



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**Activación mecánica como alternativa verde en biocatálisis y
síntesis asimétrica**

TESIS

Que presenta

I.F. MARIO PÉREZ VENEGAS

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

**EN LA ESPECIALIDAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS**

Director de la Tesis: Dr. Eusebio Juaristi y Cosío

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), bajo la dirección del Dr. Eusebio Juaristi y Cosío y con el apoyo económico de una beca (CVU No. 70766) otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Durante el desarrollo de la presente tesis doctoral se generaron las siguientes publicaciones.

- 1. Mechanochemical enzymatic resolution of *N*-benzylated- β^3 -amino esters.**
Pérez-Venegas, M.; Reyes-Rangel, G.; Neri, A.; Escalante, J.; Juaristi, E. *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 1728-1734. *Corrigendum. Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 2128-2130.
- 2. Mechanoenzymatic resolution of racemic chiral amines, a green technique for the synthesis of pharmaceutical building blocks.**
Pérez-Venegas, M.; Juaristi, E. *Tetrahedron* **2018**, *74*, 6453-6458.
- 3. Recent applications of mechanochemistry in enantioselective synthesis.**
Avila-Ortiz, C. G.; Pérez-Venegas, M.; Vargas-Caporali, J.; Juaristi, E. *Tetrahedron Lett.* **2019**, *60*, 1749-1757.
- 4. Thermal and Mechanical Stability of Immobilized *Candida antarctica* Lipase B: an Approximation to Mechanochemical Energetics in Enzyme Catalysis.**
Pérez-Venegas, M.; Tellez-Cruz, M. M.; Solorza-Feria, O.; López-Munguía, A.; Castillo, E.; Juaristi, E. *ChemCatChem* **2020**, *12*, 803-811.
- 5. Dual Mechanoenzymatic Kinetic Resolution of (\pm)-Ketorolac.**
Pérez-Venegas, M.; Rodríguez-Treviño, A. M.; Juaristi, E. *ChemCatChem* **2020**, *12*, 1782-1788.
- 6. Mechanochemical and Mechanoenzymatic Synthesis of Pharmacologically Active Compounds: A Green Perspective.**
Pérez-Venegas, M.; Juaristi, E. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2020**, *8*, 8881-8893.
- 7. Mechanochemically Activated Liebeskind-Srogl (L-S) Cross-Coupling Reaction: Green Synthesis of meso-Substituted-BODIPYs.**
Pérez-Venegas, M.; Villanueva-Hernández, M.; Peña-Cabrera, E.; Juaristi, E. *Organometallics* **2020**, *39*, 2561-2564.

DEDICATORIAS

A mis abuelos **Carmen** y **Alfredo**, a mis padres **Guadalupe** y **Alejandro**, a mis hermanos **Erika**, **Francisco** y **Alfredo** y a **mi familia**, esenciales en todo momento y necesarios para continuar.

A mi **Guayaba**, guardiana perpetua de nuestro hogar y proveedora de cariño.

Y a mi esposa **Mayte**, inextinguible fuente de apasionada aventura y alquimista que convierte los años en amaneceres.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Eusebio Juaristi**, por la confianza y las oportunidades que permitieron mi desarrollo profesional, por su amistad y por enseñarme a dirigirme con impecable rectitud en el camino de la ciencia.

A los miembros del jurado por sus excelentes observaciones y su valioso tiempo durante la revisión de este trabajo de tesis.

A la **Q. F. B. Gloria Reyes Rangel**, mentora y amiga quien me educó más allá de su deber y a quien le debo las mejores experiencias en el laboratorio, gracias por los consejos y por el impulso continuo.

A la **Dra. Claudia Gabriela Ávila Ortiz**, por su apoyo y amistad que sin duda avivaron mi deseo de continuar sin fatiga.

Al **Dr. José Martín Landeros Gálvez**, compañero, mentor y amigo, cuyo profesionalismo, buena voluntad y paciencia será un molde perpetuo que intentaré alcanzar.

A **Gabina Dionisio Cadena**, por su excelente dedicación al trabajo en el laboratorio que permitió alcanzar los objetivos de este trabajo de tesis.

Al personal de la biblioteca del departamento de Química: **Alicia Hernández Monroy**, **Alejandra Rodríguez García** y **Gonzalo Trejo Santamaría**, cuyo trabajo y atención superan la excelencia.

A la **Q. F. B. Ma. Luisa Rodríguez Pérez**, la **Q. F. B. Teresa Cortez Picasso** y al **M. en C. Víctor M. Gonzáles Díaz**, por su invaluable trabajo en la obtención de espectros de RMN de 300 MHz, 400 MHz y 500 MHz, que sustentan este trabajo de tesis.

Al **I. Q. Geiser Cuéllar Rivera**, por su apoyo en la obtención de espectros de MS-TOF.

A las secretarías del departamento de Química, **Gloria León Maturano**, **Ma. De Lourdes Murillo Escutia**, **Noemi Munguía Delgado**, **Lorena Sánchez Mendoza** y **María Teresa Contreras**, por su excelente trabajo y por su asistencia en los trámites secretariales que acompañaron mi estancia en el departamento de Química.

Y a mis compañeros de grupo **Gloria**, **Gaby**, **Martín**, **Arturo**, **Omar**, **Carlos Cruz**, **María Teresa**, **Agustín**, **Gonzalo** y **Carlos Naranjo**, por sus consejos y buena compañía.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	3
Abreviaturas y acrónimos	5
Índice de compuestos	7
1. Introducción	
1.1 Química verde	9
1.2 Mecanoquímica	11
1.3 Biocatálisis	14
1.4 Lipasas, óptimos biocatalizadores	16
1.5 Resolución cinética como estrategia de síntesis	19
1.6 Mecanoquímica y biocatálisis	23
Referencias	23
2. Objetivos	
2.1 Objetivo General	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3. Capítulo I. Resolución mecanoenzimática de β^3-aminoésteres <i>N</i>-bencilados	
3.1 Antecedentes del empleo y síntesis de β -aminoácidos y su aplicación en el ámbito de la química fina	32
3.2 Resolución cinética de β^3 -aminoésteres <i>N</i> -bencilados mediante activación mecánica	37
3.3 Escalamiento del proceso de resolución mecanoenzimático	44
3.4 Medición de <i>EA</i> y del factor- <i>E</i> en la resolución mecanoenzimática de β -aminoésteres	46
3.5 Conclusiones	47
Referencias	48
4. Capítulo II. Resolución mecanoenzimática de aminas quirales: una técnica verde para la síntesis de bloques de construcción en la química farmacéutica	
4.1 Aminas quirales como bloques de construcción en la química farmacéutica	53
4.2 Resolución de aminas quirales racémicas para la síntesis de bloques de construcción farmacéuticos ópticamente activos	55
4.3 Resolución de aminas quirales enfocada a la preparación de un ingrediente farmacéutico activo comercial enantiopuro: (<i>R</i>)-Rasagilina	63
4.4 Medición de <i>EA</i> y del factor- <i>E</i> en la resolución mecanoenzimática de aminas racémicas	65
4.5 Conclusiones	66
Referencias	67
5. Capítulo III. Estabilidad térmica y mecánica de CALB inmovilizada: Una aproximación para cuantificar la energía mecanoquímica generada empleando catálisis enzimática	
5.1 Medición de la energía mecánica que se genera en una reacción mecanoquímica	70
5.2 Desactivación de la Lipasa B de <i>Candida antarctica</i> en diferentes	72

presentaciones por efecto térmico inducido durante la molienda	
5.3 Origen del incremento de la actividad enzimática: Efecto difusional	77
5.4 Estudio de los cambios energéticos en un proceso mecanoenzimático empleando resolución cinética	82
5.5 Efecto del proceso de molienda exhaustivo sobre la actividad de CALB en N435	87
5.6 Conclusiones	89
Referencias	89
6. Capítulo IV. Resolución mecanoenzimática dual de (±)-Ketorolaco	
6.1 Impacto del (±)-Ketorolaco en el sector farmacéutico: Dos eutómeros en una mezcla racémica	92
6.2 Resolución mecanoenzimática de (±)-Ketorolaco empleando una estrategia dual: hidrólisis o esterificación enantioselectiva	94
6.3 Medición de EA en la resolución mecanoenzimática de (±)-Ketorolaco considerando ambas estrategias resolutivas	104
6.4 Conclusiones	105
Referencias	106
7. Conclusiones generales	108
8. Parte experimental	
8.1 Información general	109
8.1.1 Desarrollo matemático para obtener las ecuaciones que describen el grado de conversión (c) y enantiopreferencia (E) de las resoluciones empleando resolución cinética	109
8.2 Parte experimental del Capítulo I	113
8.3 Parte experimental del Capítulo II	119
8.4 Parte experimental del Capítulo III	126
8.5 Parte experimental del Capítulo IV	134
9. Anexos	139
Referencias	201

Resumen

Recientemente, la química verde o química sustentable, ha cautivado la atención de la comunidad científica tanto en la academia como en la industria, con especial interés en los métodos “verdes” que permiten la generación de productos o metodologías químicas que reducen la huella ecológica y por lo tanto el impacto ambiental. De entre la variedad multidisciplinaria de métodos existentes que pueden aplicarse en el ámbito de la sustentabilidad, la *mecanoquímica* (definida de manera general como el uso de fuerza mecánica producida por fricción, golpeteo o molienda que se traduce en generación de energía útil para llevar a cabo una transformación física o química) se ha establecido como una de las mejores estrategias para obtener productos de alto valor agregado, permitiendo además una reducción significativa en el uso de agentes auxiliares, especialmente disolventes, respecto a un procedimiento químico equivalente en solución. Así, cuando la técnica se combina con tácticas operacionales, como lo son la ausencia de disolvente, o bien estrategias basadas en organocatálisis o biocatálisis, la aproximación resultante puede cumplir adecuadamente con los principios de la química verde, constituyendo así un proceso verdaderamente sustentable.

En el presente trabajo se describe el uso simultáneo de fuerza mecánica como fuente energética bajo condiciones sustentables, para llevar a cabo las transformaciones químicas enantioselectivas de interés empleando enzimas como biocatalizadores, específicamente la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB). Se desarrollaron así métodos mecanoenzimáticos para la obtención enantioselectiva de productos quirales de gran interés, mediante protocolos que cumplen con los principios de la química verde.

El desarrollo de los métodos mecanoenzimáticos se basó en una estrategia de desimetrización, que dio lugar a la resolución enzimática de mezclas racémicas de compuestos quirales conteniendo diferentes grupos funcionales como son los ácidos carboxílicos, ésteres, aminas y alcoholes. Por otro lado, con el objetivo de obtener resultados reproducibles y estandarizados, se decidió emplear activación mecánica producida por molienda empleando un equipo automatizado de molienda de bolas de alta velocidad (HSBM por sus siglas en inglés, *High-Speed Ball-Milling*).

En las primeras dos secciones de este trabajo, se describen metodologías de desimetrización empleando: (1) β^3 -aminoésteres quirales *N*-protegidos y (2) aminas primarias que presentan el grupo amino unido directamente a un centro estereogénico. En ambos casos la técnica mecanoenzimática procedió con excelentes resultados obteniéndose los productos esperados con altos excesos enantioméricos ($ee > 95\%$) y excelente conversión química ($c \approx 50\%$). Sin embargo, incluso cuando estos métodos pudieron ser optimizados y llevados a una escala de mayor interés para la producción comercial, la recuperación de la enzima inmovilizada presentó inconvenientes antes de poder ser reutilizada. Esta

complicación condujo a un estudio más detallado respecto a la técnica de molienda utilizada y sus posibles consecuencias en la actividad enzimática durante el proceso mecanoquímico.

La tercera sección de este trabajo presenta los resultados de la investigación enfocada a analizar algunas características del proceso mecanoquímico que pueden alterar la viabilidad de CALB después del proceso de molienda. Específicamente, se estudió la temperatura alcanzada en el reactor durante el proceso de molienda como una posible causa de inactivación enzimática. Sorprendentemente, después de un estudio riguroso usando CALB inmovilizada y en solución, empleando diferentes temperaturas y analizando la pérdida de actividad después de un tiempo estándar de incubación, se encontró que la inactivación enzimática por efecto térmico disminuyó cuando la enzima se encuentra inmovilizada, incluso después de haber sido molida varias veces. Por otro lado, con el propósito de verificar la eficiencia enzimática en términos de estereoselectividad, se llevaron a cabo evaluaciones de la actividad enzimática al paso del tiempo, encontrando que no existe una relación entre el proceso de molienda y una pérdida de actividad y/o estereoselectividad. Efectivamente, los resultados obtenidos ponen en evidencia un efecto mínimo de la tensión mecánica sobre la actividad enzimática. Esta observación marcó la pauta para aplicar los métodos mecanoenzimáticos en la industria, especialmente en la industria de la química fina y la industria farmacéutica.

Finalmente, la cuarta sección de este trabajo se enfocó en el estudio mecanoenzimático realizado para la obtención de un ingrediente farmacéutico activo (IFA) empleando dos técnicas de desimetrización enzimática. Este estudio expuso las ventajas que el método mecanoenzimático ofrece en términos de la sustentabilidad en un proceso de síntesis enantioselectiva con potencial en la industria farmacéutica. En este estudio, se eligió al (\pm)-Ketorolaco, un antiinflamatorio no esteroideo presente en el cuadro básico de medicamentos. Específicamente, se llevó a cabo el proceso mecanoenzimático de desimetrización a través de dos técnicas, la primera, basada en la esterificación enantioselectiva del residuo ácido del Ketorolaco racémico para obtener el enantiómero activo, el (*S*)-Ketorolaco, en forma de ácido libre y el enantiómero (*R*) como producto esterificado. La segunda metodología consistió en la hidrólisis enantioselectiva de ésteres racémicos del Ketorolaco para obtener la forma activa del fármaco como éster recuperado de configuración (*S*), mientras que el enantiómero complementario (*R*) se obtuvo en forma de ácido libre. En ambos casos, los métodos mecanoenzimáticos procedieron con un buen exceso enantiomérico ($ee > 83\%$) para la forma activa del fármaco (*S*). Simultáneamente, se pudo obtener de forma enantiopura el enantiómero menos activo (*R*). De esta manera, ambas estrategias están en línea con los principios de la química verde. Cabe también señalar que estos procesos mecanoenzimáticos se llevaron a cabo en menor tiempo respecto a los procesos en solución. Por último, se debe destacar que la

obtención de ambos enantiómeros del Ketorolaco en forma enantioenriquecida constituye una notable aplicación industrial del método mecanoenzimático, ya que la forma dextrógira del fármaco (enantiómero *R*) es usada en el manejo de cáncer de ovario, mientras que la forma levógira (enantiómero *S*) es un potente agente antiinflamatorio. Con estos resultados se ilustra así el potencial de lo que recientemente se ha denominado “*mecanoquímica medicinal*”.

Abstract

Recently, *green or sustainable chemistry* has attracted the attention of the scientific community from both academic and industrial perspectives. Special interest has been paid to *green* methods that facilitate the generation of chemical products and the development of synthetic methodologies that reduce or eliminate ecological footprint and environmental impact. Among the existing multidisciplinary methods that are being applied in the sustainability field, *mechanochemistry* (generally defined as the use of mechanical force produced by friction, pounding or grinding that can afford useful energy to carry out physical or chemical transformations), has been promoted as a convenient strategy to obtain valuable products, with a significant reduction in chemical waste, especially discarded solvents, relative to comparable chemical protocols in solution. When mechanochemistry is combined with sustainable strategies such as solvent-free methods, organocatalysis, and especially biocatalysis, the resulting techniques can fulfill most of the green chemistry principles, affording a truly sustainable process.

The present thesis work describes the use of mechanical force as an efficient energy source to carry out enantioselective chemical transformations, employing *Candida antarctica Lipase B* (CALB) enzyme as biocatalyst. We could demonstrate that the resulting mechanoenzymatic methods are rather convenient for the preparation of valuable products via green chemistry protocols.

Experimentally, the present developments using mechanoenzymatic methods are based on the desymmetrization approach of enzymatic resolution of racemic chiral compounds containing diverse functionality such as carboxylic acids, esters, amines and alcohols. With the aim of achieving reproducible and standardized results, we made use of mechanical activation produced by high-speed ball-milling (HSBM) equipment.

The first two sections of this work describe desymmetrization methodologies applied to: (1) chiral *N*-protected β^3 -aminoesters and (2) chiral primary amines with the amino group directly bonded to the stereogenic center. In both cases the mechanoenzymatic technique was performed with excellent results obtaining highly enantioenriched products (*ee* > 95%) with excellent conversion (*c* \approx 50%). Nevertheless, even when these methods were optimized and scaled-up efficiently the recovery, and reuse of the supported enzyme was complicated. This challenge

motivated a more detailed study of the grinding technique and potential deactivation of the enzyme during the mechanochemical process.

The third section of this thesis presents the results of a study focused in the evaluation of the mechanochemical parameters that can alter the enzymatic activity of CALB during the grinding process. Specifically, reactor's temperature was evaluated as a potential source of enzymatic inactivation. Surprisingly, after a comprehensive study on CALB activity using both free and immobilized forms, at various reaction temperatures, it was revealed that enzymatic inactivation due to thermal effect decreases substantially when immobilized biocatalyst is used, even after repeated grinding. On the other hand, a stereoselectivity assessment based on milling time revealed no relation between the grinding process and loss of activity/stereoselectivity. These results indicate a minimal effect of mechanical stress on the enzymatic activity and pave the road for the eventual application of mechanoenzymatic processes in industry, especially in fine chemistry and pharmaceutical industry.

Finally, the fourth section of this thesis focuses in the mechanoenzymatic preparation of an active pharmaceutical ingredient (API) employing desymmetrization strategies to show the potential of the solvent-free ball-milling method in the sustainability of synthetic industrial processes. In this way, (\pm)-*Ketorolac*, a nonsteroidal anti-inflammatory drug present in the list of highly used drugs, was selected as a model to study the mechanoenzymatic preparation of pharmaceutically active molecules. The mechanoenzymatic process was performed using two different desymmetrization strategies: first, through the enantioselective esterification of the acid residue present in racemic *Ketorolac* to recover the active enantiomer, (*S*)-*Ketorolac*, as the free acid and the (*R*)-enantiomer in ester form. Second, through an enantioselective hydrolytic technique using racemic *Ketorolac* esters to afford the active form of the (*S* configured) drug as an ester and the *R* enantiomer as the free carboxylic acid. Both mechanoenzymatic cases proceeded with a good enantiomer excess ($ee > 85\%$) for the active form of the drug.

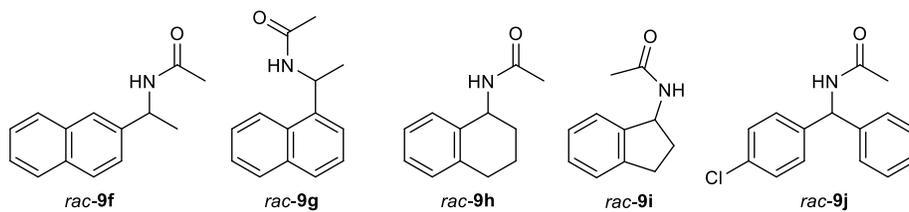
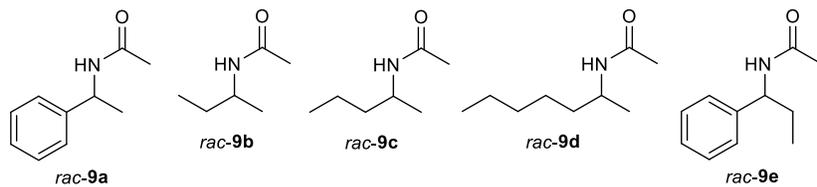
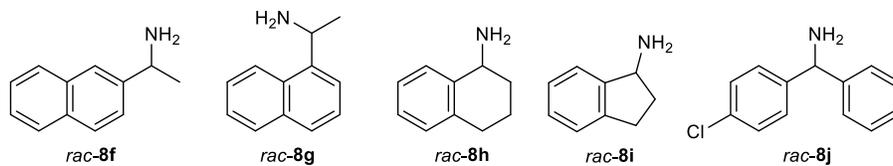
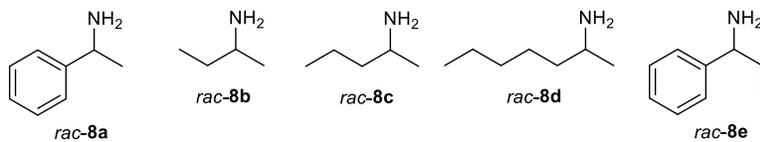
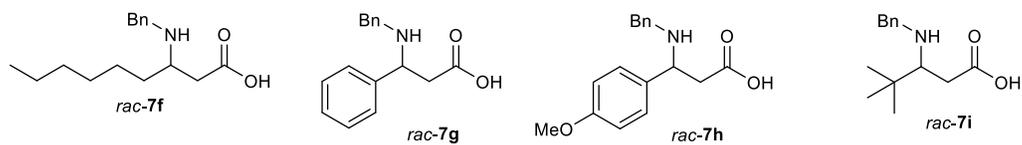
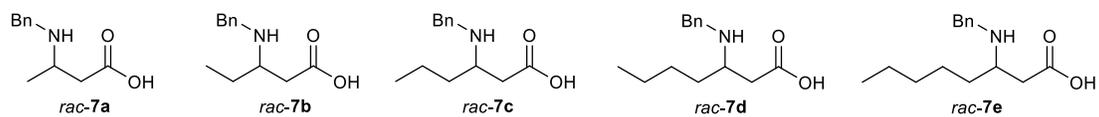
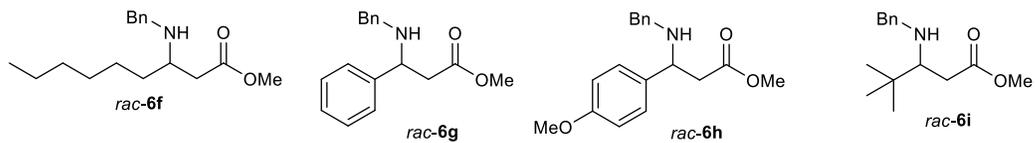
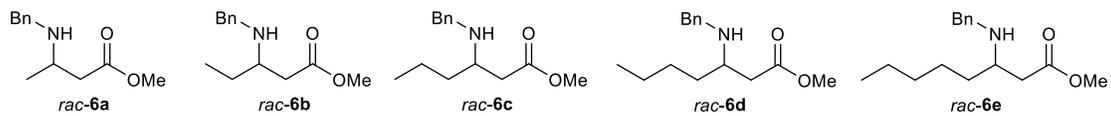
Both of the developed procedures for the preparation of enantiopure *Ketorolac* are in line with the principles of green chemistry. Interestingly, these solvent-free protocols were performed in shorter reaction times relative to analogous processes in solution. Additionally, the isolation of enantiopure (*R*)-*Ketorolac* described here could lead to an attractive industrial application of the mechanoenzymatic method, because the (*R*)-enantiomer is being used in the management of ovarian cancer whereas the (*S*)-enantiomer is a potent anti-inflammatory agent, illustrating the potential of so-called "medicinal mechanochemistry".

