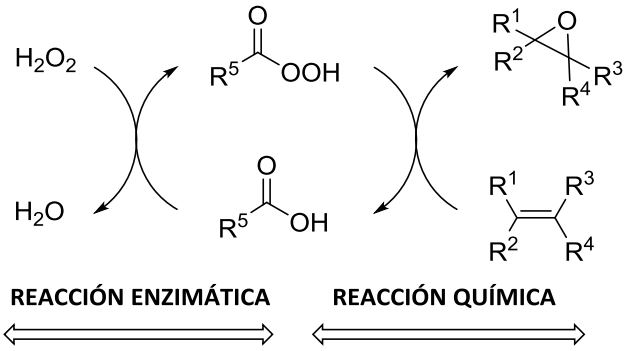
2.2. TRANSFORMACIONES OXIDATIVAS CON LIPASAS

Entre los procesos sintéticos oxidativos que se pueden llevar a cabo con lipasas, generalmente empleando disolventes orgánicos u otros medios no convencionales, destacan la reacción de epoxidación de olefinas y la oxidación de Baeyer-Villiger de grupos carbonilo mediante la generación *in situ* de perácidos. Además, se ha descubierto que la CAL-B es capaz de epoxidar directamente compuestos carbonílicos α,β-insaturados empleando agua oxigenada como nucleófilo, gracias a la presencia de una histidina, localizada en el centro activo de la lipasa.[44] También se ha descrito la oxidación de alcoholes arílicos primarios o secundarios para dar aldehídos o cetonas, respectivamente, catalizada de forma sinérgica por la CAL-B en líquidos iónicos.[45]

[44] Svedandahl, M:; Carlqvist, P.; Branneby, C.; Allner, O.; Frise, A.; Hult, K.; Berglund, P.; Brinck, T., *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2443.
[45] Sharma, U. K.; Sharma, N.; Kumar, R.; Kumar, R.; Sinha, A. K., *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4846.

2.2.1. Epoxidación mediada por lipasas

En la década de 1980, Zaks y Klibanov, describieron por primera vez la eficiencia de las lipasas en disolventes orgánicos, permitiendo el empleo de reactivos nucleófilos diferentes al agua y abriendo un gran abanico de posibilidades en transformaciones sintéticas eficientes, selectivas y benignas con el medio ambiente.[46] Basándose en estos resultados, unos años después aparecieron los primeros trabajos de investigación en los que se empleaba la formación *in situ* de perácidos mediante una reacción de perhidrólisis catalizada por lipasas, con el fin de llevar a cabo la epoxidación de alquenos, conocida como reacción de Prileschajew.[36,47] Empleando esta estrategia quimioenzimática, un determinado ácido carboxílico puede ser empleado en cantidades catalíticas, generando el correspondiente perácido en el medio de reacción que, tras llevar a cabo la reacción de epoxidación, vuelve a regenerar el ácido (Esquema 6).



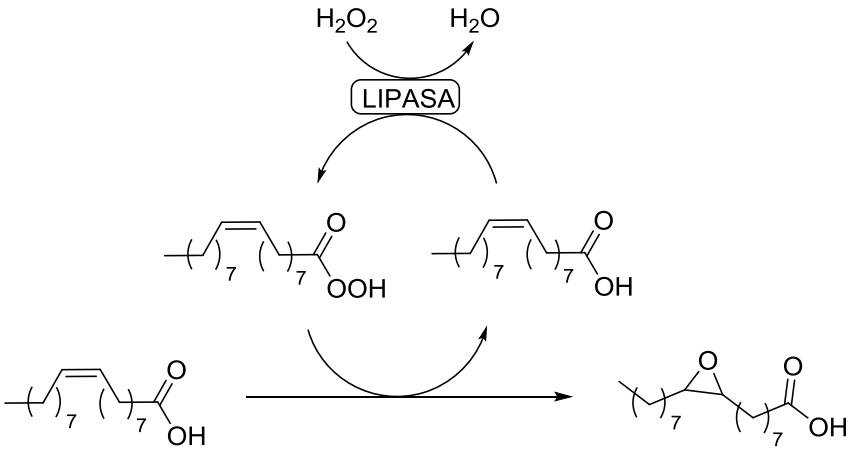
Esquema 6. Funcionamiento del sistema quimioenzimático en la epoxidación de olefinas mediada por lipasas.

En este tipo de procesos el biocatalizador más comúnmente empleado es la CAL-B, la cual se emplea inmovilizada para facilitar su actuación en medios orgánicos,[48]

[46] Zaks, A.; Klibanov, A. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 3192.
[47] Para la reacción de epoxidación convencional ver: (a) Prileschajew, N., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1909**, *42*, 4811; (b) March, J., *Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure*, John Wiley & Sons: Hoboken, 1985.
[48] Kontogianni, A.; Skouridou, V.; Sereti, V.; Stamatis, H.; Kolisis, F. N.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *21*, 67.

sistemas bifásicos agua-disolvente orgánico o líquidos iónicos.[49] Diferentes ácidos carboxílicos alifáticos lineales, desde el ácido octanoico al hexadecanoico, mostraron buenos resultados en la epoxidación de diferentes alquenos monosustituidos o cíclicos. Estudios posteriores reflejaron que es posible emplear una mayor variedad de sustratos como ésteres de etilo sustituidos en α.[50]

Una de las aplicaciones de mayor relevancia es la epoxidación de ácidos grasos, que actúan como sustratos para la lipasa en la reacción de perhidrólisis y, al mismo tiempo, son auto-epoxidados por el perácido graso formado *in situ* (Esquema 7). Las reacciones se suelen llevar a cabo en disolventes orgánicos, generalmente tolueno,[51] pero también se puede evitar el empleo de disolvente utilizando el ácido graso como reactivo y disolvente al mismo tiempo.[52]



Esquema 7. Auto-epoxidación del ácido oleico catalizada por una lipasa.

[49] (a) Madeira Lau, R.; van Rantwijk, F.; Seddon, K. R.; Sheldon, R. A., *Org. Lett.* **2000**, *2*, 4189; (b) Moreira, M. A.; Bitencourt, T. B.; da Graça Nascimento, M., *Synth. Commun.* **2005**, *35*, 2107.
[50] gen. Klass, M. R.; Warwel, S. J., *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1997**, *117*, 311.
[51] (a) Warwel, S.; gen. Klass, M. R., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1995**, *1*, 29; (b) Törnvall, U.; Orellana-Coca, C.; Hatti-Kaul, R.; Adlercreutz, D., *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 133.
[52] (a) Orellana-Coca, C.; Törnvall, U.; Adlercreutz, D.; Mattiasson, B.; Hatti-Kaul, R., *Biocatal. Biotransform.* **2005**, *23*, 431; (b) Corrêa, F. A.; Sutili, F. K.; Miranda, L. S. M.; Leite, S. G. F.; de Souza, R. O. M. A.; Leal, I. C. R., *J. Mol. Catal. B: Enzym*, **2012**, *81*, 7.

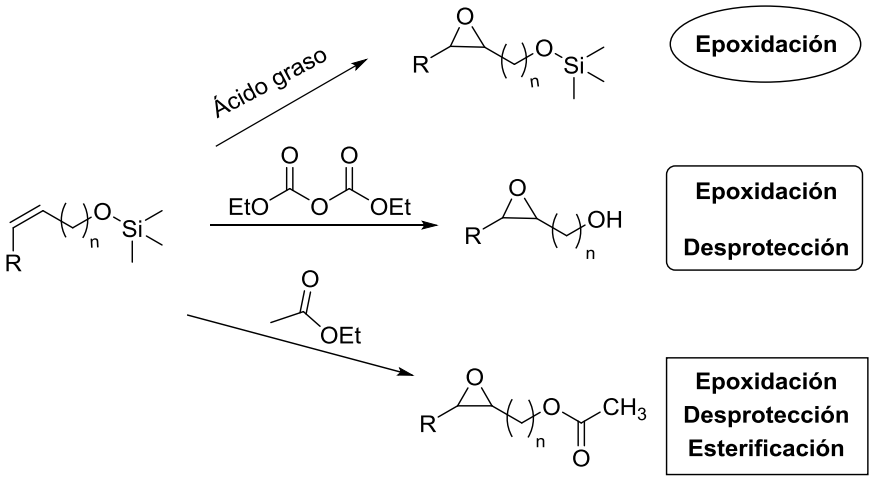
Esta estrategia también ha sido aplicada para la epoxidación de aceites vegetales insaturados, bien añadiendo cantidades catalíticas de un ácido carboxílico como precursor del perácido,[53] o directamente al generarse un ácido mediante la hidrólisis de alguno de los enlaces éster del triglicérido.[54] En algunos casos, es posible utilizar esta metodología para producir polímeros o materiales derivados de la lignina, fabricados completamente a partir de fuentes renovables.[55]

Aparte de las ventajas derivadas de las condiciones suaves de reacción bajo las que operan estos procesos, también permiten llevar a cabo reacciones en cascada.[56] En uno de estos ejemplos, se llevó a cabo la esterificación y epoxidación simultánea del ácido oleico, sin utilizar ningún disolvente, para generar epoxiestearatos de alquilo, compuestos con gran aplicación en la industria plástica.[57] También se ha descrito una reacción de epoxidación de éteres de sililo insaturados empleando agua oxigenada y CAL-B, en la que variando las condiciones de reacción, concretamente el donor de acilo, se logran distintos productos de oxidación (Esquema 8).[58]

De forma análoga, se ha llevado a cabo la epoxidación del polibutadieno y otros polímeros sintéticos, observando que el proceso presenta regioselectividad en función de la conjugación y de la estereoquímica, *E* o *Z*, de los dobles enlaces.[59] Asimismo, la epoxidación quimioenzimática de éteres de alilo derivados del glicerol permite producir

[53] Hilker, I.; Bothe, D.; Prüss, J.; Warnecke, H.-J., *Chem. Eng. Sci.* **2001**, *56*, 427.
[54] Kudanga, T.; Prasetyio, E. N.; Sipilä, J.; Nyanhongo, G. S.; Guebitz, G. M., *Process. Biochem.* **2010**, *45*, 1557.
[55] Uyama, H.; Kuwabara, M.; Tsujimoto, T.; Kobayashi, S., *Biomacromolecules*, **2003**, *4*, 211.
[56] gen. Klass, M. R.; Warwel, S., *Synth. Commun.* **1998**, *28*, 251.
[57] Orellana-Coca, C.; Billakanti, J. M.; Mattiasson, B.; Hatti-Kaul, R., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, *44*, 133.
[58] gen. Klaas, M. R.; Kunz, M.; Warwel, S. J., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, *7*, 283.
[59] Jarvie, A. W. P.; Overton, N.; St. Pourçain, C. B., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1999**, 2171.

los correspondientes epóxidos evitando el empleo de epiclorhidrina, utilizada en las síntesis tradicionales y que posee propiedades carcinógenas.[60]



Esquema 8. Diferentes productos obtenidos, en función del donor de acilo empleado, en la oxidación mediada por CAL-B de éteres de trimetilsililo insaturados.

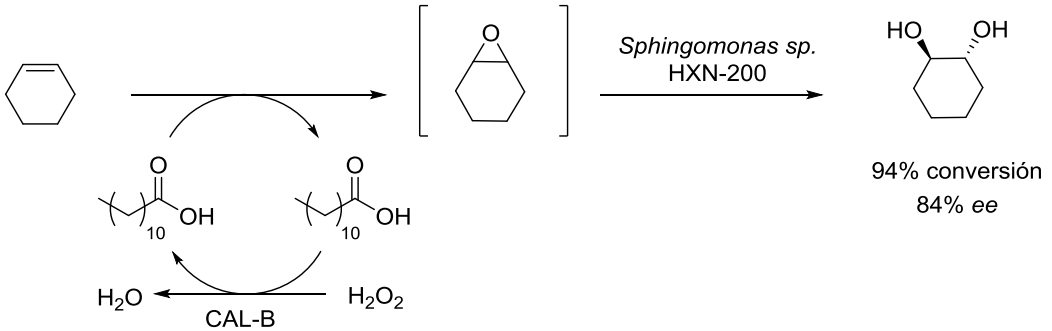
Una modificación introducida recientemente en este tipo de procesos es el empleo del complejo urea-peróxido de hidrógeno (UHP), en lugar de la disolución de agua oxigenada.[61] Para muchas aplicaciones, es conveniente disponer de un reactivo anhidro que, además, libera lentamente el peróxido de hidrógeno en el medio de reacción logrando unas condiciones oxidantes aún más suaves. Afortunadamente, esta posibilidad tiene una clara repercusión en una mayor estabilidad del enzima o de los productos. Por ejemplo, el UHP ha sido empleado en la síntesis diastereoselectiva de *N*-alquiloxaziridinas mediante la oxidación de *N*-alquiliminas arílicas, utilizando distintas lipasas, precursores del perácido y disolventes orgánicos.[62] Otra aproximación útil para oxidar compuestos sensibles a los ácidos es el empleo de carbonatos de dialquilo, ya que el monoéster del ácido carbónico que se forma tras la perhidrólisis es inestable, y

[60] Tufvesson, P.; Adlercreutz, D.; Lundmark, S.; Manea, M.; Hatti-Kaul, R., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *54*, 1.
[61] Ankudey, E. G.; Olivo, H. F.; Peeples, T. L., *Green Chem.* **2006**, *8*, 923.
[62] Bitencourt, T. B.; da Graça Nascimento, M., *Green Chem.* **2009**, *11*, 209.

descompone en dióxido de carbono y el correspondiente alcohol, dando la reacción de epoxidación en medio neutro.[58,63]

Como se ha comentado, las reacciones mediadas por lipasas no son enantioselectivas, al actuar el perácido sobre el sustrato fuera del centro activo del enzima, pero si se ha observado que la pureza óptica presente en los reactivos se mantiene en los productos.[64] Además, se ha logrado la síntesis asimétrica de epóxidos derivados del estireno, con excesos enantioméricos moderados (40-80%), empleando diferentes ácidos carboxílicos ópticamente activos en combinación con la lipasa de *Burkholderia cepacia* o la CAL-B.[65]

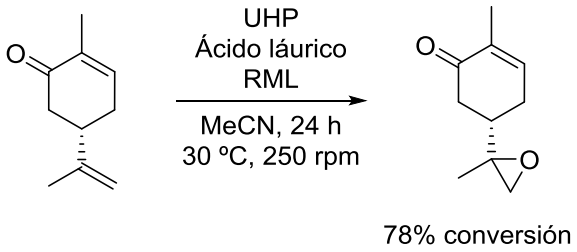
Por otro lado, se ha descrito exitosamente la acción combinada de una lipasa en un proceso global de epoxidación quimioenzimática, con una epóxido hidrolasa, que cataliza la apertura del epóxido obtenido para formar el correspondiente diol con estereoquímica *trans* (Esquema 9). La combinación de la CAL-B y células enteras de *Sphingomonas sp*. HXN-200, que poseen actividad de epóxido hidrolasa, ha mostrado ser una alternativa efectiva y ecológica en la síntesis asimétrica de dioles partiendo de olefinas cíclicas.[66]



Esquema 9. Reacción enzimática en cascada de *trans*-dihidroxilación de la ciclohexanona.

[63] gen. Klass, M. R.; Warwel, S., *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1025.
[64] Moreira, M. A.; da Graça Nascimento, M. G., *Catal. Commun.* **2007**, *8*, 2043.
[65] (a) Sarma, K.; Bhati, N.; Borthakur, N.; Goswami, A., *Tetrahedron* **2007**, *63*, 8735; (b) Sarma, K.; Goswami, A.; Goswami, B. C., *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1295.
[66] Xu, Y.; Li, A.; Jia, X.; Li, Z., *Green Chem.* **2011**, *13*, 2452.

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha descrito el uso de la lipasa de *Rhizomucor miehei* (RML)[67] en la epoxidación quimioenzimática de alquenos.[68] Así, tomando como reacción modelo de oxidación del ciclohexeno, se llevó a cabo una optimización de diversos parámetros de reacción como el disolvente, el uso de ácidos carboxílicos como precursores del perácido, la concentración de sustrato y las relaciones estequiométricas de oxidante y ácido carboxílico. Las conversiones más altas se alcanzaron empleando el ácido láurico (ácido dodecanoico), acetonitrilo como disolvente y UHP como fuente de peróxido de hidrógeno. La metodología se extendió a una serie de olefinas, obteniendo conversiones mayores al 80% en sustratos cíclicos o lineales sin conjugación del doble enlace y de hasta un 54% en derivados de estireno. También se llevó a cabo la epoxidación de terpenos, observando que el proceso es regioselectivo cuando el sustrato presenta dos dobles enlaces electrónica o estéricamente diferenciados (Esquema 10).



Esquema 10. Epoxidación regioselectiva del doble enlace exocíclico de la (*S*)-carvona.

2.2.2. Reacción de Baeyer-Villiger mediada por lipasas

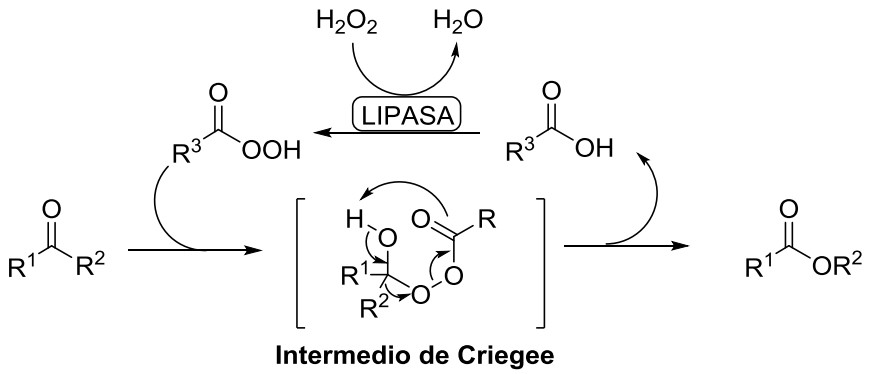
Aunque menos desarrollada que la epoxidación de Prileschajew, otra aplicación de los perácidos formados *in situ* por lipasas es la oxidación de Baeyer-Villiger de

[67] Rodrigues, R. C.; Fernández-Lafuente, R., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *64*, 1.
[68] Méndez-Sánchez, D.; Ríos-Lombardía, N.; Gotor, V.; Gotor-Fernández, V., *Tetrahedron* **2014**, *70*, 1144.

cetonas para formar lactonas.[69] En la naturaleza este tipo de reacciones son catalizadas por un tipo de enzimas pertenecientes al grupo de las oxidorreductasas, denominadas Baeyer-Villiger Monooxigenasas (BVMO), que han sido comercializadas y empleadas como catalizadores en procesos sintéticos, mostrando elevadas selectividades en procesos de desimetrización, resoluciones cinéticas y reacciones regiodivergentes.[70] Las desventajas que presentan estos biocatalizadores es que son dependientes de cofactores, como sucede con todas las oxidorreductasas, y necesitan concentraciones muy bajas de sustrato.

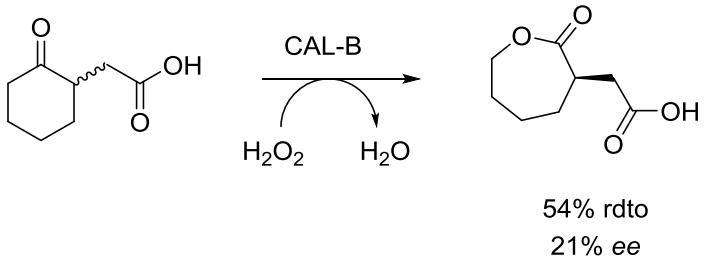
El mecanismo de la oxidación quimioenzimática de Baeyer-Villiger mediada por lipasas es análogo al de la epoxidación, ocurriendo la transformación de la cetona de partida en un éster, de forma estrictamente química fuera del centro activo del enzima (Esquema 11). Esta oxidación tiene lugar en dos pasos: inicialmente, el ataque nucleófilo del perácido sobre el carbono carbonílico genera una especie tetraédrica, conocida como intermedio de Criegee, que, en segundo lugar, experimenta una reacción concertada de reordenamiento, donde uno de los restos unidos al carbonilo migra al oxígeno y se libera el ácido carboxílico como grupo saliente. Esta etapa es la determinante de la regioselectividad del proceso, al producirse la migración del carbono que posee mayor densidad electrónica.[71]

[69] (a) Baeyer, A.; Villiger, V., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1899**, *32*, 3625; (b) ten Brink, G.-J.; Arends, I. W. C. E.; Sheldon, R. A., *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 4105.
[70] Revisiones bibliográficas recientes: (a) de Gonzalo, G.; Mihovilovic, M. D.; Fraaije, M. W., *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2208; (b) Alphand, V.; Wohlgemuth, R., *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 1928; (c) Leisch, H.; Morley, K.; Lau, P. C. K., *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4165; (d) Zhang, Z.-G.; Parra, L. P.; Reetz, M. T., *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 10160.
[71] (a) Krow, G. R., *Org. React.* **1993**, *43*, 251; (b) Renz, M.; Meunier, B., *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 737.



Esquema 11. Mecanismo general de la oxidación de Baeyer-Villiger quimioenzimática.

Utilizando esta metodología se ha descrito la oxidación de ciclopentanonas y ciclohexanonas sustituidas en posición 2 y 4, empleando el ácido tetradecanoico y CAL-B, obteniendo las correspondientes lactonas con conversiones moderadas tras varios días de reacción.[72] En algunos casos concretos se observó una ligera inducción quiral debido a la existencia de un proceso de resolución cinética en la generación del perácido, siendo la primera muestra de ello la reacción Baeyer-Villiger intramolecular de un cetoácido racémico (Esquema 12). También se obtuvieron rendimientos y excesos enantioméricos moderados en la reacción autocatalítica de 2-alquilciclohexanonas, generándose el precursor del perácido mediante la apertura de la lactona.[73]

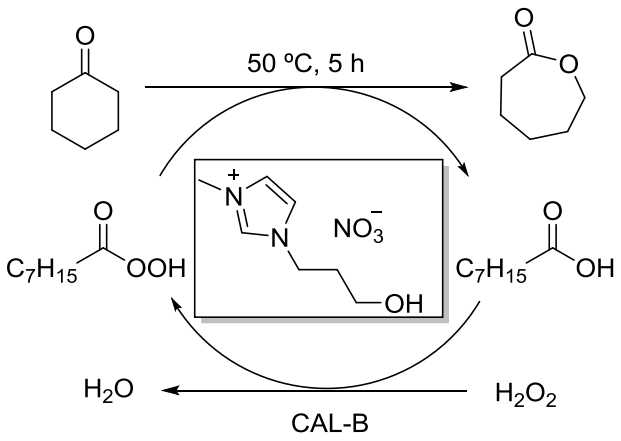


Esquema 12. Reacción Baeyer-Villiger intramolecular mediada por CAL-B.[72]

[72] Lemoult, S. C.; Richardson, P. F.; Roberts, S. M., *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, **1995**, 89.
[73] Pchelka, B. K.; Gelo-Pujic, M.; Guibe-Jampel, E., *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, **1998**, 2625.

Utilizando UHP, CAL-B y acetato de etilo, que actúa como disolvente y como precursor del perácido acético, se estudió la reacción de la ciclohexanona y derivados con sustitución en posiciones 2 o 4, observando que las ε-caprolactonas generadas no experimentaban la subsiguiente hidrólisis si se evitaba la presencia de agua en el medio.[74] Sin embargo, aplicando este mismo sistema en derivados de la ciclopentanona para obtener las correspondientes δ-valerolactonas, se encontró que estas experimentan posteriores reacciones de hidrólisis y transesterificación.[75]

Una forma de incrementar la actividad del perácido en la reacción de Baeyer-Villiger es la incorporación de líquidos iónicos, compatibles con la CAL-B, que son capaces de actuar como donores de enlaces de hidrógeno (Esquema 13). La formación de estos enlaces intramoleculares favorece el reordenamiento del intermedio de Criegee, que ocasiona un incremento sustancial en la velocidad de la reacción, e incrementa la estabilidad del enzima.[76]

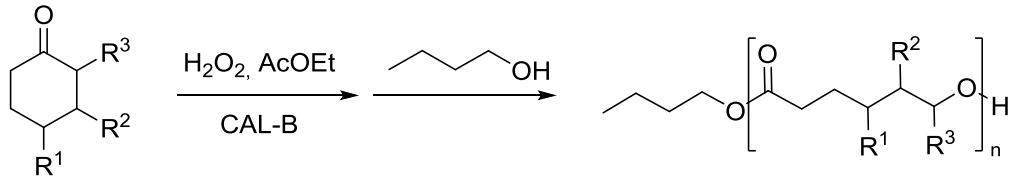


Esquema 13. Oxidación mediada por la CAL-B de la ciclohexanona en un líquido iónico.