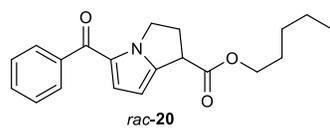
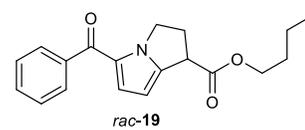
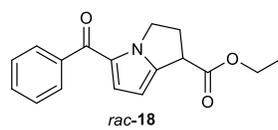
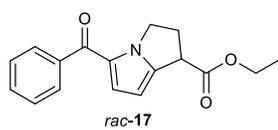
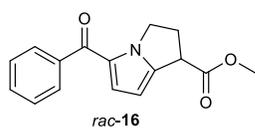
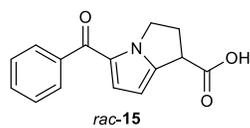
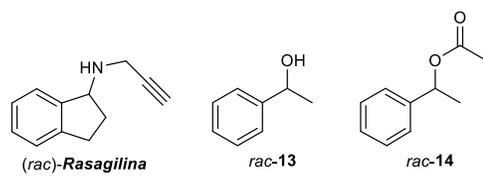
Abreviaturas y acrónimos

2M2B	2-Metil-2-butanol
AcOEt	Acetato de etilo
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
AO	Amino Oxidasa
Asp	Aspartato
B*	Biocatalizador quiral
BET	Brunauer-Emmett-Teller
Bn	Bencilo
Bz	Benzoílo
c	Conversión
C*	Catalizador quiral
CALB	Lipasa B de <i>Candida antarctica</i> (<i>Candida antarctica</i> Lipase B)
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
Cdc42	Cell division control protein 42
CoA	Coenzima A
COX	Ciclooxigenasa
D	Tiempo necesario a temperatura constante para reducir la actividad del biocatalizador en 10%
D ₂ O	Agua deuterada
$\Delta\Delta G^\ddagger$	Diferencia en energía entre estados de transición diastereoméricos
ΔG^\ddagger	Energía de activación para el estado de transición
DIPE	Éter diisopropílico
E	Enantiopreferencia
EA	Economía atómica
E_a	Energía de activación
ee	Exceso enantiomérico
EE	Esterificación enantioselectiva
E-factor	Factor ambiental
equiv.	Equivalente
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
h	hora/horas
HE	Hidrólisis enantioselectiva
His	Histidina
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia
HSBM	Molienda de bolas de alta velocidad (High-Speed Ball-Milling)
Hz	Hertz
IFA	Ingrediente Farmacéutico Activo
ImR	Imino reductasa
IPA	Isopropanol
k	Constante de velocidad
LAG	Líquido que asiste a la molienda (Liquid-Assisted Grinding)
MeOH	Metanol

μg	Microgramo
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MTBE	Éter metil <i>ter</i> -butílico
N435	Novozyme 435 [®]
N435c	Novozyme 435 [®] comercial (sin activación mecanoquímica)
N435pm	Novozyme 435 [®] previamente molida
NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato
ORTEP	Programa de graficado de elipsoides termales de Oak Ridge (Oak Ridge Thermal-Ellipsoid Plot Program)
pH	Potencial de hidrogeno
Ph	Fenilo
PM	Peso molecular
p-TSA	Ácido <i>para</i> -toluensulfónico
<i>R</i>	Constante ideal de los gases
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Rdto.	Rendimiento
SEM	Microscopia electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy)
Ser	Serina
TA	Transaminasa
<i>t</i> -Bu	<i>ter</i> -butilo
Thr	Treonina
UI	Unidad internacional de enzima
<i>V</i> _{max}	Velocidad máxima de conversión
<i>z</i>	Temperatura necesaria para disminuir <i>D</i> en una unidad logaritmica

Índice de compuestos





1. Introducción

1.1 Química verde

Durante las últimas dos décadas, la *química verde* o *química sustentable* se ha posicionado como una tendencia global que atiende a la urgente necesidad de llevar a cabo procesos químicos industriales de manera más limpia y eficiente. Esta meta está conduciendo a avances científicos y tecnológicos orientados al desarrollo de sistemas cada vez más sustentables. Estrictamente, la química verde se ha definido como el diseño de productos y procesos químicos que reducen o eliminan el uso o la generación de sustancias peligrosas.¹ Sin embargo, la definición y el campo de aplicación actual ha evolucionado de manera significativa, incentivando la creación y exploración de campos no contemplados inicialmente, como son la generación de tecnologías menos dañinas para el medio ambiente.²

Puede decirse que un proceso industrial o una reacción química es menos contaminante si evita el empleo de una cantidad sustancial de disolvente o reduce el tiempo de reacción respecto a un proceso estándar, o si elimina el uso de auxiliares químicos (aditivos) para llevar a cabo una reacción. No obstante, en el ámbito de la química verde, sobre todo industrialmente, no basta con mostrar subjetivamente una mejora en la manera en la que el proceso se lleva a cabo. Consecuentemente, Paul Anastas, considerado por algunos como el “padre” de la química verde, y John Warner propusieron doce principios fundamentales que cimentaron el campo de estudio de la química sustentable y que además, pueden usarse como guía para conocer qué tan “verde” es un proceso.³ Estos principios han sido denominados los doce principios de la química verde (Figura 1).⁴

1) Evitar la generación de residuos	2) Economía atómica	3) Síntesis menos tóxica	4) Diseñar productos benignos
5) Disolventes y auxiliares no tóxicos	6) Alta eficiencia energética	7) Uso de fuentes renovables	8) Reducir derivados
9) Catálisis	10) Diseñar para la degradación	11) Análisis en tiempo real	12) Prevención de accidentes

Figura 1. Los doce principios de la química verde.^{2,4}

Aun así, determinar el grado de observancia de la categoría “verde” puede resultar en una práctica ambigua que no necesariamente define la sostenibilidad y el impacto ambiental de un proceso. En consecuencia, se han elaborado criterios que permiten la medición cuantitativa de parámetros que pueden utilizarse para realizar comparaciones entre métodos y reacciones químicas y definir de forma clara la estrategia que se apega mayormente a lo propuesto por los doce principios de la química verde. Algunos de estos conceptos son:

- Economía atómica (*EA*)

Este parámetro, introducido en 1991 por Barry Trost, permite analizar la eficiencia de una reacción al cuantificar qué proporción del material de partida se encuentra presente en el producto final.⁵ Es importante notar que la economía atómica no corresponde al rendimiento final de una reacción, sino a la cantidad de átomos de los sustratos de partida que se encuentran incorporados en el producto final (Ec. 1).

$$EA = \frac{\text{masa de los átomos en el producto deseado}}{\text{masa total de los átomos de los reactivos}} * 100 \quad (1)$$

- Factor ambiental (*E-factor*)

El concepto de factor ambiental, introducido por Roger Sheldon en 1992, un año después de que Trost introdujera el concepto de economía atómica, visualiza de manera global la generación de desechos o todo aquello que no es el producto deseado.⁶ De manera general y simplificada se usa para cuantificar la cantidad de productos secundarios generados respecto a la cantidad de producto deseado en unidades de masa (Ec. 2).

$$\text{factor} - E = \frac{\text{Kg de productos secundarios}}{\text{Kg de producto deseado}} \quad (2)$$

La economía atómica *EA* y el factor-*E* son unidades de medida ampliamente utilizadas en la industria, aunque existen otros parámetros adicionales que pueden calcularse para cuantificar que tan “verde” es un proceso.⁷

Algunos de los parámetros de la química verde derivados de los principios 4, 5, 7, 11 y 12 (Figura 1), no pueden medirse a través de un cálculo matemático que involucre los componentes y el producto de una reacción; no obstante, existen alternativas que permiten evaluar el cumplimiento de esos principios. Especial interés se ha prestado a la evaluación correcta del quinto principio, que hace

referencia al empleo de disolventes y reactivos auxiliares no tóxicos. Debe destacarse que, aunque este principio no restringe por completo el uso de disolvente en una reacción, sí promueve su minimización o el empleo de los denominados disolventes verdes. Un disolvente verde idóneo es aquél que presenta las mejores propiedades de protección ambiental y de seguridad del usuario, y que puede obtenerse a través de fuentes naturales o producirse mediante estrategias renovables, como lo es la fermentación de microorganismos.⁸ Sin embargo, el número de disolventes con estas características y las aplicaciones inherentes que permiten su uso son reducidas.^{9,10} Ante esto, compañías como GlaxoSmithKlein han desarrollado cuadros comparativos que permiten elegir entre una variedad de disolventes de acuerdo a su grado de toxicidad (para así procurar el cumplimiento del quinto principio) facilitando la elección de un disolvente o su reemplazo para un proceso determinado.¹¹

Así, la correcta determinación de qué tan “verde” es una reacción o proceso químico requiere de un análisis profundo que en ocasiones precede a la ejecución de la reacción misma. Por ejemplo, mediante el análisis de la procedencia de las materias primas utilizadas y el costo energético asociado a su obtención, así como la seguridad inherente del proceso y su reproducibilidad. De esta forma, la evaluación exhaustiva de qué tan “verde” es un proceso requiere que las técnicas de valoración sean cada vez más precisas.^{12,13}

1.2 Mecanoquímica

Así como el quinto principio de la química verde recomienda minimizar el empleo de disolventes, el sexto principio hace referencia a la eficiencia energética con la que se lleva a cabo un proceso. Este factor no puede medirse de manera cuantitativa a través del simple estudio de una reacción o serie de reacciones químicas ya que debe analizarse la eficiencia del proceso en términos de la energía (térmica, eléctrica, lumínica, sonora, mecánica) que se emplea para realizar la transformación. Es decir, para un proceso convencional (por ejemplo, en solución, empleando un matraz y un baño de aceite), debe cuantificarse la cantidad de energía eléctrica necesaria para agitar la reacción y calentar el baño hasta la temperatura deseada y durante el tiempo requerido. Por lo general, si se realiza el cálculo teórico del gasto energético anticipado y se compara con el gasto real, este último será sustancialmente mayor debido a la pérdida de calor que se genera en la parrilla y el baño de aceite. Así mismo, debe considerarse la eficiencia con la que el equipo de calentamiento transforma la energía eléctrica en térmica y el tiempo que debe usarse para calentar de forma homogénea todo el sistema.

En este contexto, el sexto principio de la química verde se orienta a la búsqueda de tecnologías que disminuyan el gasto energético para llevar a cabo una cierta

transformación química.⁴ Especialmente, se han investigado fuentes de energía no convencionales como son la irradiación de microondas, la electroquímica, la sonoquímica y la mecanoquímica como posibles alternativas.¹⁴⁻¹⁸ Esta última aproximación, el uso de fuerza mecánica como promotora en reacciones químicas, se ha posicionado durante las últimas dos décadas como una estrategia de gran interés entre la comunidad científica.

Las reacciones mecanoquímicas, definidas como reacciones químicas inducidas por la absorción directa de energía mecánica producida por fricción, maceración o molienda,¹⁹ han sido exploradas con mayor interés en las últimas décadas. Sin embargo, su aplicación en el ámbito de la química data desde hace más de dos milenios.²⁰ No obstante, cabe señalar que hasta hace poco tiempo las técnicas de molienda estuvieron mayormente enfocadas a operaciones de trituración para la reducción del tamaño de partículas en industrias de minería o farmacéuticas.

El aprovechamiento de la fuerza mecánica como fuente de energía para activar reacciones químicas requirió como punto de partida la comprensión de los fundamentos de esta estrategia para llevar a cabo transformaciones empleando reactivos orgánicos.^{21,22} Para comprender la aceptación de esta técnica en el ámbito de la química verde es importante destacar la percepción pragmática que el empleo de la fuerza mecánica producía en el espectador. En particular, como químicos, especialmente en el ámbito de la química fina y farmacéutica, solemos asociar un proceso de molienda con una transformación física que permite modificar las propiedades de un sólido cristalino reduciendo el tamaño de partícula y permitiendo mezclar con mejor eficiencia dos sólidos.²³ La mecanoquímica modifica además las propiedades de un compuesto cristalino para incrementar algunas propiedades farmacéuticas.²⁴ Sin embargo, generalmente no asociamos el empleo de la fuerza mecánica para llevar a cabo la síntesis de un ingrediente farmacéutico activo (IFA).

En este contexto, la percepción del notable poder de la fuerza mecánica llevó a considerar que la temperatura alcanzada durante la molienda era tan alta que no era conveniente llevar a cabo la molienda de reactivos sensibles, como son los reactivos orgánicos. Efectivamente, una teoría inicial propuso un modelo relacionado con la distribución energética dentro de un molino de bolas y fue llamada la teoría de los puntos calientes o *hot spot theory* en inglés.²¹ Esta teoría plantea que durante el proceso de molienda de materiales inorgánicos el impacto generado por los artefactos de fricción (bolas de acero u otros materiales) produce puntos locales de alta energía que permiten elevar sustancialmente la temperatura del proceso.²⁵ No obstante, investigaciones más recientes empleando sustratos orgánicos, han descartado esta premisa demostrando que es posible la aplicación de los procesos mecanoquímicos en síntesis orgánica sin observarse una destrucción de los reactantes.^{26,27}

Una reacción mediada por fuerza mecánica puede realizarse mediante molienda simple usando un mortero y un pistilo (Figura 2a);²⁸ sin embargo, con el objeto de estandarizar los protocolos mecanoquímicos y facilitar su reproducibilidad, en la actualidad se prefiere usar aparatos automatizados que pueden controlar el tiempo y la frecuencia de la molienda. La elección de la configuración del equipo de molienda depende esencialmente del tipo y escala de la reacción estudiada (Figura 2). A nivel laboratorio, en la mayoría de los casos se prefiere usar la técnica de molienda de bolas de alta velocidad (HSBM, High-Speed Ball-Milling por las siglas en inglés) para llevar a cabo la reacción (Figura 2b).²⁹

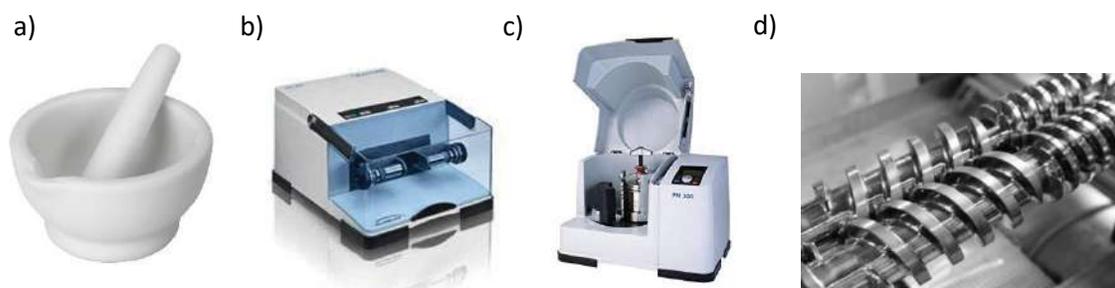


Figura 2. Equipos de molienda utilizados en reacciones orgánicas. a) Mortero y pistilo. b) Equipo de molienda de bolas de configuración vibracional. c) Equipo de molienda de bolas de configuración planetaria. d) Tornillo gemelo empleado para procesos de molienda mediante extrusión.³⁰

Los procesos de molienda presentan ventajas importantes respecto a la aplicación de otras fuentes de energía no convencionales como son las microondas y la electroquímica. En particular, destaca el hecho de que mediante la técnica mecanoquímica se llevan a cabo transformaciones químicas en ausencia de disolvente. Debe también resaltarse el hecho de que los procesos mecanoquímicos facilitan la adición de reactivos que presentan baja solubilidad en los disolventes tradicionales. Estas características posicionan las técnicas de molienda como estrategias muy atractivas en el ámbito de la química sustentable. En especial, un proceso mecanoquímico puede conducirse bajo condiciones libres de disolvente, incrementando incluso la eficiencia de una transformación al involucrar una alta concentración de los reactivos en el seno de la reacción.³¹

Las ventajas inherentes del uso de fuerza mecánica para llevar a cabo transformaciones químicas hicieron posible la exploración de diversas estrategias sintéticas para la obtención de productos e intermediarios relevantes, acrecentando el interés, estudio y aplicación de la mecanoquímica como alternativa “verde” en síntesis química, especialmente orgánica.^{22,32} De entre las aplicaciones sintéticas orgánicas exploradas bajo la influencia de fuerza mecánica destacan: reacciones de tipo Michael, Baylis-Hillman y Wittig, así como

cicloadiciones, condensaciones aldólicas y reacciones de tipo Knoevenagel así como reacciones catalizadas por metales tales como son las reacciones de Suzuki, Heck y Sonogashira.³³⁻⁴¹ No obstante, el estudio enfocado a la síntesis asimétrica de compuestos empleando prolina o diferentes organocatalizadores a través de estrategias mecanoquímicas, resultó de especial interés para la comunidad científica.⁴²⁻⁴⁴

Las técnicas de síntesis mediadas por organocatalizadores, especialmente aquéllas que se llevan a cabo empleando fuerza mecánica, ilustran la tendencia que debe seguirse para el desarrollo de protocolos con mayor sustentabilidad apegados a los doce principios de la química verde.⁴⁵ Además de incentivar la aplicación de moléculas orgánicas biodegradables que pueden sustituir a las alternativas metálicas en síntesis asimétrica. En particular, el empleo de organocatalizadores tales como la prolina o diferentes péptidos en conjunto con fuerza mecánica provee evidencia sustancial del efecto benigno de la activación mecánica sobre la estabilidad de moléculas orgánicas. Adicionalmente, la excelente estereoselectividad obtenida en estos protocolos muestra la estabilidad de los organocatalizadores ante las condiciones de molienda.⁴²⁻⁴⁶

Finalmente, el conocimiento de la estabilidad de las moléculas orgánicas, incluidos los péptidos, al embate de la fuerza mecánica producida por los equipos de molienda y la capacidad de la técnica para llevar a cabo reacciones con alta estereoselectividad, condujeron a la posibilidad del empleo de estructuras proteicas más sensibles y complejas en conjunto con procesos mecanoquímicos para llevar a cabo procesos de síntesis asimétrica; es decir, procesos enzimáticos mediados por fuerza mecánica para obtener productos con alta enantiopureza.⁴⁶

1.3 Biocatálisis

El empleo de catalizadores en una reacción química, incluso bajo condiciones convencionales usando disolvente, favorece de manera clara el cumplimiento de los conceptos fundamentales de la química verde. En especial, un biocatalizador disminuye considerablemente la energía requerida para llevar a cabo la reacción, incrementa la (estereo)selectividad de un proceso, reduce la cantidad de los desechos generados y aumenta la economía atómica.² Estas características convierten a la biocatálisis en una de las herramientas más atractivas de la química verde. Efectivamente, entre la variedad de catalizadores que pueden emplearse en el ámbito de la química sustentable como son los catalizadores metálicos y los organocatalizadores, los biocatalizadores se han constituido como las herramientas ideales para llevar a cabo un proceso “verde”.

La biocatálisis, que comprende el uso de enzimas o células completas para acelerar una transformación química,⁴⁷ es una metodología cuyas raíces datan de las antiguas civilizaciones de Mesopotamia y Asia.⁴⁸ Sin embargo, la comprensión

de los procesos biocatalíticos y las aplicaciones dirigidas a la obtención de productos específicos se registraron hasta finales de los años cincuenta del siglo pasado.⁴⁹ Dentro del ámbito de la química verde, la biocatálisis se ha convertido en una herramienta fundamental dando lugar al desarrollo de nuevos campos de investigación tales como el desarrollo de metodologías para la síntesis de compuestos mediada por enzimas de distintas clases, reacciones en cascada involucrando una o dos transformaciones enzimáticas e incluso se han aportado fundamentos para la aplicación de los principios de la evolución dirigida para la optimización de las funciones enzimáticas.⁵⁰⁻⁵⁵

Es pertinente aquí señalar que el empleo de células o enzimas para llevar a cabo un proceso químico conduce al cumplimiento de uno de los principios de la química verde, específicamente el empleo de fuentes renovables. No obstante, es importante considerar algunas características de los sistemas biológicos que podrían impedir el cumplimiento de estos principios. Por ejemplo, el empleo de una célula completa para llevar a cabo una transformación química requiere de condiciones específicas. Así, debe considerarse si la transformación se llevará a cabo dentro o fuera de la célula, ya que en el primer caso debe asegurarse que el biocatalizador posea los componentes celulares necesarios para la introducción del sustrato al interior de la célula en donde ocurrirá la catálisis (Figura 3).⁵⁶ Así mismo debe asegurarse que el producto sea liberado del biocatalizador.⁵⁶ Por otro lado, cuando el proceso toma lugar de manera extracelular, debe adecuarse el medio en el que la célula está creciendo para preservar las condiciones de crecimiento y asegurarse que el producto no interfiera con ningún otro proceso celular o desencadene la inactivación del biocatalizador.⁵⁷ En ambos casos, es necesario conocer el tiempo de activación de la enzima que realizará la catálisis y cerciorarse de la correcta generación proteica de la misma, de lo contrario el proceso deseado será lento o nunca ocurrirá.

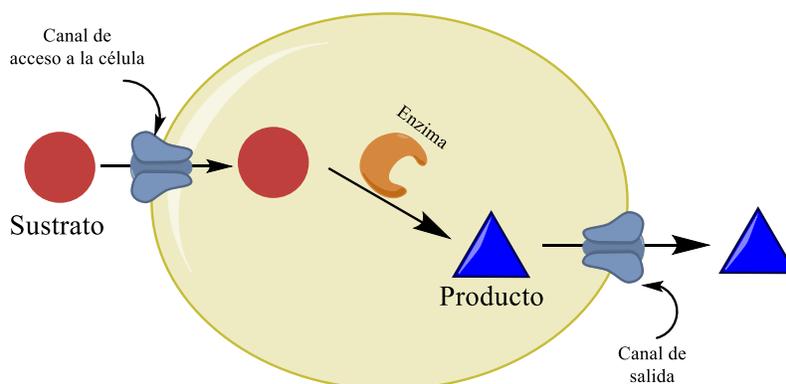


Figura 3. Representación de un proceso biocatalítico intracelular empleando una célula completa.⁵⁶

Las limitaciones inherentes del proceso y las complicaciones que pueden ocurrir durante la transformación biocatalizada por células completas han generado una mayor expectativa en el uso de enzimas como biocatalizadores. En particular, el empleo de enzimas elimina la necesidad de las condiciones de reacción que son necesarias para el crecimiento celular, minimiza posibles contaminaciones del medio de cultivo que afectan al proceso biocatalítico y elimina el tiempo de espera que es necesario para que la célula sintetice el biocatalizador, entre otras ventajas. Así, ha aumentado el empleo de enzimas como biocatalizadores a nivel industrial, especialmente en el campo farmacéutico.^{58,59}

Lamentablemente, el uso de enzimas solubles acarrea otras limitaciones importantes que afectan de manera significativa la sustentabilidad del proceso. Por ejemplo, es claro que una enzima reduce el tiempo de proceso y elimina algunas desventajas respecto al uso de células completas; sin embargo, una enzima es un sistema proteico susceptible a inactivación y desnaturalización por efecto de la temperatura, el pH y los sustratos empleados o los productos generados.⁶⁰ Adicionalmente, la recuperación de una enzima soluble conlleva un proceso laborioso que incrementa la producción de residuos. Sin embargo, se han desarrollado metodologías para emplear enzimas que sean fácilmente recuperadas del medio de reacción, una de estas metodologías consiste en la inmovilización de la enzima en soportes poliméricos estables.

La inmovilización de una enzima en un soporte adecuado incrementa de manera considerable la capacidad del biocatalizador para resistir condiciones adversas de reacción como son la temperatura, la presión y el pH. No obstante, la mayor ventaja de emplear una enzima inmovilizada es la posible recuperación del biocatalizador que puede entonces ser usado sin mayores tratamientos en nuevos ciclos catalíticos.⁶¹

Diversas enzimas han sido inmovilizadas con múltiples propósitos; por ejemplo, acetilcolinesterasas para la detección de pesticidas, ureasas como biosensores, aldolasas con el propósito de detectar analitos de interés médico y galactosidasas para la obtención de productos alimenticios, entre otras.⁶²⁻⁶⁵ Así mismo, en el ámbito de la síntesis orgánica y en especial de la química verde, la inmovilización de lipasas ha permitido el desarrollo de reacciones que conducen a la obtención de productos de interés químico y farmacéutico.

1.4 Lipasas, óptimos biocatalizadores

Una lipasa verdadera (EC 3.1.1.3) o carboxilesterasa, es una enzima que cataliza la hidrólisis y síntesis de acilglicérols con una cadena hidrocarbonada.⁶⁶ Las lipasas son en su mayoría proteínas extracelulares por lo que se producen con relativa facilidad, incluso a través de técnicas recombinantes empleando microorganismos modificados.⁶⁶ El interés químico y farmacéutico en estas

enzimas radica en su capacidad para catalizar un gran número de reacciones con alta quimio-, regio- y estereoselectividad, además de permanecer activas a temperaturas altas (hasta 70 °C) y bajo condiciones no convencionales de pH y concentración.⁶⁷ La principal característica que define a las lipasas como enzimas de elección en la industria es su notable capacidad de llevar a cabo reacciones en medios orgánicos.⁶⁸

La lipasa B de *Candida antarctica* (CALB por las siglas en inglés, *Candida antarctica* Lipase B) se encuentra entre las lipasas más estudiadas en la academia e industria. CALB está constituida por 317 residuos de aminoácidos, lo que corresponde a una masa atómica de 33kDa.⁶⁹ La estructura molecular de CALB fue resuelta en 1994, permitiendo elucidar el mecanismo de acción enzimático que involucra una triada catalítica formada por el residuo 187 de Aspartato, 224 de Histidina y 105 de Serina (Asp₁₈₇-His₂₂₄-Ser₁₀₅, Figura 4). Así mismo, participa en el proceso catalítico una cavidad por arriba del sitio activo y un segmento oxianiónico como parte de una arquitectura estructural que permite posicionar al agente acilante y al nucleófilo responsable de la formación del producto biocatalítico (Figura 5).⁶⁹

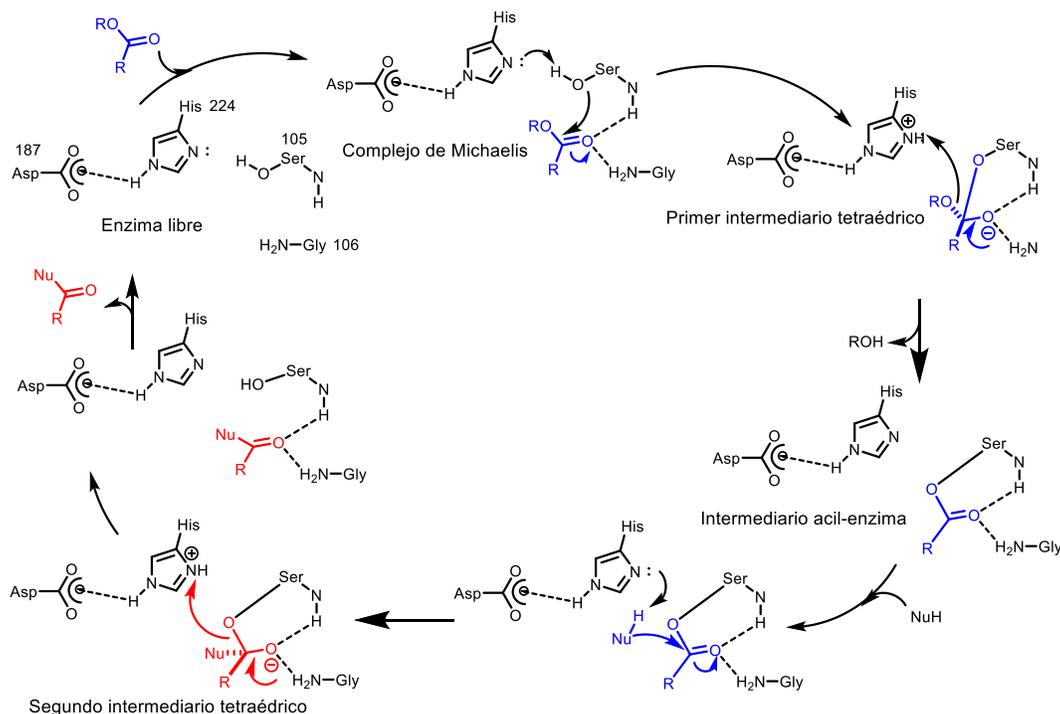


Figura 4. Mecanismo de la acción hidrolítica de CALB.⁵⁵

Es evidente que, además de sus excelentes propiedades térmicas y funcionales en disolventes orgánicos, las características estéricas del sitio catalítico de CALB

(triada catalítica, y dos cavidades de diferente tamaño para el posicionamiento de la porción pequeña (P) y grande (G) de la molécula a catalizar), le proporcionan a esta lipasa la extraordinaria capacidad de diferenciar con gran precisión entre los enantiómeros en una mezcla racémica, permitiendo la obtención de productos orgánicos con altos excesos enantioméricos.⁷⁰ También debe señalarse la sorprendente estereoselectividad del sitio catalítico que permite a CALB catalizar un gran número de reacciones en una amplia variedad de sustratos; debido a esto CALB suele denominarse una enzima *promiscua*.⁷¹

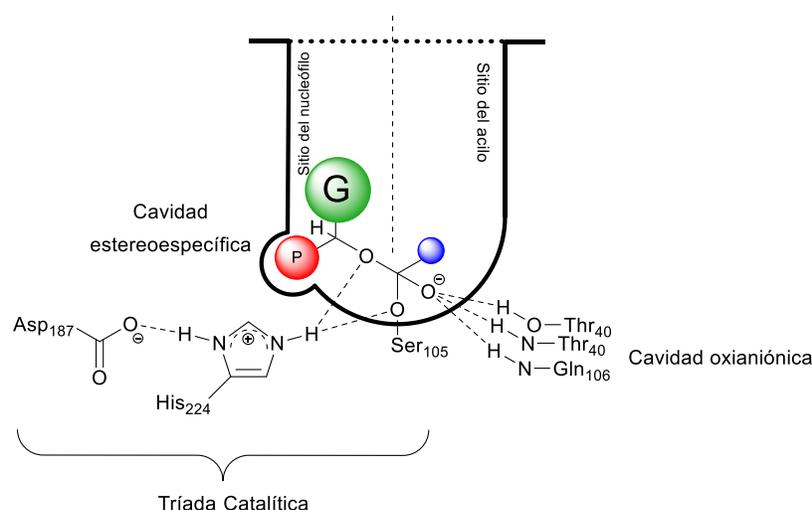


Figura 5. Representación esquemática del sitio activo de CALB indicando las porciones estructurales más relevantes del biocatalizador.⁷²

Las primeras aplicaciones de CALB en síntesis orgánica estuvieron enfocadas a la esterificación de alcoholes y de ácidos carboxílicos, a la hidrólisis de ácidos grasos o a diversas transesterificaciones, conduciendo así a aplicaciones industriales para obtener biodiesel, materias primas para la industria cosmética, de fragancias, de saborizantes y farmacéutica, así como para la obtención de lubricantes.⁷³ Las excelentes propiedades estéricas antes descritas han generado una serie de elegantes aplicaciones sintéticas empleando CALB para obtener productos con alta regio-, quimio- y estereoselectividad. Ejemplos de estas aplicaciones incluyen la síntesis de alcoholes, aminas, ácidos carboxílicos y ésteres ópticamente activos.⁷⁴⁻⁷⁷ No obstante, uno de los mayores desarrollos involucrando a CALB fue la aplicación de esta enzima en la síntesis asimétrica de compuestos con actividad farmacológica tales como lactamas, β -aminoácidos, esteroides, diferentes precursores de moléculas activas e incluso fármacos comerciales, mediante técnicas que involucran reacciones de acilación o esterificación o mediante la separación enantiomérica de mezclas racémicas.⁷⁸⁻⁸⁰ Algunos ejemplos

específicos de estas aplicaciones serán discutidos durante los siguientes capítulos de este trabajo.