[74] Rios, M. Y.; Salazar, E.; Olivo, H. F., *Green Chem.* **2007**, *9*, 459.
[75] Rios, M. Y.; Salazar, E.; Olivo, H. F., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *54*, 61.
[76] Kotlewska, A. J.; Van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A.; Arends, I. W. C. E., *Green Chem.* **2011**, *13*, 2154.

Recientemente, se han desarrollado nuevas formas de inmovilización de la CAL-B que permiten mejorar su actividad en la reacción de Baeyer-Villiger al aumentar su estabilidad frente al peróxido de hidrógeno. La utilización del enzima adsorbido en resinas *Sepabeads* ha mostrado una mayor tolerancia a concentraciones elevadas de oxidante, debido al mayor carácter hidrofóbico de este soporte respecto a la CAL-B disponible comercialmente, inmovilizada en resinas acrílicas (*Novozym 435*).[77] De igual manera, la inmovilización de esta lipasa en una estructura de sílica mesoporosa, modificada para que posea una superficie muy hidrofóbica, presenta una elevada actividad y estabilidad en la oxidación de varias cetonas cíclicas.[78]

La combinación de una oxidación Baeyer-Villiger mediada por la CAL-B junto con un proceso de polimerización mediante apertura de anillo permite la síntesis en cascada de poliésteres (Esquema 14). El empleo de varias ciclohexanonas como sustratos permite obtener distintos polímeros con pesos moleculares variables en función de los sustituyentes.[79]



Esquema 14. Reacción en cascada catalizada por CAL-B para la formación de poliésteres.

[77] Hernandez, K.; Fernandez-Lafuente, R., *Process Biochem.* **2011**, *46*, 873.
[78] Drożdż, A.; Chrobok, A.; Baj, S.; Szymańska, K.; Mrowiec-Białoń, J.; Jarzębski, A. B., *Appl. Catal., A* **2013**, *467*, 163.
[79] Zhong, J.; Xu, F.; Wang, J.; Li, Y.; Lin, X.; Wu, Q., *RSC Adv.* **2014**, *4*, 8533.

OBJETIVOS

En la introducción de este trabajo se ha puesto de manifiesto la creciente importancia de las biotransformaciones en procesos sintéticos orgánicos, los cuales transcurren con elevada eficiencia y selectividad catalítica de forma acorde a los 12 principios básicos de la Química Sostenible.

Basándonos en la capacidad de las lipasas para catalizar procesos de perhidrólisis en la formación de perácidos, y la posibilidad de emplear estos en un proceso *one-pot* oxidativo, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- Identificar una cetona cíclica como sustrato modelo, y optimizar una metodología sintética general para su reacción de Baeyer-Villiger en condiciones suaves de reacción.

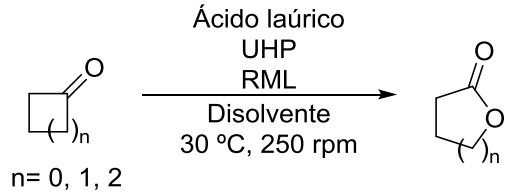
- Sintetizar mediante procedimientos químicos sencillos una familia representativa de cetonas cíclicas y sus correspondientes lactonas, desarrollando métodos analíticos adecuados para el seguimiento de las reacciones quimioenzimáticas de oxidación.

- Extender la metodología de oxidación quimioenzimática a los sustratos sintetizados, con el fin de obtener una serie de lactonas con buenos rendimientos y alta pureza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Basándonos en los estudios previos de epoxidación quimioenzimática de alquenos, desarrollados en nuestro grupo de investigación,[68] se decidió emplear inicialmente la lipasa de *Rhizomucor miehei* (RML) para catalizar la formación de un perácido responsable de la oxidación de Bayer-Villiger. Así, se eligieron inicialmente tres cetonas cíclicas como son la ciclobutanona, la ciclopentanona y la ciclohexanona, empleando ácido laúrico como precursor del perácido correspondiente, el complejo formado por urea y agua oxígenada (UHP) como agente oxidante y acetonitrilo como disolvente a 30 ºC y 250 rpm (Tabla 2).

Tabla 2. Reacción de Baeyer-Villiger de cetonas cíclicas alifáticas empleando 2 equivalentes de ácido laúrico, 1.1 equivalentes de UHP, la RML (50 mg/mmol de cetona) en disolvente orgánico (660 mM de cetona) tras 24 horas de reacción a 30 ºC y 250 rpm.

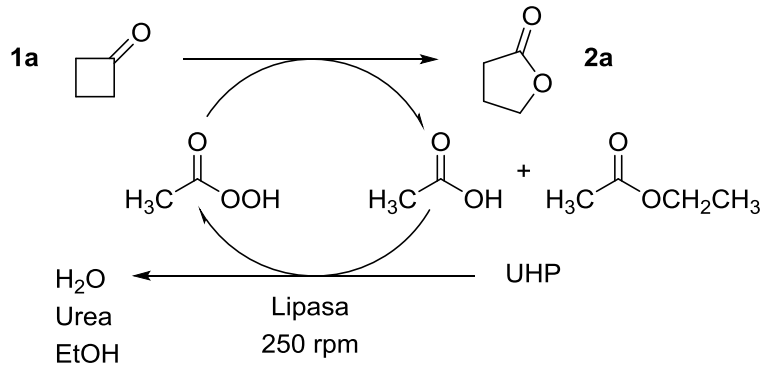


Entrada	Sustrato	Disolvente	Conversión (%)[a]
1	Ciclohexanona	MeCN	34
2	Ciclopentanona	MeCN	27
3	Ciclobutanona	MeCN	n.d.
4	Ciclobutanona	Et_2O	94
5	Ciclobutanona	CH_2Cl_2	81
6	Ciclobutanona	TBME	98

[a] Conversión calculada por CG del crudo de reacción. n.d.: no determinada.

Las reacciones se llevaron a cabo con 0.5 mmoles de sustrato, observando conversiones moderadas tanto para la ciclohexanona como para la ciclopentanoa (27-34%, entradas 1 y 2). Desafortunadamente, en el caso de la ciclobutanona no fue posible determinar la conversión de la reacción (entrada 3), ya que en el método analítico empleado existe un solapamiento de los picos en cromatografía gaseosa entre la ciclobutanona y el acetonitrilo. Por ese motivo, se decidió elegir un disolvente más volátil como dietil éter (entrada 4), diclorometano (entrada 5) o *terc*-butilmetil éter (entrada 6), observándose excelentes conversiones hacia la formación de la γ-butirolactona (**2a**) deseada tras 24 horas de reacción.

Una desventaja que presenta esta metodología es la dificultad en la purificación de los productos finales de oxidación, ya que tras un proceso de extracción líquido-líquido y cromatografía de columna no es posible separar completamente el ácido láurico de la lactona deseada. Por ello, se decidió emplear un sistema libre de ácido, utilizando el propio acetato de etilo (AcOEt) como disolvente y precursor de ácido perácetico. Así, tomando la ciclobutanona (**1a**) como sustrato modelo, se planteó el desarrollo de la metodología que se indica en el Esquema 15.



Esquema 15. Oxidación de la ciclobutanona (**1a**) en γ-butirolactona (**2a**) mediante la formación del ácido peracético.

4.1. REACCIÓN DE BAEYER VILLIGER DE LA CICLOBUTANONA

En primer lugar, se llevó a cabo un muestreo de biocatalizadores midiendo las conversiones alcanzadas en la oxidación de la ciclobutanona (**1a**) tras 24 h de reacción (Tabla 3). Para ello, se utilizaron 0.25 mmol de sustrato en una concentración de 660 mM en AcOEt, un equivalente de UHP y 12.5 mg de lipasa a 30 ºC y 250 rpm. Cabe destacar inicialmente que, mientras la prueba en ausencia de enzima apenas condujo a la formación de la lactona **2a** (entrada 1), todas las lipasas empleadas condujeron a conversiones superiores al 30%. La lipasa de *Candida antarctica* tipo B (CAL-B, entrada 3), mostró ser el catalizador más eficiente alcanzando un 77% de conversión, mientras que las lipasas de *Rhizomucor miehei* (entrada 3), AK de *Pseudomonas fluorescencs* (entrada 4), *Pseudomonas cepacia* soportada en diatomita (entrada 5) y la de *Candida rugosa* (entrada 6), no superaron el 46%.

Tabla 3. Reacción de Baeyer-Villiger de la ciclobutanona (**1a**) en la γ-butirolactona (**2a**) empleando 1 equivalente de UHP, distintas lipasas (50 mg/mmol de **1a**) en AcOEt (660 mM de **1a**) tras 24 horas de reacción a 30 ºC y 250 rpm.

Entrada	Lipasa	Conversión (%)[a]
1	----	3
2	CAL-B	77
3	RML	32
4	AK	34
5	PSL-SD	46
6	CRL	42

[a] Conversión calculada por CG del crudo de reacción.

A continuación, se decidió estudiar la influencia de diversos parámetros de reacción como el tipo y cantidad de agente oxidante, así como la concentración de la ciclobutanona (**1a**). Las pruebas llevadas a cabo con una disolución acuosa al 30% de H_2O_2 como agente oxidante en lugar de UHP, condujeron a la formación de

subproductos, poca reproducibilidad de los resultados y una mayor conversión del sustrato en ausencia del enzima (la reacción sin catalizador alcanza conversiones del 25-30% en 24 h frente al 3% utilizando UHP, entrada 1 de la Tabla 2). Por lo tanto, se decidió seguir empleando UHP como fuente de peróxido de hidrógeno.

En este punto, se llevó a cabo un estudio variando la cantidad de UHP (1.0 a 2.0 equivalentes) y la concentración de la ciclobutanona (500 mM a 1 M), estudiando el proceso quimioenzimático de oxidación a distintos tiempos de reacción, con el fin de alcanzar una conversión completa en la γ–lactona (**2a**). Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Reacción de Baeyer-Villiger de 0.25 mmoles de ciclobutanona (**1a**) empleando UHP como agente oxidante, CAL-B (50 mg/mmol de **1a**) en AcOEt a 30 ºC y 250 rpm.

Entrada	Tiempo (h)	UHP (eq)	Concentración (mM)	Conversión (%)[a]
1	24	1.0	660	77
2	24	2.0	660	>99
3	20	2.0	660	97
4	20	1.5	660	>99
5	20	1.0	500	60
6	20	1.0	800	74
7	20	1.0	1000	75
8	20	1.2	1000	79
9	20	1.5	1000	83
10	20	2.0	1000	96
11[b]	20	1.5	660	>99

[a] Conversión calculada por CG del crudo de reacción. Corresponde con la formación de lactona **2a**.
[b] 0.50 mmol sustrato.

En comparación con los resultados obtenidos en el screening inicial con la CAL-B (entrada 2 de la Tabla 3 o entrada 1 de la Tabla 4), se observa que al duplicar los equivalentes de UHP se consigue pasar de un 77% a una conversión completa tras 24 h. Este tiempo fue estrictamente necesario para la desaparición del producto de partida, ya que tras 20 horas la conversión era de un 97% (entrada 3). Sin embargo, el empleo de tan solo 1.5 equivalentes de oxidante permitió alcanzar la conversión completa a las 20 h (entrada 4), lo que indica una posible inactivación del enzima cuando se utiliza demasiada cantidad de peróxido de hidrógeno. Desafortunadamente, un mayor descenso de la cantidad de agente oxidante (1.0 equivalentes) tanto a más bajas como a más altas concentraciones de la cetona 1a condujeron a conversiones entre el 60 y el 75% (entradas 5-7).

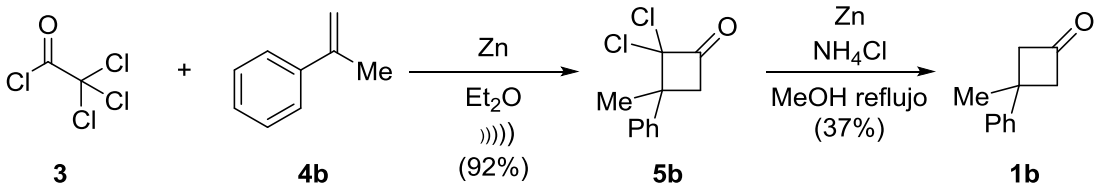
Como se puede observar en las entradas de la 7 a la 10 de la Tabla 4, el método admite una gran tolerancia a concentraciones de sustrato muy elevadas (1000 mM), observando que un incremento en la cantidad de oxidante conduce a un aumento acusado de la conversión, llegando a una conversión del 96% con 2 equivalentes de UHP (entrada 10). Finalmente, se optó por elegir las condiciones de la entrada 4 empleando una concentración de sustrato de 660 mM, 1.5 equivalentes de UHP a 30 ºC y 250 rpm, obteniendo una conversión completa a las 20 h, incluso al duplicar la cantidad de todos los reactivos y el enzima (entrada 11), lo que demuestra la reproducibilidad de la metodología empleada.

4.2. SÍNTESIS Y REACCIÓN DE BAEYER VILLIGER DE DISTINTAS CICLOBUTANONAS SUSTITUIDAS EN LA POSICIÓN 3

Con la intención de dar una aplicación general a la metodología descrita anteriormente para la preparación de γ-butirolactona (**2a**), se procedió a sintetizar una serie de ciclobutanonas **1b-i** con sustitución en la posición 3 del anillo. Para ello, se tomaron sustratos accesibles comercialmente desarrollando diversas aproximaciones sintéticas dependiendo del compuesto final deseado.

4.2.1. Síntesis de las ciclobutanonas 1b-i

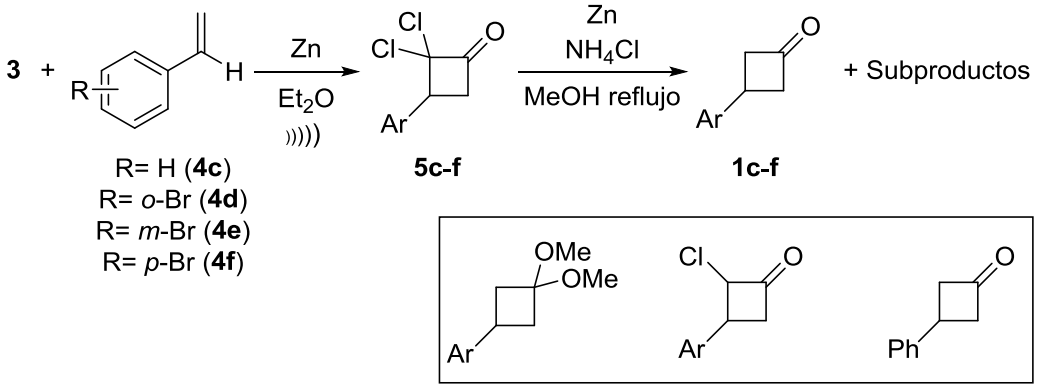
Las ciclobutanonas **1b-g** se sintetizaron mediante rutas sintéticas descritas en la bibliografía basadas en dos pasos de reacción: (i) una reacción de cicloadición [2+2] entre la 2,2-diclorocetena, formada en el medio de reacción a partir del tricloruro de acetilo (**3**), y diversos estirenos **3b-g**; (ii) y una posterior reducción de la ciclobutanona diclorada **4b-g** obtenida empleando zinc (Esquemas 16 y 18). Así, inicialmente se llevó a cabo la reacción entre **3** y el 2-fenilpropeno o α-metil-estireno (**4b**) en presencia de Zn,[80] obteniéndose la 2,2-diclorocetena **5b** con un 92% de rendimiento, compuesto que fue posteriormente reducido en presencia de Zn para dar tras cromatografía de columna la 3-fenil-3-metilciclobutanona (**1b**) con un 34% de rendimiento global de los dos pasos.



Esquema 16. Síntesis de la 3-fenil-3-metilciclobutanona (**1b**).

[80] Metha, G.; Rao, P. S. H., *Synth. Commun.* **1985**, *15*, 991.

De una manera análoga, esta ruta permitió obtener la 3-fenilciclobutanona (**1c**), empleando como material de partida el estireno (**4c**), sin embargo cuando se emplearon estirenos bromados los resultados fueron poco satisfactorios, obteniendo rendimientos muy bajos en el caso de las cetonas **1e-f**, y sin observar formación del producto de cicloadición **5d** cuando se partió del *orto*-bromoestireno (**4d**). Los mayores problemas tuvieron lugar en el segundo paso de reacción, donde se obtenía como subproducto el acetal dimetílico de las correspondientes ciclobutanonas y, en algunos casos, la reducción no era completa obteniendo la correspondiente ciclobutanona monoclorada, cuya separación por cromatografía de columna no fue posible. Además, en el caso de los compuestos bromados se observó la sustitución del átomo de bromo por uno de hidrógeno, obteniendo la cetona **1c**, dificultando de nuevo el aislamiento con alta pureza de la ciclobutanona deseada (Esquema 17).

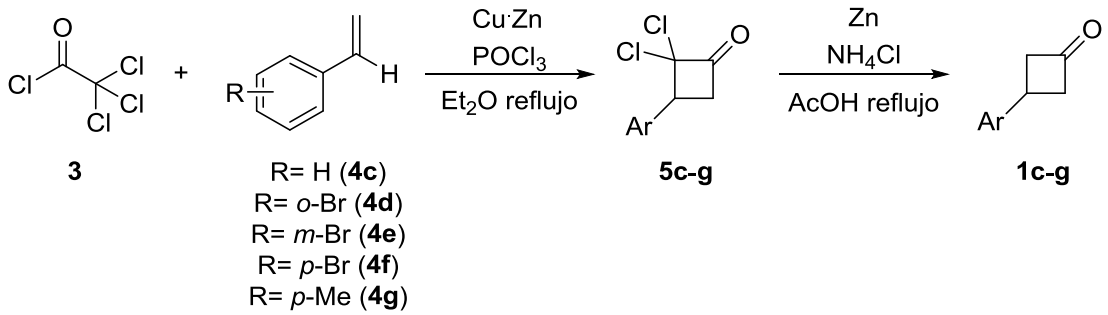


Esquema 17. Productos obtenidos en la reducción de las cetonas **5c-f** con Zn y cloruro amónico en MeOH, obtenidas por reacción de tricloruro de acetilo con estirenos en presencia de Zn.

Para evitar estas reacciones secundarias, se decidió llevar a cabo la formación de la cetona **4d** empleando, por un lado, una mezcla cobre-zinc para el proceso de cicloadición, y por otro zinc en ácido acético glacial, en lugar de metanol (Esquema 18).[81] De esta manera, se evitó la formación del acetal dimetílico y, más importante, no

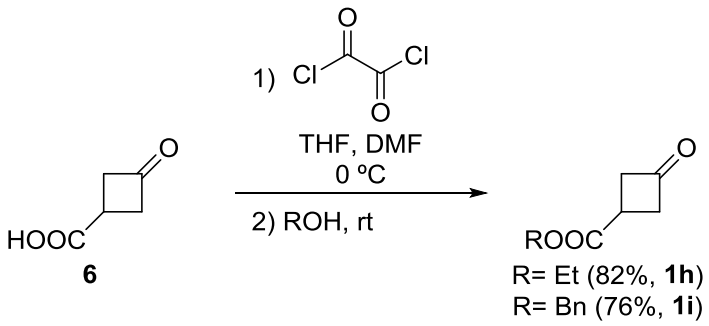
[81] (a) Coelho, F., de Azevedo, M. B. M.; Boschiero, R.; Resende, P., *Synth. Commun.* **1997**, *27*, 2455; (b) Trost, B. M.; Xie, J., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6231.

se observó la reducción del enlace C-Br del anillo aromático. Adicionalmente, el empleó de estas condiciones más fuertes permitió la eliminación de los dos átomos de cloro de forma más eficaz de la diclorocetona **4f**. Con el fin de dar generalidad al procedimiento, se desarrolló el procesos conjunto con una serie de estirenos no sustituidos (**4c**), bromados (**4d**-**f**) y metilados (**4g**), obteniéndose las butirolactonas **1c**-**g** con rendimientos globales moderados (31-50%).



Esquema 18. Síntesis de γ-butirolactonas **1c**-**g**.

De una manera más simple y empleando el ácido 3-oxociclobutanocarboxílico (**6**) como material de partida, se llevó a cabo su esterificación con etanol o alcohol bencílico empleando cloruro de oxalilo para la formación del cloruro de ácido intermedio, obteniéndose las butirolactonas **1h** y **1i** con un 82 y un 76% de rendimiento aislado respectivamente, tras purificación por cromatografía de columna en gel de sílice (Esquema 19).



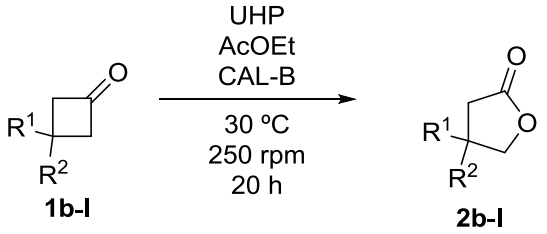
Esquema 19. Síntesis de los cetoésteres **1h y 1i**.

4.2.2. Oxidaciones de Baeyer Villiger de las ciclobutanonas 1b-l mediadas por la CAL-B

Una vez obtenidas las cetonas **1b-i**, se incorporaron al conjunto de sustratos otras ciclobutanonas comercialmente accesibles como la 3-(*p*-clorofenil)ciclobutanona (**1j**), la 3-(*p*-fluorofenil)ciclobutanona (**1k**) y la 3-benciloxiciclobutanona (**1l**). Antes de llevar a cabo las correspondientes reacciones de oxidación quimioenzimáticas empleando la CAL-B, como se había realizado con la ciclobutanona (**1a**), se desarrollaron métodos analíticos empleando la técnica de cromatografía de gases, para poder seguir las reacciones y medir las conversiones (ver *parte experimental*). Así, adicionalmente se sintetizaron las lactonas **2b-l** por reacción de las cetonas con ácido *meta*-cloroperbenzoico en diclorometano.

En la Tabla 5 se recogen los resultados obtenidos en la reacción de Baeyer-Villiger empleando la CAL-B, complejo UHP como agente oxidante y el AcOEt como disolvente y, a su vez, precursor del ácido peracético. Cabe mencionar que las reacciones en ausencia de enzima condujeron a conversiones no superiores, en ningún caso, al 25%, demostrándose de esa manera la eficiencia del sistema enzimático. En estas reacciones en blanco, los valores de conversión más altos se alcanzaron con las cetonas bromadas, siendo el más alto el de **1d** (22%) probablemente por el efecto estérico del bromo en posición *orto*. Con los cetoésteres **1h-i** prácticamente no se observó conversión del blanco (< 5%), al igual que con las cetonas sustituidas con un grupo fenilo **1b-c** (< 3%).

Tabla 5. Reacción de Baeyer-Villiger de distintas ciclobutanonas **1b-l** empleando 1.5 equivalentes de UHP como agente oxidante, CAL-B (50 mg/mmol de cetona) en AcOEt (660 mM de cetona) a 30 ºC y 250 rpm.



Entrada	Sustrato[a]	R^1	R^2	Conversión (%)[b]	Rdto. (%)[c]
1	**1b**	Me	Ph	94	93[d]
2	**1c**	H	Ph	94	99[d]
3	**1d**	H	2-Br-C_6H_4	>99	98
4	**1e**	H	3-Br-C_6H_4	>99	97
5	**1f**	H	4-Br-C_6H_4	>99	99
6	**1g**	H	4-Me-C_6H_4	>99	97
7	**1h**	H	COOEt	>99	84
8	**1i**	H	COOBn	>99	96
9	**1j**	H	4-Cl-C_6H_4	>99	87
10	**1k**	H	4-F-C_6H_4	78	51
11	**1l**	H	OBn	90	94[d]

[a] Se emplearon entre 0.20-0.55 mmoles de cetona, excepto en la entrada 6 que se escaló la reacción a 250 mg (1.56 mmoles) de la cetona **1g**.
[b] Conversión calculada por CG del crudo de reacción a las 20 h de reacción.
[c] Rendimientos de los productos aislados.
[d] Los productos se aislaron una vez que la reacción alcanzó conversión completa.

En el caso de las reacciones catalizadas con la CAL-B, se midieron las conversiones a las 20 horas de reacción siendo en todos los casos superiores al 90%, excepto para el compuesto fluorado en posición para del anillo aromático (entrada 10). A excepción de este caso, se hizo un seguimiento periódico de las reacciones, hasta observar la desaparición completa de la cetona de partida, momento en el cual se llevó a cabo el aislamiento de los productos finales y se calcularon los rendimientos aislados,

los cuales fueron entre altos y excelentes. El proceso de purificación requerido es muy simple y efectivo, necesitando simplemente de una filtración del enzima y una extracción del producto final, en contra de lo que sucede con otros procesos de oxidación químicos catalizados por metales o sales inorgánicas.

De todos los casos estudiados un escaso número de cetonas necesitaron de más de 20 horas para alcanzar una conversión completa: las fenilciclobutanonas **1b** y **1c** (entradas 1 y 2) que necesitaron de 30 horas, así como la cetona **1l** que requirió de 40 horas (entrada 11). Cabe destacar que los cetoésteres **1h** y **1i** (entradas 7 y 8) experimentaron la oxidación de Bayer-Villiger sin observarse formación de productos secundarios de hidrólisis, lo cual no sería de extrañar al ser mediada la reacción por un enzima hidrolítico como es la CAL-B.

Sorprendentemente, la cetona fluorada en posición *para* **1k** (entrada 10) mostró una reactividad menor al análogo clorado (**1j**, entrada 9) o bromado (**1f**, entrada 5), siendo necesaria una purificación por cromatografía de columna para aislar la lactona **2k**, que se obtuvo con un rendimiento moderado pese a que el análisis por cromatografía de gases del crudo de reacción no muestra la formación de otros subproductos.

Por último, es destacable la eficiencia en el escalado de las reacciones, así la cetona metilada en posición *para* **1g**, donde se emplearon 250 mg de cetona partida, alcanzado una conversión completa tras 20 horas de reacción (entrada 6).

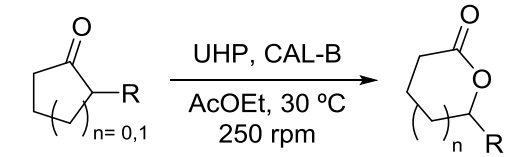
4.3. REACCIONES DE BAEYER-VILLIGER DE DERIVADOS DE CICLOPENTANONA Y CICLOHEXANONA

Finalmente se decidió llevar a cabo un estudio de la posible aplicabilidad de este procedimiento a otras cetonas cíclicas, como ciclopentanonas y ciclohexanonas sustituidas o no en la posición 2. Así, empleando las condiciones de reacción

previamente optimizadas con las ciclobutanonas **1a-l**, se observó la formación exclusiva de un producto de reacción en proporciones muy variables según la estructura del producto de partida (Tabla 6).

En los tres sustratos empleados que podrían conducir a dos posibles productos según la regioselectividad de la reacción (entradas 2, 4 y 5) se observó únicamente la formación del producto normal de oxidación Baeyer-Villiger, es decir, la lactona que posee el grupo más sustituido en posición α al átomo de oxígeno debido a la migración del grupo con mayor densidad electrónica. Los valores observados en la conversión muestran que la oxidación de los ciclos de 6 se produce más fácilmente que la de los de 5, y por otro lado que existe un aumento importante en la reactividad cuando uno de los carbonos en α al carbonilo se encuentra sustituido, lo que parece indicar que el reordenamiento del intermedio de Criegee es el paso limitante en la oxidación de los sustratos.

Tabla 6. Reacción de Baeyer-Villiger de distintas ciclopentanonas y ciclohexanonas empleando 1.5 equivalentes de UHP como agente oxidante, CAL-B (50 mg/mmol de cetona) en AcOEt (660 mM de cetona) a 30 ºC y 250 rpm.



R= H, Me, Ph

Entrada	Sustrato (mmol)[a]	Producto	Conversión (%)[b]
1	Ciclopentanona (0.50)	δ-Valerolactona	25
2	2-Metilciclopentanona (0.25)	5-Metil-δ-valerolactona	58
3	Ciclohexanona (0.50)	ε-Caprolactona	44
4	2-Metilciclohexanona (0.50)	6-Metil-ε-caprolactona	83
5	2-Fenilciclohexanona (0.25)	6-Fenil-ε-caprolactona	87

[a] Cantidad de cetona empleada entre paréntesis.
[b] Conversión calculada por CG del crudo de reacción.

CONCLUSIONES

En este Trabajo Fin de Máster se ha puesto a punto una metodología quimioenzimática en one-pot para la formación de γ-butirolactona a partir de ciclobutanona, optimizando distintos parámetros de reacción como el tipo de enzima, la concentración de sustrato y la cantidad de agente oxidante.

La lipasa de Candida antarctica de tipo B ha resultado ser un catalizador muy eficaz del proceso de perhidrólisis del acetato de etilo con el complejo urea-peróxido de hidrógeno, obteniéndose el ácido perácetico que ha sido el responsable directo de la reacción de Baeyer-Villiger.

Posteriormente, y con el fin de generalizar esta aproximación quimioenzimática, se ha desarrollado la síntesis de una familia de ciclobutanonas diferentemente sustituidas en la posición 3 del anillo, la cual se ha basado en un proceso de dos etapas, consistente en una reacción de cicloadición [2+2] entre la 2,2-dicloroceteno y derivados del estireno para formar las correspondientes 2,2-diclorociclobutanonas, que fueron reducidas en presencia de zinc para dar las correspondientes 3-arilciclobutanonas. Alternativamente, se han sintetizado cetoésteres por esterificación del ácido ciclobutanoico con etanol o alcohol bencílico utilizando cloruro de oxalilo.

La oxidación de las cetonas sintetizadas, utilizando la CAL-B como mediador y UHP como fuente de peróxido de oxígeno, ha permitido obtener las correspondientes lactonas con excelentes rendimientos aislados tras un simple proceso de filtración y extracción.

El proceso ha transcurrido satisfactoriamente a altas concentraciones de sustrato (600 a 1000 mM), siendo fácilmente escalable hasta al menos 250 mg de sustrato.

PARTE EXPERIMENTAL

6.1. DISOLVENTES Y REACTIVOS GENERALES

Los reactivos químicos fueron adquiridos de distintas casas comerciales como Sigma-Aldrich, Acros o Fluka. La lipasa de *Candida antarctica* tipo B fue donada por la compañía Novo-Nordisk (CAL-B, Novozym-435, 7300 PLU/g); la lipasa de *Rhizomucor miehei* fue obtenida de Novo-Nordisk (RML, 150 IUN/g); las lipasas de *Pseudomonas cepacia* (PSL-SD, 23000 U/g), AK de *Pseudomonas fluorescens* (AK, 23700 U/g) y *Candida rugosa* (CRL, 1410 U/g) fueron adquiridas a Sigma-Aldrich.

El dietil éter empleado en las reacciones de cicloadición [2+2] fue sometido a un tratamiento de secado sobre sodio, empleando como indicador la benzofenona y almacenándose bajo atmósfera de nitrógeno. El oxicloruro de fósforo ($POCl_3$) fue destilado bajo presión reducida previamente a su utilización. El resto de reactivos y disolventes fueron empleados sin purificación adicional.

6.2. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS

6.2.1. Cromatografía en gel de sílice

Para la cromatografía en capa fina (TLC, del inglés *thin layer chromatography*) se han utilizado cromatofolios de gel de sílice 60 F_{254} con tamaño de partícula de 10 a 12 μm, las cuales llevan incorporado un indicador fluorescente para detección por ultravioleta (λ_{max} = 254 mm), comercializados por Merck.

Como reveladores se empleó una disolución acuosa formada por un 1% de $KMnO_4$ (2 g), un 5% de K_2CO_3 (10 g) y un 5% de NaOH (10 g) en 200 mL de agua, estando las proporciones indicadas en relación peso:volumen. Alternativamente, se utilizó una disolución de *p*-anisaldehído (12 mL) en ácido sulfúrico fumante (17 mL), ácido acético (5 mL) y MeOH (450 mL).

Las cromatografías de columna se realizaron sobre gel de sílice 60, con tamaño de partícula de 40-63 μm o 230-400 *mesh*, adquirido a Merck.

6.2.2. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los experimentos de resonancia magnética nuclear de ^{1}H-RMN, ^{13}C-RMN y DEPT se realizaron en los espectrómetros Bruker AV-300 (300.13 MHz para ^{1}H y 75.5 MHz para ^{13}C) y Bruker DPX-300 (300.13 MHz para ^{1}H y 75.5 MHz para ^{13}C), empleando en todos los casos $CDCl_3$ como disolvente. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón, relativos a la señal del tetrametilsilano como referencia interna, y las constantes de acoplamiento (*J*) en Hertzios (Hz).

6.2.3. Espectroscopía infrarroja (IR)

Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro PERKIN-ELMER FT: ESPECTRUM 100T empleando como soporte dos monocristales de NaCl, utilizando nujol para disolver los compuestos sólidos, en la zona comprendida entre 4000 y 700 cm^{-1}. Las bandas de vibración se indican en valores de *v* máxima y se expresan en cm^{-1}.

6.2.4. Puntos de fusión

Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Gallenkamp usando tubos capilares abiertos y, por tanto, sus valores no están corregidos.

6.2.5. Espectrometría de masas (EM)

Los experimentos de masas se realizaron con un equipo MAT 95 de Finigan, empleando la técnica de ionización por electrospray en modo positivo (ESI^+).

6.2.6. Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)

Los experimentos de masas de alta resolución se llevaron a cabo utilizando un espectrómetro micrOTOF-Q para obtener los espectros de masas con la técnica ESI^+. Los valores se refieren a unidades de masa atómica (uma). En todos los casos se observaron perfectamente los iones moleculares de los compuestos estudiados, a excepción de la 3-(4-bromofenil)ciclobutan-2-ona (**1f**).

6.2.7. Cromatografía de gases (CG)

Los análisis de cromatografía de gases (CG) para la medida de las conversiones en las reacciones quimioenzimáticas de Bayer-Villiger se llevaron a cabo en un cromatógrafo Hewlett-Packard 6860 con un detector de ionización de llama, utilizando

las columnas con relleno aquiral HP-1 (30 m x 0.32 mm x 0.25 μm) y HP-5 (30 m x 0.32 mm x 0.25 μm).

Las condiciones de inyección empleando la técnica de CG y los tiempos de retención (t_R) para la ciclobutanona (**1a**), la γ-butirolactona (**2a**), así como diferentes ciclobutanonas **1b-l** y lactonas **2b-l** sustituidas en posición 3, se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Separación analítica por CG de los sustratos **1a-l** y productos **2a-l** de las oxidaciones quimioenzimáticas.[a]

Método[b]	**Sustrato**	t_R **(min)**	**Producto**	t_R **(min)**
A	**1a**	2.1	**2a**	7.0
B	**1b**	11.5	**2b**	13.7
C	**1c**	7.0	**2c**	10.8
C	**1d**	11.2	**2d**	13.8
C	**1e**	11.6	**2e**	14.4
C	**1f**	11.8	**2f**	14.6
C	**1g**	8.7	**2g**	11.0
B	**1h**	6.5	**2h**	11.4
B	**1i**	14.7	**2i**	16.0
C	**1j**	6.8	**2j**	10.5
C	**1k**	10.3	**2k**	13.3
C	**1l**	11.8	**2l**	13.2

[a] Para todas las medidas se empleó la columna HP-1 excepto para **1a** y **2a**, con las que se utilizó la HP-5.

[b] Temperatura inicial (ºC)/ tiempo (min)/ rampa (ºC/ min)/ temperatura (ºC)/ tiempo (min).
Método **A**: 30 (ºC)/ 5 (min)/ 30 (ºC/ min)/ 180 (ºC)/ 0 (min)
Método **B**: 70 (ºC)/ 7 (min)/ 10 (ºC/ min)/ 90 (ºC)/ 0 (min)/ 20 (ºC/ min)/ 200 (ºC)/ 2 (min)
Método **C**: 100 (ºC)/ 5 (min)/ 10 (ºC/min)/ 220 (ºC)/ 1 (min)

Tabla 8. Separación analítica por CG con la columna HP-1 de los sustratos y productos de las oxidaciones quimioenzimáticas de cetonas cíclicas de cinco y seis eslabones.

Método[a]	**Compuesto**	t_R **(min)**
A	Ciclopentanona	3.4
A	δ-Valerolactona	5.9
D	2-Metilciclopentanona	1.9
D	5-Metil-δ-valerolactona	5.9
D	Ciclohexanona	2.2
D	ε-Caprolactona	7.5
D	2-Metilciclohexanona	2.9
D	6-Metil-ε-caprolactona	9.7
D	2-Fenilciclohexanona	13.9
D	6-Fenil-ε-caprolactona	15.1

[a] Temperatura inicial (ºC)/ tiempo (min)/ rampa (ºC/ min)/ temperatura (ºC)/ tiempo (min).
Método **A**: 30 (ºC)/ 5 (min)/ 30 (ºC/ min)/ 180 (ºC)/ 0 (min)
Método **D**: 70 (ºC)/ 10 (min)/ 40 (ºC/ min)/ 200 (ºC)/ 4 (min)

6.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

6.3.1. Síntesis química de la 3-fenil-3-metilciclobutanona (1b)

a) Reacción de cicloadición [2+2]

En un matraz de dos bocas bajo atmósfera inerte se disuelve el α-metilestireno (**4b**, 650 μL, 5.0 mmol) en Et_2O seco (50 mL) y se añade Zn (654 mg, 10.0 mmol). A continuación, se acopla un embudo de adición compensada donde se coloca una disolución de cloruro de tricloroacetilo (**3**, 837 μL, 7.5 mmol) en Et_2O seco (25 mL). Se introduce el montaje en el baño de ultrasonidos y se deja gotear lentamente la disolución de **3** sobre la suspensión, manteniendo la temperatura del baño entre 15 y 20 ºC. Se sonica durante otra hora adicional, siempre controlando la temperatura del baño, y transcurrido ese tiempo se detiene la reacción por filtración en una placa con celita. El crudo de reacción se lava repetidas veces con agua (2 x 25 mL), una disolución saturada de $NaHCO_3$ (5 x 25 mL) y salmuera (25 mL). La fase orgánica resultante se seca con Na_2SO_4, se filtra y se elimina el disolvente a presión reducida. El crudo obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (5% AcOEt/hexano), aislándose la 2,2-dicloro-3-metil-3-fenilciclobutanona **5b** con un 92% de rendimiento.

b) Reducción con Zn

En un matraz provisto de un imán se disuelve la 2,2-dicloro-3-metil-3-fenilciclobutanona (**5b**, 1.160 g, 5.06 mmol) en MeOH (20 mL) y se añade NH_4Cl hasta saturación. Se añade Zn (1.987 g, 30.38 mmol) y se agita la suspensión a reflujo durante 12 h. Transcurrido ese tiempo, se filtra en una placa con celita y se evapora el disolvente bajo presión reducida. El crudo obtenido se redisuelve en Et_2O (100 mL) y se lava con agua (2 x 50 mL), una disolución saturada de $NaHCO_3$ (2 x 50 mL) y salmuera (50 mL). La fase orgánica resultante se seca con Na_2SO_4, se filtra y se elimina el disolvente en el

rotavapor. El crudo obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (10% AcOEt/hexano), aislándose la ciclobutanona **2b** con un 37% rendimiento (34% global para las dos estapas).

6.3.2. Síntesis química de las ciclobutanonas 1c-g

a) Preparación de la aleación Cu·Zn

Una disolución de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (760 mg, 3.0 mmol) en agua (5 mL) se añade en dos porciones sobre una suspensión de Zn (6.5 g, 99.4 mmol) en agua (10 mL). Tras un minuto, se filtra en una placa y se lava con agua (2 x 5 mL), acetona (2 x 5 mL) y Et_2O (2 x 5 mL). El sólido gris negruzco obtenido se seca a presión reducida en un horno de bolas a 100 ºC durante 6 h y se guarda bajo atmósfera inerte.

b) Reacción de cicloadición [2+2]

En un matraz Schlenk provisto de un imán y bajo atmósfera inerte se prepara una suspensión del estireno **3c-g** (5.0 mmol) y Cu·Zn (1.31 g, 0.26 g/ mmol estireno) en Et_2O seco (20 mL). Por otro lado, en un embudo de adición acoplado se disuelve cloruro de tricloroacetilo (**3**, 1116 μL, 10.0 mmol), oxicloruro de fósforo ($POCl_3$) recién destilado (512 μL, 5.5 mmol) en Et_2O seco (11 mL). Esta disolución se adiciona sobre el estireno correspondiente de manera lenta a temperatura ambiente y, una vez completada, se calienta la mezcla a reflujo durante 24 h. Se deja enfriar el crudo de reacción y se filtra con celita. Se elimina parte del Et_2O en el rotavapor y se añade hexano (100 mL), se agita vigorosamente y se deja reposar, formándose un precipitado. La disolución sobrenadante se decanta y se lava con una disolución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (2 x 40 mL) y salmuera (40 mL). La fase orgánica resultante se seca con Na_2SO_4, se filtra y el disolvente se elimina a presión reducida, obteniéndose la

correspondiente 2,2-diclorocetona **5c-g** que se usa posteriormente sin purificación adicional.

c) Reducción con Zn

El crudo obtenido en el paso anterior, donde está presente la ciclobutanona diclorada correspondiente **5c-g** (5.0 mmol) se disuelve en ácido acético glacial (20 mL) y se añade Zn (1.34 g, 20.0 mmol). La reacción se calienta a reflujo durante 12 h y, transcurrido ese tiempo, se añade agua (25 mL). Se extrae con Et_2O (2 x 15 mL) y se combinan las fases orgánicas. Estas se lavan con una disolución saturada de $NaHCO_3$ (4 x 15 mL) y salmuera (2 x 15 mL), se secan con Na_2SO_4, se filtran y se elimina el disolvente en el rotavapor. El crudo obtenido se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (10-20% AcOEt/hexano), aislándose las ciclobutanonas **2c-g** con rendimientos globales del 30 al 50%.

6.3.3. Síntesis química del 3-oxociclobutanocarboxilato de etilo (1h)

En un matraz Schlenk bajo atmósfera inerte se disuelve el ácido 3-oxociclobutanocarboxílico (**6**, 200 mg, 1.75 mmol) en THF seco (7 mL), se adiciona una gota de DMF y se enfría la disolución en baño de hielo. Se añade cloruro de oxalilo (276 μL, 3.5 mmol) y se agita durante media hora la mezcla, tiempo tras el cual se evapora el THF en el rotavapor, se redisuelve en EtOH (7 mL) y se agita a temperatura ambiente durante 8 h. Transcurrido este tiempo, se evapora el disolvente en el rotavapor y se purifica por cromatografía de columna en gel de síllice (10-20% AcOEt/hexano), obteniéndose la ciclobutanona **1h** con un 82% de rendimiento.

6.3.4. Síntesis química del 3-oxociclobutanocarboxilato de bencilo (1i)

En un matraz Schlenk bajo atmósfera inerte se disuelve ácido 3-oxociclobutanocarboxílico (**6**, 200 mg, 1.75 mmol) en THF seco (7 mL), se adiciona una gota de DMF y se enfría la disolución en baño de hielo. Se añade cloruro de oxalilo (276 μL, 3.5 mmol), agitando durante media hora la mezcla. Transcurrido este tiempo se retira la mezcla del baño de hielo y se adiciona alcohol bencílico (544 μL, 5.26 mmol), agitando durante 8 h a temperatura ambiente. Se evapora el disolvente en el rotavapor y se purifica por cromatografía de columna en gel de sílice (20% AcOEt/hexano), obteniéndose la ciclobutanona **1i** con un 76% de rendimiento.

6.3.5. Síntesis química de las lactonas 2b-l con ácido *m*-cloroperbenzoico (MCPBA)

A una disolución de la correspondiente ciclobutanona **1b-l** (0.25 mmol) en CH_2Cl_2 (1.0 mL) se añade el MCPBA (88 mg, 0.50 mmol) y se agita durante 20 h. El crudo de reacción se lava repetidamente con una disolución acuosa saturada de $NaHCO_3$ (6 x 5 mL), la fase orgánica se seca con Na_2SO_4, se filtra y se elimina el disolvente en el rotavapor. El crudo obtenido se purifica con cromatografía de columna en gel de sílice (10-30% AcOEt/hexano), aislándose las lactonas **2a-l** con rendimientos comprendidos entre el 45 y el 90%.

6.3.6. Procedimiento general para la síntesis quimioenzimática de lactonas utilizando ácido láurico

Sobre una disolución de ciclobutanona, ciclopentanona o ciclohexanona (0.5 mmol) en un disolvente orgánico (Et_2O, CH_2Cl_2 o TBME, 760 μL) depositada en matraz Erlenmeyer, se añaden sucesivamente ácido láurico (200 mg, 1.0 mmol), UHP (52 mg, 0.55 mmol) y la RML (25 mg). La reacción se agita durante 24 horas a 30 ºC y 250 rpm. Transcurrido ese tiempo se añaden 2 mL de agua y se filtra el enzima. Se

extrae con AcOEt (3 x 5 mL) y las fases orgánicas combinadas se lavan con agua (2 x 5 mL) y salmuera (5 mL) y se secan con Na_2SO_4. A continuación, se toman alícuotas para obtener las medidas de conversión por CG (ver Tabla 2).

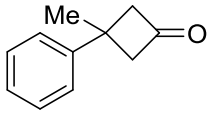
6.3.7. Procedimiento general para la síntesis de lactonas 2a-l empleando la CAL-B en AcOEt

Sobre una disolución de **1a-l** (0.25 mmol) en AcOEt (379 μL, 30.0 mmol) se añade UHP (35 mg, 0.38 mmol) y CAL-B (12.5 mg). La suspensión se agita durante 20 h a 30 ºC y 250 rpm y se toma una alícuota para la medida de la conversión por CG. La reacción se mantiene hasta alcanzar la conversión completa del sustrato y, transcurrido ese tiempo, se añade agua (2 mL) y se filtra el enzima. Se extrae con AcOEt (3 x 5 mL) y las fases orgánicas combinadas se lavan con agua destilada (2 x 5 mL) y salmuera (5 mL). A continuación se secan con Na_2SO_4 y el disolvente se elimina a presión reducida obteniendo las correspondientes lactonas **2a-l** con rendimientos comprendidos entre el 51 y el 99% (ver Tabla 5).[35]

[35] En el caso de la lactona **2k** se llevó a cabo la purificación en columna cromatográfica en gel de sílice, empleando como eluyente una mezcla al 30% AcOEt/hexano.