CALB ha sido empleada para llevar a cabo la separación de mezclas racémicas mediante diferentes estrategias. En su mayoría, las biotransformaciones mediadas por ésta y otras lipasas se llevan a cabo por resolución cinética, una técnica de gran alcance en síntesis asimétrica que se discutirá en el siguiente apartado.^{81, 82}

Finalmente, es posible encontrar distintas presentaciones comerciales de CALB; sin embargo, se prefiere su uso de manera inmovilizada (Novozym 435[®], N435), lo que permite su reutilización. N435 se ha empleado de manera industrial en una gran variedad de procesos mostrando un alto grado de resistencia y estabilidad a las condiciones requeridas para su manejo a gran escala demostrando ventajas sustanciales en comparación con otras variedades de lipasas, convirtiéndose en un biocatalizador de gran impacto y sustentabilidad.⁸³

1.5 Resolución cinética como estrategia de síntesis.

La resolución cinética es una técnica de separación química ampliamente usada en la preparación enantioselectiva de diferentes compuestos quirales de interés. Los fundamentos que ayudan a comprender la naturaleza de una separación enantiomérica en términos de la formación de complejos diastereoméricos que pueden separarse físicamente fueron establecidos por Pasteur a mediados del siglo XIX.⁸⁴

Alternativamente, una síntesis enantioselectiva se puede conseguir mediante la transformación química de un solo enantiómero por acción de un agente que manifieste y genere quiralidad (como son una enzima o una célula completa); este fundamento sostiene en gran medida la hipótesis de trabajo en esta tesis. Específicamente, para que una reacción enzimática mediada por resolución cinética se lleve a cabo de manera eficaz se debe asegurar que las constantes de velocidad (k) para la biotransformación del par enantiomérico sean diferentes. En este contexto, para que la resolución enzimática sea eficiente, la constante de velocidad de un enantiómero debe ser considerablemente menor a la constante de velocidad de transformación del enantiómero opuesto (Figura 6).

Es importante enfatizar que, incluso cuando las constantes sean completamente diferentes entre sí, debe considerarse que la enzima puede catalizar la reacción en ambos enantiómeros, aunque a velocidades diferentes. Por tanto, se debe detener el proceso biocatalítico cuando la conversión hacia el producto deseado haya alcanzado no más de un 50% de su valor.⁸⁴ En este sentido, es importante notar que con una reacción altamente enantioselectiva es posible obtener productos con alta enantiopureza a bajos grados de conversión ($c = 0 - 50\%$).

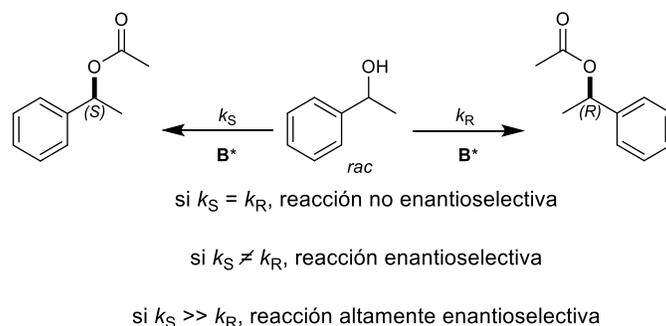


Figura 6. Representación de una resolución cinética mediada por un biocatalizador quiral (B^*) mostrando los posibles escenarios de acuerdo con la diferencia entre las constantes de velocidad para cada enantiómero.

No obstante, una reacción poco selectiva, puede de igual forma enantioenriquecer uno o ambos productos a grados de conversión altos. Por lo tanto, la relación entre la pureza enantiomérica, definida por el exceso enantiomérico (ee , Ec. 3) y el grado de conversión (c , Ec. 4) son necesarios para describir un proceso de resolución enzimática.⁸⁵

$$ee = \frac{|[R] - [S]|}{[R] + [S]} \quad (3)$$

$$c = 1 - \frac{[R] + [S]}{[R]_0 + [S]_0} \quad (4)$$

Las ecuaciones 3 y 4 permiten expresar las concentraciones de cada enantiómero en relación con la conversión y el exceso enantiomérico. De esta forma, después de un tratamiento matemático extenso, es posible obtener una representación que describe el proceso de resolución en relación con el exceso enantiomérico y conversión química (ver parte experimental).^{84,85} Este modelo se describe en la ecuación 5, un concepto que suele denominarse factor de estereoselectividad (s), no obstante, para efectos de este trabajo, se definirá como *enantiopreferencia* (E).^{84, 85}

$$E = \frac{\ln [(1 - c)(1 - ee)]}{\ln [(1 - c)(1 + ee)]} \quad (5)$$

Las ecuaciones 4 y 5 se emplean para evaluar un proceso biocatalítico cuando se conocen las concentraciones de ambos enantiómeros en un tiempo determinado de la reacción; no obstante, existen otras aproximaciones que también se utilizan en la evaluación de interés.⁸⁵ En este sentido, considerando que de manera práctica una reacción enantioselectiva puede ser monitoreada a través de instrumentos que permiten conocer el exceso enantiomérico del producto de biocatálisis y del sustrato remanente, y teniendo en cuenta que las reacciones mediadas por CALB suelen ser altamente enantioselectivas, las ecuaciones 4 y 5 se modifican para adecuarse a los datos que se obtienen directamente de la reacción (Ec. 6 y Ec. 7):

$$c = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \quad (6)$$

$$E = \frac{\ln [1 - c(1 + ee_p)]}{\ln [1 - c(1 - ee_p)]} \quad (7)$$

Es claro que conociendo el exceso enantiomérico (ee) de los productos de la reacción se calcula fácilmente el grado de conversión (c). Así mismo, conociendo la conversión de la reacción se define la enantiopreferencia (E) del sistema biocatalítico a un tiempo determinado. Por esta razón, las ecuaciones 6 y 7 se emplearán a lo largo de este trabajo.

Además de describir la enantiopreferencia de un proceso enzimático para catalizar la modificación química de un enantiómero sobre el otro, el valor de E se emplea también para calcular la diferencia en energía de activación entre los estados de transición diastereoméricos para la reacción de cada enantiómero.⁸⁶ Esta información termodinámica conduce a un estudio más profundo respecto a la selectividad de una enzima. La relación entre el valor de E y el $\Delta\Delta G^\ddagger$ se define a través de la ecuación modificada de Eyring para los estados de transición (Ec. 8).⁸⁶

$$\ln E = \frac{-\Delta\Delta G^\ddagger}{RT} \quad (8)$$

Donde E es el valor de la enantiopreferencia, R es la constante ideal de los gases, T es la temperatura del sistema y $\Delta\Delta G^\ddagger$ es la diferencia entre las energías de los estados de transición diastereoméricos. De la ecuación 8 se concluye que si se desea conocer el valor de $\Delta\Delta G^\ddagger$ para una reacción en particular, debe evaluarse E a un tiempo t determinado a diferentes temperaturas. La pendiente de un gráfico

de $R \ln E$ vs $1/T$ proporciona el valor de la diferencia de energía de activación entre los estados de transición diastereoméricos (Figura 7).

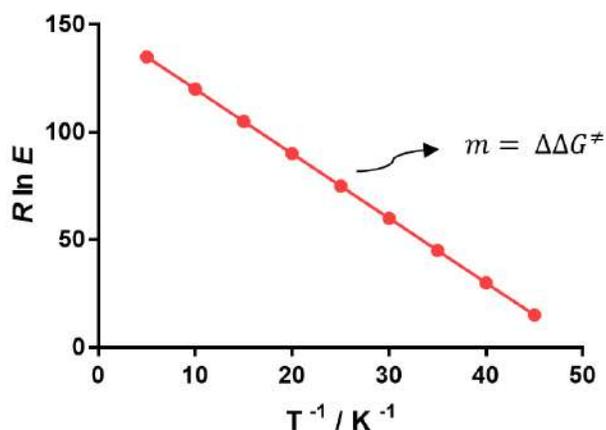


Figura 7. Representación gráfica del cálculo para obtener la diferencia en energía de activación entre los estados de transición diastereoméricos ($\Delta\Delta G^\ddagger$).

Finalmente, es importante mencionar que los estudios pertinentes a este análisis cuando se emplea CALB han determinado que el segundo estado de transición tetraédrico del mecanismo de reacción (Figura 4), es el paso determinante del proceso biocatalítico.^{87,88} Por lo tanto, el valor de $\Delta\Delta G^\ddagger$ que se obtenga al realizar un estudio con CALB (ver las siguientes secciones en esta tesis), permitirá predecir la selectividad del proceso (Figura 8).

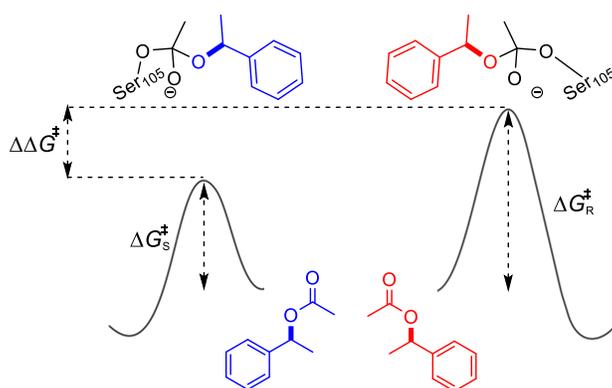


Figura 8. Representación del paso determinante en la acilación enantioselectiva de un alcohol secundario quiral mostrando la barrera energética de cada enantiómero y la diferencia en energía de activación entre ambos estados diastereoméricos.

1.6 Mecanoquímica y biocatálisis.

Como resultado de las consideraciones especificadas anteriormente; es decir, la conveniencia de desarrollar metodologías en línea con los doce principios de la química verde mediante el estudio de la fuerza mecánica como inductora de reacciones químicas, y que se ha enriquecido recientemente con la evaluación de órganocatalizadores para llevar a cabo síntesis asimétrica, en conjunto con las excelentes propiedades de diferentes enzimas como la CALB para llevar a cabo procesos de resolución cinética enantioselectiva que permiten obtener productos de interés, fue posible materializar el empleo de enzimas para llevar a cabo biocatálisis asistida por fuerza mecánica.⁴⁶

De esta forma, y como se expondrá a lo largo de los siguientes capítulos de esta tesis, la conjunción de ambas estrategias (mecanoquímica y biocatálisis) permitió la exploración de un campo nuevo en el área de la síntesis asimétrica, cuya fertilidad ha desembocado en la generación de protocolos para la obtención de productos con alto valor agregado empleando diferentes enzimas.⁸⁹ Destacadamente, la experimentación mostrada en este trabajo suministró parte de la evidencia necesaria para consolidar este nuevo campo de aplicación en biocatálisis;⁹⁰ no obstante, y debido a la versatilidad de la técnica desarrollada, diferentes aplicaciones han surgido para la separación y síntesis de productos tales como derivados de lignina, péptidos y oligopéptidos, así como para el aprovechamiento de biopolímeros para la obtención de diferentes azúcares y el desarrollo de estrategias para la generación de intermediarios farmacéuticos a través de estrategias enzimáticas mediadas por activación mecánica.⁹¹⁻⁹⁵

Referencias

- 1.- United States Environmental Protection Agency. Basics of Green Chemistry. <http://www.epa.gov/greenchemistry/basics-green-chemistry>. 2017, último acceso 08/02/2020.
- 2.- Erythropel, H. C.; Zimmerman, J. B.; de Winter, T. M.; Petitjean, L.; Melnikov, F.; Lam, C. H.; Lounsbury, A. W.; Mellor, K. E.; Janković, N. Z.; Tu, Q.; Pincus, L. N.; Falinski, M. M.; Shi, W.; Coish, P.; Plata, D. L.; Anastas, P. T. The Green ChemisTREE: 20 years after taking root with the 12 principles. *Green Chem.* **2018**, *20*, 1929-1961.
- 3.- Horton, B. Green chemistry puts down roots. *Nature* **1999**, *400*, 797-799.
- 4.- Anastas, P. T.; Warner, J. C. *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, Oxford, **1998**.
- 5.- Trost, B. M. The atom economy—a search for synthetic efficiency. *Science* **1991**, *254*, 1471-1477.
- 6.- Sheldon, R. A. Metrics of Green Chemistry and Sustainability: Past, Present, and Future. *Chem. Ind.* **1992**, 903-906.

-
- 7.- Dicks, A. P.; Hent, A. *Green Chemistry Metrics A Guide to Determining and Evaluating Process Greenness*. Springer, New York, **2015**.
- 8.- Capello, C.; Fischer, U.; Hungerbühler, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chem.* **2007**, *9*, 927-934.
- 9.- Sheldon, R. A. Green solvents for sustainable organic synthesis: state of the art. *Green Chem.* **2005**, *7*, 267-278.
- 10.- Jessop, P. G. Searching for green solvents. *Green Chem.* **2011**, *13*, 1391-1398.
- 11.- Alder, C. M.; Hayler, J. D.; Henderson, R. K.; Redman, A. M.; Shukla, L.; Shuster, L.; Sneddon, H. F. Updating and further expanding GSK's solvent sustainability guide. *Green Chem.* **2016**, *18*, 3879-3890.
- 12.- McDonough, W.; Braungart, M.; Anastas, P. T.; Zimmerman, J. B. Peer Reviewed: Applying the Principles of Green Engineering to Cradle-to-Cradle Design. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 434A-441A.
- 13.- Kreuder, A. D.; House-Knight, T.; Whitford, J.; Ponnusamy, E.; Miller, P.; Jesse, N.; Rodenborn, R.; Sayag, S.; Gebel, M.; Aped, I.; Sharfstein, I.; Manaster, E.; Ergaz, I.; Harris, A.; Grice, L. N. A Method for Assessing Greener Alternatives between Chemical Products Following the 12 Principles of Green Chemistry. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2017**, *5*, 2927-2935.
- 14.- Keglevich, G. *Milestones in Microwave Chemistry*. Springer, New York, **2016**.
- 15.- Matthews, M. A. Green electrochemistry. Examples and challenges. *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73*, 1305-1308.
- 16.- Chatel, G. How sonochemistry contributes to green chemistry? *Ultrason. Sonochem.* **2018**, *40*, 117-122.
- 17.- Do, J.-L.; Frišćić, T. Mechanochemistry: A Force of Synthesis. *ACS Cent. Sci.* **2017**, *3*, 13-19.
- 18.- Baig, R. B. N.; Varma, R. S. Alternative energy input: mechanochemical, microwave and ultrasound-assisted organic synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1559-1584.
- 19.- McNaught A. D.; Wilkinson, A. *IUPAC Compendium of Chemical Technology (Gold Book)*, 2nd ed, Blackwell Scientific Publications, Oxford, **1997**.
- 20.- Boldyrev, V. V.; Tkáčová, K. Mechanochemistry of Solids: Past, Present, and Prospects. *J. Mater. Synth. Proc.* **2000**, *8*, 121-132.
- 21.- Andersen, J.; Mack, J. Mechanochemistry and organic synthesis: from mystical to practical. *Green Chem.* **2018**, *20*, 1435-1443.
- 22.- Wang, G.-W. Mechanochemical organic synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 7668-7700.
- 23.- Seiberts, K. D.; Collins, P. C.; Luciani, C. V.; Fisher, E. S. "Milling operations in the pharmaceutical industry", en *Chemical Engineering in the Pharmaceutical Industry*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, **2011**.
- 24.- Kumar, D.; Worku, Z. A.; Gao, Y.; Kamaraju, V. K.; Glennon, B.; Babu, R. P.; Healy, A. M. Comparison of wet milling and dry milling routes for ibuprofen pharmaceutical

crystals and their impact on pharmaceutical and biopharmaceutical properties. *Powder Technol.* **2018**, *330*, 228-238.

25.- Fischer, F.; Wenzel, K.-J.; Rademann, K.; Emmerling, F. Quantitative determination of activation energies in mechanochemical reactions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 23320-23325.

26.- Andersen, J. M.; Mack, J. Decoupling the Arrhenius equation *via* mechanochemistry. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 5447-5453.

27.- Andersen, J.; Mack, J. Insights into Mechanochemical Reactions at Targetable and Stable, Sub-ambient Temperatures. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 132062-13065.

28.- Ren, Z.; Cao, W.; Tong, W. The Knoevenagel condensation reaction of aromatic aldehydes with malononitrile by grinding in the absence of solvents and catalysts. *Synth. Commun.* **2002**, *32*, 3475-3479.

29.- Stolle, A.; Szuppa, T.; Leonhardt, S. E. S.; Ondruschka, B. Ball milling in organic synthesis: solutions and challenges. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2317-2329.

30.- Las imágenes mostradas en la Figura 2 fueron tomadas de: a) y d) material libre de catálogos y proveedores de materiales industriales y de laboratorio, y b) y c), de catálogos de la marca *Retsch* disponibles electrónicamente en la siguiente dirección www.retsch.com

31.- Friščić, T.; Mottillo, C.; Titi, H. M. Mechanochemistry for Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 1018-1029.

32.- James, S. L.; Adams, C. J.; Bolm, C.; Braga, D.; Collier, P.; Friščić, T.; Grepioni, F.; Harris, K. D. M.; Hyett, G.; Jones, W.; Krebs, A.; Mack, J.; Maini, L.; Orpen, A. G.; Parkin, I. P.; Shearouse, W. C.; Steed, J. W.; Waddell, D. C. Mechanochemistry: opportunities for new and cleaner synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 413-447.

33.- Zhang, Z.; Dong, Y.-W.; Wang, G.-W.; Komatsu, K. Highly Efficient Mechanochemical Reactions of 1,3-Dicarbonyl Compounds with Chalcones and Azachalcones Catalyzed by Potassium Carbonate. *Synlett* **2004**, *1*, 61-64.

34.- Mack, J.; Shumba, M. Rate enhancement of the Morita-Baylis-Hillman reaction through mechanochemistry. *Green Chem.* **2007**, *9*, 328-330.

35.- Balema, V. P.; Wiench, J. W.; Pruski, M.; Pecharsky, V. K. Mechanically Induced Solid-State Generation of Phosphorus Ylides and the Solvent-Free Wittig Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6244-6245.

36.- Watanabe, H.; Hiraoka, R.; Senna, M. A Diels-Alder reaction catalyzed by eutectic complexes autogenously formed from solid state phenols and quinones. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 4481-4484.

37.- Kaupp, G.; Naimi-Jamal, R. M.; Schmeyers, J. Quantitative Reaction Cascades of Ninhydrin in the Solid State. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 594-600.

38.- Kaupp, G.; Naimi-Jamal, R. M.; Schmeyers, J. Solvent-free Knoevenagel condensations and Michael additions in the solid state and in the melt with quantitative yield. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3753-3760.

-
- 39.- Nielsen, S. F.; Peters, D.; Axelsson, O. The Suzuki Reactions Under Solvent-Free Conditions. *Synth. Commun.* **2000**, *30*, 3501-3509.
- 40.- Tullberg, E.; Peters, D.; Frejd, T. The Heck reaction under ball-milling conditions. *J. Organomet. Chem.* **2004**, *689*, 3778-3781.
- 41.- Fulmer, D. A.; Shearouse, W. C.; Medonza, S. T.; Mack, J. Solvent-free Sonogashira coupling reaction *via* high speed ball milling. *Green Chem.* **2009**, *11*, 1821-1825.
- 42.- Rodríguez, B.; Rantanen, T.; Bolm, C. Solvent-Free Asymmetric Organocatalysis in a Ball Mill. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6924-6926.
- 43.- Hernández, J. G.; Juaristi, E. Asymmetric Aldol Reaction Organocatalyzed by (S)-Proline Containing Dipeptides: Improved Stereinduction under Solvent-Free Conditions. *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 1464-1467.
- 44.- Hernández, J. G.; García-López, V.; Juaristi, E. Solvent-free asymmetric aldol reaction organocatalyzed by (S)-proline-containing thiodipeptides under ball-milling conditions. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 92-97.
- 45.- Chauhan, P.; Chimni, S. S. Mechanochemistry assisted asymmetric organocatalysis: A sustainable approach. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 2132-2141.
- 46.- Hernández, J. G.; Frings, M.; Bolm, C. Mechanochemical Enzymatic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols under Ball-Milling Conditions. *ChemCatChem* **2016**, *8*, 1769-1772.
- 47.- Paul, P. E. V.; Sangeetha, V.; Deepika, R. G. "Emerging Trends in the Industrial Production of Chemical Products by Microorganisms", en *Recent Developments in Applied Microbiology and biochemistry*, Elsevier, London, UK, **2019**.
- 48.- Guerra-Doce, E. The origins of Inegriation: Archaeological Evidence of the Consumption of Fermented Beverages and Drugs in Prehistoric Eurasia. *J. Archaeol. Method Theory* **2015**, *22*, 751-782.
- 49.- Bornscheuer, U. T.; Buchholz, K. Highlights in Biocatalysis-Historical Landmarks and Current Trends. *Eng. Life Sci.* **2005**, *5*, 309-323.
- 50.- Hughes, D. L. Biocatalysis in Drug Development-Highlights of the Recent Patent Literature. *Org. Process Res. Dev.* **2018**, *22*, 1063-1080.
- 51.- France, S. P.; Hepworth, L. J.; Turner, N. J.; Flitsch, S. L. Constricting Biocatalytic Cascades: In Vitro and in Vivo Approaches to de Novo Multi-Enzyme Pathways. *ACS Catal.* **2017**, *7*, 710-724.
- 52.- Chen, W.-H.; Vázquez-González, M.; Zoabi, A.; Abu-Reziq, R.; Willner, I. Biocatalytic cascades driven by enzymes encapsulated in metal-organic framework nanoparticles. *Nat. Catal.* **2018**, *1*, 689-695.
- 53.- Wang, J.-b.; Li, G.; Reetz, M. T. Enzymatic site-selectivity enable by structure-guided directed evolution. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 3916-3928.
- 54.- Sheldon, R. A.; Brady, D. The limits to biocatalysis: pushing the envelope. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 6088-6104.
- 55.- Arnold, F. H. Directed Evolution: Bringing New Chemistry to Life. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 4143-4148.

-
- 56.- Kell, D. B.; Swainston, N.; Pir, P.; Oliver, S. G. Membrane transporter engineering in industrial biotechnology and whole cell biocatalysis. *Trends Biotechnol.* **2015**, *33*, 237-246.
- 57.- Wachtmeister, J.; Rother, D. Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *42*, 169-177.
- 58.- Choi, J.-M.; Han, S.-S.; Kim, H.-S. Industrial Applications of Enzyme Biocatalysis: Current Status and Future Aspects. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1443-1454.
- 59.- Truppo, M. D. Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry: The Need for Speed. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 476-480.
- 60.- Buchholz, K.; Kasche, V.; Bornsheuer, U. T. *Biocatalysts and Enzyme Technology*. 2nd ed. Wiley-VCH Verlag & Co. Weinheim, Germany, **2012**.
- 61.- Sheldon, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289-1307.
- 62.- Joshi, K. A.; Tang, J.; Haddon, R.; Wang, J.; Chen, W.; Mulchandani, A. A Disposable Biosensor for Organophosphorus Nerve Agents Based on Carbon Nanotubes Modifies Thick Film Strip Electrode. *Electroanal.* **2005**, *17*, 54-58.
- 63.- Tsai, H. C.; Doong, R. A. Simultaneous Determination of pH, Urea, Acetylcholine and Heavy Metals Using Array-Based Enzymatic Optical Biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 1796-1804.
- 64.- Wang, X.; Wang, M.; Zhang, Y.; Miao, X.; Huang, Y.; Zhang, J.; Sun, L. Electrochemical biosensor based on enzyme substrate as a linker: Application for aldolase activity with pectin-thionine complex as recognition element and signal amplification probe. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, *83*, 91-96.
- 65.- Carpio, C. González, P.; Ruales, J.; Batista-Viera, F. Bone-bound enzymes for food industry application. *Food Chem.* **2000**, *68*, 403-409.
- 66.- Jaeger, K.-E.; Eggert, T. Lipases for Biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 390-397.
- 67.- Arroyo, M.; de la Mata, I.; García, J.-L.; Barredo, J.-L. "Biocatalysis for Industrial Production of Active Pharmaceutical Ingredients (APIs)", en *Biotechnology of Microbial Enzymes*. Elsevier, London, UK, **2017**.
- 68.- Gotor-Fernández, V.; Brieva, R.; Gotor, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2006**, *40*, 111-120.
- 69.- Gotor-Fernández, V.; Busto, E.; Gotor, V. *Candida antarctica* Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 797-812.
- 70.- Escorcía, A. M.; Sen, K.; Daza, M. C.; Doerr, M.; Thiel, W. Quantum Mechanics/Molecular Mechanics Insights into the Enantioselectivity of the *O*-Acetylation of (*R,S*)-Propranolol Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B. *ACS Catal.* **2017**, *7*, 115-127.
- 71.- Humble, M. S.; Berglund, P. Biocatalytic promiscuity. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *19*, 3391-3401.