6.4. DATOS EXPERIMENTALES: CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

3-Fenil-3-metilciclobutan-2-ona (1b)



1b

Fórmula empírica: $C_{11}H_{12}O$

Peso molecular: 160.22 g/mol

Estado físico: Aceite incoloro

***R*$_f$** (20% AcOEt/hexano): 0.68

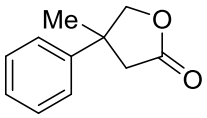
^{1}H RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 1.62 (s, 3H), δ 3.07-3.17 (m, 2H), δ 3.42-3.53 (m, 2H), δ 7.23-7.42 (m, 5H) ppm

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 31.1 (CH_3), δ 34.0 (C), δ 59.3 ($2CH_2$), δ 125.7 (CH), δ 126.3 (CH), δ 128.6 (2CH), δ 148.3 (C), δ 206.6 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3059, 3026, 2958, 2921, 1785, 1602, 1496, 1445, 1381, 1080, 764 cm^{-1}

HRMS (ESI^+, *m/z*): calculada para ($C_{11}H_{12}NaO$) $(M+Na)^+$: 183.0780, encontrada: 183.0776

4-Fenil-4-metildihidrofuran-2(3H)-ona (2b)



2b

Fórmula empírica: $C_{11}H_{12}O_2$

Peso molecular: 176.21 g/mol

Estado físico: Sólido blanco

Punto de fusión: 49-51 ºC

$\boldsymbol{R_f}$ (30% AcOEt/hexano): 0.43

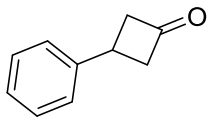
^{1}H RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 1.54 (s, 3H), 2.68 (dd, $^2J_{HH}$= 16.8, $^4J_{HH}$= 0.4, 1H), 2.93 (dd, $^2J_{HH}$= 16.8, $^4J_{HH}$= 0.6, 1H), 4.39-4.47 (m, 2H), 7.18-7.23 (m, 2H), 7.27-7.33 (m, 1H), 7.36-7.42 (m, 2H) ppm

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 28.1 (CH_3), 42.1 (CH_2), 44.2 (C), 78.5 (CH_2), 125.2 (2CH), 127.3 (CH), 129.1 (2CH), 144.4 (C), 176.2 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3024, 2969, 2930, 2904, 1773, 1601, 1497, 1305, 1173, 1094, 1020, 767 cm^{-1}

HRMS (ESI^+, *m/z*): calculada para ($C_{11}H_{12}NaO_2$) $(M+Na)^+$: 199.0730, encontrada: 199.0781

3-Fenilciclobutan-2-ona (1c)



1c

Fórmula empírica: $C_{10}H_{10}O$

Estado físico: Aceite incoloro

Peso molecular: 146.19 g/mol

$\boldsymbol{R_f}$ (20% AcOEt/hexano): 0.45

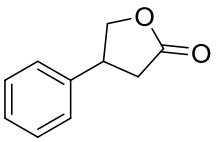
^{1}H RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 3.10-3.22 (m, 2H), 3.35-3.47 (m, 2H), 3.51-3.65 (m, 1H), 7.13-7.31 (m, 5H) ppm

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 28.5 (CH), 54.8 ($2CH_2$), 126.6 (2CH), 126.7 (CH), 128.8 (2CH), 143.7 (C), 206.8 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3062, 3029, 2975, 2923, 1785, 1603, 1496, 1380, 1104, 780 cm^{-1}

HRMS (ESI^+, *m/z*): calculada para ($C_{10}H_{10}NaO$) $(M+Na)^+$: 169.0624, encontrada: 169.0632

4-Fenildihidrofuran-2(3H)-ona (**2c**)



2c

Fórmula empírica: $C_{10}H_{10}O_2$

Peso molecular: 162.07 g/mol

Estado físico: Sólido blanco

Punto de fusión: 46-47 ºC

$\boldsymbol{R_f}$ (20% AcOEt/hexano): 0.20

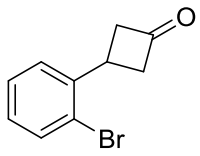
^{1}H RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 2.67 (dd, $^2J_{HH}$= 17.5, $^3J_{HH}$= 9.1, 1H), 2.92 (dd, $^2J_{HH}$= 17.5, $^3J_{HH}$= 8.3, 1H), 3.73-3.85 (m, 1H), 4.26 (dd, $^2J_{HH}$= 9.0, $^3J_{HH}$= 8.1, 1H), 4.66 (dd, $^2J_{HH}$= 9.0, $^3J_{HH}$= 8.3, 1H), 7.21-7.40 (m, 5H) ppm

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 35.8 (CH_2), 41.2 (CH), 74.1 (CH_2), 126.8 (2CH), 127.8 (CH), 129.2 (2CH), 139.5 (C), 176.5 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3064, 3032, 2973, 2904, 1763, 1601, 1456, 1355, 1163, 1010, 761 cm^{-1}

HRMS (ESI^+, *m/z*): calculada para ($C_{10}H_{10}NaO_2$) $(M+Na)^+$: 185.0573, encontrada: 185.0592

3-(2-Bromofenil)ciclobutan-2-ona (1d)



1d

Fórmula empírica: $C_{10}H_9BrO$

Peso molecular: 225.08 g/mol

Estado físico: Aceite amarillo

$\boldsymbol{R_f}$ (20% AcOEt/hexano): 0.72

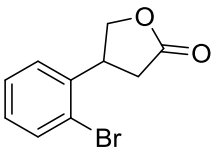
^{1}H RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 3.16-3.29 (m, 2H), 3.46-3.59 (m, 2H), 3.87-4.02 (m, 1H), 7.10-7.19 (m, 1H), 7.30-7.39 (m, 2H), 7.57-7.64 (m, 1H) ppm

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 29.1 (CH), 53.2 ($2CH_2$), 124.9 (C), 126.6 (CH), 127.8 (CH), 128.4 (CH), 133.3 (CH), 141.7 (C), 206.0 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3062, 2983, 2927, 1788, 1590, 1567, 1472, 1380, 1102, 1027, 755 cm^{-1}

HRMS (ESI^+, *m/z*): calculada para ($C_{10}H_9BrNaO$) $(M+Na)^+$: 246.9729, encontrada: 246.9703

4-(2-Bromofenil)dihidrofuran-2(3H)-ona (2d)



2d

Fórmula empírica: $C_{10}H_9BrO_2$

Peso molecular: 241.08 g/mol

Estado físico: Sólido blanco

Punto de fusión: 56-57 ºC

$\boldsymbol{R_f}$ (20% AcOEt/hexano): 0.41

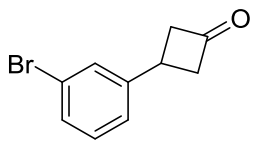
^{1}H RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): 2.67 (dd, $^2J_{HH}$= 17.6, $^3J_{HH}$= 6.7, 1H), 2.97 (dd, $^2J_{HH}$= 17.6, $^3J_{HH}$= 8.6, 1H), 4.17-4.24 (m, 2H), 4.71 (dd, $^2J_{HH}$= 9.0, $^3J_{HH}$= 7.2, 1H), 7.17 (ddd, $^3J_{HH}$= 8.0, $^3J_{HH}$= 7.1, $^4J_{HH}$= 1.9 ,1H), 7.26-7.35 (m, 2H), 7.61 (dd, $^3J_{HH}$= 8.0, $^4J_{HH}$= 1.3, 1H) ppm

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 34.9 (CH_2), 40.3 (CH), 73.0 (CH_2), 124.5 (C), 126.8 (CH), 128.4 (CH), 129.3 (CH), 133.6 (CH), 140.0 (C), 176.2 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3064, 2990, 2914, 1779, 1568, 1473, 1440, 1372, 1168, 1023, 753 cm^{-1}

HRMS (ESI^+, *m/z*): calculada para ($C_{10}H_9BrNaO_2$) $(M+Na)^+$: 262.9678, encontrada: 262.9670

3-(3-Bromofenil)ciclobutan-2-ona (1e)



1e

Fórmula empírica: $C_{10}H_9BrO$

Peso molecular: 225.08 g/mol

Estado físico: Aceite amarillo pálido

***R*f** (30% AcOEt/hexano): 0.77

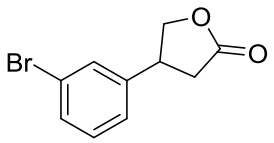
^{1}H RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 3.18-3.30 (m, 2H), 3.45-3.58 (m, 2H), 3.61-3.74 (m, 1H), 7.22-7.27 (m, 2H), 7.36-7.43 (m, 1H), 7.45-7.48 (m, 1H) ppm

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 38.3 (CH), 54.7 ($2CH_2$), 122.9 (C), 125.3 (CH), 129.9 (2CH), 130.4 (CH), 146.0 (C), 205.7 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3062, 2975, 2923, 1785, 1636, 1596, 1566, 1477, 1378, 1102, 1074, 780 cm^{-1}

HRMS (ESI^+, *m/z*): calculada para ($C_{10}H_{10}BrO$) $(M+H)^+$: 224.9910, encontrada: 224.9889

4-(3-Bromofenil)dihidrofuran-2(3H)-ona (2e)



2e

Fórmula empírica: $C_{10}H_9BrO_2$

Peso molecular: 241.08 g/mol

Estado físico: Aceite amarillento

R_f (30% AcOEt/hexano): 0.50

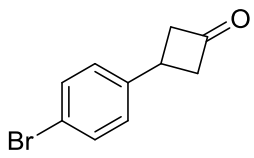
^{1}H RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): 2.64 (dd, $^2J_{HH}$= 17.5, $^3J_{HH}$= 8.8, 1H), 2.93 (dd, $^2J_{HH}$= 17.5, $^3J_{HH}$= 8.7, 1H), 3.70-3.82 (m, 1H), 4.25 (dd, $^2J_{HH}$= 9.1, $^3J_{HH}$= 7.6, 1H), 4.66 (dd, $^2J_{HH}$= 9.1, $^3J_{HH}$= 7.8, 1H), 7.16 (dt, $^3J_{HH}$= 7.7, $^4J_{HH}$= 1.2 ,1H), 7.25 (t, $^3J_{HH}$= 7.8, 1H), 7.38 (t, $^4J_{HH}$= 1.8, 1H), 7.42 (ddd, $^3J_{HH}$= 7.8, $^4J_{HH}$= 1.8, $^4J_{HH}$= 1.2, 1H) ppm

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 35.6 (CH_2), 40.8 (CH), 73.7 (CH_2), 123.3 (C), 125.4 (CH), 130.1 (CH), 130.9 (CH), 131.0 (CH), 141.9 (C), 175.9 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3058, 2971, 2913, 1781, 1597, 1568, 1479, 1266, 1169, 1024, 737 cm^{-1}

HRMS (ESI^+, *m/z*): calculada para ($C_{10}H_9BrNaO_2$) $(M+Na)^+$: 262.9678, encontrada: 262.9657

3-(4-Bromofenil)ciclobutan-2-ona (1f)



1f

Fórmula empírica: $C_{10}H_9BrO$

Peso molecular: 225.08 g/mol

Estado físico: Sólido amarillo-anaranjado

Punto de fusión: 49-51 ºC

$\boldsymbol{R_f}$ (30% AcOEt/hexano): 0.59

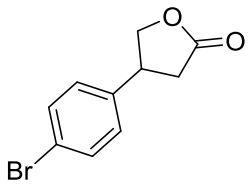
^{1}H RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): 3.13-3.25 (m, 2H), 3.42-3.55 (m, 2H), 3.57-3.69 (m, 1H), 7.13-7.19 (m, 2H), 7.42-7.48 (m, 2H) ppm

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 28.2 (CH), 54.8 ($2CH_2$), 120.6 (C), 128.4 (2CH), 131.9 (2CH), 142.7 (C), 206.0 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3055, 2987, 1786, 1489, 1422, 1395, 1101, 1075, 1009, 821 cm^{-1}

EM (ESI^+, *m/z*): 225 $(M+H)^+$; 227 $(M+H)^+$

4-(4-Bromofenil)dihidrofuran-2(3H)-ona (2f)



2f

Fórmula empírica: $C_{10}H_9BrO_2$

Peso molecular: 241.08 g/mol

Estado físico: Sólido blanco

Punto de fusión: 72-74 ºC

***R*$_f$** (30% AcOEt/hexano): 0.31

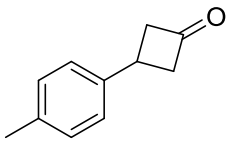
^{1}H RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 2.62 (dd, $^2J_{HH}$= 17.5, $^3J_{HH}$= 8.8, 1H), 2.93 (dd, $^2J_{HH}$= 17.5, $^3J_{HH}$= 8.7, 1H), 3.68-3.83 (m, 1H), 4.23 (dd, $^2J_{HH}$= 9.1, $^3J_{HH}$= 7.6, 1H), 4.65 (dd, $^2J_{HH}$= 9.1, $^3J_{HH}$= 7.8, 1H), 7.08-7.14 (m, 2H), 7.46-7.52 (m, 2H) ppm

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 35.7 (CH_2), 40.7 (CH), 73.8 (CH_2), 121.7 (C), 128.5 (2CH), 132.4 (2CH), 138.6 (C), 176.0 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3016, 2930, 2901, 1767, 1589, 1487, 1424, 1221, 1158, 1016, 826 cm^{-1}

HRMS (ESI^+, *m/z*): calculada para ($C_{10}H_9BrNaO_2$) $(M+Na)^+$: 262.9678, encontrada: 262.9673

3-(3-Metilfenil)ciclobutanona (1g)



1g

Fórmula empírica: $C_{11}H_{12}O$

Peso molecular: 160.22 g/mol

Estado físico: Aceite amarillento

$\boldsymbol{R_f}$ (30% AcOEt/hexano): 0.79

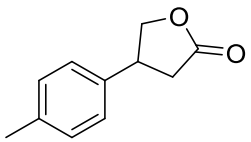
^{1}H RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 2.38 (s, 3H), 3.18-3.31 (m, 2H), 3.43-3.55 (m, 2H), 3.60-3.72 (m, 1H), 7.10-7.25 (m, 4H) ppm

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 21.0 (CH_3), 28.1 (CH), 54.8 ($2CH_2$), 126.4 (2CH), 129.4 (2CH), 136.2 (C), 140.6 (C), 206.9 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3023, 2974, 2922, 1785, 1608, 1516, 1450, 1417, 1379, 1167, 1109, 1020, 813 cm^{-1}

HRMS (ESI^+, *m/z*): calculada para ($C_{22}H_{24}NaO_2$) $(2M+Na)^+$: 343.1669, encontrada: 334.1654

4-(4-Metilfenil)dihidrofuran-2(3H)-ona (2g)



2g

Fórmula empírica: $C_{11}H_{12}O_2$

Peso molecular: 176.21 g/mol

Estado físico: Sólido blanco

Punto de fusión: 40-42 ºC

$\boldsymbol{R_f}$ (30% AcOEt/hexano): 0.54

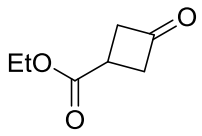
^{1}H RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 2.34 (s, 3H), 2.65 (dd, $^2J_{HH}$= 17.5, $^3J_{HH}$= 9.2, 1H), 2.90 (dd, $^2J_{HH}$= 17.5, $^3J_{HH}$= 8.6, 1H), 3.69-3.82 (m, 1H), 4.24 (dd, $^2J_{HH}$= 9.1, $^3J_{HH}$= 8.0, 1H), 4.65 (dd, $^2J_{HH}$= 9.1, $^3J_{HH}$= 7.9, 1H), 7.10-7.20 (m, 4H) ppm

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 21.1 (CH_3), 35.9 (CH_2), 40.9 (CH), 74.3 (CH_2), 126.7 (2CH), 129.9 (2CH), 136.4 (C), 137.6 (C), 176.6 (C) ppm

IR (NaCl): ν 2978, 2948, 2916, 1761, 1608, 1519, 1484, 1455, 1427, 1350, 1214, 1158, 1008, 827 cm^{-1}

HRMS (ESI^+, *m/z*): calculada para ($C_{11}H_{12}NaO_2$) $(M+Na)^+$: 199.0730, encontrada: 199.0728

3-Oxociclobutanocarboxilato de etilo (1h)



1h

Fórmula empírica: $C_7H_{10}O_3$

Peso molecular: 142.15 g/mol

Estado físico: Aceite incoloro

$\boldsymbol{R_f}$ (40% AcOEt/hexano): 0.54

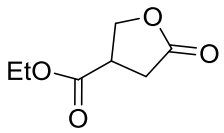
^{1}H RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 1.25 (t, $^3J_{HH}$= 7.1, 3H), 3.12-3.43 (m, 5H), 3.87-4.02 (m, 1H), 4.17 (q, $^3J_{HH}$= 7.1, 2H) ppm

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 14.2 (CH_3), 27.4 (CH), 51.6 ($2CH_2$), 61.3 (CH_2), 174.1 (C), 203.9 (C) ppm

IR (NaCl): ν 2985, 2937, 1797, 1733, 1467, 1375, 1346, 1215, 1193, 1099, 1052, 858 cm^{-1}

HRMS (ESI^+, *m/z*): calculada para ($C_7H_{10}NaO_3$) $(M+Na)^+$: 165.0522, encontrada: 165.0531

Tetrahidro-5-oxo-3-furanocarboxilato de etilo (2h)



2h

Fórmula empírica: $C_7H_{10}O_4$

Peso molecular: 158.15 g/mol

Estado físico: Líquido incoloro

$\boldsymbol{R_f}$ (40% AcOEt/hexano): 0.30

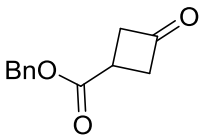
^{1}H RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 1.25 (t, $^3J_{HH}$= 7.1, 3H), 2.64-2.88 (m, 2H), 3.87-4.02 (m, 1H), 4.17 (q, $^3J_{HH}$= 7.1, 2H), 4.37-4.52 (m, 2H) ppm

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 14.1 (CH_3), 30.9 (CH_2), 40.0 (CH), 61.9 (CH_2), 69.1 (CH_2), 171.2 (C), 175.3 (C) ppm

IR (NaCl): ν 2986, 2941, 1783, 1733, 1477, 1375, 1348, 1198, 1176, 1024, 845 cm^{-1}

HRMS (ESI^+, *m/z*): calculada para ($C_7H_{10}NaO_4$) $(M+Na)^+$: 181.0471, encontrada: 181.0477

3-Oxociclobutanocarboxilato de bencilo (1i)



1i

Fórmula empírica: $C_{12}H_{12}O_3$

Peso molecular: 204.23 g/mol

Estado físico: Aceite incoloro

$\boldsymbol{R_f}$ (30% AcOEt/hexano): 0.56

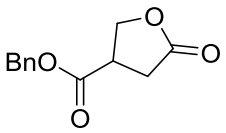
^{1}H RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 3.20-3.50 (m, 5H), 5.19 (s, 2H), 7.33-7.39 (m, 5H) ppm

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 27.5 (CH), 51.7 ($2CH_2$), 67.2 (CH_2), 128.4 (2CH), 128.6 (CH), 128.7 (2CH), 135.5 (C), 203.6 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3034, 2926, 2854, 1792, 1732, 1498, 1456, 1380, 1347, 1186, 1100, 1051, 752 cm^{-1}

HRMS (ESI^+, *m/z*): calculada para ($C_{12}H_{12}NaO_3$) $(M+Na)^+$: 227.0679, encontrada: 227.0660

Tetrahidro-5-oxo-3-furanocarboxilato de bencilo (2i)



2i

Fórmula empírica: $C_{12}H_{12}O_4$

Peso molecular: 220.22 g/mol

Estado físico: Sólido gomoso blanco

$\boldsymbol{R_f}$ (30% AcOEt/hexano): 0.33

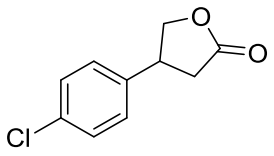
^{1}H RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 2.71-2.95 (m, 2H), 3.44-3.56 (m, 1H), 4.42-4.56 (m, 2H), 5.20 (s, 2H), 7.33-7.44 (m, 5H) ppm

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 30.9 (CH_2), 40.1 (CH), 67.7 (CH_2), 69.0 (CH_2), 128.5 (2CH), 128.8 (3CH), 135.0 (C), 171.0 (C), 175.1 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3066, 3034, 2959, 1779, 1736, 1636, 1498, 1456, 1383, 1350, 1175, 1013, 754 cm^{-1}

HRMS (ESI^+, *m/z*): calculada para ($C_{12}H_{12}NaO_4$) $(M+Na)^+$: 243.0628, encontrada: 243.0671

4-(4-Clorofenil)dihidrofuran-2(3H)-ona (2j)



2j

Fórmula empírica: $C_{10}H_9ClO_2$

Punto de fusión: 54-56 ºC

Estado físico: Sólido blanco

Peso molecular: 196.63 g/mol

$\boldsymbol{R_f}$ (30% AcOEt/hexano): 0.41

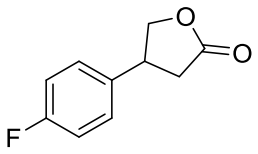
^{1}H RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 2.61 (dd, $^2J_{HH}$= 17.5, $^3J_{HH}$= 8.9, 1H), 2.92 (dd, $^2J_{HH}$= 17.5, $^3J_{HH}$= 8.7, 1H), 3.70-3.82 (m, 1H), 4.23 (dd, $^2J_{HH}$= 9.1, $^3J_{HH}$= 7.7, 1H), 4.65 (dd, $^2J_{HH}$= 9.1, $^3J_{HH}$= 7.8, 1H), 7.13-7.19 (m, 2H), 7.30-7.36 (m, 2H) ppm

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 35.7 (CH_2), 40.6 (CH), 73.9 (CH_2), 128.2 (C), 129.4 (2CH), 133.6 (C), 138.1 (C), 176.1 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3055, 2987, 2914, 1782, 1496, 1423, 1170, 1094, 1025, 828 cm^{-1}

HRMS (ESI^+, *m/z*): calculada para ($C_{10}H_9ClNaO_2$) $(M+Na)^+$: 219.0183, encontrada: 219.0156

4-(4-Fluorofenil)dihidrofuran-2(3H)-ona (2k)



2k

Fórmula empírica: $C_{10}H_9FO_2$

Peso molecular: 180.18 g/mol

Estado físico: Sólido blanco

Punto de fusión: 65-67 ºC

$\boldsymbol{R_f}$ (30% AcOEt/hexano): 0.38

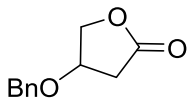
^{1}H RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 2.62 (dd, $^2J_{HH}$= 17.5, $^3J_{HH}$= 8.9, 1H), 2.92 (dd, $^2J_{HH}$= 17.5, $^3J_{HH}$= 8.7, 1H), 3.71-3.84 (m, 1H), 4.23 (dd, $^2J_{HH}$= 9.1, $^3J_{HH}$= 7.7, 1H), 4.65 (dd, $^2J_{HH}$= 9.1, $^3J_{HH}$= 7.8, 1H), 7.00-7.09 (m, 2H), 7.16-7.24 (m, 2H) ppm

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 35.9 (CH_2), 40.6 (CH), 74.1 (CH_2), 116.2 (d, $^2J_{CF}$= 21.5, 2CH), 128.4 (d, $^3J_{CF}$= 8.0, 2CH), 128.4 (d, $^4J_{CF}$= 2.9, C), 162.2 (d, $^1J_{CF}$= 246.6, C), 176.2 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3068, 2914, 1777, 1602, 1514, 1433, 1219, 1165, 1013, 843 cm^{-1}

HRMS (ESI^+, *m/z*): calculada para ($C_{10}H_9FNaO_2$) $(M+Na)^+$: 203.0479, encontrada: 203.0474

4-Benciloxidihidrofuran-2(3H)-ona (2l)



2l

Fórmula empírica: $C_{11}H_{12}O_3$

Peso molecular: 192.21 g/mol

Estado físico: Sólido gomoso blanco

***R*f** (40% AcOEt/hexano): 0.30

^{1}H RMN ($CDCl_3$, 300.13 MHz): δ 2.55-2.74 (m, 2H), 4.32-4.43 (m, 3H), 4.48-4.55 (m, 1H), 7.27-7.40 (m, 5H) ppm

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ 35.0 (CH_2), 71.2 (CH_2), 73.2 (CH_2), 73.9 (CH), 127.8 (2CH), 128.2 (CH), 128.7 (2CH), 137.0 (C), 175.6 (C) ppm

IR (NaCl): ν 3066, 3034, 2923, 1779, 1603, 1455, 1401, 1374, 1333, 1166, 1086, 1050, 993, 886, 747 cm^{-1}

HRMS (ESI^+, *m/z*): calculada para ($C_{11}H_{12}NaO_3$) $(M+Na)^+$: 215.0679, encontrada: 215.0726

REFERENCIAS

1 (a) Anastas, P; Eghbali, N., *Chem. Soc. Rev*. **2010**, *39*, 301. (b) Li, C-J.; Anastas, P., *Chem. Soc. Rev*. **2012**, *41*, 1413.

2 Anastas, P.; Warner, J. C., *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: New York, 1998.

3 (a) Wenda, S.; Illner, S.; Mell, A.; Kragl, U., *Green Chem*. **2011**, *130*, 3007; (b) Ran, N.; Zhao, L.; Chen, Z.; Tao, J., *Green Chem.* **2008**, *10*, 361.

4 (a) Poliakoff, M.; Licence, P., *Nature* **2007**, *450*, 810; (b) Tang, S. Y.; Bourne, R. A.; Smith, R. L.; Poliakoff, M., *Green Chem.* **2008**, *10*, 268.