-
- 72.- Ottosson, J.; Fransson, L.; King, J. W.; Hult, K. Size as a parameter for solvent effects on *Candida antarctica* lipase B enantioselectivity. *Biochim. Biophys. Acta.* **2002**, *1594*, 325-334.
- 73.- Anderson, E. M.; Larsson, K. M.; Kirk, O. One Biocatalyst-Many Applications: The Use of *Candida Antarctica* B-Lipase in Organic Synthesis. *Biocatal. Biotransform.* **1998**, *16*, 181-204.
- 74.- Ottosson, J.; Hult, K. Influence of acyl chain length on the enantioselectivity of *Candida antarctica* lipase B and its thermodynamic components in kinetics resolution of *sec*-alcohols. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2001**, *11*, 1025-1028.
- 75.- Li, N.; Zong, M.-H.; Ma, D. Regioselective Acylation of Nucleosides Catalyzed by *Candida Antarctica* Lipase B: Enzyme Substrate Recognition. *Eur. J Org. Chem.* **2008**, 5375-5378.
- 76.- Villo, L.; Kreen, M.; Kudryashova, M.; Metsala, A.; Tamp, S.; Lille, Ü.; Pehk, T.; Parve, O. A chemoenzymatic synthesis of deoxy sugar esters involving stereoselective acetylation of hemiacetals catalyzed by CALB. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* **2011**, *68*, 44-51.
- 77.- Su, A.; Kiokekli, S.; Naviwala, M.; Shirke, A. N.; Pavlidis, I. V.; Gross, R. A. Cutinases as stereoselective catalysts: Specific activity and enantioselectivity of cutinases and lipases for menthol and its analogs. *Enzyme Microb. Tech.* **2020**, *133*, 109467.
- 78.- Gianolio, E.; Mohan, R.; Berkessel, A. Enantiopure N-Benzyloxycarbonyl- β^2 -amino Acid Allyl Esters from Racemic β -Lactams by Dynamic Kinetic Resolution using *Candida antarctica* Lipase B. *Adv. Synth. Catal.* **2016**, *358*, 30-33.
- 79.- Cardillo, G.; Gennari, A.; Gentilucci, L.; Mosconi, E.; Tolomelli, A.; Troisi, S. Synthesis of chiral non-racemic intermediates and Arg-Gly-Asp mimetics by CaLB-catalyzed resolution. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 96-102.
- 80.- Barbayianni, E.; Kokotos, G. Biocatalyzed Regio- and Chemoselective Ester Cleavage: Synthesis of Bioactive Molecules. *ChemCatChem* **2012**, *4*, 592-608.
- 81.- Toledo, M. V.; Suster, C. R. L.; Ferreira, M. L.; Collins, S. E.; Briand, L. E. Molecular recognition of an acyl-enzyme intermediate on the lipase B from *Candida antarctica*. *Catal. Sci. Technol.* **2017**, *7*, 1953-1964.
- 82.- Ghanem, A.; Aboul-Enein, H. Y. Application of lipases in kinetic resolution of racemates. *Chirality* **2005**, *17*, 1-15.
- 83.- Ortiz, C.; Ferreira, M. L.; Barbosa, O.; dos Santos, J. C. S.; Rodrigues, R. C.; Berenguer-Murcia, Á.; Briand, L. E.; Fernandez-Lafuente, R. Novozym 435: the "perfect" lipase immobilized biocatalyst? *Catal. Sci. Technol.* **2019**, *9*, 2380-2420.
- 84.- Kagan, H. B.; Fiaud, J. C. "Kinetic Resolution", en *Topics in Stereochemistry*, Vol. 18, John Wiley & Sons, USA, **1988**.
- 85.- Straathof, A. J. J.; Jongejan, J. A. The enantiomeric ratio: origin, determination and prediction. *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *21*, 559-571.
- 86.- Overbeeke, P. L. A.; Ottosson, J.; Hult, K.; Jongejan, J. A.; Duine, J. A. The Temperature Dependence of Enzymatic Kinetic Resolutions Reveals the Relative Contribution of Enthalpy and Entropy to Enzymatic Enantioselectivity. *Biocatal. Biotransfor.* **1999**, *17*, 61-79.

-
- 87.- Bocola, M.; Stubbs, M. T.; Sotriffer, C.; Hauer, B.; Friedrich, T.; Dittrich, K.; Klebe, G. Structural and energetic determinants for enantiopreferences in kinetic resolution of lipases. *Protein Eng.* **2003**, *16*, 319-322.
- 88.- Li, C.; Tan, T.; Zhang, H.; Feng, W. Analysis of the Conformational Stability and Activity of *Candida antarctica* Lipase B in Organic Solvents. Insight from molecular dynamics and quantum mechanics/simulations. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 28434-28441.
- 89.- Kaabel, S.; Friščić, T.; Auclair K. Mechanoenzymatic Transformations in the Absence of Bulk Water: A More Natural Way of Using Enzymes. *ChemBioChem* **2020**, *21*, 742-758.
- 90.- Avila-Ortiz, C. G.; Pérez-Venegas, M.; Vargas-Caporali, J.; Juaristi, E. Recent applications of mechanochemistry in enantioselective synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2019**, *60*, 1749-1757.
- 91.- Weißbach, U.; Dabral, S.; Konnert, L.; Bolm, C.; Hernández, J. G. Selective enzymatic esterification of lignin model compounds in the ball mill. *Beilstein J. Org. Chem.* **2017**, *13*, 1788-1795.
- 92.- Ardila-Fierro, K. J.; Crawford, D. E.; Körner, A.; James, S. L.; Bolm, C.; Hernández, J. G. Papain-catalysed mechanochemical synthesis of oligopeptides by milling and twin-screw extrusion: application in the Juliá-Colonna enantioselective epoxidation. *Green Chem.* **2018**, *20*, 1262-1269.
- 93.- Hammerer, F.; Loots, L.; Do, J.-L.; Therien, J. P. D.; Nickels, C. W.; Friščić, T.; Auclair K. Solvent-Free Enzyme Activity: Quick, High-Yielding Mechanoenzymatic Hydrolysis of Cellulose into Glucose. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 2621-2624.
- 94.- Hammerer, F.; Ostadjoo, S.; Friščić, T.; Auclair K. Towards Controlling the Reactivity of Enzymes in Mechanochemistry: Inert surfaces Protect β -Glucosidase Activity During Ball Milling. *ChemSusChem* **2020**, *13*, 106-110.
- 95.- Pérez-Venegas, M.; Juaristi, E. Mechanochemical and Mechanoenzymatic Synthesis of Pharmacologically Active Compounds: A Green Perspective. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2020**, *8*, 8881-8893.

2 Objetivos

2.1 Objetivo General

- Diseñar estrategias mecanoenzimáticas para la resolución cinética de compuestos de interés farmacéutico empleando la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada y activación mecánica generada por molienda de bolas de alta velocidad siguiendo los principios de la química verde.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudiar la eficiencia resolutoria de CALB empleando sustratos racémicos con diversidad de naturaleza y demanda estérica, en combinación con la aplicación de fuerza mecánica producida por molienda.
- Sintetizar las materias primas y los estándares racémicos necesarios para llevar a cabo la evaluación de las técnicas mecanoenzimáticas.
- Evaluar los parámetros mecanoquímicos de frecuencia y tiempo de molienda como moduladores en la resolución cinética de mezclas racémicas de compuestos quirales.
- Optimizar las condiciones de la reacción de desimetrización de mezclas racémicas de compuestos quirales para generar productos con altos excesos enantioméricos. En particular, se busca desarrollar reacciones que procedan con buena conversión química y buenos valores de enantioselectividad.
- Examinar el efecto de la fuerza mecánica sobre la actividad de CALB y su posible repercusión en la eficiencia, en especial la enantioselectividad, del biocatalizador.

3 Capítulo I
RESOLUCIÓN MECANOENZIMÁTICA DE
 β^3 -AMINOÉSTERES *N*-BENCILADOS

3.1 Antecedentes del empleo y síntesis de β -aminoácidos y su aplicación en el ámbito de la química fina.

Los β -aminoácidos (Figura 9, centro) a diferencia de los α -aminoácidos, son estructuras no proteínogénicas que se presentan de manera esporádica en la naturaleza.¹ No obstante, el número, diversidad e importancia de los β - (y γ -) aminoácidos es notable.²

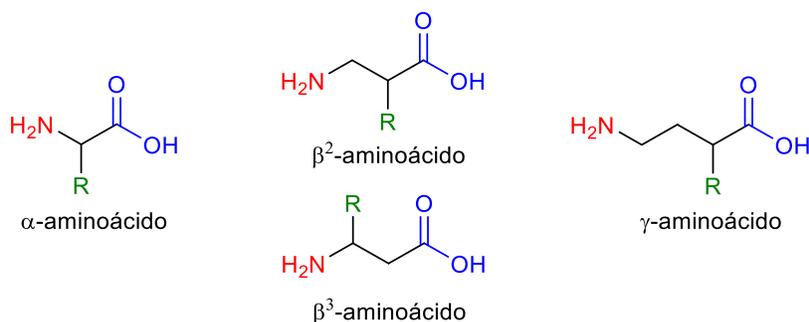


Figura 9. Clasificación de los aminoácidos de acuerdo con la posición del grupo amino respecto al grupo carboxílico.

Las excelentes propiedades biológicas de estos compuestos que actúan como peptidomiméticos incluyen un aumento de la actividad terapéutica respecto a moléculas homólogas y una mayor resistencia al embate de enzimas proteolíticas.³ En consecuencia, el empleo de los β -aminoácidos como posible inhibidores enzimáticos y como protectores proteicos se ha incrementado de manera sustancial en el ámbito farmacéutico.⁴⁻⁶ Cabe también destacar la identificación de estructuras naturales conteniendo residuos de β -aminoácidos como son el taxol, proveniente de la conífera *Taxus brevifolia*, la bleomicina, producida por *Streptomyces verticillus* y la microcistina, presente en cianobacterias, como agentes anticancerígenos con excelentes resultados.¹

A pesar de la clara lejanía entre los orígenes naturales de las estructuras empleadas como agentes terapéuticos y el metabolismo de los mamíferos, es posible identificar β -aminoácidos en diferentes estructuras biológicas y en algunas rutas metabólicas. Un ejemplo claro es el caso de la β -alanina, el β -aminoácido más simple que se presenta de manera natural en la vitamina B5 (Figura 10). Esta vitamina es necesaria para la síntesis de la Coenzima A (CoA), cuya función metabólica en humanos es vital. De igual forma, la β -alanina es componente de la carnosina, un dipéptido responsable de algunas funciones metabólicas tales como detoxificación de radicales libres y subproductos de membrana (Figura 10).²

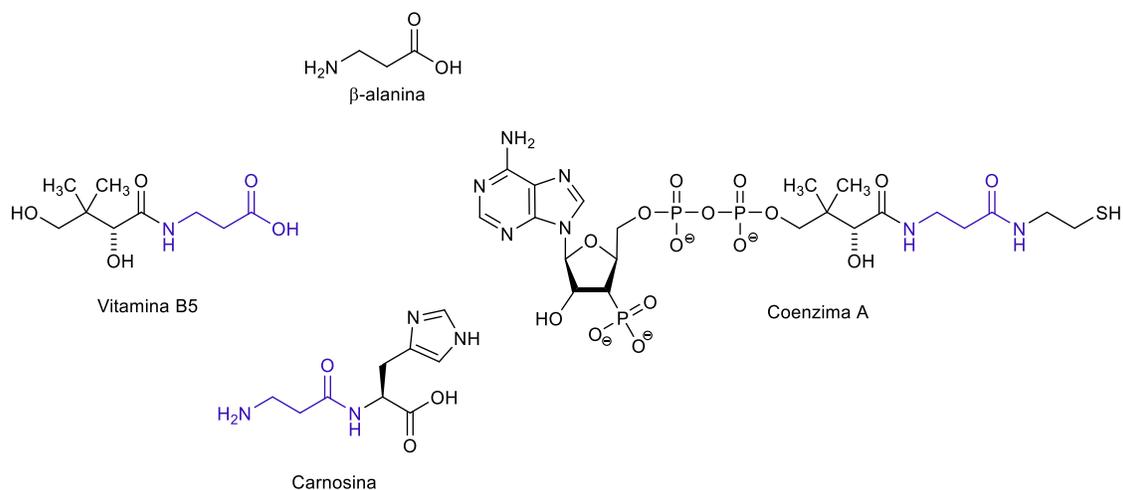


Figura 10. β -Alanina como bloque de construcción de diversos productos naturales.

Se han explorado diversas estrategias para la síntesis de β -aminoácidos incluyendo la homologación de α -aminoácidos, adiciones de Michael a compuestos carbonílicos α,β -insaturados, reacciones tipo Knoevenagel empleando un aldehído, un ácido dicarboxílico y una amina, apertura de productos naturales que incluyen fragmentos lactámicos, reacciones que involucran transposición de Curtius, entre otras (Figura 11).⁷⁻¹⁵ No obstante, en las últimas tres décadas se ha dedicado especial atención a la búsqueda de metodologías para la obtención de β -aminoácidos mediante estrategias asimétricas empleando por ejemplo catalizadores de distintas clases.¹⁶

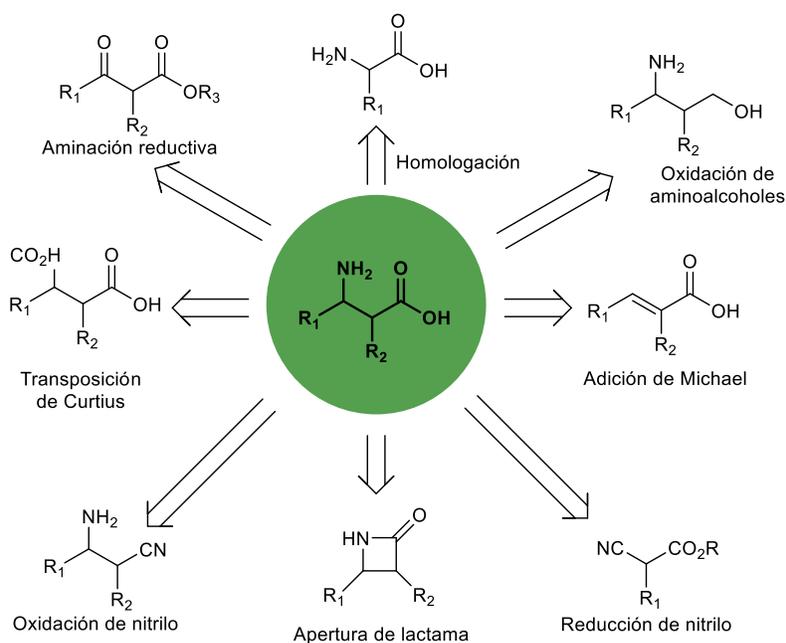
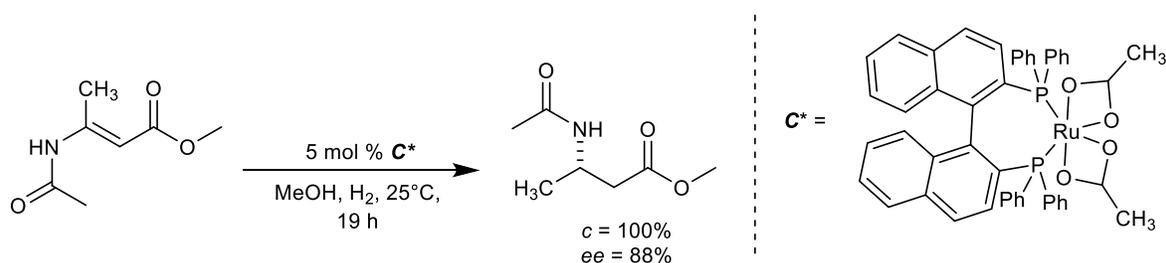


Figura 11. Síntesis de β -aminoácidos de forma racémica.¹⁷

Uno de los trabajos pioneros en el área de la síntesis asimétrica de β -aminoácidos fue descrito por Noyori en 1991, empleando compuestos de coordinación de rutenio para llevar a cabo la hidrogenación asimétrica de β -(amino)acrilatos (Esquema 1).¹⁸ Esta reacción procedió con resultados que van de moderados a buenos, tanto en relación con la conversión química (*c*) como con el exceso enantiomérico (*ee*). Este reporte fue seguido por el desarrollo de catalizadores organometálicos quirales que incluyen el uso de ferroceno, rutenio e iridio, así como una amplia galería de ligandos quirales conteniendo fosfinas y grupos voluminosos como arilos o bifenilos.¹⁹⁻²¹ Lamentablemente, el alto costo de los compuestos de coordinación en conjunto con su toxicidad limitó su empleo en el área farmacéutica. Actualmente, el impulso proporcionado por los doce principios de la química verde ha motivado la búsqueda de alternativas menos dañinas para el medio ambiente.

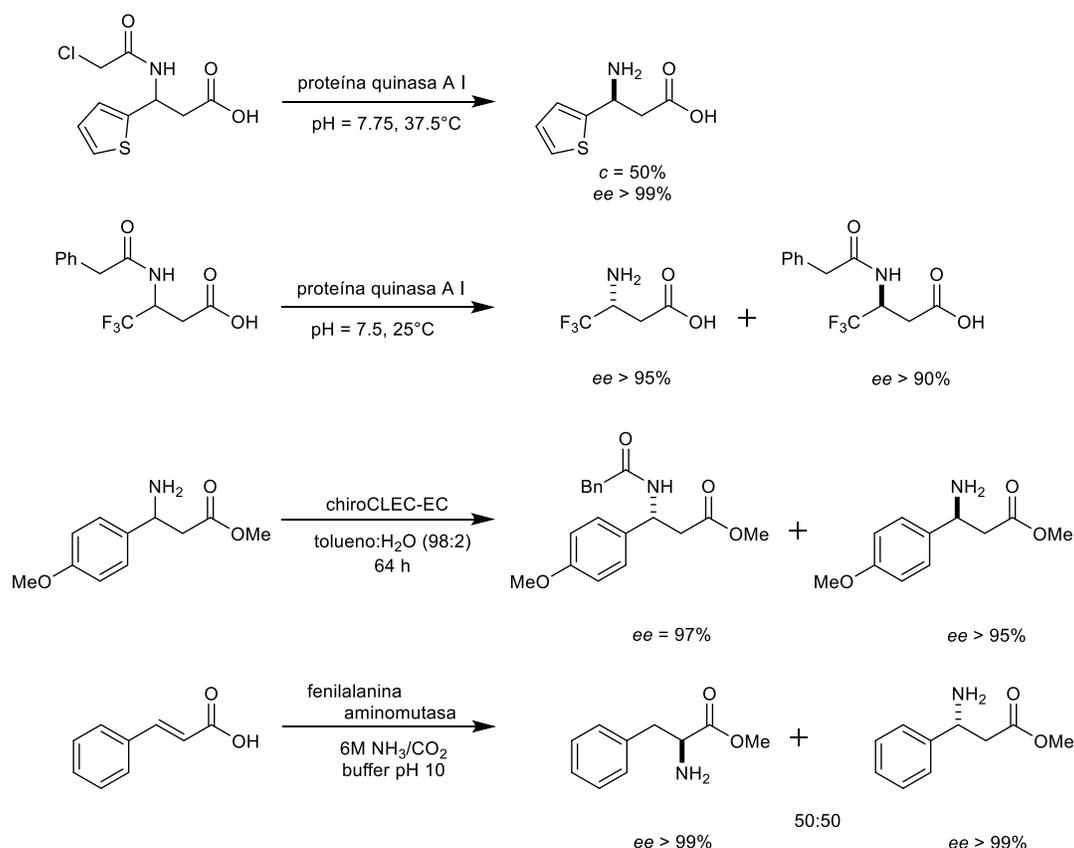


Esquema 1. Empleo de compuestos de coordinación quirales de Ru en la síntesis asimétrica de β -aminoácidos.¹⁸

Recientemente se han descrito estrategias alternativas empleando reacciones de tipo Mannich, adición conjugada y organocatálisis aplicadas en la síntesis enantioselectiva de β -aminoácidos.^{16,22-25} Además, en las últimas dos décadas se ha explorado considerablemente el uso de enzimas como biocatalizadores para llevar a cabo reacciones asimétricas para la obtención de β -aminoácidos con alta pureza enantiomérica.

Como se mencionó anteriormente, el uso de biocatalizadores contribuye de manera importante al cumplimiento de los principios de la química verde propuestos por Anastas y Warner, reduciendo notablemente el consumo de energía, el tiempo y costo de una reacción química y conduciendo de manera más limpia la transformación deseada. De esta forma, la biocatálisis se constituye como una herramienta “verde” y sustentable.²⁶ En este contexto, se ha examinado una amplia variedad de enzimas para llevar a cabo la preparación enantioselectiva de β -aminoácidos a través de la técnica de resolución cinética enzimática. En particular, cabe destacar el empleo de la α -quimiotripsina, la acilasa I, diversas hidrolasas, la penicilina G acilasa, la péptido deformilasa, la hidantoinasa, varias transaminasas, y aminomutasas (Esquema 2).²⁹⁻³⁹

Como consecuencia de la naturaleza de las enzimas empleadas y de las condiciones requeridas para la biocatálisis, la mayoría de las biotransformaciones deben realizarse en medio acuoso o empleando mezclas de disolventes orgánicos y agua.



Esquema 2. Ejemplos selectos de métodos biocatalíticos aplicados a la síntesis enantioselectiva de β-aminoácidos.^{31,33,34,37,38}

Por fortuna, se han descubierto biocatalizadores que son empleados en medios orgánicos para facilitar e incluso mejorar las condiciones de reacción.⁴⁰ De entre el universo de biocatalizadores estudiados, las lipasas han mostrado una notable capacidad para catalizar reacciones en medios orgánicos, facilitando la exploración de estrategias sintéticas en medios no acuosos con excelentes resultados.⁴¹ Especial interés se ha colocado en el estudio de la lipasa B de *Candida antarctica* (CALB), una enzima promiscua con una capacidad sintética extraordinaria, que es empleada en la síntesis asimétrica de β-aminoácidos en solución a través de diferentes estrategias resolutivas (Figura 12).⁴²

Los protocolos evaluados en medios orgánicos empleando CALB se basan, como es el caso de las técnicas tradicionales en solución (Esquema 2), en la capacidad de la enzima para catalizar de manera rápida y eficiente la modificación química de uno de los enantiómeros de una mezcla racémica;⁴¹ es decir, facilitar la modificación química del enantiómero cuya energía de activación para dicha transformación sea menor, limitando la conversión del enantiómero con la mayor energía de activación. A este tipo de estrategia resolutive se le denomina *resolución cinética*, y será evaluada como método resolutive en este capítulo.⁴³

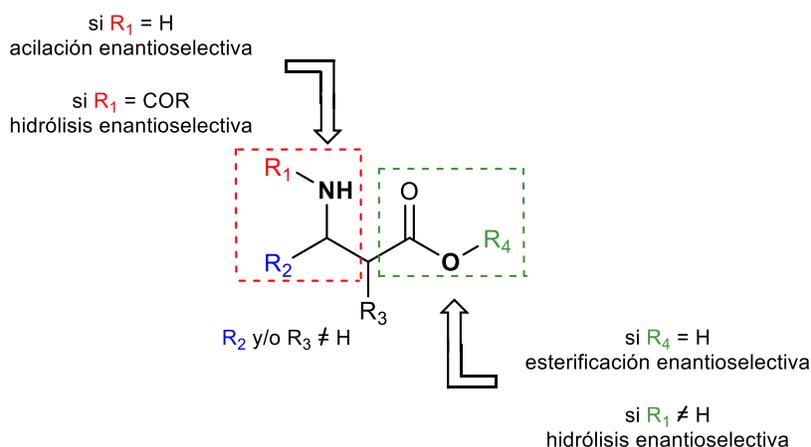
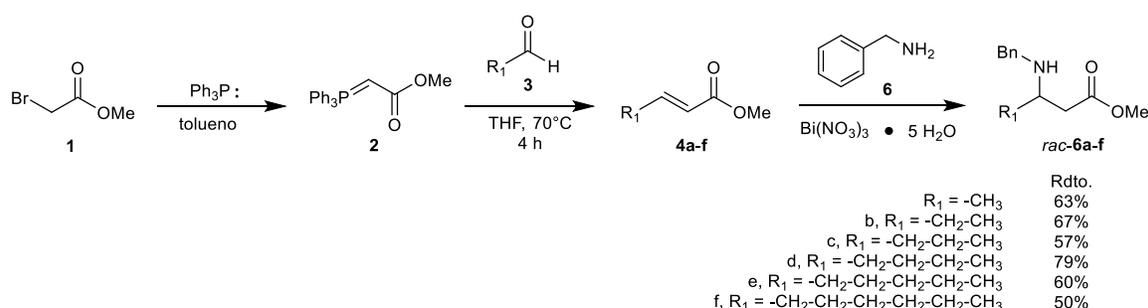


Figura 12. Métodos de resolución de β -aminoácidos racémicos empleando CALB.

Así, con el objetivo de explorar metodologías que permitan el desarrollo de estrategias para la obtención de β -aminoácidos quirales mediante metodologías que cumplan con los principios de la química verde,⁴⁴⁻⁴⁷ se decidió llevar a cabo la resolución cinética de β^3 -aminoésteres *N*-bencilados mediada por activación mecánica producida por molienda de bolas de alta velocidad (HSBM) y empleando CALB inmovilizada como biocatalizador.

3.2 Resolución cinética de β^3 -aminoésteres *N*-bencilados mediante activación mecánica

Considerando reportes previos donde se emplea CALB para llevar a cabo la resolución de β -aminoésteres racémicos, se planteó una metodología enzimática alterna empleando activación mecánica para la resolución de estructuras modelo similares;^{11,48} así, se decidió sintetizar algunos sustratos racémicos para evaluar la resolución mecanoenzimática (Esquema 3).



Esquema 3. Síntesis de β -aminoésteres *N*-bencilados racémicos conteniendo cadenas alifáticas.

La síntesis de los sustratos racémicos comenzó con una reacción tipo Wittig entre el iluro de fósforo **2**, previamente sintetizado empleando bromoacetato de metilo (**1**) y trifenilfosfina, y una serie de aldehídos alifáticos para obtener una familia de acrilatos alquil sustituidos (**4a-f**) en buenos rendimientos (70-86%). Posteriormente, mediante la adición conjugada de bencilamina fue posible sintetizar los sustratos racémicos (*rac-6a-f*) en rendimientos moderados (50-79%, Esquema 3). Por otro lado, con el objetivo de explorar sustratos con sustituyentes aromáticos y otros grupos voluminosos se decidió incluir en el estudio las estructuras *rac-6g-h*, desarrolladas posteriormente (Figura 13).¹¹

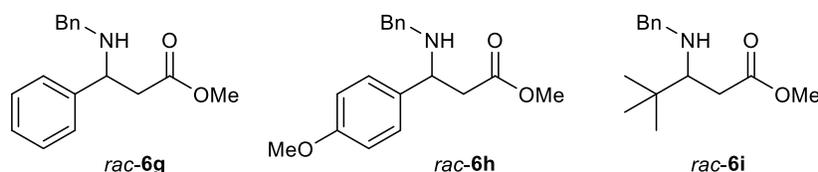
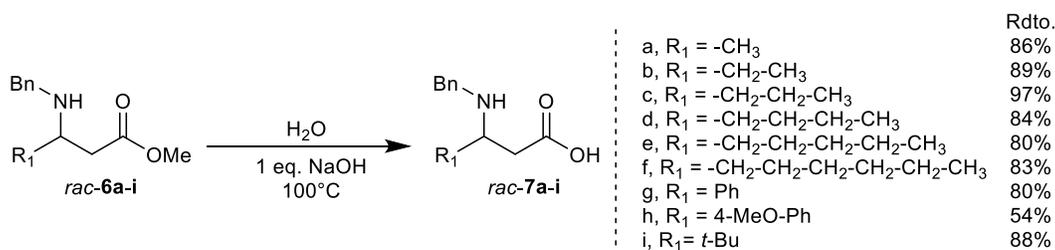


Figura 13. β -Aminoésteres con grupos aromáticos o alifáticos voluminosos.

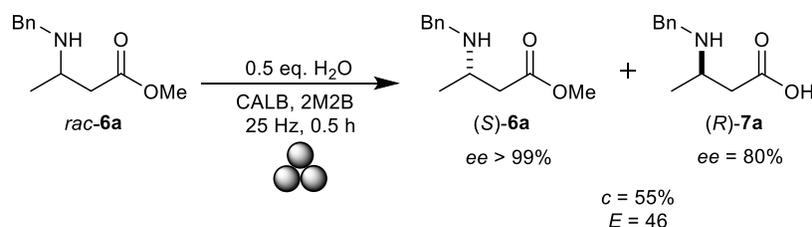
Adicionalmente, con el propósito de caracterizar los productos esperados del proceso biocatalítico y generar los estándares racémicos que posteriormente se requerirían para analizar los productos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés, High Performance Liquid Chromatography), se sintetizaron los ácidos carboxílicos racémicos correspondientes como se muestra en el Esquema 4, con excelentes resultados (rendimiento > 80%).



Esquema 4. Hidrólisis de los ésteres **6a-i** en medio básico para la obtención de los β-aminoácidos racémicos **rac-7a-i**.

Una vez que se sintetizaron y caracterizaron los sustratos racémicos **rac-6a-i** y **rac-7a-i**, se procedió a evaluar la estrategia resolutive enzimática combinada con activación mecánica empleando CALB inmovilizada (N435) y el sustrato racémico **6a** como modelo.

Una primera aproximación empleando hidrólisis enantioselectiva (Figura 12), se llevó a cabo aplicando activación mecánica producida por molienda de bolas de alta velocidad (HSBM) a través de un equipo de molienda vibracional Retsch, MixerMill MM200 (Figura 1b) y utilizando bolas y un reactor de molienda de ágata, así como alcohol *ter*-amílico (2-metil-2-butanol (2M2B), 0.2 mL) como líquido que asiste a la molienda (LAG por sus siglas en inglés, Liquid-Assisted Grinding)⁴⁹ y 0.5 equivalentes de agua (Esquema 5).



Esquema 5. Resolución mecanoenzimática del sustrato **rac-6a**. Las tres esferas debajo de la línea de reacción indican la reacción mecanoquímica.⁵⁰

La reacción enzimática mediada por activación mecánica a 25 Hz de frecuencia se llevó a cabo de manera eficiente, obteniéndose dos productos que fueron purificados por cromatografía en columna empleando sílica gel como fase

estacionaria y una mezcla de hexano y acetato de etilo (9:1) y metanol y cloruro de metileno (8:2) como fase móvil. Posteriormente, los compuestos puros fueron analizados por HPLC con columna quiral; de esta forma, la diferencia del área de cada pico obtenido mediante análisis de HPLC se empleó para calcular el exceso enantiomérico de cada compuesto (ver parte experimental), obteniéndose excelentes valores de enantio pureza [(*S*)-**6a**, $ee > 99\%$ y (*R*)-**7a**, $ee > 80\%$] en tan solo 30 minutos de reacción, empleando una cantidad mínima de disolvente (0.2 mL). Además, los valores de conversión (c , en porcentaje) y de la enantio preferencia (E), calculados mediante las ecuaciones 6 y 7 sustituyendo los valores de ee correspondientes, indican que el proceso resolutivo fue inducido apropiadamente por CALB. Por otra parte, es posible establecer algunos puntos importantes respecto al empleo de biocatálisis con activación mecánica, tales como:

- ✓ La energía mecánica producida durante el proceso de molienda a 25 Hz no es demasiado alta para inactivar a la enzima inmovilizada, al menos durante 30 minutos de reacción.
- ✓ La cantidad de líquido LAG empleado durante el proceso mecanoquímico resulta suficiente para homogeneizar el medio de reacción, permitiendo la catálisis y representando una reducción muy significativa del disolvente empleado.
- ✓ Finalmente, la energía mecánica que se provee al medio es suficiente para que la resolución se lleve a cabo, confirmando la viabilidad del proceso biocatalítico mediante activación mecánica.

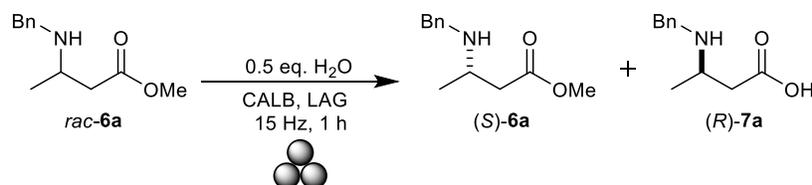
Considerando los puntos antes descritos y habiendo comprobado la viabilidad del uso de enzimas en combinación con mecanoquímica en las resoluciones de interés, se continuó con la búsqueda de las condiciones mecanoenzimáticas óptimas para llevar a cabo el procedimiento biocatalítico. En particular, se evaluó la frecuencia de molienda como parámetro clave en la reacción de desimetrización. Desde un punto de vista energético, resulta intuitivo asumir que la energía mecánica que se proporciona al sistema está directamente relacionada con la frecuencia empleada para llevar a cabo el proceso de molienda.⁵¹ Este efecto ha sido estudiado con anterioridad mostrando una tendencia entre el rendimiento de una reacción y la frecuencia aplicada en el proceso.⁵¹ Así, de manera provisional se puede anticipar una menor conversión química como consecuencia del empleo de una frecuencia vibracional más baja. En este sentido, es importante determinar continuamente el efecto de la frecuencia en cualquier transformación activada con energía mecánica.

En el caso presente, una disminución de 10 Hz en la frecuencia aplicada al proceso de resolución parece haber repercutido en la enantioselectividad del proceso, conduciendo a un $\%ee_{(S)-6a} = 89\%$ y $\%ee_{(R)-7a} = 77\%$, así como una alteración en la conversión química ($c = 54\%$) y en la enantio preferencia del sistema ($E = 23$). No obstante, la disminución observada es relativamente baja

considerando la reducción del 40% en la energía que se aplicó al sistema (de 25 Hz a 15 Hz). Por tanto, se decidió evaluar el efecto de dicha frecuencia en un intervalo mayor de tiempo (60 minutos). Inesperadamente, se obtuvieron resultados extraordinarios de exceso enantiomérico para ambos productos ($\%ee_{(S)-6a} = 99\%$, $\%ee_{(R)-7a} = 95\%$) con una conversión química prácticamente ideal ($c = 51\%$) y un aumento notable en el valor de enantioselectividad ($E > 200$). En este sentido, el aumento en enantioselectividad, conversión química y enantioselectividad se relacionó con el tiempo de activación química que le permite a la enzima catalizar la reacción hasta obtener un producto prácticamente enantiopuro ($\%ee_{(S)-6a} = 99\%$) que eleva sustancialmente la enantioselectividad del sistema.

Cabe también destacar que con la metodología optimizada se logró disminuir en un orden de magnitud el uso de disolvente, reduciendo además el tiempo de reacción a la mitad, en comparación con los resultados previamente obtenidos en solución.¹¹ De esta forma, la optimización de los parámetros de reacción sugirió mantener una frecuencia de molienda de 15 Hz y un tiempo de reacción de una hora. Como se mencionó en la introducción de este trabajo, uno de los puntos de gran interés para lograr que una transformación química cumpla con los principios de la química verde consiste en eliminar el uso de disolventes. Cuando no es posible omitirlos, se prefiere hacer uso de disolventes “verdes”. Así, se decidió explorar una serie de disolventes como LAGs en la reacción mecanoenzimática; aunque, no todos ellos son “verdes” (Tabla 1).

Tabla 1. Optimización del LAG en el proceso de resolución mecanoenzimático.

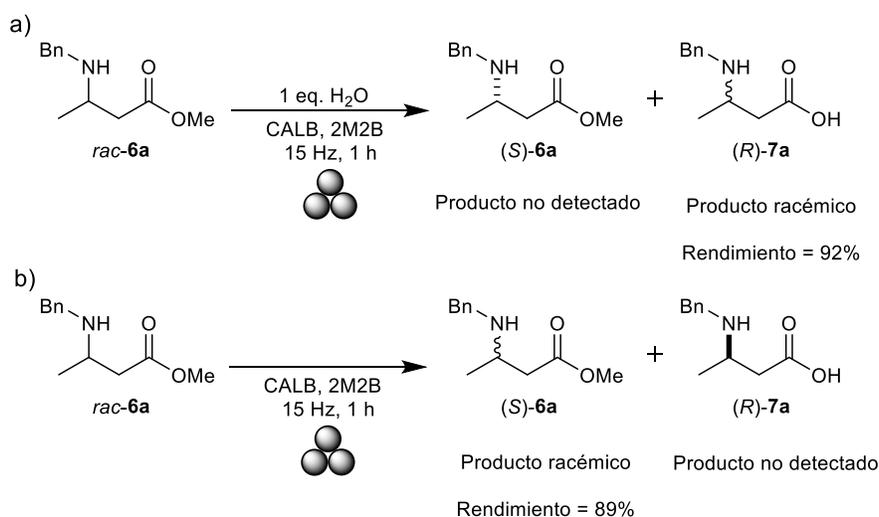


ensayo ^a	LAG ^b	(S)-6a		(R)-7a		c ^d (%)	E ^e
		Rdto (%)	ee (%) ^c	Rdto (%)	ee (%) ^c		
1	2M2B	51	99	49	95	51	>200
2	hexano	40	97	60	86	53	55
3	AcOEt	86	69	13	95	42	81
4	DIPE	76	92	19	88	51	51
5	tolueno	75	72	25	93	44	60
6	dioxano	53	79	47	95	45	94
7	IPA	80	48	20	95	34	63
8	CH ₃ CN	65	65	29	95	41	77
9	-	58	95	41	92	51	89

^aLas reacciones se llevaron a cabo empleando activación mecánica a 15 Hz por 1 h. ^bSe emplearon 0.2 mL de cada disolvente como LAG. ^cDeterminado después del proceso de purificación usando HPLC y empleando columna con fase estacionaria quiral. ^dCalculada empleando la Ecuación 6. ^eCalculada empleando la Ecuación 7. 2M2B = 2-metil-2-butanol. AcOEt = Acetato de etilo. DIPE = Éter diisopropílico. IPA = Alcohol isopropílico. CH₃CN = Acetonitrilo.

Así, se evaluaron aditivos LAG con diversas características en la resolución mecanoenzimática. Sin embargo, no existe una tendencia clara entre los resultados, incluso al comparar disolventes con propiedades similares como hidrofobicidad (ensayos 2 y 5) o polaridad (ensayos 1, 7 y 8). Por otro lado, debe considerarse que el aditivo LAG introducido a la reacción se emplea como asistente en la molienda, en comparación con las técnicas en solución en donde el disolvente resuspende las partículas de enzima inmovilizada durante la catálisis y disuelve los componentes de la reacción. Adicionalmente, incluso cuando la mayoría de las lipasas sufren un fenómeno denominado activación interfacial que depende de la relación estructura enzimática-medio de reacción y que modula la actividad enzimática en ciertos disolventes mejorando o inhibiendo la catálisis, estudios recientes muestran que este efecto no es visible en CALB cuando se emplean sustratos de menor tamaño comparados con los sustratos naturales.⁵² De esta forma, podemos decir que el efecto de los diferentes aditivos LAG no puede compararse en términos de activación interfacial.^{53,54} Finalmente, aunque la enantiopureza de los productos es alta cuando la reacción se llevó a cabo bajo condiciones libres de disolvente (ensayo 9) el valor de enantioselectividad es bajo, lo que justifica la elección del alcohol *ter*-amílico (2M2B), un disolvente “verde”,⁵⁵ como LAG para la desimetrización de β -aminoésteres.

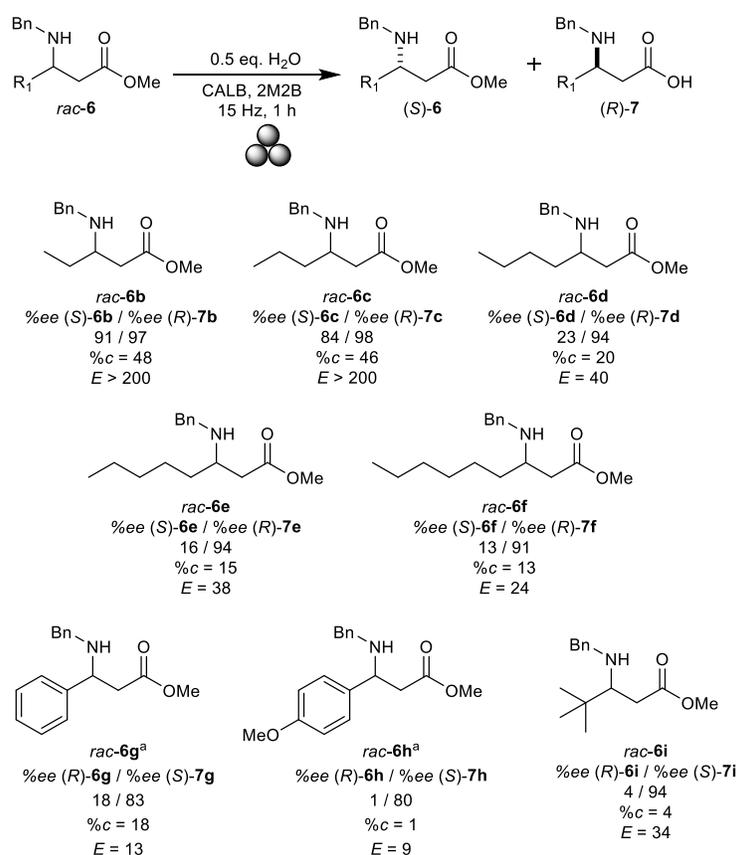
Del mismo modo que el aditivo LAG modifica las condiciones de reacción durante el proceso resolutivo, la cantidad de agua presente en la reacción puede alterar el valor de conversión y la enantioselectividad del proceso. Por lo tanto, con el fin de evaluar el efecto del agua en la biotransformación, se decidió duplicar su concentración (1 equiv. en vez de 0.5 equiv, Esquema 6a).



Esquema 6. Resolución mecanoenzimática del sustrato *rac-6a* empleando a) 1 equivalente de agua y b) bajo condiciones libres de agua.

Por otro lado, considerando que el sistema empleado no es completamente hermético y que los reactivos utilizados (N435 y 2M2B) pudieran introducir agua al seno de la reacción, se evaluó también el proceso en ausencia total de agua (Esquema 6b). Es claro que el agua juega un papel importante en el proceso resolutorio. En particular, cuando se emplea un equivalente de agua en comparación a medio equivalente, la reacción resulta no selectiva y casi la totalidad del sustrato *rac-6a* da lugar al β-aminoácido racémico. En contraste, cuando no se tiene agua en el sistema, no se observa conversión hacia el producto de biocatálisis y el sustrato recuperado es racémico.

Como se mencionó con anterioridad, CALB es una enzima *promiscua* que puede catalizar diferentes reacciones en un gran número de sustratos. Por lo tanto, teniendo en cuenta las condiciones óptimas para la activación mecanoenzimática producida por molienda vibracional a 15 Hz de frecuencia por una hora, 2M2B como aditivo LAG y 0.5 equivalentes de agua, se decidió evaluar el proceso resolutorio en una familia de β-aminoésteres racémicos (Esquema 7).



Esquema 7. Alcance del proceso mecanoenzimático empleando diferentes sustratos racémicos. ^aSe emplearon 0.75 equivalentes de agua.

Los resultados registrados ofrecieron datos relevantes que permiten entender el comportamiento de CALB en la desimetrización mecanoquímica. Así, después de que los productos fueron aislados y analizados como en el caso del sustrato modelo, fue claro que la biocatálisis sufrió inhibición cuando se incrementó el tamaño de la cadena hidrocarbonada del β -aminoéster, disminuyendo el porcentaje de conversión de 51% en el sustrato *rac*-**6a** ($R_1 = -CH_3$), hasta 13% cuando se empleó el sustrato *rac*-**7f** ($R_1 = -CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3$). Sin embargo, se logró observar una mejora en enantioselectividad cuando se incrementó la longitud de la cadena, pasando de un *ee* = 95% para el producto en el sustrato modelo ($R_1 = -CH_3$), hasta un 98% cuando se empleó el β -aminoéster *rac*-**6c**. El efecto de la cadena hidrocarbonada sobre la actividad enzimática ha sido estudiado anteriormente con resultados similares, demostrando que la eficacia de la enzima para resolver sustratos con cadenas hidrocarbonadas depende de factores enzimáticos y termodinámicos que afectan la catálisis.⁵⁶ Por otro lado, en este estudio se observó que CALB tiene una mayor preferencia por β -aminoésteres con cadenas de uno a tres carbonos (*rac*-**6a-c**), aunque con pérdida de eficiencia enzimática, posiblemente debido al impedimento estérico de la cadena que facilita el reconocimiento enantiomérico pero limita el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima.⁵⁶ Adicionalmente, CALB presentó una menor actividad y selectividad sobre sustratos que presentan grupos voluminosos como lo demuestran los resultados para los sustratos *rac*-**6g-i** ($R_1 = Ph, 4MeO-Ph, t-Bu$).

La asignación correcta de la configuración absoluta de los productos del proceso biocatalítico (*R*)-**7b-f** y (*S*)-**7g-i** se llevó a cabo por comparación con los datos descritos en la literatura.¹¹ Por otro lado, la recristalización del producto (*R*)-**7a** de metanol, generó cristales adecuados para difracción de rayos-X que condujeron a la asignación de la configuración (*R*) en el producto **7a** (Figura 14).

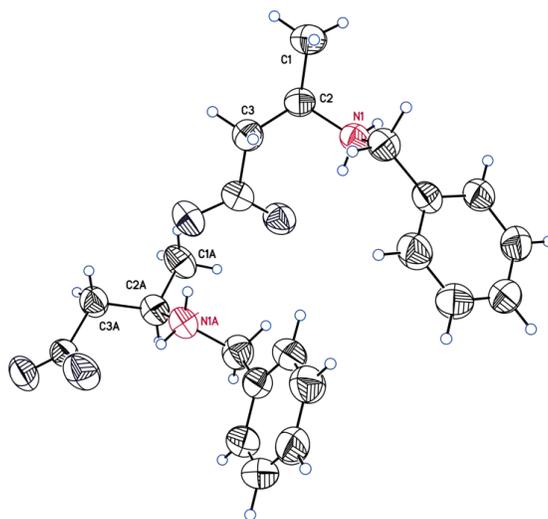
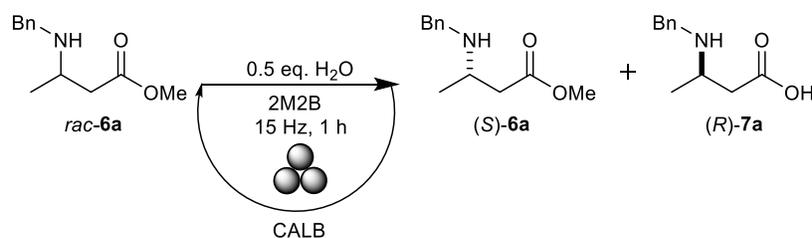


Figura 14. Diagrama ORTEP del producto cristalino (*R*)-**7a**.

Una de las ventajas más significativas del empleo de enzimas inmovilizadas en resoluciones cinéticas consiste en la posibilidad/potencial de reciclaje del biocatalizador sin pérdida considerable de actividad y enantioselectividad.¹¹ Por tanto, se decidió evaluar la recuperabilidad del catalizador después de hasta 4 ciclos sucesivos de molienda (Tabla 2).

Tabla 2. Evaluación de la recuperabilidad del biocatalizador en la resolución de β -aminoésteres.



ensayo ^a	ciclo de recuperación ^b	(S)-6a		(R)-7a		c ^d (%)	E
		Rdto (%)	ee ^c (%)	Rdto (%)	ee ^c (%)		
1	-	51	99	49	95	51	>200
2	1	65	35	35	88	28	22
3	2	80	6	20	80	7	10
4	3	-	-	-	-	-	-

^aLas reacciones se llevaron a cabo empleando activación mecánica a 15 Hz por 1 h usando 0.2 mL de 2M2B. ^bN435 fue recuperada por centrifugación después de cada ciclo catalítico y secada a temperatura ambiente a presión reducida. ^cDeterminado después del proceso de purificación usando HPLC y empleando columna con fase estacionaria quiral. ^dCalculada empleando la Ecuación 6. ^eCalculada empleando la Ecuación 7.

Lamentablemente, se apreció una pérdida considerable de actividad y selectividad después de cada ciclo catalítico, debido posiblemente al estrés mecánico que sufre el soporte enzimático (soporte de resina acrílica conteniendo alrededor de 10000 UI por gramo) con cada ciclo de molienda, pulverizando y modificando la estructura interna del material, comprometiendo así la actividad enzimática de CALB.

3.3 Escalamiento del proceso de resolución mecanoenzimático.

Ciertamente, una de las características de interés de cualquier transformación química es la capacidad de la técnica para poder realizarse empleando una mayor cantidad de reactivos y de esta forma incrementar el volumen del producto deseado en un tiempo razonable. Por fortuna, esta característica puede aplicarse a casi cualquier reacción química, siempre y cuando los parámetros de reacción y los instrumentos necesarios se encuentren accesibles. Sin embargo, para el caso de las transformaciones mediadas por activación mecánica aún no hay parámetros que definan un esquema general que permita trasladar las características de una reacción a microescala a una de mayor escala. No obstante, existen equipos como

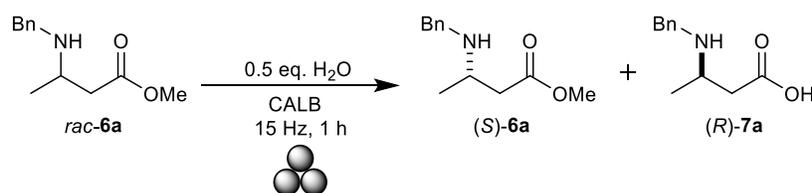
los extrusores que pueden ser usados en procesos continuos para obtener una gran cantidad de producto en poco tiempo (Figura 1d).⁵⁷

A pesar de que el escalamiento de una reacción mecanoquímica cuando se emplean enzimas no es un procedimiento sencillo, considerando la capacidad de la técnica para generar productos de interés farmacéutico se exploró una estrategia que permitiría obtener una mayor cantidad de producto con alta enantioselectividad.

Para desarrollar esta estrategia se consideraron algunos puntos relevantes: (1) la reacción mecanoenzimática está controlada por la cantidad de agua agregada a la reacción (Esquema 6a); por lo tanto, es posible llevar a cabo el proceso biocatalítico conservando la misma cantidad de enzima, pero incrementando la cantidad de sustrato y agua. (2) Debido a la naturaleza de los sustratos empleados (líquidos semioleosos) al incrementar la cantidad de este componente en la reacción es posible homogeneizar el medio de la misma forma que se hace al agregar LAG. De esta manera, una reacción con un excedente de sustrato líquido puede conducirse bajo condiciones libres de disolvente. (3) Si la cantidad de enzima fuese limitante en el procedimiento de resolución, debería de obtenerse una menor conversión, aunque el procedimiento tendría que conducirse con la misma enantioselectividad.