5 (a) Gotor, V., *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6*, 420; (b) Sutton, P. W.; Adams, J. P.; Archer, I.; Auriol, D.; Avi, M.; Branneby, C.; Collis, A. J.; Dumas, B.; Eckrich, T.; Fotheringham, I.; Halle, R.; Hanlon, S.; Hansen, M.; Holt-Tiffin, K. E.; Howard, R. M.; Huisman, G. W.; Iding, H.; Kiewel, K.; Kittelmann, M.; Kupfer, E.; Laumen, K.; Lefèvre, F.; Luetz, S.; Mangan, D. P.; Martin, V. A.; Meyer, H.-P.; Moody, T. S.; Osorio-Lozada, A.; Robins, K.; Snajdrova, R.; Truppo, M. D.; Wells, A.; Wirz, B.; Wong, J. W., *Biocatalysis in the Fine Chemical and Pharmaceutical Industries, in Practical Methods for Biocatalysis and Biotransformations 2,* John Wiley & Sons: Chichester, 2012.

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

7 (a) Palomo, J. M., *Curr. Org. Synth.* **2009**, *6*, 1; (b) Tran, D. N.; Balkus, Jr., K. J., *ACS Catal.* **2011**, *1*, 956; (c) Garcia-Galan, C.; Berenguer-Murcia, A.; Fernandez-Lafuente, R.; Rodrigues, R. C. *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2885; (d) Stepankova, V.; Bidmanova, S.; Koudelakova, T.; Prokop, Z.; Chaloupkova, R.; Damborsky, J., *ACS Catal.* **2013**, *3*, 2823.

8 Woodward, J., *J. Microbiol. Meth*. **1988**, *8*, 91.

9 Faber, K., *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer: Berlin, 2011.

10 Kazlauskas, R. J., *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 195.

11 Busto, E.; Gotor-Fernández, V.; Gotor, V., *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504.

12 Reetz, M. T., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12480.

13 Wandrey, C.; Liese, A.; Kihumbu, D., *Org. Process Rev. Dev.* **2000**, *4*, 286.

14 Walsh, R., *Alternative Perspectives of Enzyme Kinetic Modeling, Medicinal Chemistry and Drug Design*, InTech, 2012

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

16 Prelog, V., *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*, 119

17 Kiss, G.; Çelebi-Ölçüm, N.; Moretti, R.; Baker, D.; Houk, K. N., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *22*, 5700.

18 Schmid, R. D.; Verger, R.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608.

19 Gotor-Fernández, V.; Busto, E.; Gotor, V., *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 797.

20 Wong, C-H.; Whitesides, G. M.; *Tetrahedron Organic Chemistry Series. Volume 12, Enzymes in Synthetic Organic Chemistry*, Elsevier Science: Oxford, 1994.

21 Klibanov, A. M., *Trends Biochem. Sci.* **1989**, *14*, 141.

22 Trodler, P.; Schmid, R. D.; Pleiss, J., *BMC Struct. Biol.* **2009**, *9*, 38.

23 Brady, L.; Brzozowski, Z. S.; Derewenda, Z. S.; Dodson, E.; Dodson, D.; Tolley, S.; Turkenburg, J. P.; Christiansen, L.; Huge-Jensen, B.; Norskov, L.; Thim, L.; Menge, U., *Nature* **1990**, *343*, 767.

24 Hedstrom, L.; *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4501.

25 Hernáiz, M. J.; Alcántara, A. R.; García, J. I.; Sinisterra, J. V., *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 9422.

26 Entre otros: (a) Gotor, V., *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2189; (b) García-Urdiales, E.; Rebolledo, F.; Gotor, V.; *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 721; (c) Roberts, S. M.; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2001**, 1475; (d) Carboni-Oerlemans, C.; Domínguez de María, P.; Tuin, B.; Bargeman, G.; van der Meer, A.; van Gemert, R., *J. Biotechnol.* **2006**, *126*, 140.

27 Hult, K.; Berglund, P.; *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231.

28 (a) Park, H-S.; Nam, S-H.; Lee, J. K.; Yoon, C. N.; Mannervik, B.; Benkovic, S. J.; Kim, H-S.; *Science* **2006**, *311*, 535. (b) Jochens, H.; Stiba, K.; Savile, C.; Fujii, R.; Yu, J-G.; Gerassenkov, T.; Kazlauskas, R. J.; Bornscheuer, U. T.,

Angew. Chem. Int. Ed. **2009**, *48*, 3532. (c) Turner, N. J.; *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 567.

29 Khersonsky, O.; Tawfik, D-S., *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 471.

30 Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S.; Jones, T. A., *Structure* **1994**, *2*, 293.

31 Martinelle, M; Holmquist, M.; Hult, K., *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1258*, 272.

32 Skjot, M.; De María, L.; Chatterjee, R.; Svendsen, A.; Patkar, S.; *ChemBioChem* **2009**, *10*, 520.

33 Gotor, V.; *Biocatal. Biotransform.* **2000**, *18*, 87.

34 (a) Svendendahl, M.; Hult, K.; Berglund, P., *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17988; (b) Ferrario, V.; Ebert, C.; Svendsen, A.; Besenmatter, W.; Gardossi, L., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2014**, *101*, 7.

35 Gamenara, D.; Seoane, G. A.; Saenz-Méndez, P.; Domínguez de María, P., *Redox Biocatalysis: Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons: Hoboken, 2013.

36 (a) Björkling, F.; Godtfredsen, S. E.; Kirk, O., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 1301; (b) Björkling, F.; Frykman, H.; Godtfredsen, S. E.; Kirk, O., *Tetrahedron* **1992**, *48*, 4587 (c) Kirk, O.; Christensen, M. W.; Dambus, T.; Godtfredsen, S. E., *Biocatalysis* **1994**, *11*, 65.

37 Kirk, O.; Conrad, L. S., *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 977.

38 Yin, D. L.; Bernhardt, P.; Morley, K. L.; Jiang, Y.; Cheeseman, J. D.; Purpero, V.; Schrag, J. D.; Kazlauskas, R. J., *Biochemistry* **2010**, *49*, 1931.

39 Bernhardt, P.; Hult, K.; Kazlauskas, R. J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2742.

40 Dinu, C. Z.; Zhu, G.; Bale, S. S.; Anand, G.; Reeder, P. J.; Sanford, K.; Whited, G.; Kane, R. S.; Dordick, J. S., *Adv. Funct. Mater.* **2010**, *20*, 392.

41 Entre otros: (a) Bott, R. R.; Hua, L.; Qian, Z.; Rife, C. L.; Shetty, J. K.; Tang, Z.; Yu, Z.; Zhang, B., *WO 2014081622*; (b) Dicosimo, R.; Payne, M. S.; Gavagan, J. E., *WO 20140113966*; (c) Graycar, T. P.; Pricelius, S.; Poulose, A. J.; Estell,

D. A., *WO 2014059360*; (d) Bastigkeit, T.; Benda, K.; Mussmann, N:; Eiting, T.; Hellmuth, H., *DE 102012215624*.

42 (a) Kamm, B.; Grubber, P. R.; Kamm, M., *Biorefineries- Industrial Processes and Products: Status Quo and Future Directions*, Wiley-VCH: Weinheim, 2010. (b) Domínguez de María, P., *ChemSusChem*, **2011**, *4*, 327.

43 Duncan, S.; Jing, Q.; Katona, A.; Kazlauskas, R. J.; Schilling, J.; Tschirner, U.; Aldajani, W. W., *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *160*, 1637.

44 Svedandahl, M:; Carlqvist, P.; Branneby, C.; Allner, O.; Frise, A.; Hult, K.; Berglund, P.; Brinck, T., *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2443.

45 Sharma, U. K.; Sharma, N.; Kumar, R.; Kumar, R.; Sinha, A. K., *Org. Lett.* **2009**, *11*, 4846.

46 Zaks, A.; Klibanov, A. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1985**, *82*, 3192.

47 Para la reacción de epoxidación convencional ver: (a) Prileschajew, N., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1909**, *42*, 4811; (b) March, J., *Advanced Organic Chemistry, Reactions, Mechanisms and Structure,* John Wiley & Sons: Hoboken, 1985.

48 Kontogianni, A.; Skouridou, V.; Sereti, V.; Stamatis, H.; Kolisis, F. N.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2003**, *21*, 67.

49 (a) Madeira Lau, R.; van Rantwijk, F.; Seddon, K. R.; Sheldon, R. A., *Org. Lett.* **2000**, *2*, 4189; (b) Moreira, M. A.; Bitencourt, T. B.; da Graça Nascimento, M., *Synth. Commun.* **2005**, *35*, 2107.

50 gen. Klass, M. R.; Warwel, S. J., *J. Mol. Catal. A: Chem.* **1997**, *117*, 311.

51 (a) Warwel, S.; gen. Klass, M. R., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1995**, *1*, 29; (b) Törnvall, U.; Orellana-Coca, C.; Hatti-Kaul, R.; Adlercreutz, D., *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 133.

52 (a) Orellana-Coca, C.; Törnvall, U.; Adlercreutz, D.; Mattiasson, B.; Hatti-Kaul, R., *Biocatal. Biotransform.* **2005**, *23*, 431; (b) Corrêa, F. A.; Sutili, F. K.; Miranda, L. S. M.; Leite, S. G. F.; de Souza, R. O. M. A.; Leal, I. C. R., *J. Mol. Catal. B: Enzym*, **2012**, *81*, 7.

53 Hilker, I.; Bothe, D.; Prüss, J.; Warnecke, H.-J., *Chem. Eng. Sci.* **2001**, *56*, 427.

54 Kudanga, T.; Prasetyio, E. N.; Sipilä, J.; Nyanhongo, G. S.; Guebitz, G. M., *Process. Biochem.* **2010**, *45*, 1557.

55 Uyama, H.; Kuwabara, M.; Tsujimoto, T.; Kobayashi, S., *Biomacromolecules*, **2003**, *4*, 211.

56 gen. Klass, M. R.; Warwel, S., *Synth. Commun.* **1998**, *28*, 251.

57 Orellana-Coca, C.; Billakanti, J. M.; Mattiasson, B.; Hatti-Kaul, R., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2007**, *44*, 133.

58 gen. Klaas, M. R.; Kunz, M.; Warwel, S. J., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, *7*, 283.

59 Jarvie, A. W. P.; Overton, N.; St. Pourçain, C. B., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1999**, 2171.

60 Tufvesson, P.; Adlercreutz, D.; Lundmark, S.; Manea, M.; Hatti-Kaul, R., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *54*, 1.

61 Ankudey, E. G.; Olivo, H. F.; Peeples, T. L., *Green Chem.* **2006**, *8*, 923.

62 Bitencourt, T. B.; da Graça Nascimento, M., *Green Chem.* **2009**, *11*, 209.

63 gen. Klass, M. R.; Warwel, S., *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1025.

64 Moreira, M. A.; da Graça Nascimento, M. G., *Catal. Commun.* **2007**, *8*, 2043.

65 (a) Sarma, K.; Bhati, N.; Borthakur, N.; Goswami, A., *Tetrahedron* **2007**, *63*, 8735; (b) Sarma, K.; Goswami, A.; Goswami, B. C., *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 1295.

66 Xu, Y.; Li, A.; Jia, X.; Li, Z., *Green Chem.* **2011**, *13*, 2452.

67 Rodrigues, R. C.; Fernández-Lafuente, R., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *64*, 1.

68 Méndez-Sánchez, D.; Ríos-Lombardía, N.; Gotor, V.; Gotor-Fernández, V., *Tetrahedron* **2014**, *70*, 1144.

69 (a) Baeyer, A.; Villiger, V., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1899**, *32*, 3625; (b) ten Brink, G.-J.; Arends, I. W. C. E.; Sheldon, R. A., *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 4105.

70 Revisiones bibliográficas recientes: (a) de Gonzalo, G.; Mihovilovic, M. D.; Fraaije, M. W., *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2208; (b) Alphand, V.; Wohlgemuth, R., *Curr. Org. Chem.* **2010**, *14*, 1928; (c) Leisch, H.; Morley, K.; Lau, P. C. K.,

Chem. Rev. **2011**, *111*, 4165; (d) Zhang, Z.-G.; Parra, L. P.; Reetz, M. T., *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 10160.

71 (a) Krow, G. R., *Org. React.* **1993**, *43*, 251; (b) Renz, M.; Meunier, B., *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 737.

72 Lemoult, S. C.; Richardson, P. F.; Roberts, S. M., *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, **1995**, 89.

73 Pchelka, B. K.; Gelo-Pujic, M.; Guibe-Jampel, E., *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, **1998**, 2625.

74 Rios, M. Y.; Salazar, E.; Olivo, H. F., *Green Chem.* **2007**, *9*, 459.

75 Rios, M. Y.; Salazar, E.; Olivo, H. F., *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *54*, 61.

76 Kotlewska, A. J.; Van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A.; Arends, I. W. C. E., *Green Chem.* **2011**, *13*, 2154.

77 Hernandez, K.; Fernandez-Lafuente, R., *Process Biochem.* **2011**, *46*, 873.

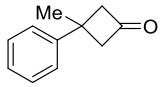
78 Drożdż, A.; Chrobok, A.; Baj, S.; Szymańska, K.; Mrowiec-Białoń, J.; Jarzębski, A. B., *Appl. Catal., A* **2013**, *467*, 163.

79 Zhong, J.; Xu, F.; Wang, J.; Li, Y.; Lin, X.; Wu, Q., *RSC Adv.* **2014**, *4*, 8533.

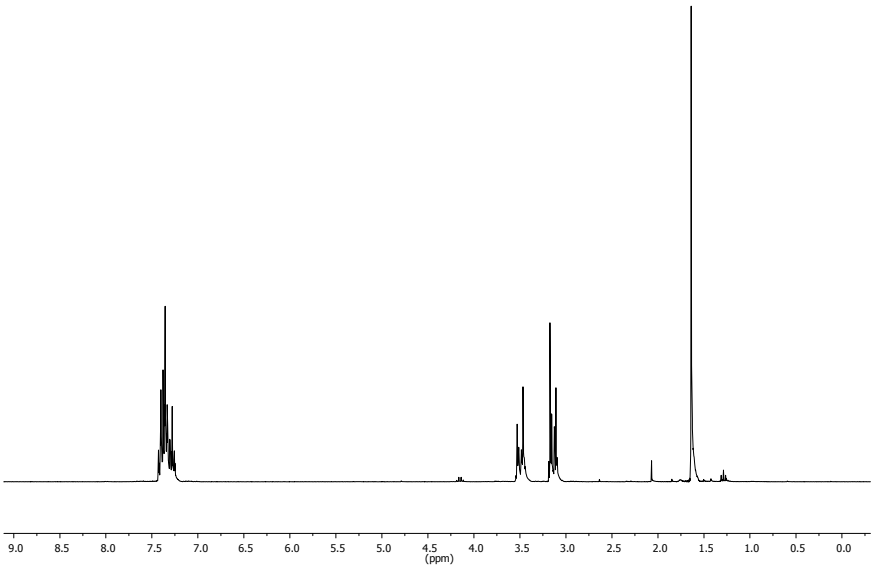
80 Metha, G.; Rao, P. S. H., *Synth. Commun.* **1985**, *15*, 991.

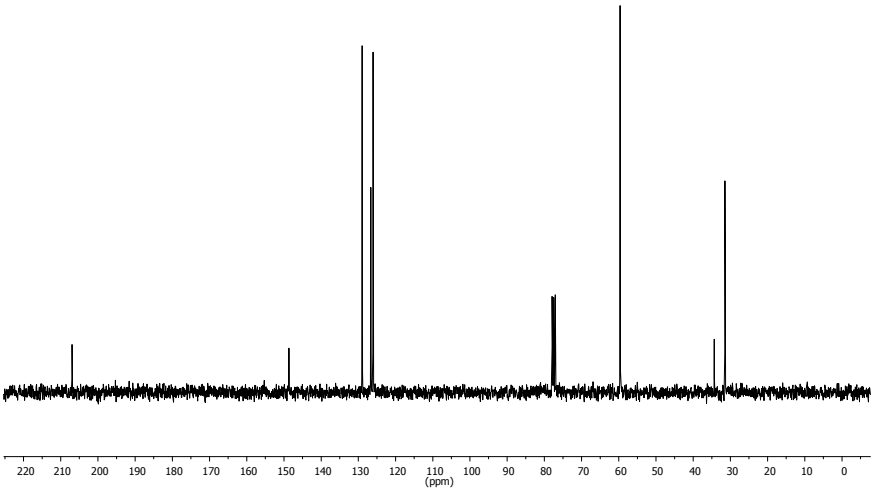
81 (a) Coelho, F., de Azevedo, M. B. M.; Boschiero, R.; Resende, P., *Synth. Commun.* **1997**, *27*, 2455; (b) Trost, B. M.; Xie, J., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 6231.

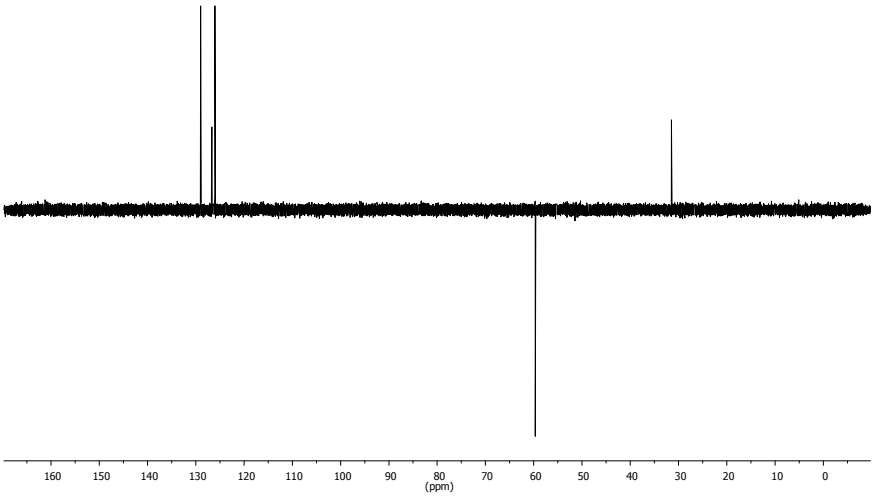
APÉNDICE DE ESPECTROS

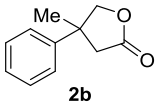

Me
O

1b

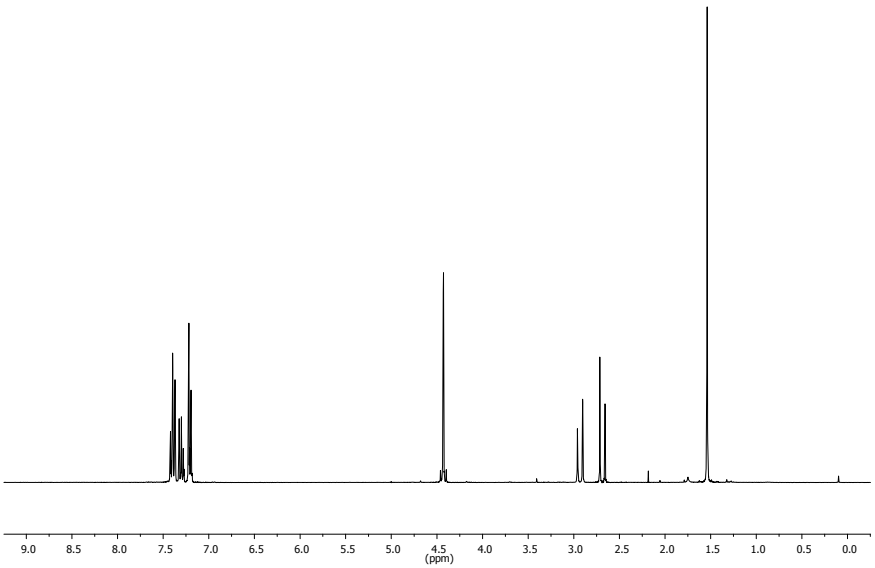

9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)

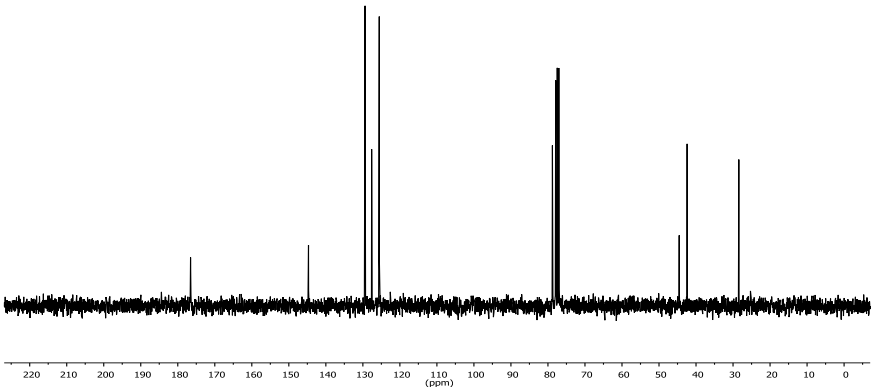

220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

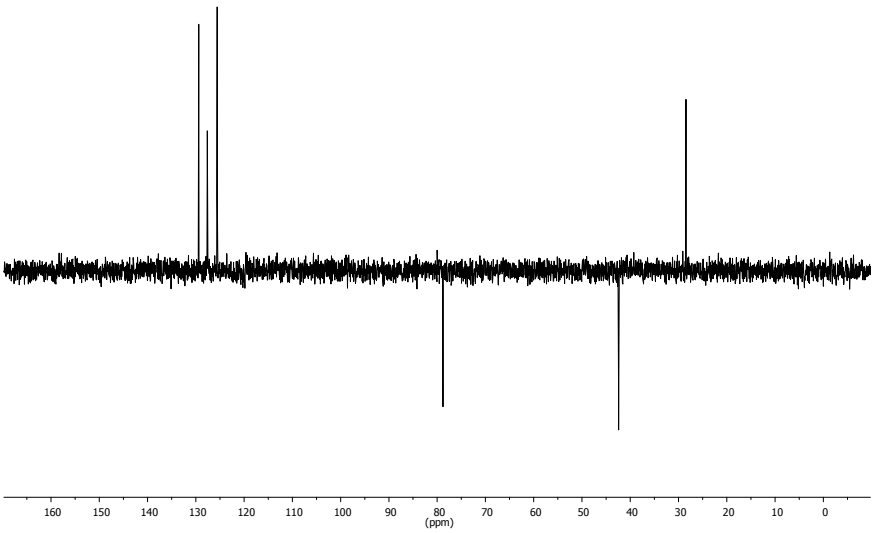

160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

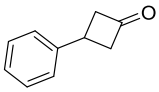

Me
O
O

2b

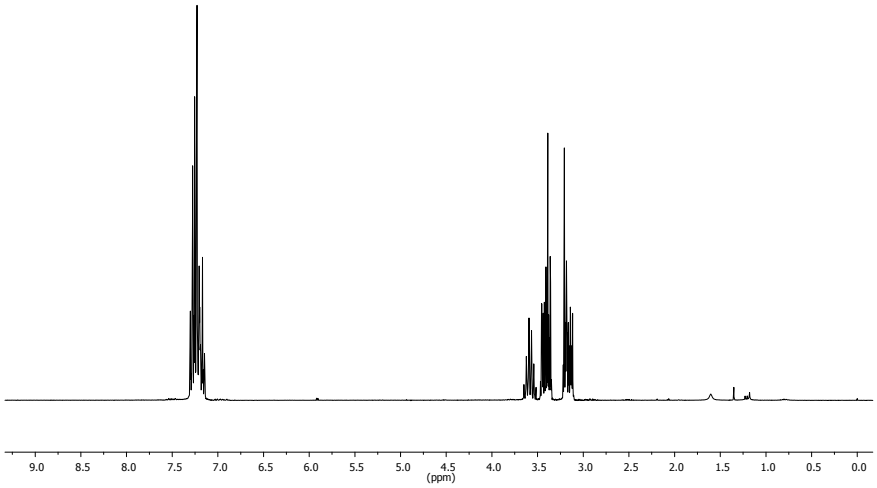

9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)