Considerando lo anterior, se llevó a cabo una serie de reacciones en donde la cantidad de enzima se mantuvo constante pero los equivalentes de sustrato y agua se incrementaron respecto a la reacción original (Tabla 3).

Tabla 3. Escalamiento de la resolución mecanoenzimática bajo condiciones libres de disolvente.



ensayo ^a	Incremento en equivalentes ^b	ee (S)-6a ^c (%)	ee (R)-7a ^c (%)	c ^d (%)	E
1	1	99	95	51	>200
2	3	62	93	40	52
3	6	53	93	36	47
8	9	49	94	34	53

^aLas reacciones se llevaron a cabo empleando activación mecánica a 15 Hz por 1 h. ^bIncremento geométrico de la cantidad sustrato/H₂O, 2:1. ^cDeterminado después del proceso de purificación usando HPLC y empleando columna con fase estacionaria quiral. ^dCalculada empleando la Ecuación 6. ^eCalculada empleando la Ecuación 7.

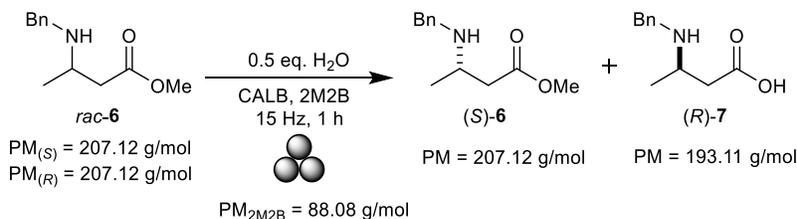
Como se había anticipado, la catálisis puede conducirse en ausencia de disolvente empleando el exceso de sustrato como LAG. Sorprendentemente, no existe pérdida relativa de la enantiopureza del producto (*R*)-**7a** aun trabajando a una escala 9 veces mayor. Es pertinente resaltar que un aumento en el tiempo del proceso (90 min) no resultó en un incremento sustancial del grado de conversión ni de la enantiopureza del proceso de la resolución. La adición de LAG en la proporción correspondiente no provocó ningún cambio en el proceso, aunque disminuyó ligeramente la enantiopureza del ácido obtenido ($ee_{(R)-7a} = 90\%$). Finalmente, la disminución de enantiopureza de (*S*)-**6a** al aumentar la proporción de sustrato se debe a la baja conversión ocasionada por una catálisis incompleta, posiblemente como consecuencia de un proceso de mezclado ineficiente dentro del reactor de molienda.

En conclusión, podemos afirmar que es posible escalar una reacción mecanoenzimática empleando un reactor de tipo vibracional y este resultado puede aplicarse para la obtención de β -aminoácidos de interés comercial con excelente pureza enantiomérica ($ee_{(R)-7a} > 90\%$).

3.4 Medición de *EA* y del factor-*E* en la resolución mecanoenzimática de β -aminoésteres.

Las ecuaciones 1 y 2 describen el cálculo que debe realizarse para conocer los valores de la *EA* y el factor-*E* de un proceso; sin embargo, para llevar a cabo este cálculo en una resolución cinética deben hacerse consideraciones adicionales. La reacción de resolución procede de tal forma que al final del proceso se aíslan dos moléculas diferentes, un éster proveniente del enantioenriquecimiento del sustrato empleado y un ácido producto del proceso biocatalítico (Esquema 5). En este sentido, debe definirse si ambas o solo una de esas especies son valiosas como productos. Por un lado, la técnica de resolución es un proceso de desimetrización que cuando se realiza eficientemente, debe asegurar la separación de una mezcla racémica vía derivatización; por el otro, aun cuando el sustrato empleado conserva sus características constitucionales y de conectividad, la característica de enantioenriquecimiento puede adjudicarle valor. Así, en este trabajo ambos productos obtenidos al final de la biocatálisis serán considerados productos de reacción y por tanto, serán usados para el cálculo de la *EA* y del factor-*E*.

De esta forma, las ecuaciones 1 y 2 para el proceso optimizado de resolución (ensayo 1, Tabla 1) empleando el sustrato *rac*-**6a** (82 mg) y 2M2B (163 mg) como LAG (omitiendo la carga del biocatalizador debido a que es recuperable y el agua), conducen al producto (*S*)-**6a** (41.8 mg) y (*R*)-**7a** (37.5 mg) por simple extracción del reactor de molienda con metanol (5 mL, ver parte experimental) (Esquema 8). La resolución global se lleva a cabo de la siguiente manera:



Esquema 8. Reacción de resolución modelo para el cálculo de la EA y el factor-*E*.

$$EA = \frac{207.12 \frac{\text{g}}{\text{mol}} + 193.11 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{207.12 \frac{\text{g}}{\text{mol}} + 207.12 \frac{\text{g}}{\text{mol}} + 88.08 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} * 100 \approx 80\%$$

$$\text{factor} - E = \frac{163 \text{ mg} + 3960 \text{ mg}}{41.8 \text{ mg} + 37.5 \text{ mg}} = 52$$

Obteniéndose un excelente valor para la *EA* (80%), y un valor moderado de factor-*E* (*E* = 52), respecto a metodologías previamente reportadas por el grupo de investigación.¹¹

3.5 Conclusiones.

Se diseñó una metodología mecanoenzimática empleando resolución cinética para desimetrizar una familia de β-aminoésteres *N*-protegidos racémicos con resultados que van de buenos a excelentes. Se optimizaron las condiciones de reacción examinando el impacto de la frecuencia y tiempo de molienda, así como la naturaleza de los aditivos LAG y la cantidad de agua presente en el medio de reacción. Se obtuvieron parámetros clave que facilitaron la obtención de productos con buenos excesos enantioméricos, reduciendo el uso de disolventes y disminuyendo en 50% el tiempo de reacción respecto a estrategias previas realizadas en solución. Además, se exploró la capacidad de CALB para ser recuperada del medio de reacción, así como para efectuar un proceso resolutivo a mayor escala, obteniéndose resultados que van de moderados a buenos. Así, las aproximaciones realizadas en este capítulo y que se llevaron a cabo con buena economía atómica (*EA* = 80%) y factor ambiental (*E* = 52) constituyen las bases para el desarrollo de estrategias enantioselectivas enfocadas a la síntesis de derivados farmacéuticos o a la síntesis de ingredientes farmacológicamente activos de interés comercial, incentivando el estudio de metodologías alternas y un análisis más profundo de la técnica mecanoenzimática.

Referencias

- 1.- Kudo, F.; Miyanaga, A.; Eguchi, T. Biosynthesis of natural products containing β -amino acids. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 1056-1073.
- 2.- Seebach, D.; Beck, A. K.; Bierbaum, D. J. The World of β - and γ - Peptides Comprised of Homologated Proteinogenic Amino Acids and Other Components. *Chem. Biodivers.* **2004**, *8*, 1111-1239.
- 3.- Steer, D. L.; Lew, R. A.; Perlmutter, P.; Smith, A. I.; Aguilar, M.-I. β -Amino Acids: Versatile Peptidomimetics. *Curr. Med. Chem.* **2002**, *9*, 811-822.
- 4.- Farmer, L. J.; Clark, M. P.; Boyd, M. J.; Perola, A.; Jones, S. M.; Tsai, A.; Jacobs, M. D.; Bandarage, U. P.; Ledebøer, M. W.; Wang, T.; Deng, H.; Ledford, B.; Gu, W.; Duffy, J. P.; Bethiel, R. S.; Shannon, D.; Byrn, R. A.; Leeman, J. R.; Rijnbrand, R.; Bennett, H. B.; O'Brien, C.; Memmott, C.; Nti-Addae, K.; Bennani, Y. L.; Charifson, P. S. Discovery of Novel, Orally Bioavailable β -Amino Acid Azaindole Inhibitors of Influenza PB2. *ACS Med. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 256-260.
- 5.- Gentilucci, L.; de Marco, R.; Cerisoli, L. Chemical Modifications Designed to Improve Peptide Stability: Incorporation of Non-Natural Amino Acids, Pseudo-Peptide Bonds, and Cyclization. *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 3185-3203.
- 6.- Kiss, L.; Mándity, I. M.; Fülöp, F. Highly functionalized cyclic β -amino acid moieties as promising scaffolds in peptide research and drug design. *Amino Acids* **2017**, *49*, 1441-1455.
- 7.- Arndt, F.; Eistert, B.; Partale, W. Berichte der deutschen chemischen Gessellschaft (A and B Series). *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1927**, *60*, 1364-1370.
- 8.- Podlech, J.; Seebach, D. On the preparation of β -amino acids from α -amino acids using the Arndt-Eistert reaction: Scope, limitations and stereoselectivity. Application to carbohydrate peptidation. Stereoselective α -alkylations of some β -amino acids. *Liebigs Ann.* **1995**, 1217-1228.
- 9.- Escalante, J.; Carrillo-Morales, M.; Linzaga, I. Michael Additions of Amines to Methyl Acrylates Promoted by Microwave Irradiation. *Molecules* **2008**, *13*, 340-347.
- 10.- Tan, C. Y. K.; Weaver, D. F. A one-pot synthesis of 3-amino-3-arylpropionic acids. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7449-7461.
- 11.- Rangel, H.; Carrillo-Morales, M.; Galindo, J. M.; Castillo, E.; Obregón-Zuñiga, A.; Juaristi, E.; Escalante, J. Structural features of *N*-benzylated- β -amino acid methyl esters essential for enantiodifferentiation by lipase B from *Candida antarctica* in hydrolytic reactions. *Tetrahedron: Asymmetry* **2015**, *26*, 325-332.
- 12.- Palomo, C.; Aizpurua, J. M.; Ganboa, I.; Oiárbide, M. β -Lactams as Versatile Intermediates in α - and β - Amino Acid Synthesis. *Synlett* **2001**, *12*, 1813-1826.
- 13.- Abele, S.; Seebach, D. Preparation of Achiral and of Enantiopure Geminally Disubstituted β -Amino Acids for β -Peptide Synthesis. *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 1-15.
- 14.- Kobayashi, S.; Kamiyama, K.; Iimori, T.; Ohno, M. Creation of novel chiral synthons with enzymes and applications to natural product synthesis. 15. Efficient introduction of chiral centers into cyclohexane ring. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2557-2560.

-
- 15.- Taggi, A. E.; Hafez, A. M.; Lectka, T. α -Imino Esters: Versatile Substrates for the Catalytic, Asymmetric Synthesis of α - and β -Amino Acids and β -Lactams. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 10-19.
- 16.- Juaristi, E.; Soloshonok, V. *Enantioselective Synthesis of β -Amino Acids*. Wiley-VCH Verlag & Co. Hoboken, New Jersey, 2nd ed. **2005**.
- 17.- Liljeblad, A.; Kanerva, L. T. Biocatalysis as a profound tool in the preparation of highly enantiopure β -amino acids. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 5831-5854.
- 18.- Lubell, W. D.; Kitamura, M.; Noyori, R. Enantioselective synthesis of β -amino acids based on BINAP-ruthenium (II) catalyzed hydrogenation. *Tetrahedron: Asymmetry* **1991**, *2*, 543-554.
- 19.- Hsiao, Y.; Rivera, N. R.; Rosner, T.; Karska, S. W.; Njolito, E.; Wang, F.; Sun, Y.; Armstrong III, J. D.; Grabowski, E. J. J.; Tillyer, R. D.; Spindler, F.; Malan, C. Highly Efficient Synthesis of β -Amino Acid Derivatives via Asymmetric Hydrogenation of Unprotected Enamines. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9918-9919.
- 20.- Tang, W.; Wu, S.; Zhang, X. Enantioselective Hydrogenation of Tetrasubstituted Olefins of Cyclic β -(Acylamino)acrylates. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9570-9571.
- 21.- Enthaler, S.; Erre, G.; Junge, K.; Schröder, K.; Addis, D.; Michalik, D.; Hapke, M.; Redkin, D.; Beller, M. Iridium-Catalyzed Hydrogenation of β -Dehydroamino Acid Derivatives Using Monodentate Phosphoramidites. *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 3352-3362.
- 22.- Pan, Y.; Zhao, Y.; Ma, T.; Yang, Y.; Liu, H.; Jiang, Z.; Tan, C.-H. Enantioselective Synthesis of α -Fluorinated β -Amino Acid Derivatives by an Asymmetric Mannich reaction and Selective Deacylation/Decarboxylation Reactions. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 779-782.
- 23.- Xu, L.-W.; Xia, C.-G. A Catalytic Enantioselective Aza-Michael Reaction: Novel Protocols for Asymmetric Synthesis of β -Amino Carbonyl Compounds. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 633-639.
- 24.- Noda, H.; Shibasaki, M. Recent Advances in the Catalytic Asymmetric Synthesis of β^2 - and $\beta^{2,2}$ -Amino Acids. *Eur. J. Org. Chem.* **2020**, 2350-2361.
- 25.- Sibi, M. P.; Itoh, K. Organocatalysis in Conjugate Amine Additions. Synthesis of β -Amino Acid Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8064-8065.
- 26.- Sheldon, R. A.; Woodley, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 801-838.
- 27.- Cohen, S. G.; Khedouri, E. Requirements for Stereospecificity in Hydrolysis by α -Chymotrypsin. Diethyl β -Acetamidoglutarate. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 1093-1096.
- 28.- Cohen, S. G.; Sprinzak, Y.; Khedouri, E. Requirements for Stereospecificity in Hydrolysis by α -Chymotrypsin. III. The Acylamino Group¹. *J. Am. Chem. Soc.* **1961**, *83*, 4225-4228.
- 29.- Cohen, S. G.; Crossley, J.; Khedouri, E. Action of α -Chymotrypsin on Diethyl N-Acetylaspartate and on Diethyl N-Methyl-N-Acetylaspartate. *Biochemistry* **1963**, *2*, 820-823.

-
- 30.- Chenault, H. K.; Dahmer, J.; Whitesides, G. M. Kinetic resolution of unnatural and rarely occurring amino acids: enantioselective hydrolysis of N-acyl amino acids catalyzed by acylase I. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 6354-6364.
- 31.- Gröger, H.; Trauthwein, H.; Buchholz, S.; Drauz, K.; Sacherer, C.; Godfrin, S.; Werner, H. The first aminoacylase-catalyzed enantioselective synthesis of aromatic β -amino acids. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 1977-1978.
- 32.- Lloyd, R. C.; Lloyd, M. C.; Smith, M. E. B.; Holt, K. E.; Swift, J. P.; Keene, P. A.; Taylor, S. J. C.; McCague, R. Use of hydrolases for the synthesis of cyclic amino acids. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 717-728.
- 33.- Soloshonok, V. A.; Kirilenko, A. G.; Fokina, N. A.; Shishkina, I. P.; Galushko, S. V.; Kukhar, V. P.; Švedas, V. K.; Kozlova, E. V. Biocatalytic resolution of β -fluoroalkyl- β -amino acids. *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5*, 1119-1126.
- 34.- Roche, D.; Prasad, K.; Repic, O. Enantioselective acylation of β -aminoesters using penicillin G Acylase in organic solvents. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 3665-3668.
- 35.- Sonke, T.; Kaptein, B.; Wagner, A. F. V.; Quaedflieg, P. J. L. M.; Schultz, S.; Ernste, S.; Schepers, A.; Mommers, J. H. M.; Broxterman, Q. B. Peptide deformylase as biocatalyst for the synthesis of enantiomerically pure amino acid derivatives. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **2004**, *29*, 265-277.
- 36.- May, O.; Siemann, M.; Pietzsch, M.; Kiess, M.; Mattes, R.; Sylđatk, C. J. Substrate-dependent enantioselectivity of a novel hydantoinase from *Arthrobacter aurescens* DSM 3745; purification and characterization as new member of cyclic amidases. *J. Biotechnol.* **1998**, *61*, 1-13.
- 37.- Mathew, S.; Jeong, S.-S.; Chung, T.; Lee, S.-H.; Yun, H. Asymmetric synthesis of aromatic β -amino acids using ω -transaminase: Optimizing the lipase concentration to obtain thermodynamically unstable β -keto acids. *Biotechnol. J.* **2016**, *11*, 185-190.
- 38.- Szymanski, W.; Wu, B.; Weiner, B.; de Wildeman, S.; Feringa, B. L.; Janssen, D. B. Phenylalanine Aminomutase-Catalyzed Addition of Ammonia to Substituted Cinnamic Acids: a Route to Enantiopure α - and β - Amino Acids. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 9152-9157.
- 39.- Turner, N. J. Ammonia Lyases and Aminomutases as Biocatalysts for the Synthesis of α -amino and β -amino Acids. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15*, 234-240.
- 40.- Sellek, G. A.; Chaudhuri, J. B. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzyme Microb. Technol.* **1999**, *25*, 471-482.
- 41.- Salihu, A.; Alam, Z. Solvent tolerant lipases: A review. *Process Biochem.* **2015**, *50*, 86-96.
- 42.- Anderson, E. M.; Larsson, K. M.; Kirk, O. One Biocatalyst-Many Applications: The Use of *Candida Antarctica B*-Lipase in Organic Synthesis. *Biocatal. Biotransfor.* **1998**, *16*, 181-204.
- 43.- Ghanem, A.; Aboul-Enein, H. Y. Application of Lipases in Kinetic Resolution of Racemates. *Chirality* **2005**, *17*, 1-15.
- 44.- Martinelle, M.; Holmquist, M.; Hult, K. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1995**, *1258*, 272-276.

-
- 45.- Sánchez, V. M.; Rebolledo, F.; Gotor, V. *Candida antarctica* lipase catalyzed resolution of ethyl (\pm)-3-aminobutyrate. *Tetrahedron Asymmetry*. **1997**, *8*, 37-40.
- 46.- Gedey, S.; Liljeblad, A.; Fülöp, F.; Kanerva, L. T. Sequential resolution of ethyl 3-aminobutyrate with carboxylic acid esters by *Candida antarctica* lipase B. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 2573-2581.
- 47.- Adam, W.; Groer, P.; Humpf, H.-U.; Saha-Möller, C. R. Synthesis of Optically Active α -Methylene β -Lactams through Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4919-4922.
- 48.- Hernández, J. G.; Frings, M.; Bolm, C. Mechanochemical Enzymatic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols under Ball-Milling Conditions. *ChemCatChem* **2016**, *8*, 1769-1772.
- 49.- Frišćić, T.; Trask, A. V.; Jones, W.; Motherwell, W. D. S. Screening for Inclusion Compounds and Systematic Construction of Three-Component Solids by Liquid-Assisted Grinding. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7546-7550.
- 50.- Rightmire, N. R.; Hanusa, T. P. Advances in organometallic synthesis with mechanochemical methods. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 2352-2362.
- 51.- Andersen, J. M.; Mack, J. Decoupling the Arrhenius equation *via* mechanochemistry. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 5447-5453.
- 52.- Verger, R. "Interfacial activation" of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* **1997**, *15*, 32-38.
- 53.- Stauch, B.; Fisher, S. J.; Cianci, M. Open and closed states of *Candida antarctica* lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation. *J. Lipid Res.* **2015**, *56*, 2384-2358.
- 54.- Zisis, T.; Freddolino, P. L.; Turunen, P.; van Teeseling, M. C. F.; Rowan, A. E.; Blank, K. G. Interfacial Activation of *Candida antarctica* Lipase B: Combined Evidence from Experiment and Simulation. *Biochemistry* **2015**, *54*, 5969-5979.
- 55.- Alder, C. M.; Hayler, J. D.; Henderson, R. K.; Redman, A. M.; Shukla, L.; Shuster, L.; Sneddon, H. F. Updating and further expanding GSK's solvent sustainability guide. *Green Chem.* **2016**, *18*, 3879-3890.
- 56.- Vaysse, L.; Ly, A.; Moulin, G.; Dubreucq, E. Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous medium. *Enzyme Microbiol. Technol.* **2002**, *31*, 648-655.
- 57.- Ardila-Fierro, K. J.; Crawford, D. E.; Körner, A.; James, S. L.; Bolm, C.; Hernández, J. G. Papain-catalysed mechanochemical synthesis of oligopeptides by milling and twin-screw extrusion: application in the Juliá-Colonna enantioselective epoxidation. *Green Chem.* **2018**, *20*, 1262-1269.

4 Capítulo II

**RESOLUCIÓN MECANOENZIMÁTICA DE
AMINAS QUIRALES: UNA TÉCNICA
VERDE PARA LA SÍNTESIS DE BLOQUES
DE CONSTRUCCIÓN EN LA QUÍMICA
FARMACÉUTICA.**

4.1 Aminas quirales como bloques de construcción en la química farmacéutica.

Aminas quirales, referidas en este trabajo a aquellas aminas que presentan al grupo amino directamente unido a carbonos estereogénicos, son grupos funcionales con gran relevancia en la agroindustria y en el ámbito farmacéutico.¹ La importancia de estas aminas, así como las de otros compuestos con centros de quiralidad, se ha acrecentado debido al establecimiento de las diferencias farmacológicas que existen entre los enantiómeros de una mezcla racémica.² Esta observación ha impulsado el estudio de las propiedades biológicas de las aminas ópticamente activas y ha conducido al desarrollo de estrategias sintéticas asimétricas para la preparación de aminas enantioméricamente puras.

En especial, las aminas quirales que presentan actividad biológica se han convertido, junto con los β -aminoácidos, en uno de los grupos funcionales de mayor estudio en la actualidad (Figura 15). De esta manera, las metodologías asimétricas para la obtención de aminas quirales son más abundantes que las expuestas en la síntesis enantioselectiva de β -aminoácidos, que se describieron en el capítulo anterior.

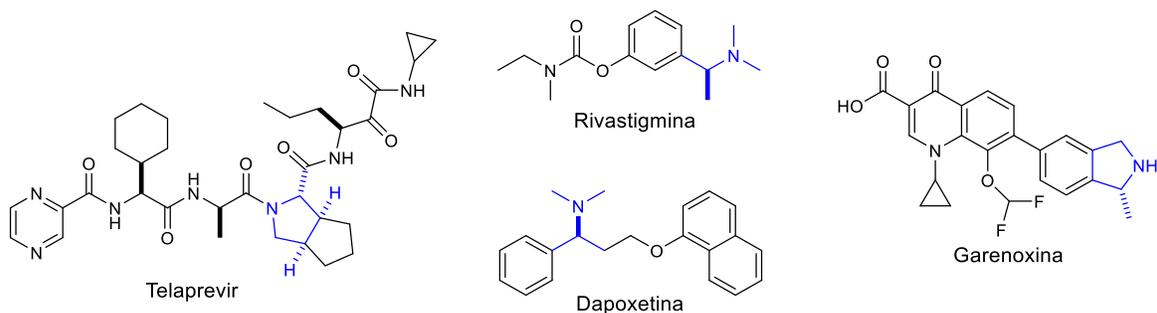


Figura 15. Ejemplos selectos de compuestos farmacéuticos conteniendo segmentos de aminas quirales.

De manera semejante con algunas rutas sintéticas enantioselectivas descritas anteriormente en esta tesis, la síntesis de aminas quirales puede llevarse a cabo empleando catalizadores de rutenio para llevar a cabo reducciones enantioselectivas de sustratos insaturados, como son las iminas.³ Por otro lado, se ha explorado la activación de enlaces C–H para llevar a cabo la inserción de grupos amino y la hidroaminación de alquenos, entre otras tácticas.^{4,5} No obstante, en la actualidad las rutas biocatalíticas han abierto el panorama hacia estrategias acorde con lo propuesto por los doce principios de la química verde.⁶ En particular, evitando la aplicación de ciertas metodologías sintéticas que requieren el uso de metales de transición, que son potencialmente tóxicos.

La resolución cinética de aminas quirales *N*-protegidas vía hidrólisis enantioselectiva de derivados *N*-acilados representa una estrategia práctica para la obtención de aminas quirales.^{7,8} Por otro lado, se han descrito estrategias que involucran la modificación, reducción o inserción enantioselectiva de un grupo amino empleando diferentes protocolos enzimáticos (Figura 16).⁷⁻¹⁰

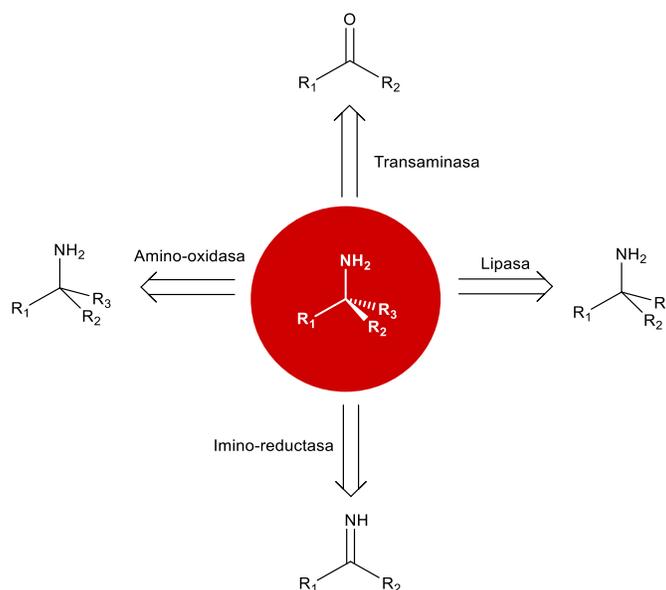


Figura 16. Estrategias enzimáticas para la obtención de aminas quirales.⁷⁻¹⁰

Las metodologías que involucran el empleo de las amino-oxidetas (AO) e imino-reductetas (ImR) han permitido el desarrollo de protocolos para la obtención de aminas quirales con excelentes resultados.^{7,8} Lamentablemente, la dependencia de las AO por cobre o flavina y de las ImR por NADPH como cofactores en la reacción enzimática limitan su aplicación a nivel industrial.¹

Por su parte, las transaminetas (TA) son biocatalizadores extensamente explorados en la síntesis de aminas quirales.^{9,10} Las TA presentan un mecanismo de acción enzimático complejo pero muy estereoselectivo comparado con otras enzimas. Es justo esta peculiaridad la que ha generado una amplia expectativa en el uso de estos biocatalizadores para llevar a cabo la síntesis de bloques de construcción quirales de interés industrial.⁹ Desafortunadamente, como ocurre con las AO y las ImR, las TA requieren del piridoxal fosfato como coenzima, para que presente actividad en la forma de vitamina B6, restringiendo su aplicación.¹

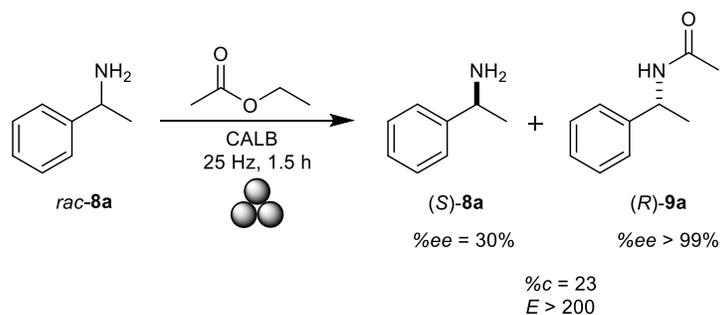
En este sentido, lipetas como CALB se han aplicado con mucho éxito en la síntesis asimétrica de aminas quirales (*vide infra*). Estas enzimas, a diferencia de las AO, ImR y TA, no requieren de cofactores o coenzimas para llevar a cabo la biotransformación deseada. Además, su costo es bajo y presentan un alto grado de recuperabilidad.¹

Diferentes lipasas, incluida CALB, se han empleado con anterioridad en la resolución cinética de aminas vía acilación o hidrólisis enantioselectiva e incluso se han desarrollado tácticas de resolución dinámica empleando agentes racemizantes para obtener más del 50% de conversión; no obstante, la mayoría de esos métodos requieren condiciones de reacción no “verdes” que incluyen temperaturas elevadas y tiempos largos de reacción - tan largos como 10 días.¹¹⁻¹⁶

Considerando los excelentes resultados que se obtuvieron aplicando la estrategia mecanoenzimática para la resolución de β -aminoésteres (ver capítulo anterior) además de las ventajas adicionales cuando se emplea activación mecánica en conjunto con un proceso biocatalítico (reducción en la cantidad de disolvente/disminución del tiempo de reacción), se decidió explorar la desimetrización de aminas quirales a través de estrategias mecanoenzimáticas empleando CALB y acilación enantioselectiva.

4.2 Resolución de aminas quirales racémicas para la síntesis de bloques de construcción farmacéuticos ópticamente activos.

Para el estudio de la resolución cinética mecanoenzimática de aminas quirales se decidió emplear a la 1-feniletilamina (*rac*-**8a**) como sustrato racémico modelo. De esta forma, una primera aproximación se llevó a cabo empleando la amina racémica, CALB inmovilizada, y acetato de etilo (6 equiv.) como agente acilante (Esquema 9, ver también la parte experimental). Así mismo, se aplicó activación mecánica (25 Hz) producida por un equipo de molienda de bolas de geometría vibracional (MM200) durante una hora y media empleando bolas y un reactor de molienda de ágata. Finalmente, debido al exceso de agente acilante líquido (acetato de etilo), fue posible llevar a cabo el proceso bajo condiciones libres de disolvente y de LAG.



Esquema 9. Resolución mecanoenzimática de *rac*-**8a** bajo condiciones libres de disolvente.

Una vez finalizado el tiempo de reacción se extrajo el contenido del reactor de molienda con metanol (5 mL) y los productos fueron purificados por cromatografía en columna usando sílica gel como fase estacionaria y una mezcla de hexano y

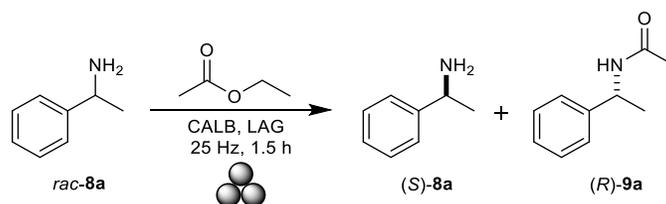
acetato de etilo (9:1) como fase móvil. Los compuestos puros fueron analizados por HPLC con columna de fase estacionaria quiral; de esta forma, la diferencia de área de cada pico obtenido mediante el análisis de HPLC se empleó para calcular el exceso enantiomérico de cada compuesto (ver parte experimental). El proceso biocatalítico procedió con alta enantioselectividad hacia la forma (*R*) del sustrato racémico, obteniéndose un producto de biocatálisis enantiopuro ($\%ee_{(R)-9a} > 99\%$) con un valor de enantiopreferencia alto ($E > 200$, Ec. 7). No obstante, el exceso enantiomérico para la amina enantioenriquecida recuperada ($\%ee_{(S)-8a} = 30\%$) y la conversión de la reacción ($c = 23\%$, Ec. 6) indicaron que la biotransformación no fue completa (Esquema 9). Así, aunque esta primera prueba puso de manifiesto la capacidad de la técnica mecanoenzimática para conducir un proceso biocatalítico con alta estereoespecificidad, fue necesario optimizar los parámetros del proceso para incrementar la conversión de la reacción y de esta forma separar eficientemente la mezcla racémica.

Con el objetivo de evaluar el efecto energético de la frecuencia y tiempo de molienda se llevaron a cabo reacciones adicionales modificando estos parámetros de reacción. Sin embargo, es importante mencionar que el equipo vibracional empleado durante el desarrollo experimental presenta restricciones operacionales, restringiendo la frecuencia máxima del equipo a 25 Hz (la frecuencia operacional del equipo de molienda utilizado es de 3 a 25 Hz) y el tiempo de molienda continua está limitado a 90 minutos. Así, una disminución en la frecuencia de molienda a 15 Hz, manteniendo el tiempo de molienda continua a 90 minutos ($\%ee_{(S)-8a} = 31\%$, $\%ee_{(R)-9a} > 99\%$, $c = 24\%$, $E > 200$) o una disminución en el tiempo de reacción a 1 hora manteniendo la máxima frecuencia operacional ($\%ee_{(S)-8a} = 26\%$, $\%ee_{(R)-9a} > 99\%$, $c = 21\%$, $E > 200$) no afecta considerablemente la conversión y enantiopreferencia de la reacción, aunque sí el rendimiento del producto obtenido ($\text{rdto}_{(R)-9a, 25\text{Hz}, 1.5\text{h}} = 32\%$, $\text{Rdto}_{(R)-9a, 15\text{Hz}, 1.5\text{h}} = 21\%$, $\text{Rdto}_{(R)-9a, 25\text{Hz}, 1\text{h}} = 20\%$). En consecuencia, se decidió emplear la máxima frecuencia del equipo (25 Hz) durante el máximo tiempo posible (90 minutos).

De manera similar, aunque el agente acilante se empleó en la práctica como LAG en la reacción, se decidió incluir un LAG adicional para optimizar el proceso (Tabla 4). Inesperadamente, se encontró que la adición de un aditivo LAG al medio de reacción dificulta la biotransformación, disminuyendo la conversión y el rendimiento del proceso.

Ante la imposibilidad de optimizar la reacción mecanoenzimática modificando los parámetros de reacción, se optó por realizar cambios en los reactivos empleados para llevar a cabo la biocatálisis. En particular, se investigó el uso de agentes acilantes más eficientes.¹⁷ Primeramente, se intercambié el acetato de etilo por acetato de isopropilo en la reacción (Tabla 5). En la ausencia de disolvente no existe una diferencia significativa entre el uso de acetato de etilo o de isopropilo (comparar ensayo 1 en las Tabla 4 y 5), obteniéndose prácticamente el mismo valor de la enantiopureza en la amina recuperada (*S*)-**8a**.

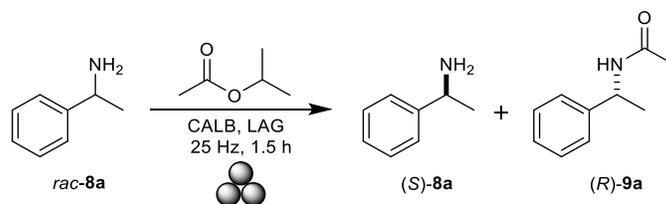
Tabla 4. Evaluación del LAG en la desimetrización de aminas racémicas.



ensayo ^a	LAG ^b	(S)-8a		(R)-9a		c ^d (%)	E ^e
		Rdto (%)	ee (%) ^c	Rdto (%)	ee (%) ^c		
1	-	55	30	32	> 99	23	> 200
2	2M2B	81	10	10	> 99	9	> 200
3	DIPE	77	10	16	> 99	9	> 200
4	dioxano	78	17	16	> 99	15	> 200
5	tolueno	80	13	13	> 99	12	> 200

^aLas reacciones se llevaron a cabo empleando activación mecánica a 25 Hz por 1.5 h. ^bSe emplearon 0.2 mL de cada disolvente como LAG. ^cDeterminado después del proceso de purificación usando HPLC y empleando columna con fase estacionaria quiral. ^dCalculada empleando la Ecuación 6. ^eCalculada empleando la Ecuación 7. 2M2B = 2-metil-2-butanol. DIPE = Éter diisopropílico.

Tabla 5. Evaluación del LAG en la desimetrización de aminas racémicas, utilizando acetato de isopropilo como agente acilante.



ensayo ^a	LAG ^b	(S)-8a		(R)-9a		c ^d (%)	E ^e
		Rdto (%)	ee (%) ^c	Rdto (%)	ee (%) ^c		
1	-	62	30	25	> 99	23	> 200
2 ^f	-	70	30	21	> 99	23	> 200
3 ^g	-	63	60	33	> 99	38	> 300
4	2M2B	70	41	24	> 99	29	> 200
5	DIPE	43	39	38	> 99	28	> 200
6	dioxano	45	78	40	> 99	44	> 400
7	tolueno	61	65	32	> 99	40	> 300

^aLas reacciones se llevaron a cabo empleando activación mecánica a 25 Hz por 1.5 h, a menos que se especifique otra condición. ^bSe emplearon 0.2 mL de cada disolvente como LAG. ^cDeterminado después del proceso de purificación usando HPLC y empleando columna con fase estacionaria quiral. ^dCalculada empleando la Ecuación 6. ^eCalculada empleando la Ecuación 7. ^fSe emplearon 15 Hz como frecuencia de reacción. ^gEl proceso se llevó a cabo por 1 h. 2M2B = 2-metil-2-butanol. DIPE = Éter diisopropílico.

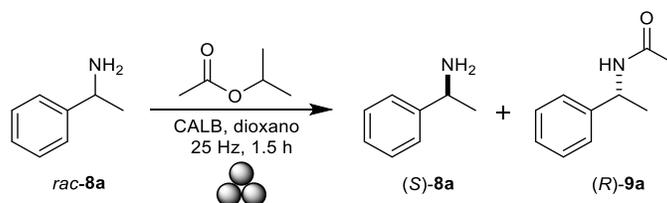
Sin embargo, cuando se adicionó LAG a la reacción se observó un incremento en el exceso enantiomérico de (S)-8a, alcanzando un 78% cuando se empleó dioxano, un disolvente parcialmente “verde”, incrementando igualmente la conversión (c = 44%) y la enantioselectividad (E > 400) del sistema (ensayo 6).

Dos agentes acilantes adicionales, acetato de isopropenilo y metoxiacetato de metilo, fueron analizados en el proceso mecanoenzimático. Cuando se empleó el primero de ellos se obtuvo el producto de la biocatálisis racémico en 80% de rendimiento. Finalmente, cuando se analizó el segundo agente acilante la reacción de resolución no presentó avance alguno.

Como alternativa a la evaluación de agentes acilantes, se decidió modificar el material de molienda. En este sentido, se estudiaron contenedores y bolas de diferentes materiales en la reacción empleando acetato de isopropilo como agente acilante. Cuando se intercambió el recipiente y las bolas de ágata por componentes de acero inoxidable, la reacción procedió con la misma enantiopureza para el producto de biocatálisis ($\%ee_{(R)-9a} > 99\%$) y enantioselectividad ($E > 300$). No obstante, la conversión y rendimiento del producto acilado no presentó mejoría ($\%c = 28\%$ y $Rdto = 30\%$). Inesperadamente, cuando el reactor de ágata fue intercambiado por uno de polimetilmetacrilato y las bolas de ágata fueron reemplazadas por balines de acero inoxidable la reacción no procedió.

Finalmente, con el propósito de estudiar el efecto de la carga del agente acilante y del biocatalizador, se realizaron experimentos adicionales empleando las mejores condiciones encontradas hasta este punto (ensayo 6 en la Tabla 5), pero modificando las cantidades de los componentes de reacción (Tabla 6).

Tabla 6. Evaluación de la carga del agente acilante y del biocatalizador en la desimetrización mecanoenzimática.



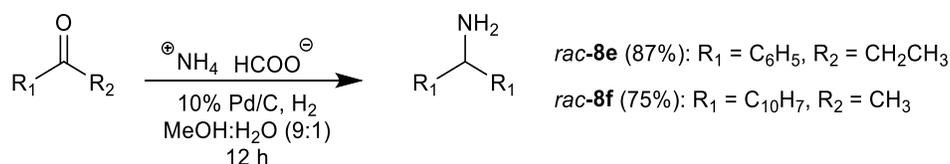
ensayo ^a	(S)-8a		(R)-9a		c ^c (%)	E ^d
	Rdto (%)	ee (%) ^b	Rdto (%)	ee (%) ^b		
1 ^e	60	39	32	>99	28	>200
2 ^f	45	54	40	>99	35	>300
3 ^g	60	36	30	>99	27	>200
4 ^h	40	55	42	>99	36	>300

^aLas reacciones se llevaron a cabo empleando activación mecánica a 25 Hz por 1.5 h, así como 100mg de N435, 6 equiv. de acetato de isopropilo y 0.2 mL de dioxano, a menos que se especifique otra condición. ^bDeterminado después del proceso de purificación usando HPLC y empleando columna con fase estacionaria quiral. ^cCalculada empleando la Ecuación 6. ^dCalculada empleando la Ecuación 7. ^eSe emplearon 4 equiv. de agente acilante. ^fSe emplearon 8 equiv. de agente acilante. ^gSe emplearon 75 mg de N435. ^hSe emplearon 125 mg de N435.

Se puede concluir que las condiciones óptimas encontradas conducen al enantioenriquecimiento de la amina (S)-8a, y a la separación enantioselectiva de

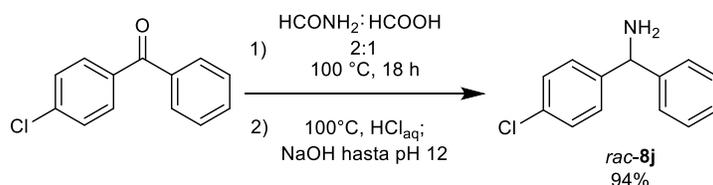
la amida (*R*)-**9a**, con valores considerablemente altos de conversión química y enantioselectividad (entrada 6 en la Tabla 5, %*c* = 44, *E* >> 400). Así, se decidió explorar estas condiciones en la resolución de diferentes aminas racémicas.

Aunque la mayoría de las aminas racémicas estudiadas fueron adquiridas comercialmente, los sustratos racémicos *rac*-**8e** y *rac*-**8f** fueron sintetizados a través de aminación reductiva (Esquema 10).¹⁸



Esquema 10. Aminación reductiva de cetonas para obtener las aminas racémicas *rac*-**8e-f**.

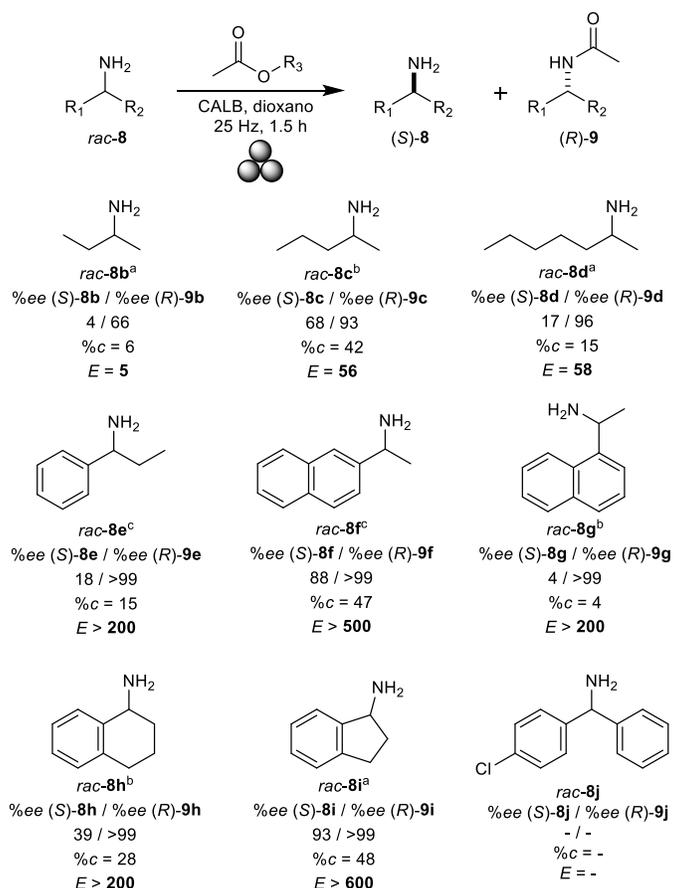
Por otro lado, el sustrato *rac*-**8j**, fue sintetizado a través de una metodología alterna de aminación (Esquema 11).¹⁹



Esquema 11. Obtención de la amina *rac*-**8j**.

El proceso mecanoenzimático de resolución presentó resultados variados de acuerdo con el tipo de sustrato utilizado. Debe notarse que se muestra el resultado obtenido de la resolución empleando el mejor agente acilante para cada caso y que el proceso de purificación y análisis procedió como en el sustrato modelo (Esquema 12). Por un lado, cuando se intercambié el grupo aromático por una cadena alifática en *rac*-**8b-d**, el producto acilado (*R*)-**9** se obtuvo con menor enantioselectividad. Sin embargo, cuando se incrementó el tamaño de la cadena hidrocarbonada se observó una tendencia a que la enantioselectividad aumente, aunque, con una pérdida considerable en conversión (*ee*_{(*R*)-**9d**} = 96%, *c* = 15%). Un efecto similar al observado durante la resolución de β-amino ésteres (ver capítulo I en esta tesis). En contraste, con los sustratos *rac*-**8e-i** se obtuvieron productos prácticamente enantiopuros (*ee* > 99%) con conversiones que van de moderadas a buenas. Esto se aprecia especialmente con el sustrato racémico *rac*-**8i**

(Esquema 12). La resolución cinética del sustrato *rac-8i* se llevó a cabo de manera excepcional, obteniéndose el producto acilado enantiopuro ($ee_{(R)-9i} > 99\%$) y la amina recuperada altamente enantioenriquecida ($ee_{(S)-8i} = 93\%$), con una conversión casi ideal ($c = 48\%$) en un proceso altamente enantiopreferente ($E > 600$). Cabe destacar también que se empleó un disolvente verde (acetato de etilo) como agente acilante. Desafortunadamente, cuando el proceso biocatalítico se llevó a cabo con el sustrato *rac-8j* se obtuvo un producto racémico, posiblemente debido a la similitud entre los sustituyentes aromáticos que impiden la correcta diferenciación de los enantiómeros en la mezcla racémica.

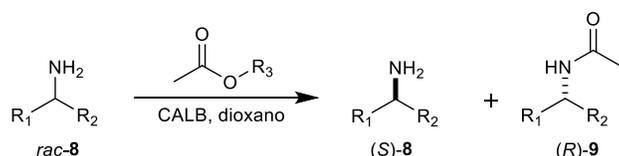


Esquema 12. Resolución cinética de una familia de aminas racémicas vía activación mecanoenzimática. ^aEmpleando acetato de etilo como agente acilante. ^bEmpleando acetato de isopropilo como agente acilante. ^cEmpleando acetato de isopropenilo como agente acilante

Con el objetivo de comparar diversas estrategias en la desimetrización de aminas racémicas (mecanoquímica *versus* reacción en solución a temperatura ambiente *versus* reacción en solución a reflujo) se decidió llevar a cabo el proceso de

resolución mediante tres técnicas distintas, adicionales a la antes descrita (Esquema 12). La primera, a través de una reacción en solución a 55 °C por 1.5 h; la segunda, a través de una reacción en solución a 80 °C por 1.5 h y, por último, aplicando calentamiento a 80 °C por 8 h, empleando el mejor agente acilante encontrado para cada caso (Tabla 7).

Tabla 7. Resolución enzimática de aminas quirales empleando condiciones convencionales de agitación y temperatura.



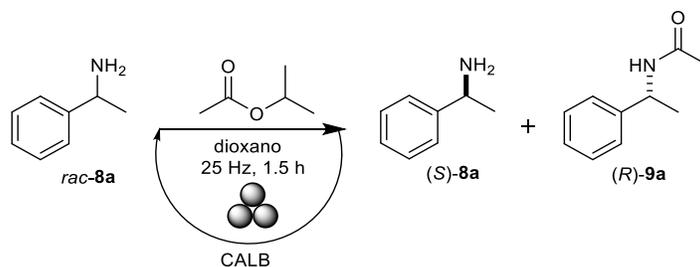
ensayo ^a	Amina	Agente acilante	tiempo (h)	temperatura (°C)	(S)-8		(R)-9		c ^c (%)	E ^d
					Rdto (%)	ee (%) ^b	Rdto (%)	ee (%) ^b		
1	<i>rac-8a</i>	AIPr	1.5	55	60	7	21	99	7	>200
2	<i>rac-8a</i>	AIPr	1.5	80	54	11	27	89	11	19
3	<i>rac-8a</i>	AIPr	8	80	46	10	29	92	10	26
4	<i>rac-8b</i>	AE	1.5	55	86	<i>rac</i>	-	-	-	-
5	<i>rac-8b</i>	AE	1.5	80	32	<i>rac</i>	15	<i>rac</i>	-	-
6	<i>rac-8b</i>	AE	8	80	30	<i>rac</i>	22	<i>rac</i>	-	-
7	<i>rac-8c</i>	AIPr	1.5	55	93	<i>rac</i>	-	-	-	-
8	<i>rac-8c</i>	AIPr	1.5	80	76	<i>rac</i>	trazas	-	-	-
9	<i>rac-8c</i>	AIPr	8	80	56	<i>rac</i>	trazas	-	-	-
10	<i>rac-8d</i>	AE	1.5	55	80	<i>rac</i>	trazas	-	-	-
11	<i>rac-8d</i>	AE	1.5	80	76	<i>rac</i>	trazas	-	-	-
12	<i>rac-8d</i>	AE	8	80	74	<i>rac</i>	trazas	-	-	-
13	<i>rac-8e</i>	AIPrn	1.5	55	97	<i>rac</i>	-	-	-	-
14	<i>rac-8e</i>	AIPrn	1.5	80	95	<i>rac</i>	-	-	-	-
15	<i>rac-8e</i>	AIPrn	8	80	93	<i>rac</i>	-	-	-	-
16	<i>rac-8f</i>	AIPrn	1.5	55	54	65	39	98	40	195
17	<i>rac-8f</i>	AIPrn	1.5	80	50	70	41	98	42	>200
18	<i>rac-8f</i>	AIPrn	8	80	48	91	46	98	48	>300
19	<i>rac-8g</i>	AIPrn	1.5	55	76	7	12	98	7	>100
20	<i>rac-8g</i>	AIPrn	1.5	80	82	9	14	84	10	13
21	<i>rac-8g</i>	AIPrn	8	80	62	23	27	96	19	61
22	<i>rac-8h</i>	AIPrn	1.5	55	86	<i>rac</i>	trazas	-	-	-
23	<i>rac-8h</i>	AIPrn	1.5	80	76	<i>rac</i>	trazas	-	-	-
24	<i>rac-8h</i>	AIPrn	8	80	63	34	37	80	30	13
25	<i>rac-8i</i>	AE	1.5	55	70	28	28	88	24	21
26	<i>rac-8i</i>	AE	1.5	80	62	46	34	87	35	23
27	<i>rac-8i</i>	AE	8	80	80	<i>rac</i>	12	69	-	-
28	<i>rac-8j</i>	AIPrn	1.5	55	89	<i>rac</i>	6	<i>rac</i>	-	-
29	<i>rac-8j</i>	AIPrn	1.5	80	60	<i>rac</i>	32	<i>rac</i>	-	-
30	<i>rac-8j</i>	AIPrn	8	80	62	<i>rac</i>	24	<i>rac</i>	-	-

^aLas reacciones se llevaron a cabo mediante agitación magnética y calentamiento a 55°C por 1.5 h, así como 100mg de N435, 6 equiv. del mejor agente acilante y 5 mL de dioxano, a menos que se especifique otra condición. ^bDeterminado después del proceso de purificación usando HPLC empleando columna con fase estacionaria quiral. ^cCalculada empleando la Ecuación 6. ^dCalculada empleando la Ecuación 7. AE= Acetato de Etilo. AIPr= Acetato de Isopropilo. AIPrn= Acetato de Isopropenilo.

Los resultados obtenidos demuestran con claridad las ventajas de la técnica mecanoenzimática sobre las condiciones de calentamiento en solución (Tabla 7). En particular, esto se aprecia en los resultados de la desimetrización del sustrato racémico *rac-8a*, en donde la enantioselectividad del sistema varía sustancialmente (comparar el ensayo 6, Tabla 5, $E_{\text{mecanoenzimática}} \gg 400$ y el ensayo 1, Tabla 7, $E_{\text{solución}} > 200$). Además, la resolución de los sustratos *rac-8b-e* resultó inviable cuando se realizó el procedimiento en solución (ensayos 4-15, Tabla 7). Finalmente, el resultado de la resolución de las aminas *rac-8f-i* fue superior cuando se llevó a cabo el proceso mecanoenzimático respecto a los procedimientos en solución con calentamiento (comparar Esquema 12 con ensayos 4-27 de la Tabla 7). Este efecto se aprecia claramente en el proceso resolutivo del sustrato *rac-8i*, que alcanza un valor de E superior a 600 cuando el proceso de resolución se llevó a cabo mecanoquímicamente, en comparación con los procesos en solución (ensayos 25-27) que alcanzaron un valor de E máximo de 23.

Para evaluar la recuperabilidad y escalamiento del proceso de desimetrización se llevaron a cabo reacciones adicionales (Tabla 8 y Esquema 13, respectivamente).