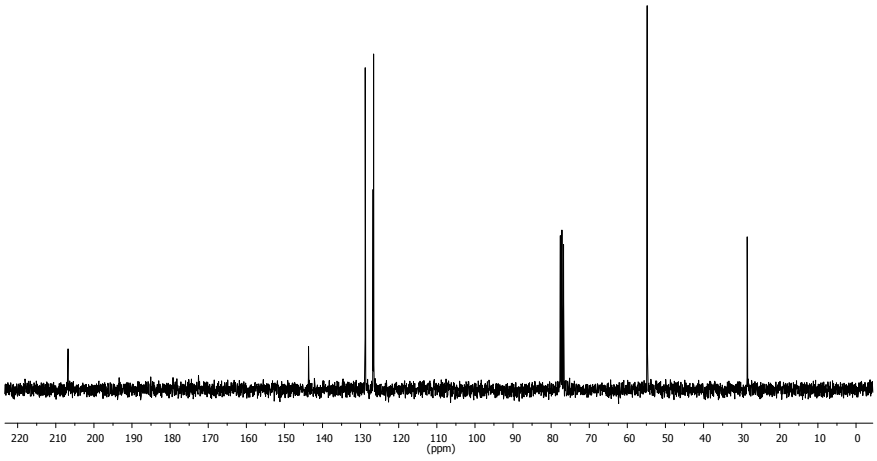

220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

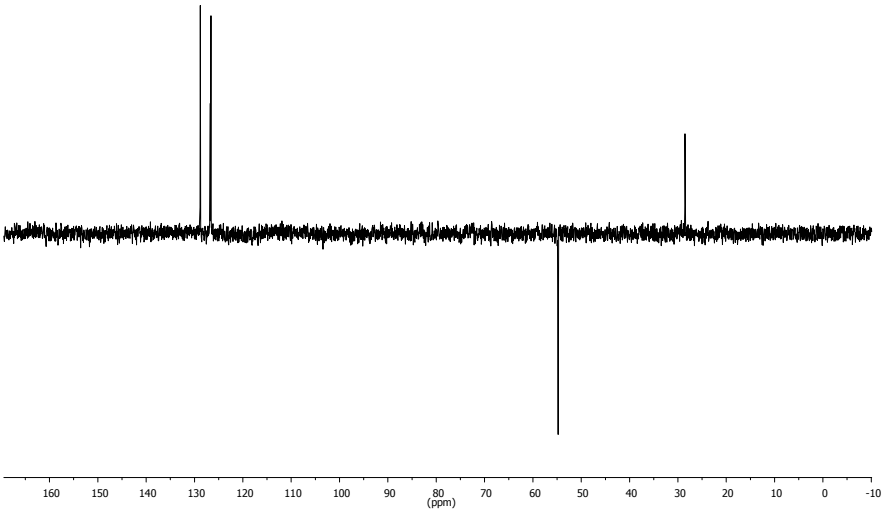

160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

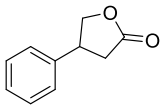


1c

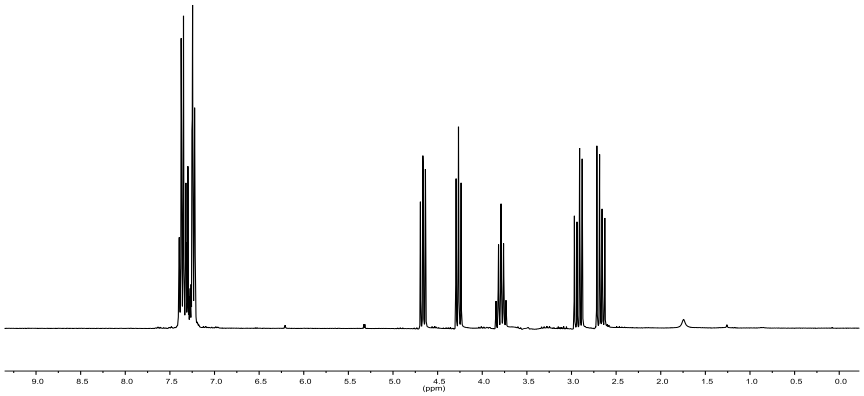

9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)

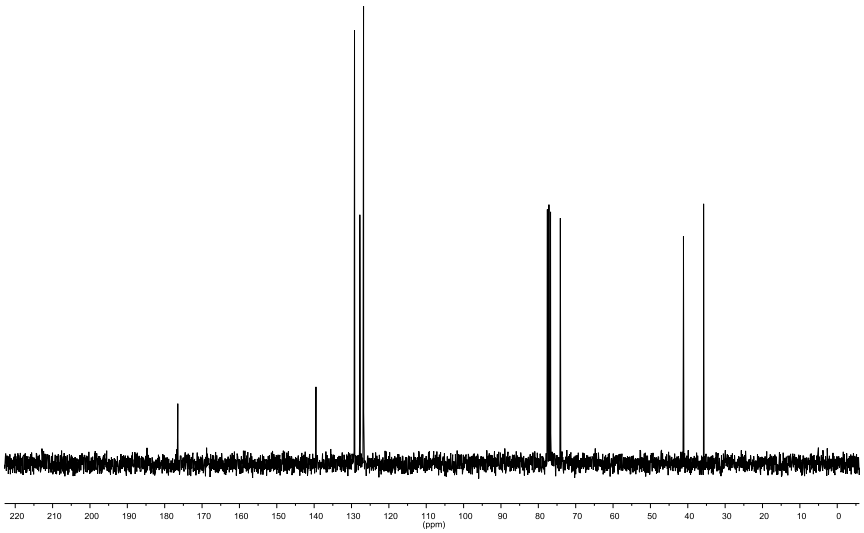

220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

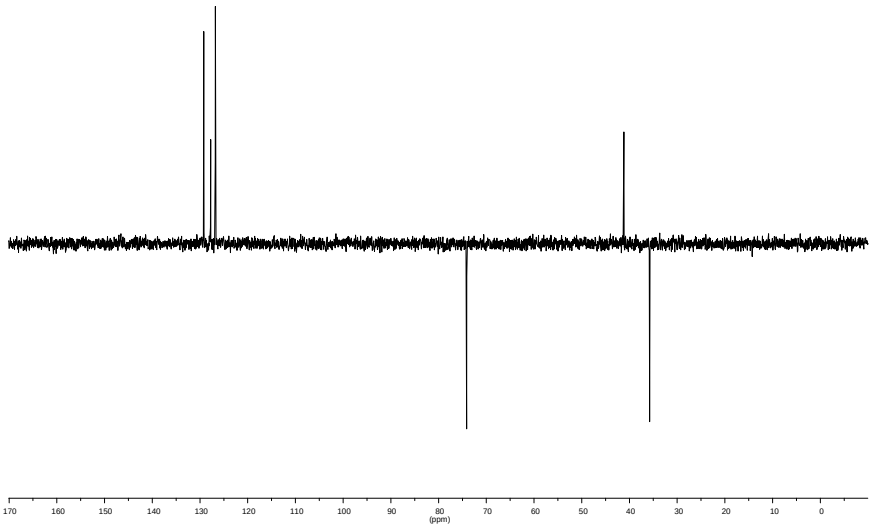

160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 -10
(ppm)


O
O

2c

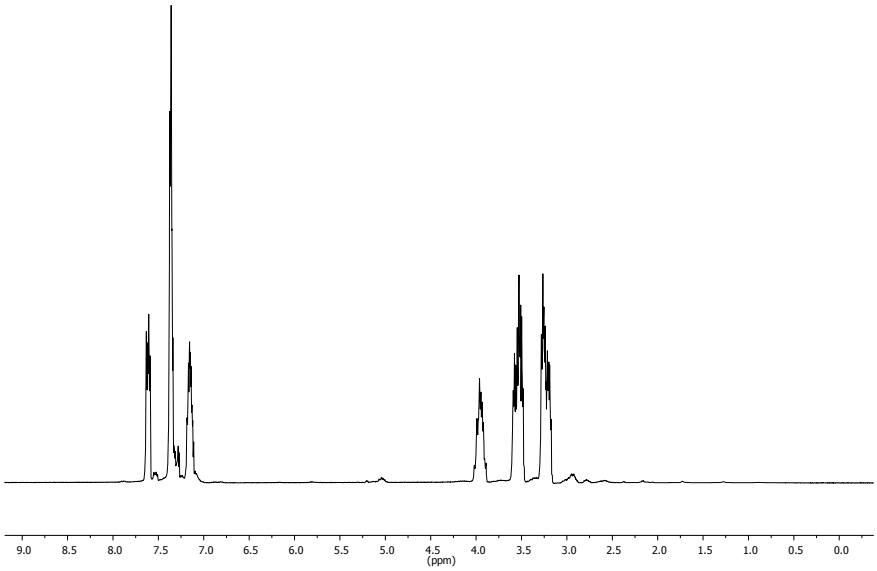

9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)

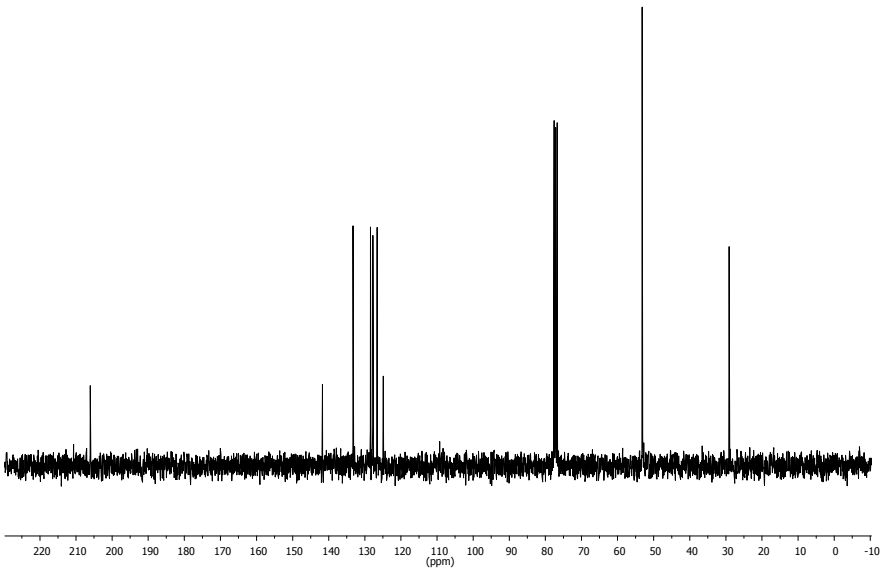

220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

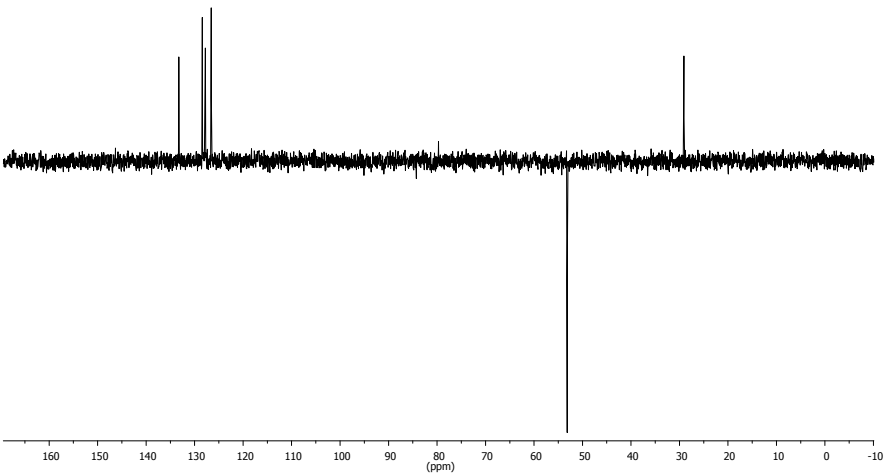

170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

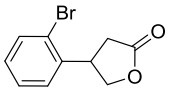
Br
O

1d

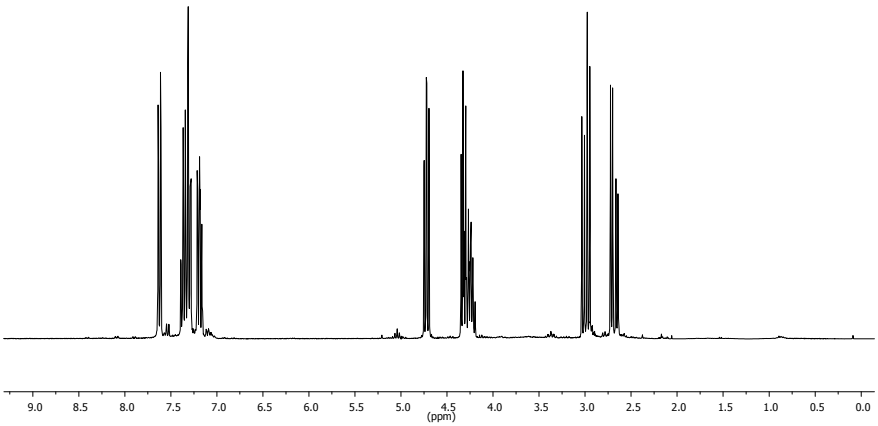

9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)

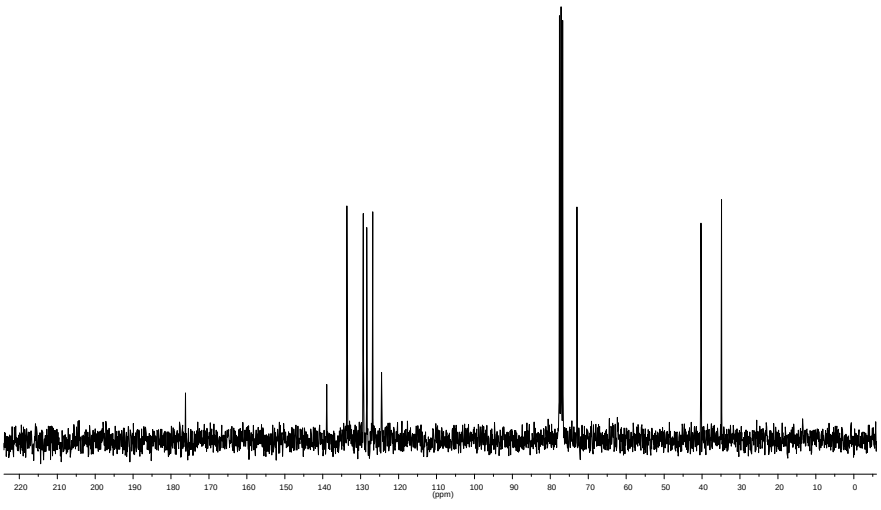

220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 -10
(ppm)

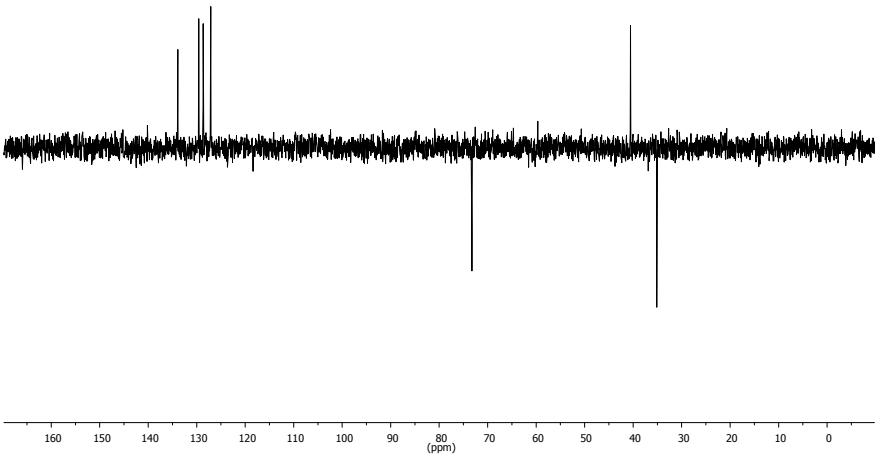

160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 -10
(ppm)

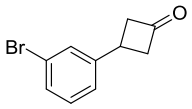

Br
O
O

2d

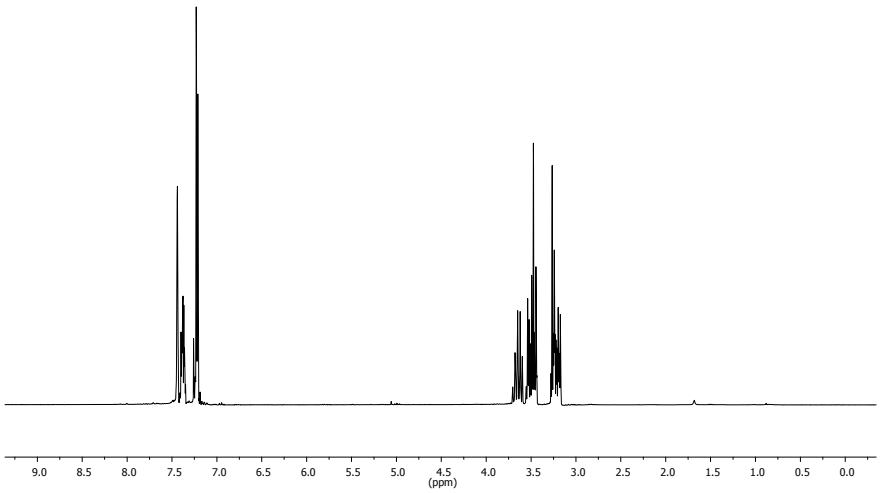

9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)

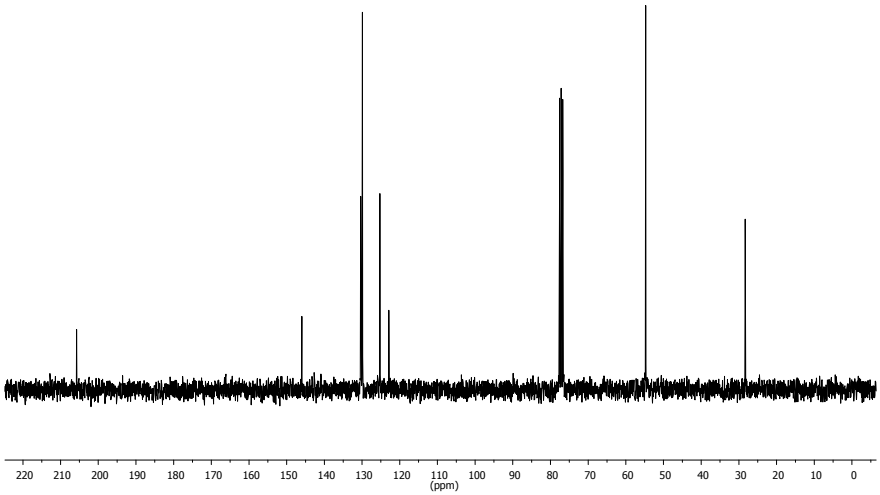

220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

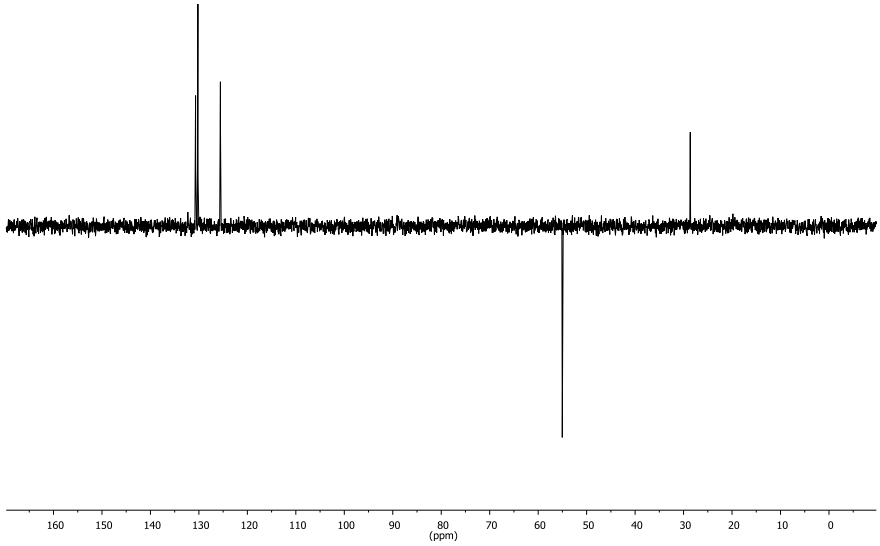

160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

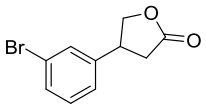

Br
O

1e

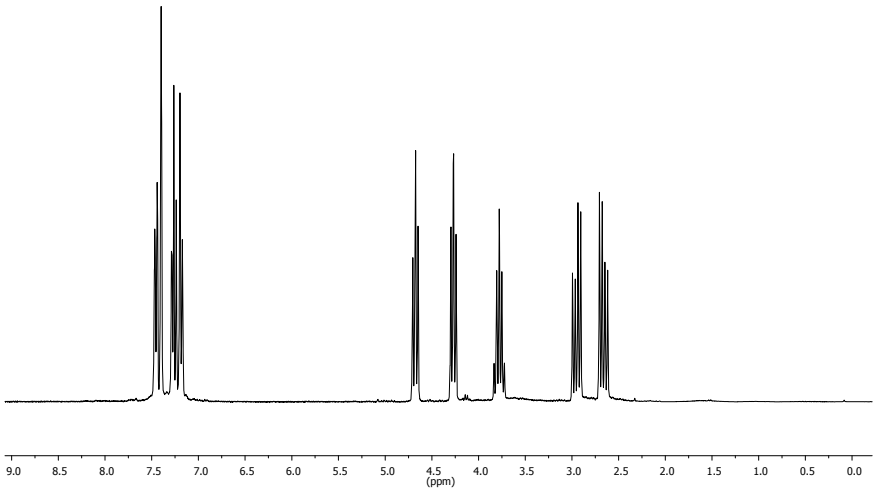

9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)

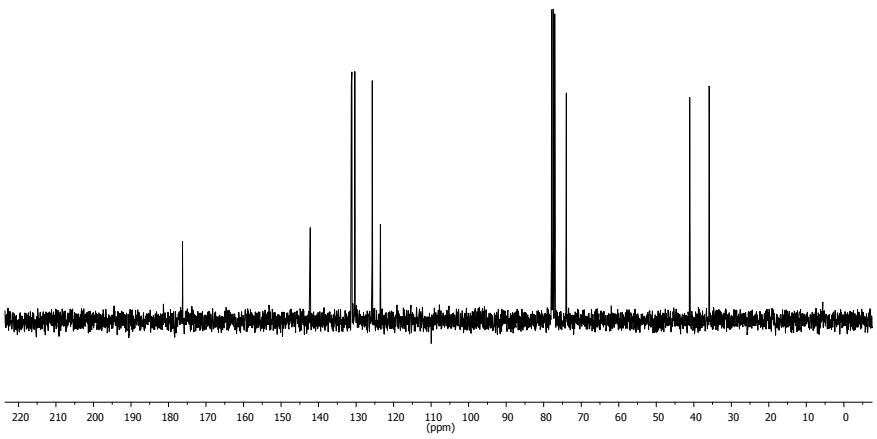

220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

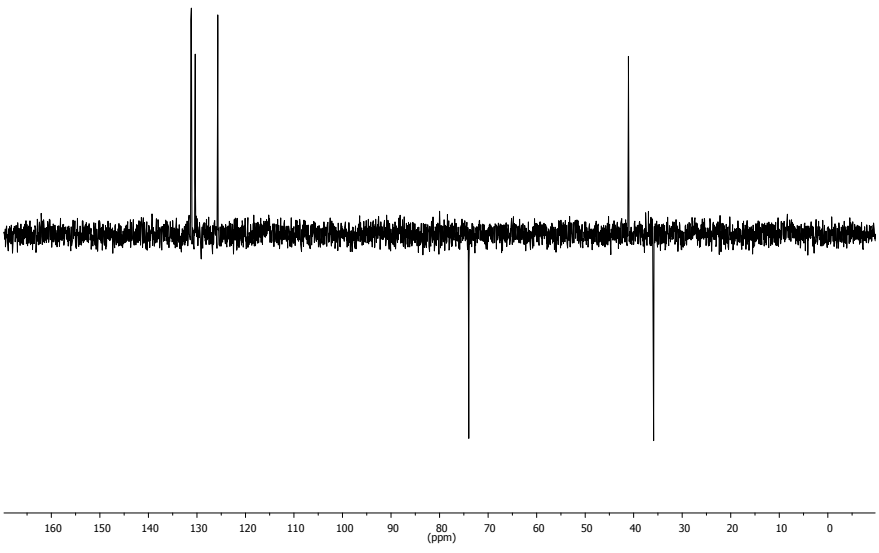

160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

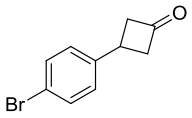

Br
O
O

2e

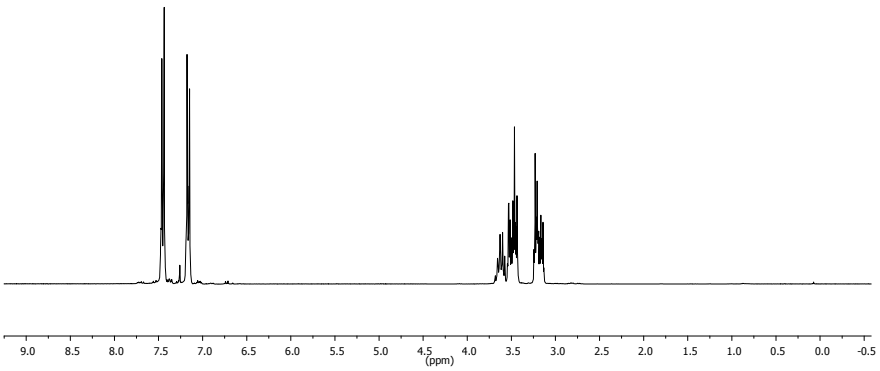

9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)

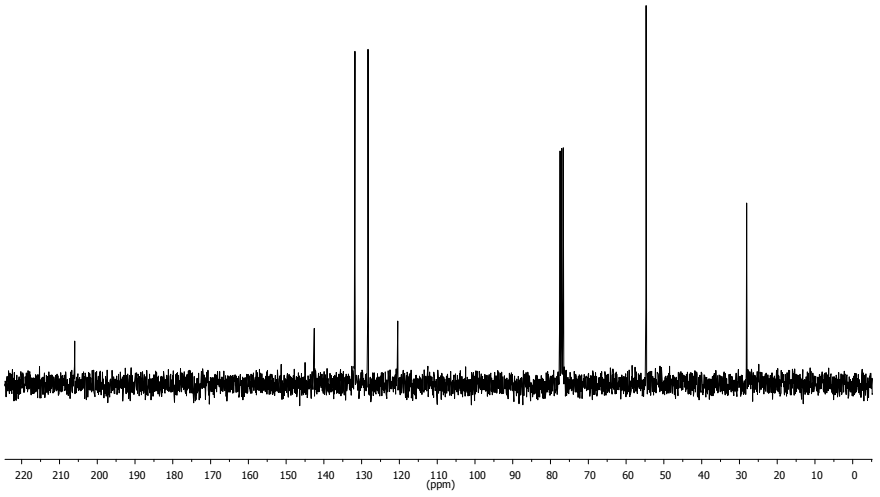

220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

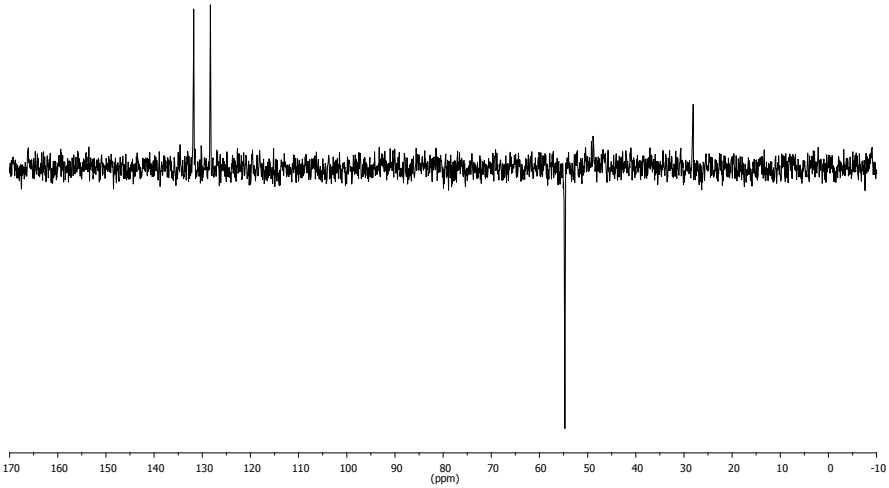

160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

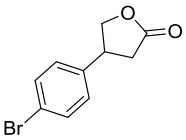

O
Br

1f

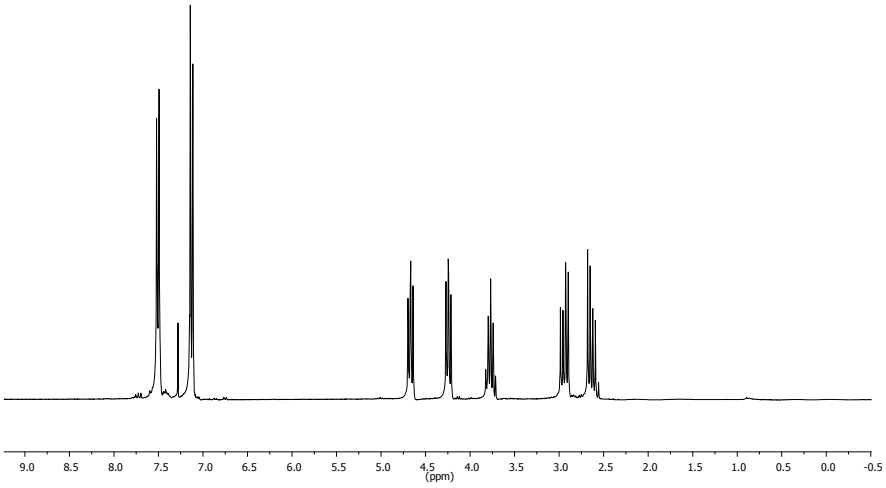

9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 -0.5
(ppm)

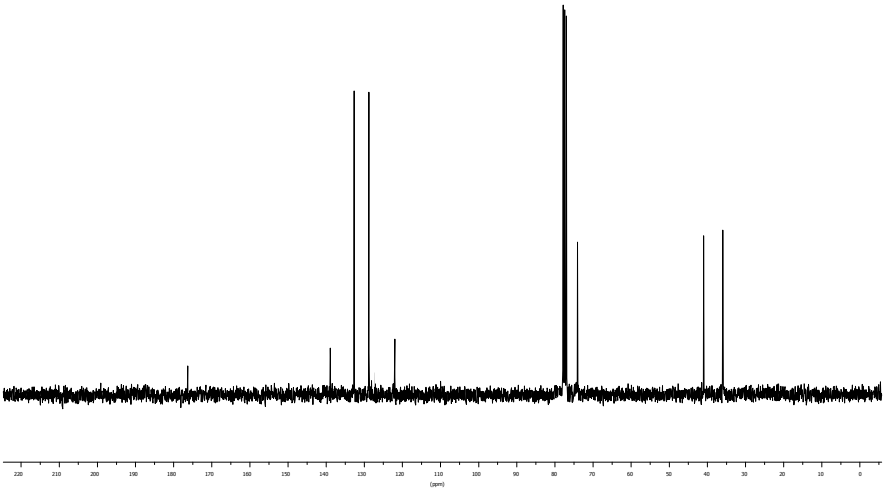

220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

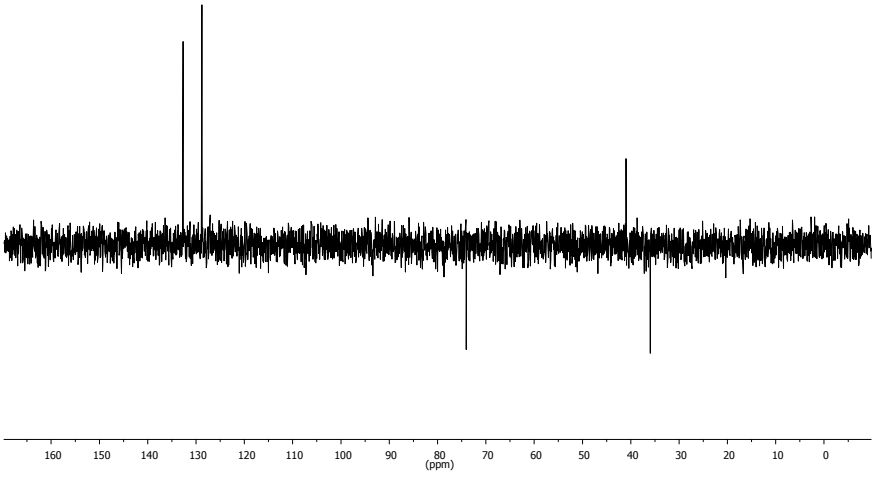

170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 -10
(ppm)

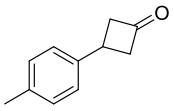

O
O
Br

2f

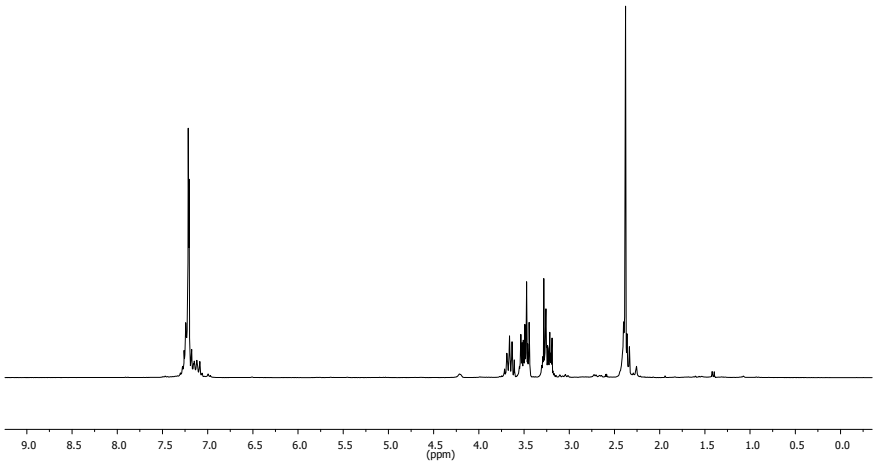

9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 -0.5
(ppm)

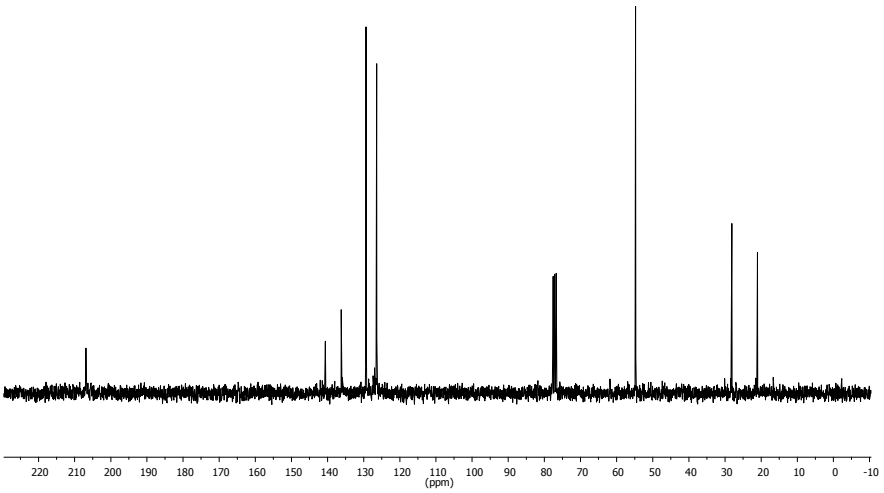

(ppm)

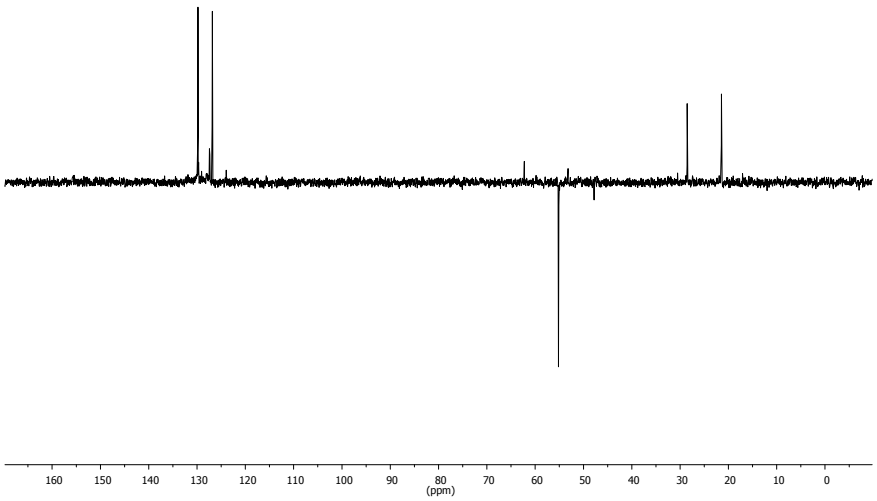

160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

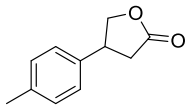


1g

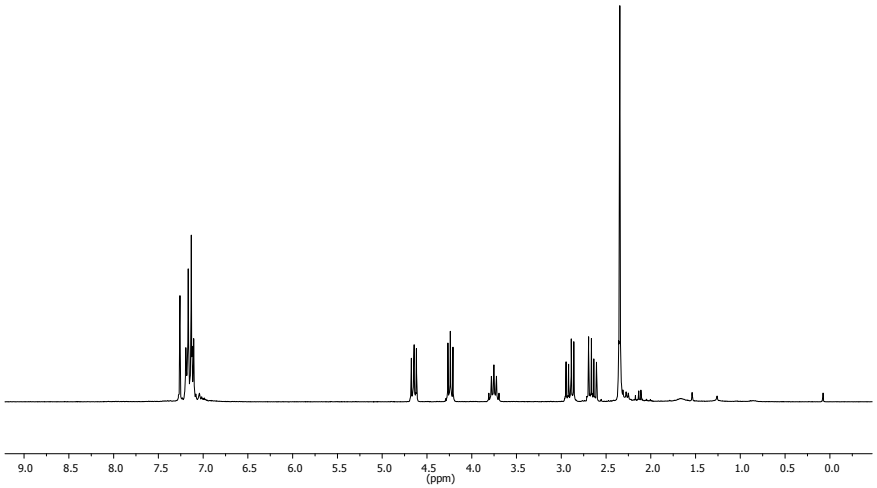

9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)

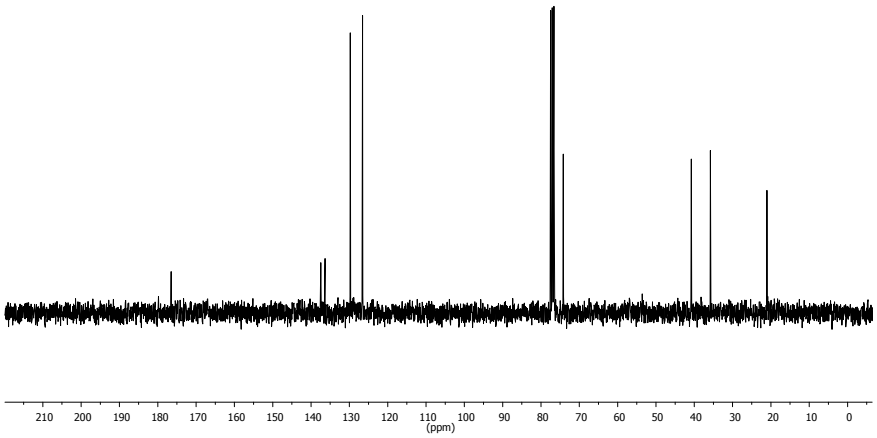

220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 -10
(ppm)

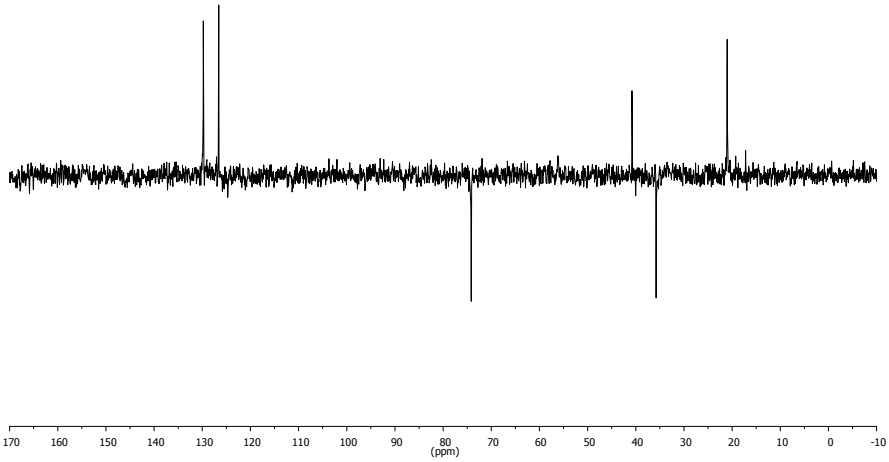

160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

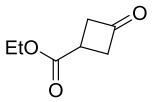


2g

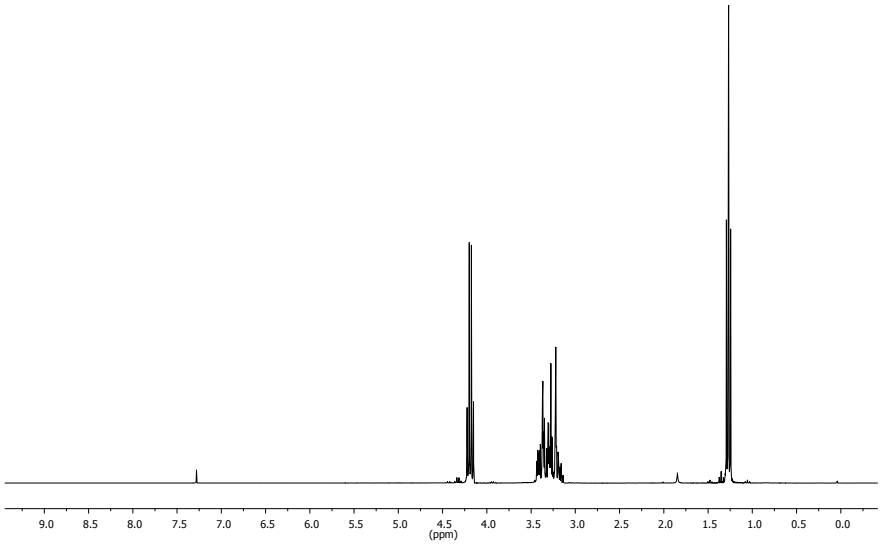

9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)

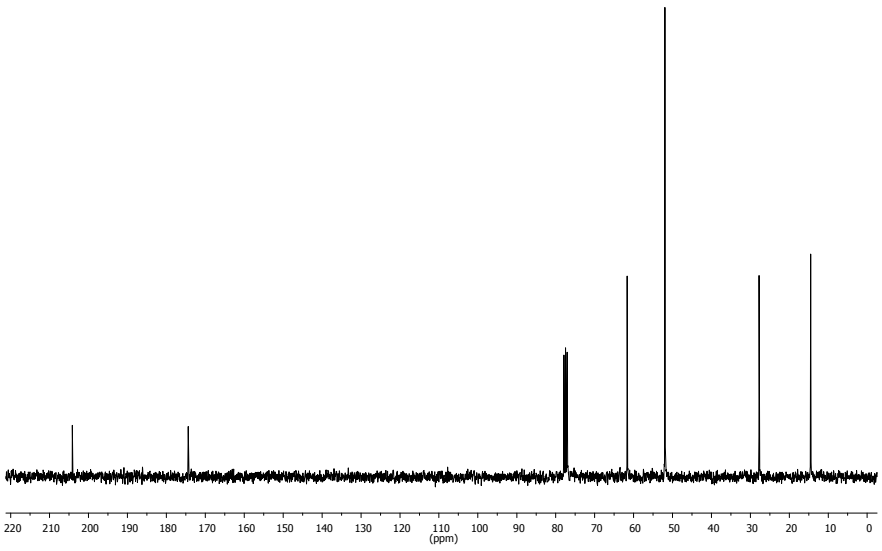

210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

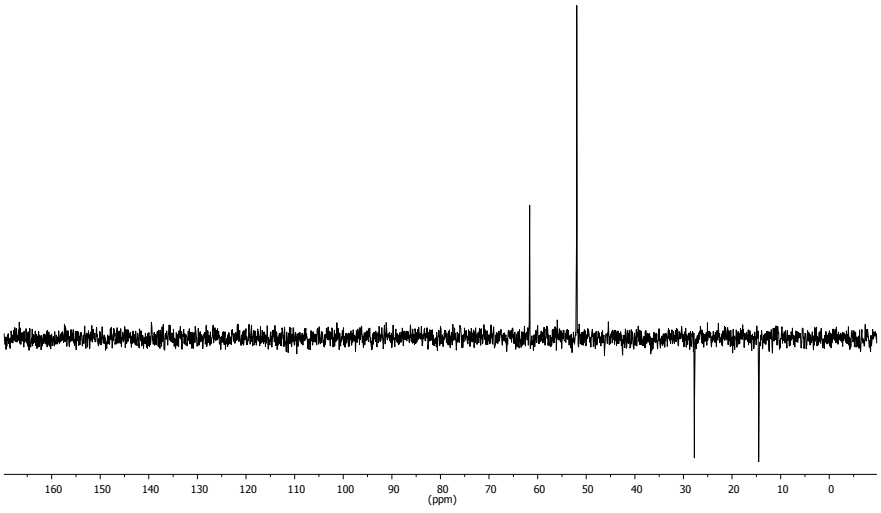

170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 -10
(ppm)

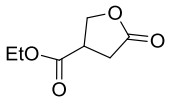

EtO
O
O

1h

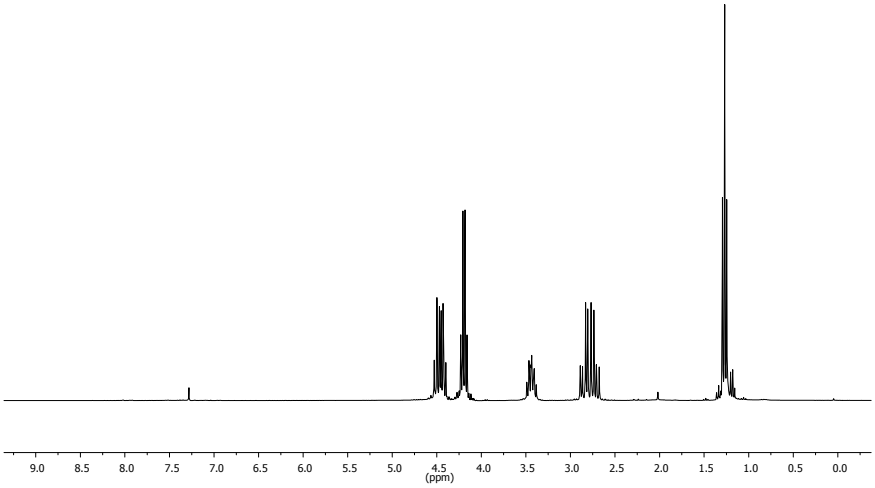

9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)

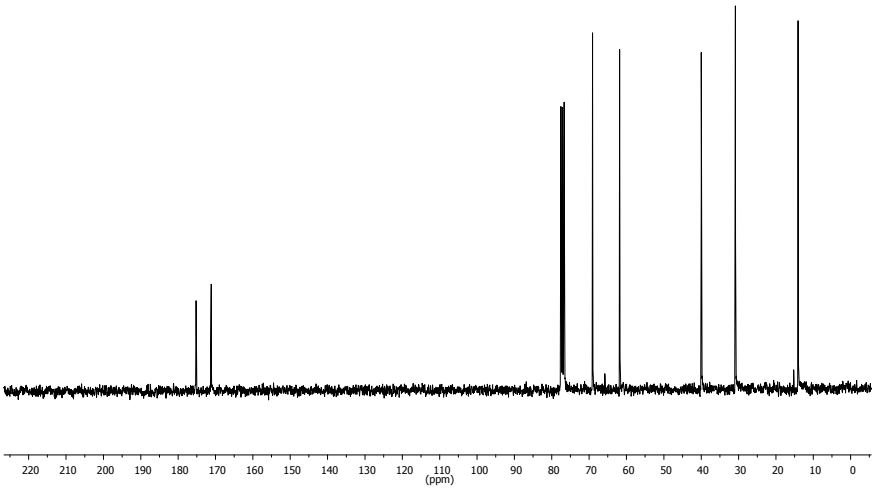

220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

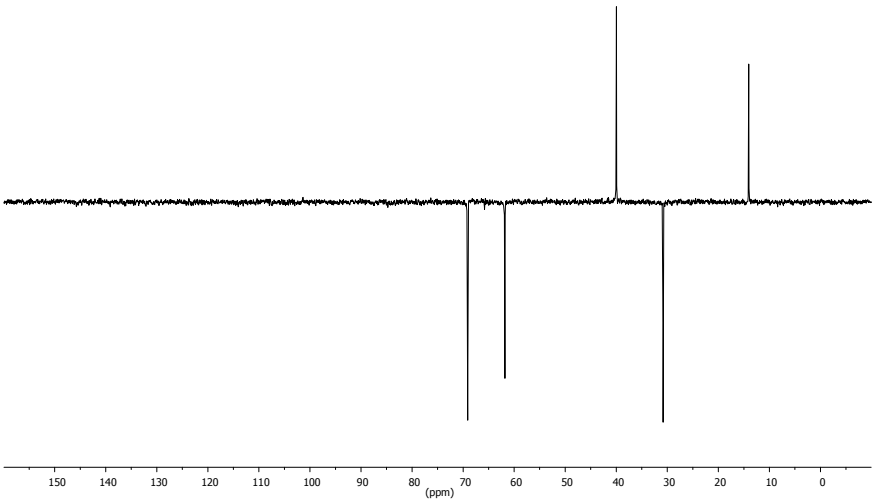

160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

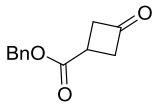

EtO
O
O
O

2h

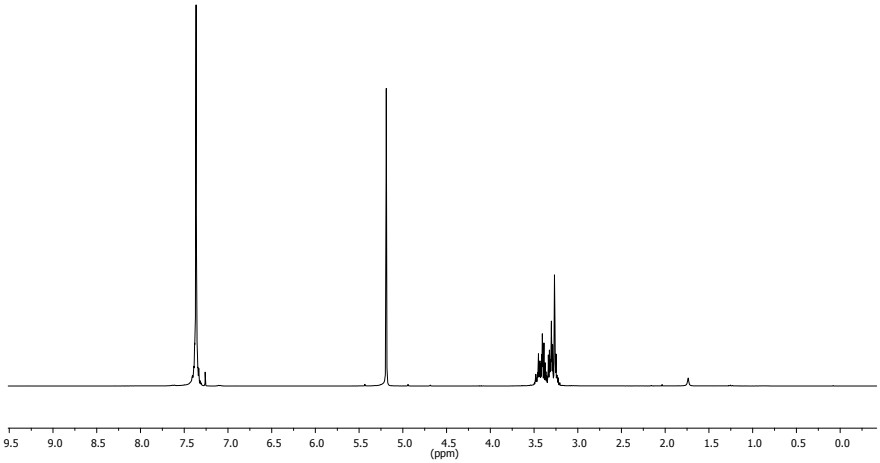

9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)

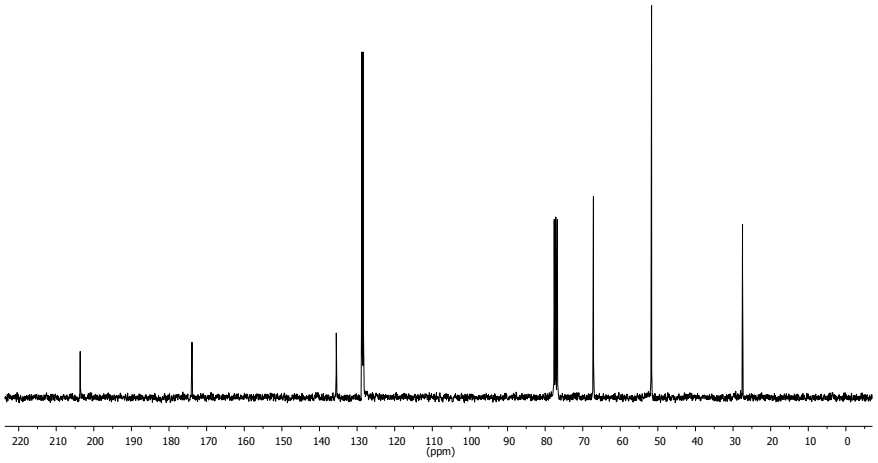

220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

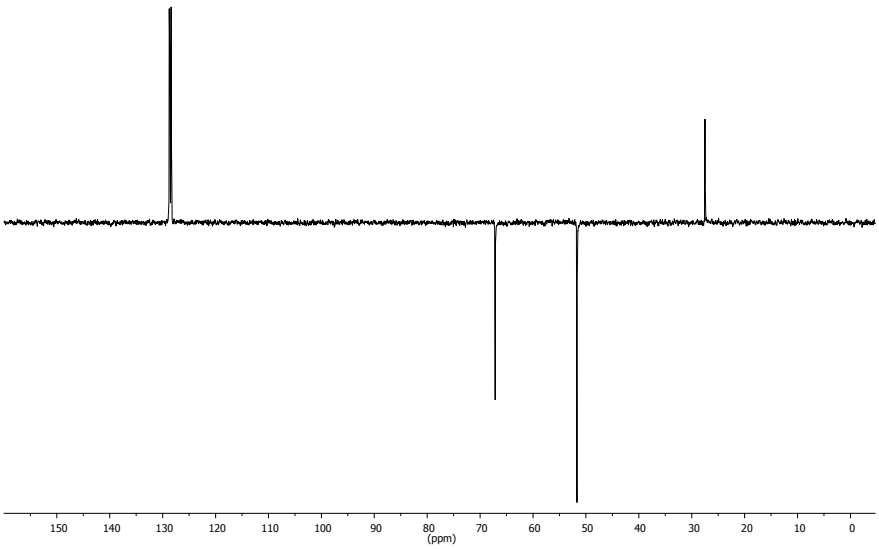

150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

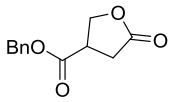

BnO
O
O

1i

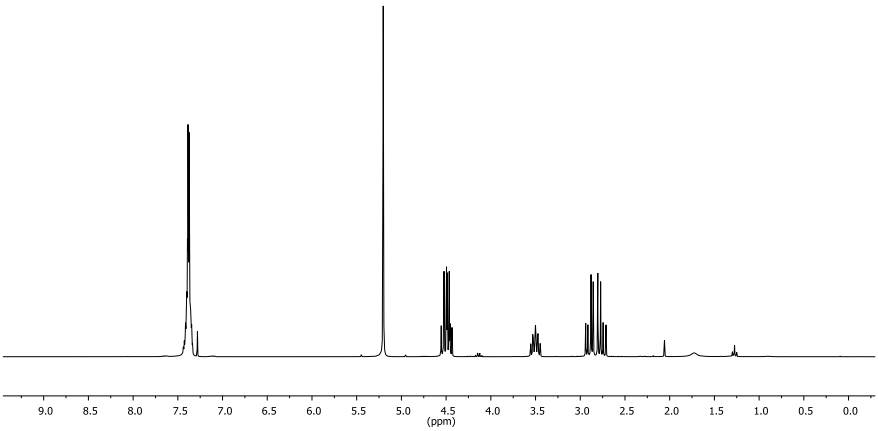

9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)

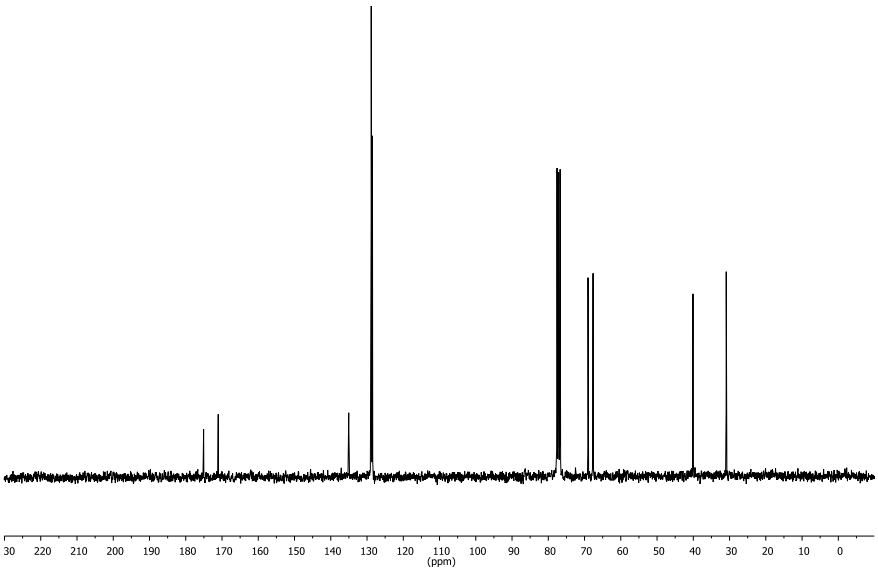

220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

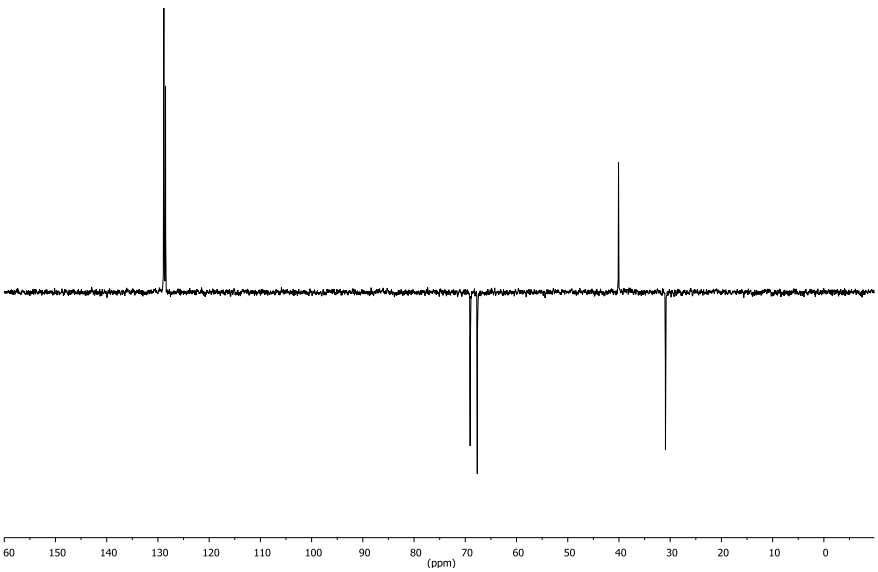

150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

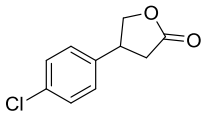

BnO
O
O
O

2i

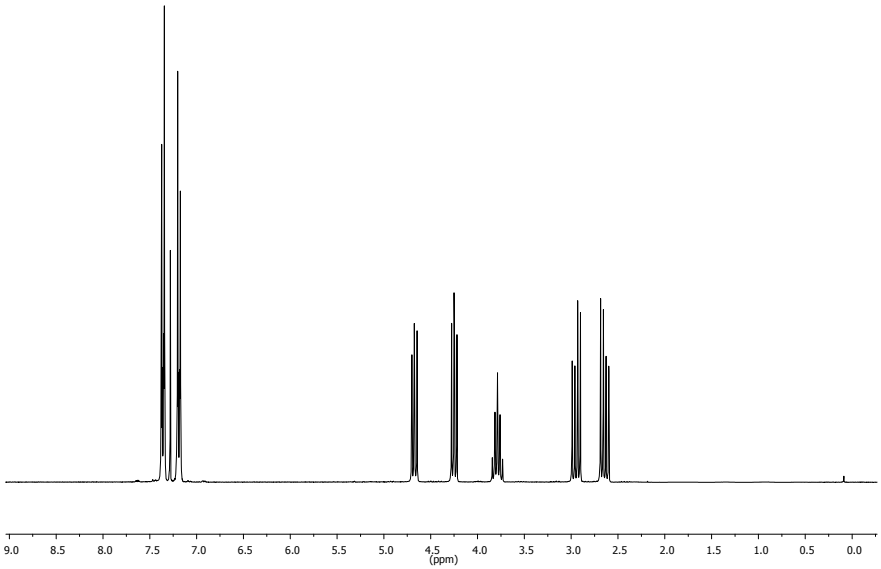

9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)

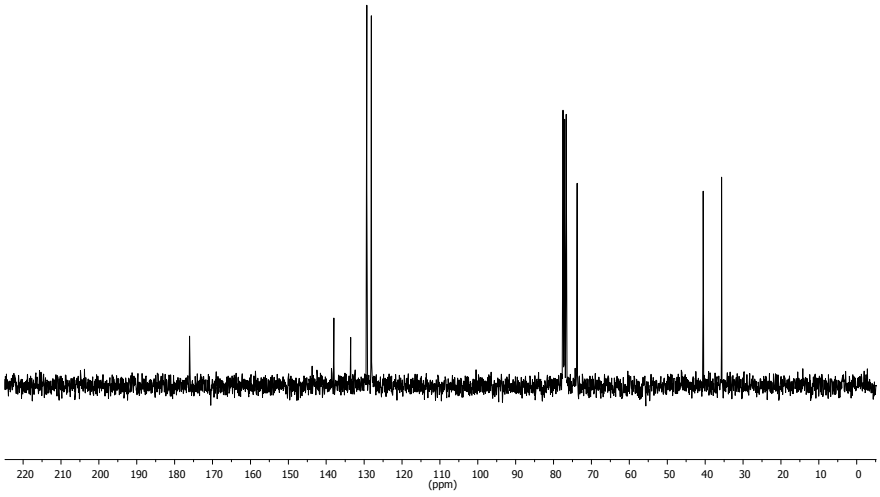

30 220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

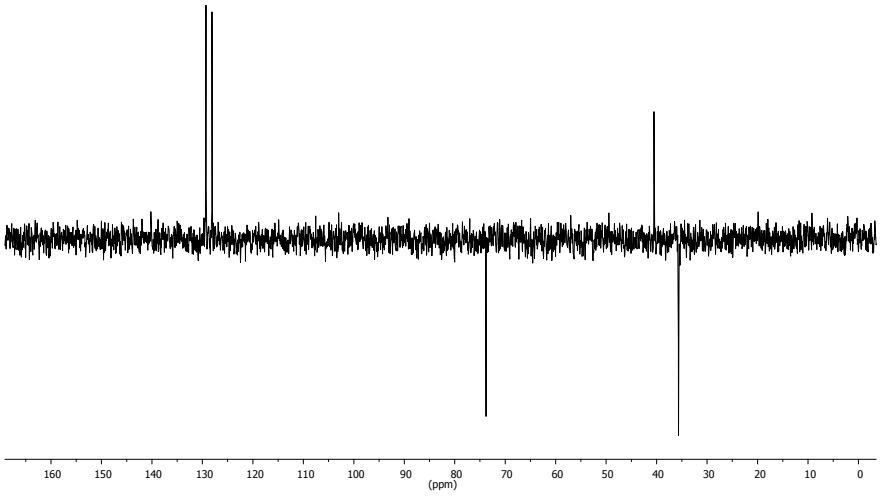

60 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

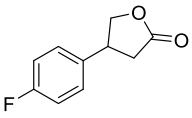

O
O
Cl

2j

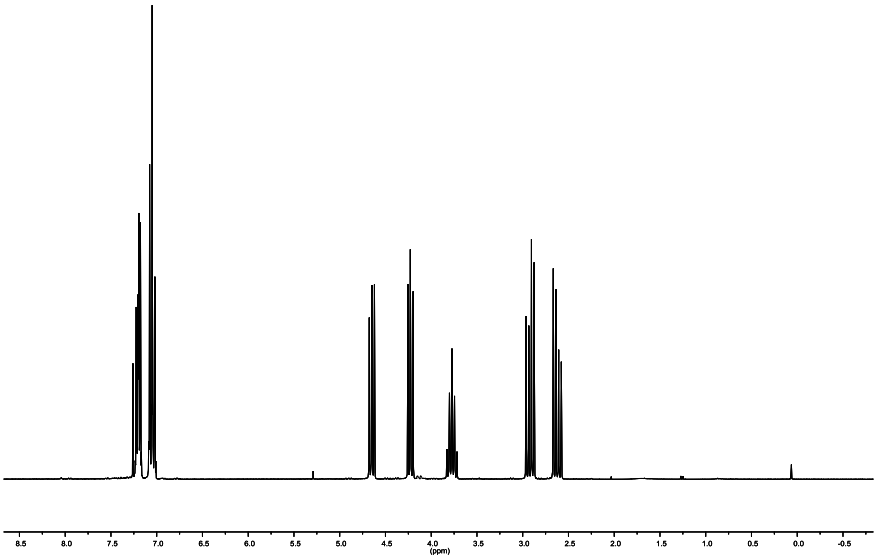

9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)

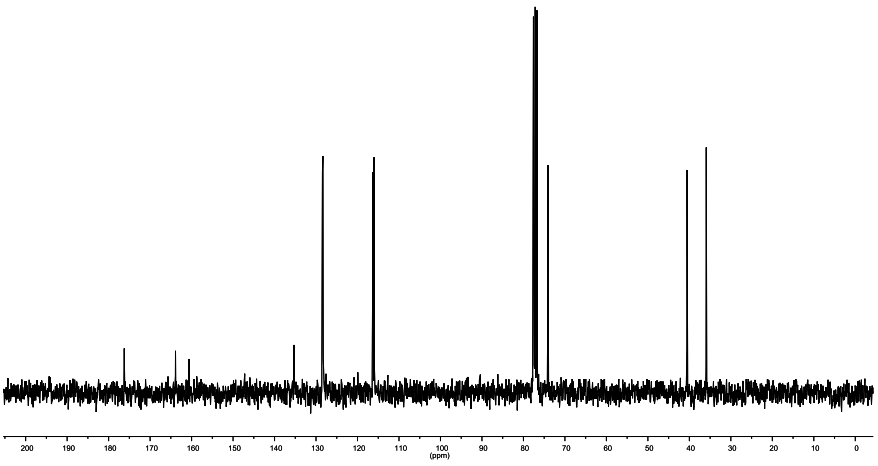

220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

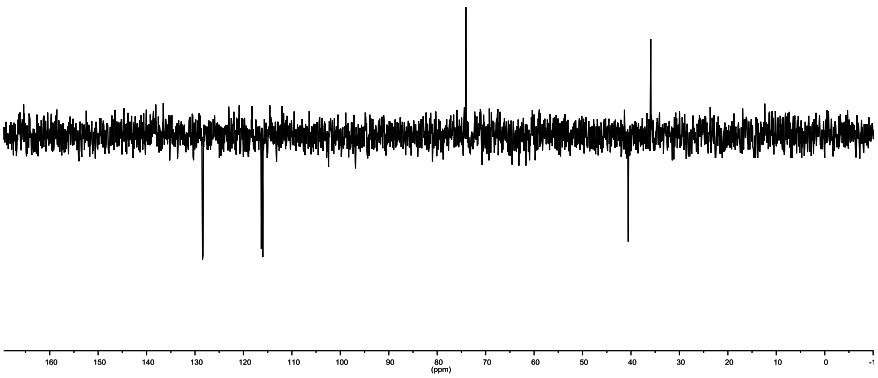

160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

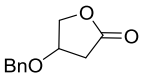

O
O
F

2k

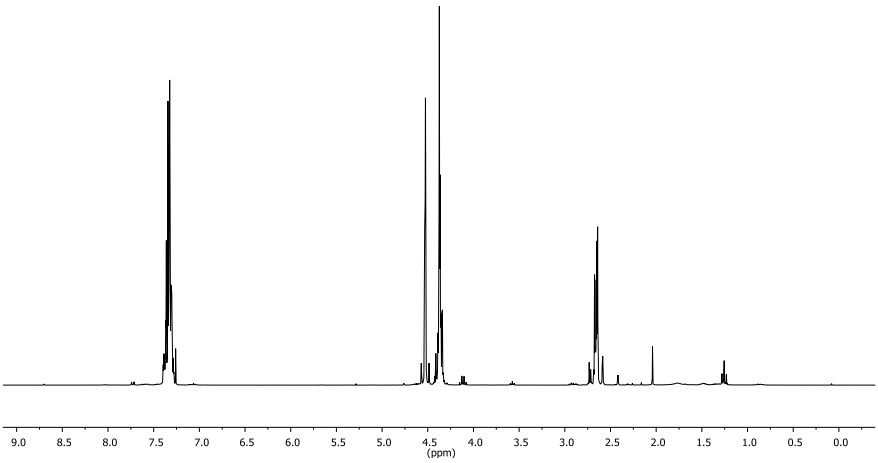

8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 -0.5
(ppm)

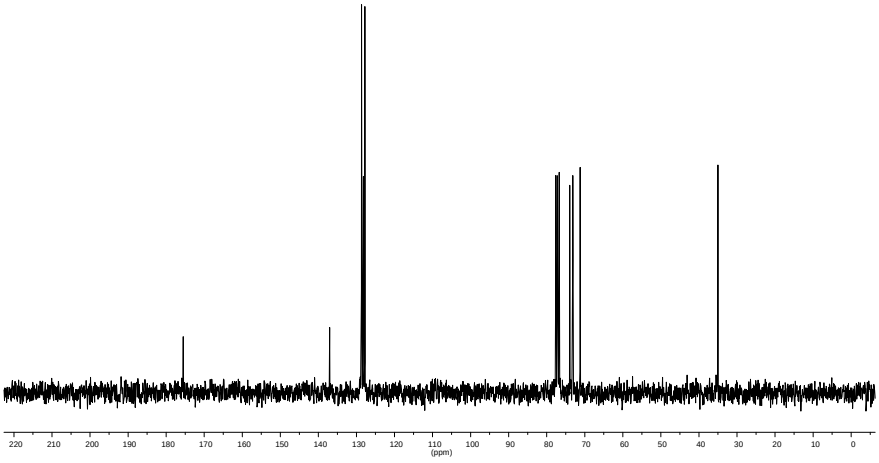

200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)

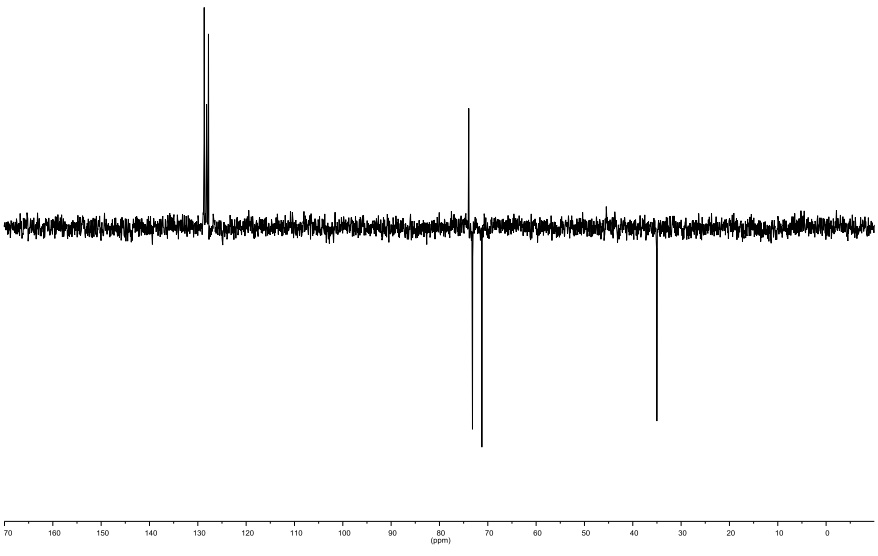

160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)


O
O
BnO

2l


9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0
(ppm)


220 210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)


70 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0
(ppm)