Tabla 8. Evaluación de la recuperabilidad del biocatalizador en la resolución de aminas racémicas.



ensayo ^a	ciclo de recuperación ^b	(S)-8a		(R)-8a		c ^d (%)	E
		Rdto (%)	ee ^c (%)	Rdto (%)	ee ^c (%)		
1	-	56	78	40	>99	44	>400
2	1	65	52	30	>99	34	>300
3	2	85	17	15	>99	15	>200
4	3	-	-	trazas	-	-	-

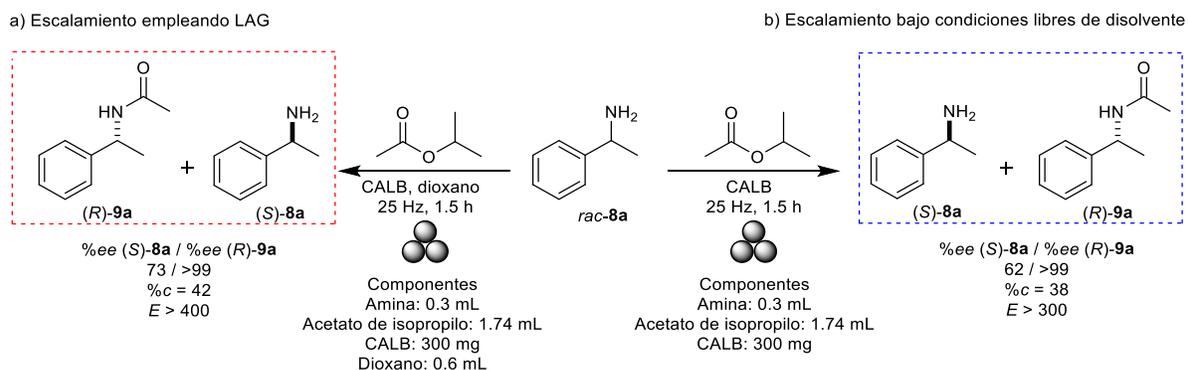
^aLas reacciones se llevaron a cabo empleando activación mecánica a 25 Hz por 1.5 h usando 0.2 mL de dioxano. ^bN435 fue recuperada por centrifugación después de cada ciclo catalítico y secada a temperatura ambiente a presión reducida.

^cDeterminado después del proceso de purificación usando HPLC y empleando columna con fase estacionaria quiral.

^dCalculada empleando la Ecuación 6. ^eCalculada empleando la Ecuación 7.

De igual forma que cuando se recupera y reutiliza el biocatalizador en la resolución mecanoenzimática de β -aminoésteres (ver el capítulo I), CALB inmovilizada presentó una menor actividad enzimática después de cada ciclo catalítico, disminuyendo la conversión y la enantioselectividad del sistema. No obstante, no existe pérdida de enantioselectividad ($ee_{(R)-9a} > 99\%$) por parte de la

enzima recuperada, presumiblemente debido a la alta estereoselectividad de CALB que no se ve afectada por el efecto de la activación mecánica. En contraste, la enantiopreferencia del sistema puede decaer como consecuencia de la disminución en enantiopureza de la amina recuperada. Así, no queda claro si la fuerza mecánica en la molienda es responsable de la inactivación enzimática de CALB por efecto destructivo del soporte o si existe algún otro mecanismo de inactivación que aún debe establecerse. Este dilema se discutirá en el capítulo III de esta tesis.



Esquema 13. Escalamiento del proceso resolutorio mecanoenzimático.

Por otro lado, el escalamiento de la reacción multiplicando por tres veces la cantidad utilizada de todos los componentes (Esquema 13a, ver también la parte experimental) muestra un comportamiento similar a la reacción modelo, en donde la enantiopureza del producto de biocatálisis es alta ($ee_{(R)\text{-}9a} > 99\%$), obteniéndose un procedimiento altamente enantiopreferente ($E > 400$), aunque con una muy ligera pérdida de exceso enantiomérico para el producto (S)-8a. Lamentablemente, cuando esta reacción se condujo bajo condiciones libres de disolvente (Esquema 13b) existe una ligera pérdida en la enantiopureza de la amina enantioenriquecida, disminuyendo los valores de conversión y de enantiopreferencia. Sin embargo, en ambos casos el procedimiento es exitoso al obtenerse un producto enantiopuro ($ee_{(R)\text{-}9a} > 99\%$).

4.3 Resolución de aminas quirales enfocada a la preparación de un ingrediente farmacéutico activo comercial enantiopuro: (R)-Rasagilina.

Como se mencionó en la introducción de este capítulo, las aminas quirales son bloques de construcción de gran relevancia en el ámbito farmacéutico. La síntesis

y aislamiento de aminas quirales con alta pureza enantiomérica es de vital importancia para llevar a cabo estudios biológicos que permitan identificar la actividad farmacológica de los enantiómeros por separado. Esto permite determinar si ambos enantiómeros son responsables del efecto biológico observado, antes de llevar a cabo el estudio de las propiedades farmacológicas completas del fármaco (como son la farmacocinética, farmacodinamia y biodisponibilidad, entre otras). En este sentido, puede definirse al enantiómero con mayor actividad biológica como el *eutómero* ($\epsilon\upsilon$ =bueno, $\mu\epsilon\rho\omicron\zeta$ = parte), mientras que el enantiómero con menor o nula actividad suele denominarse *distómero* ($\delta\upsilon\zeta$ =malo, $\mu\epsilon\rho\omicron\zeta$ = parte).²⁰

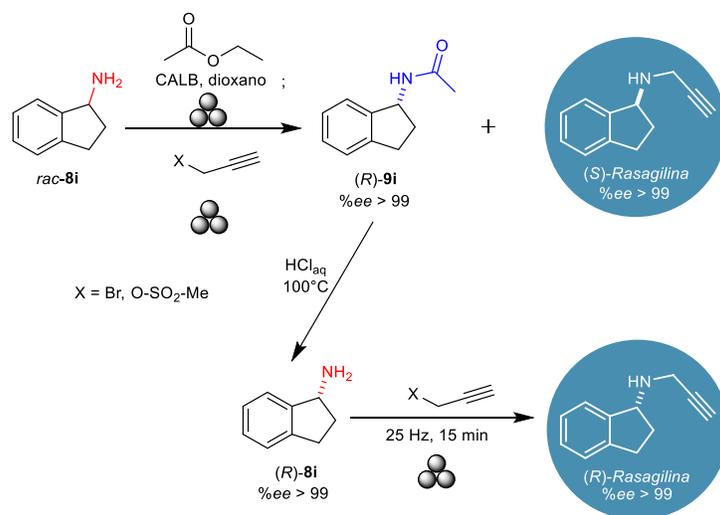
De esta forma, y considerando los beneficios que se obtienen al llevar a cabo la desimetrización de mezclas racémicas mediante la estrategia mecanoenzimática, se decidió explorar dicha ruta para la obtención del eutómero de un ingrediente farmacéutico activo empleando activación mecánica y biocatálisis.

La resolución mecanoenzimática del sustrato *rac-8i* procede eficientemente, obteniéndose una amina altamente enantioenriquecida ($ee_{(S)-8i} = 93\%$) y un producto acilado enantiopuro ($ee_{(R)-9i} > 99\%$, Esquema 12). Es decir, pueden aislarse ambos enantiómeros después del proceso mecanoenzimático. La forma (*R*) del sustrato *rac-8i* es precursora de un ingrediente farmacéutico activo, la (*R*)-Rasagilina (eutómero), que es usada en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson debido a su capacidad para inhibir irreversiblemente a la monoamino oxidasa B, permitiendo una mejora sustancial en las complicaciones neuronales en los pacientes con esta enfermedad.^{21,22}

En este contexto, se han descrito ya varios métodos en solución para la síntesis asimétrica de Rasagilina.²³⁻²⁵ En este trabajo, se diseñó una estrategia para la desimetrización mecanoenzimática del sustrato *rac-8i* que permitió la obtención de ambas formas enantioméricamente puras del fármaco (Esquema 14).

La síntesis de (*R*)-Rasagilina se realizó siguiendo el esquema de resolución mecanoenzimático empleando el sustrato racémico *rac-8i*, 6 equivalentes de acetato de etilo como agente acilante, dioxano como LAG y activación mecánica a 25 Hz por 90 minutos. Una vez terminado el tiempo de reacción se adicionaron 2 equivalentes de mesilato de propargilo (o bromuro de propargilo) y la mezcla de reacción se agitó a 25 Hz de frecuencia por 15 minutos. Por último, el contenido del reactor fue extraído y la mezcla se purificó por cromatografía en columna usando sílica gel como fase estacionaria y hexano y acetato de etilo (9:1) como fase móvil. Mediante este proceso se obtuvo un producto de acilación que fue analizado por HPLC con columna de fase quiral para evaluar la enantiopureza del producto, obteniéndose una amida enantiopura ($ee_{(R)-9i} > 99\%$) así como la forma (*S*) del fármaco Rasagilina también enantiopura ($ee_{(S)-Rasagilina} > 99\%$).

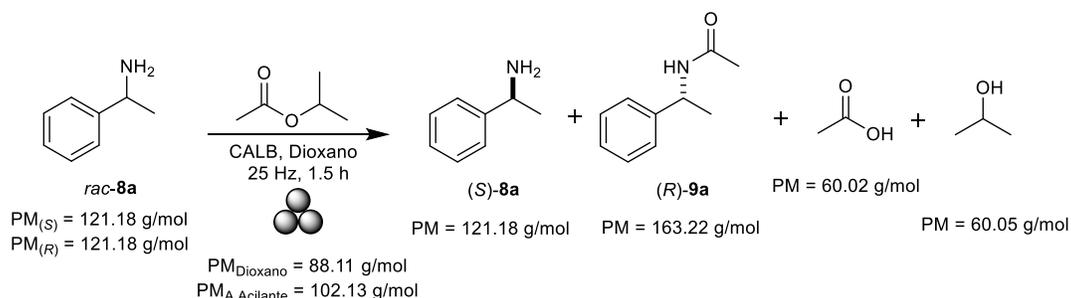
A continuación, se procedió a liberar la amina del producto acilado (*R*)-**9i** sometándolo a reflujo con HCl_(aq). Una vez que se obtuvo la amina libre (*R*)-**8i**, se trató bajo agitación mecánica con 2 equivalentes de mesilato de propargilo para así obtener el eutómero del fármaco, la (*R*)-Rasagilina en forma enantiopura. A través de este proceso, se logró obtener las dos formas enantioméricamente puras del ingrediente farmacéutico activo en 46% de rendimiento para la forma (*S*) y en 44% de rendimiento para la forma (*R*), con una conversión final ideal ($c \approx 50\%$), en un proceso altamente enantiopreferente ($E \gg 500$).



Esquema 14. Síntesis asimétrica de (*R*)- y (*S*)-Rasagilina a través de una técnica mecanoenzimática.

4.4 Medición de *EA* y del factor-*E* en la resolución mecanoenzimática de aminas racémicas.

El cálculo de la *EA* y del factor-*E* para la desimetrización mecanoenzimática de aminas racémicas se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente (capítulo I), considerando a la amina enantioenriquecida y al producto acilado como productos de la reacción e incluyendo ambas formas enantioméricas del sustrato como materias primas. De esta forma, para el proceso optimizado de resolución (ensayo 5 en la Tabla 6), se empleó el sustrato *rac*-**8a** (96.5 mg), 6 equivalentes (502 mg) de acetato de isopropenilo como agente acilante y dioxano (206 mg) como LAG (omitiendo la carga del biocatalizador debido a que es recuperable). Los productos fueron (*S*)-**8a** (43.4 mg) y (*R*)-**9a** (26.7 mg) y se asumió que solo 0.4 equivalentes de agente acilante se consumen en el proceso de desimetrización, debido a la conversión obtenida ($c \approx 40\%$). Además, se consideran los 5 mL de metanol necesarios para la extracción de los productos. Así, las Ecuaciones 1 y 2 pueden desarrollarse con ayuda del Esquema 15.



Esquema 15. Reacción modelo para el cálculo de la *EA* y el factor-*E*.

$$EA = \frac{121.18 \frac{g}{mol} + 163.22 \frac{g}{mol}}{121.18 \frac{g}{mol} + 121.18 \frac{g}{mol} + 88.11 \frac{g}{mol} + 102.13 \frac{g}{mol}} * 100 \approx 65\%$$

$$factor E = \frac{206 \text{ mg} + 275.61 \text{ mg} + 275.74 \text{ mg} + 3960 \text{ mg}}{43.4 \text{ mg} + 26.7 \text{ mg}} = 67$$

Obteniéndose buenos valores de *EA* (65%) y de factor-*E* (67) para la desimetrización de aminas.

4.5 Conclusiones

Se logró extender a aminas quirales racémicas la técnica mecanoenzimática resolutive, que previamente había sido empleada en la resolución de β -aminoésteres quirales (capítulo I). La técnica de desimetrización mecanoenzimática de aminas quirales racémicas procedió con éxito, habiendo optimizado componentes claves como son el aditivo LAG y el agente acilante. El amplio alcance de esta estrategia mecanoenzimática se confirmó al resolver satisfactoriamente una serie representativa de aminas quirales racémicas. Simultáneamente, se demostró la superioridad de la técnica mecanoenzimática por sobre las técnicas convencionales en solución. Así mismo, cuando se evaluó la recuperabilidad del catalizador fue posible constatar que la enantioselectividad del producto biocatalítico se mantuvo constante. Este resultado sugiere que el proceso de molienda no es lo suficientemente destructivo como para interferir con la estereoselectividad de la enzima CALB. Finalmente, la técnica de resolución mecanoenzimática fue usada en la síntesis eficiente y sustentable del ingrediente farmacéutico activo comercial (*R*)-Rasagilina, demostrando la viabilidad de la técnica en síntesis orgánica asimétrica de compuestos farmacológicamente activos.

Referencias.

- 1.- Ghislieri, D.; Turner, N. J. Biocatalytic Approaches to the Synthesis of Enantiomerically Pure Chiral Amines. *Top. Catal.* **2014**, *57*, 284-300.
- 2.- Nguyen, L. A.; He, H.; Pham-Huy, C. Chiral Drugs: An Overview. *Int. J. Biomed. Sci.* **2006**, *2*, 85-100.
- 3.- Uematsu, N.; Fujii, A.; Hashiguchi, S.; Ikariya, T.; Noyori, R. Asymmetric Transfer Hydrogenation of Imines. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4916-4917.
- 4.- Liang, C.; Collet, F.; Robert-Peillard, F.; Müller, P.; Dodd, R. H.; Dauban, P. Toward a Synthetically Useful Stereoselective C-H Amination of Hydrocarbons. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 343-350.
- 5.- Reznichenko, A. L.; Hultsch, K. C. C_2 -Symmetric Zirconium Bis (Amidate) Complexes with Enhanced Reactivity in Aminoalkene Hydroamination. *Organometallics.* **2010**, *29*, 24-27.
- 6.- Sun, H.; Zhang, H.; Ang, E. L.; Zhao, H. Biocatalysis for the Synthesis of Pharmaceuticals and Pharmaceutical Intermediates. *Bioorg. Med. Chem.* **2018**, *26*, 1275-1284.
- 7.- Ghislieri, D.; Green, A. P.; Pontini, M.; Willies, S. C.; Rowles, I.; Frank, A.; Grogan, G.; Turner, N. J. Engineering and Enantioselective Amine Oxidase for the Synthesis of Pharmaceutical Building Blocks and Alkaloid Natural Products. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10863-10869.
- 8.- Mitsukura, K.; Kuramoto, T.; Yoshida, T.; Kimoto, N.; Yamamoto, H.; Nagasawa, T. A NADPH-dependent (S)-imine Reductase (SIR) from *Streptomyces* Sp. GF3546 for Asymmetric Synthesis of Optically Active Amines: Purification, Characterization, Gene Cloning, and Expression. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 8079-8086.
- 9.- Kelly, S. A.; Pohle, S.; Wharry, S.; Mix, S.; Allen, C. C. R.; Moody, T. S.; Gilmore, B. F. Application of ω -Transaminases in the Pharmaceutical Industry. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 349-367.
- 10.- Patil, M. D.; Grogan, G.; Bommarius, A.; Yun, H. Recent Advances in ω -Transaminase-Mediated Biocatalysis for the Enantioselective Synthesis of Chiral Amines. *Catalysts* **2018**, *8*, 254.
- 11.- Smidt, H.; Fischer, A.; Fischer, P.; Schmid, R. D. Preparation of optically pure chiral amines by lipase-catalyzed enantioselective hydrolysis of *N*-acyl-amines. *Biotechnol. Tech.* **1996**, *10*, 335-338.
- 12.- Ismail, H.; Lau, R. M.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. Fully Enzymatic Resolution of Chiral Amines: Acylation and Deacylation in the Presence of *Candida antarctica* Lipase B. *Adv. Synth. Catal.* **2008**, *350*, 1511-1516.
- 13.- Seddigi, Z. S.; Malik, M. S.; Ahmed, S. A.; Babalghith, A. O.; Kamal, A. Lipases in asymmetric transformations: Recent advances in classical kinetic resolution and lipase-metal combinations for dynamic processes. *Coord. Chem. Rev.* **2017**, *348*, 54-70.

-
- 14.- Lima, R. N.; dos Anjos, C. S.; Orozco, E. V. M.; Porto, A. L. M. Versatility of *Candida antarctica* lipase in the amide bond formation applied in organic synthesis and biotechnological processes. *Mol. Catal.* **2019**, *466*, 75-105.
- 15.- Gustafson, K. P. J.; Görbe, T.; de Gonzalo-Calvo, G.; Yuan, N.; Schreiber, C. L.; Shchukarev, A.; Tai, C.-W.; Persson, I.; Zou, X.; Bäckvall, J.-E. Chemoenzymatic Dynamic Kinetic Resolution of Primary Benzylic Amines using Pd⁰-CalB CLEA as a Biohybrid Catalyst. *Chem. Eur. J.* **2019**, *25*, 9174-9179.
- 16.- Musa, M. M. Enzymatic racemization of alcohols and amines: An approach for bi-enzymatic dynamic kinetic resolution. *Chirality* **2020**, *32*, 147-157.
- 17.- Pelagalli, R.; Chiarotto, I.; Feroci, M.; Vecchio, S. Isopropenyl acetate, a remarkable, cheap and acylating agent of amines under solvent- and catalyst-free conditions: a systematic investigation. *Green Chem.* **2012**, *14*, 2251-2255.
- 18.- Allegretti, M.; Berdini, V.; Cesta, M. C.; Curti, R.; Nicoli, L.; Topai, A. One-pot, new stereoselective synthesis of *endo*-tropanamine. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4257-4259.
- 19.- Dalmolen, J.; Tiemersma-Wegman, T. D.; Nieuwenhuijzen, J. W.; van der Sluis, M.; van Echten, E.; Vries, T. R.; Kaptein, B.; Broxterman, Q. B.; Kellogg, R. M. The Dutch Resolution Variant of the Classical Resolution of Racemates by Formation of Diastereomeric Salts: Family Behavior in Nucleation Inhibition. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 5619-5624.
- 20.- Lehmann, P. A.; Rodriguez de Miranda, J. F.; Ariëns, E. J. Stereoselectivity and Affinity in Molecular Pharmacology en *Progress in Drug Research*, Vol. 20, Birkhäuser, Basel, **1978**.
- 21.- Finberg, J. P. M.; Lamensdorf, I.; Commissiong, J. W.; Youdim, M. B. H. Pharmacology and neuroprotective properties of rasagiline. *J. Neural Transm. (Suppl.)* **1996**, *48*, 95-101.
- 22.- Youdim, M. B. H.; Gross, A.; Finberg, J. P. M. Rasagiline [N-propargyl-1R(+)-aminoindan], a selective and potent inhibitor of mitochondrial monoamine oxidase B. *Br. J. Pharmacol.* **2001**, *132*, 500-506.
- 23.- Ma, G.; Xu, Z.; Zhang, P.; Liu, J.; Hao, X.; Ouyang, J. Liang, P.; You, S.; Jia, X. A Novel Synthesis of Rasagiline via a Chemoenzymatic Dynamic Kinetic Resolution. *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18*, 1169-1174.
- 24.- Fonseca, T. de S.; da Silva, M. R.; de Oliveira, M. da C. F.; de Lemos, T. L. G.; Marques, R. de A.; de Mattos, M. C. Chemoenzymatic synthesis of rasagiline mesylate using lipases. *Appl. Catal. A Gen.* **2015**, *492*, 76-82.
- 25.- Matzel, M.; Gand, M.; Höhne, M. One-pot asymmetric synthesis of (*R*)- and (*S*)-rasagiline by reductive amination applying imine reductases. *Green Chem.* **2017**, *19*, 385-389.

5 Capítulo III

**Estabilidad térmica y mecánica de CALB
inmovilizada: Una aproximación para
cuantificar la energía mecanoquímica
generada empleando catálisis enzimática**

5.1 Medición de la energía mecánica que se genera en una reacción mecanoquímica

Durante el desarrollo de los capítulos I y II de este trabajo fue posible evaluar el uso de la fuerza mecánica producida por molienda de bolas de alta velocidad en reacciones de resolución cinética empleando CALB inmovilizada (N435), permitiendo la obtención de productos con alta pureza enantiomérica en cortos periodos de tiempo y cumpliendo con los doce principios de la química verde. Los resultados de estos procedimientos han confirmado la viabilidad de esta estrategia para llevar a cabo reacciones en síntesis enantioselectiva y han evidenciado la versatilidad de las nuevas metodologías mediadas por activación mecánica para realizar transformaciones enzimáticas con buenos resultados.

Sin embargo, hasta ahora los métodos mecanoenzimáticos descritos aquí solo se han explorado de una manera empírica, es decir buscando el desarrollo de aplicaciones que permitan la obtención de productos de interés. En particular se ha postergado el estudio de las características inherentes al sistema mecanoquímico incluyendo la evaluación de, por ejemplo, la energía que se genera dentro del reactor de molienda, así como el mecanismo por el cual esa energía se transfiere al sistema, las pérdidas energéticas que existen debido a que el sistema no es cerrado ni hermético, entre otras.

El estudio térmico de una reacción mediada por activación mecánica resulta en un procedimiento complejo en donde debe considerarse la cantidad y estado físico de los reactivos y disolventes usados, la frecuencia y tiempo de duración de la molienda, así como la configuración del equipo. De la misma forma, debe estudiarse la composición del recipiente en donde se lleva a cabo el proceso y el material de los accesorios empleados para producir la activación mecanoquímica. Por tanto, aun cuando existan en la literatura estimados aproximados de la energía térmica que se genera en una reacción mecanoquímica, esos datos no pueden emplearse universalmente para anticipar las condiciones experimentales de otras transformaciones.¹ Estas consideraciones nos motivaron a realizar un estudio energético de las metodologías mediadas por activación mecánica.

En este sentido, la estimación de la energía que se produce cuando se lleva a cabo un proceso de molienda puede ayudar a entender los efectos que la energía mecánica tiene sobre el desarrollo de la reacción, permitiendo saber por ejemplo si dicha energía es suficiente para volatilizar componentes líquidos como son los disolventes LAG lo que repercutiría en la movilidad del sistema dentro del reactor. Así mismo, los datos energéticos pueden ayudar a determinar si el proceso es lo suficientemente energético para escindir los enlaces covalentes requeridos o provocar la desactivación de estructuras sensibles como son las enzimas.

Desafortunadamente, aún no existe una herramienta o método que permita la cuantificación exacta de la energía que se genera durante un proceso mediado por

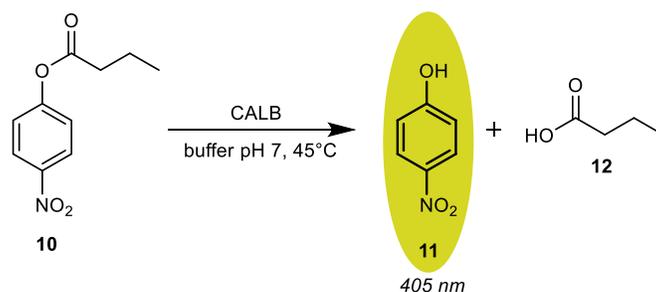
activación mecánica. No obstante, se han desarrollado estrategias que conducen a un mayor entendimiento de la manera cómo afecta la energía térmica generada en una reacción mecanoquímica en contraste con una reacción en solución. Además, se han implementado metodologías para realizar el monitoreo de la formación del producto deseado en tiempo real para de esta forma establecer la frecuencia vibracional y tiempo de molienda ideales.²⁻⁵

Las limitaciones experimentales, en conjunto con la escasa literatura disponible respecto a procesos enzimáticos en síntesis orgánica mediados por activación mecánica, han dificultado el entendimiento de los eventos que toman lugar durante el desarrollo de los protocolos resolutivos estudiados en los capítulos I y II de esta tesis. Concretamente, ha sido imposible determinar el grado de inactivación/desnaturalización/destrucción del biocatalizador (N435) por la energía mecánica producida en la implementación de los protocolos resolutivos. Por consiguiente, para entender la información recabada respecto a una disminución de la actividad y la estereoselectividad cuando se emplea un biocatalizador que ha sido recuperado del proceso, como se ha mostrado en la resolución de β -aminoésteres y aminas racémicas (capítulos I y II), se requiere determinar los factores que podrían ser fundamentales para el diseño de futuros procedimientos mecanoenzimáticos.

De esta forma, y conociendo que la fuerza mecánica producida dentro de un reactor de molienda puede ser medida mediante técnicas analíticas en las que se aplica o genera energía térmica, se decidió evaluar el efecto térmico que podría dar lugar a la desactivación del catalizador.^{6,7} En este sentido, el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática ha sido estudiado ampliamente, sobre todo en el campo de la ciencia de los alimentos.⁸⁻¹¹ Así, con el objetivo de evaluar si la energía térmica producida por la molienda es capaz de inactivar el biocatalizador se decidió estudiar el efecto de dicha energía mecánica en la enzima CALB. Sin embargo, considerando que la enzima mencionada se encuentra adsorbida sobre un soporte que pudiese modificar sus propiedades, se condujeron experimentos empleando tanto CALB en solución, así como N435 comercial (N435c) o previamente molida (N435pm).

5.2 Desactivación de la Lipasa B de *Candida antarctica* en diferentes presentaciones por efecto térmico inducido durante la molienda

El estudio de inactivación de CALB comenzó con la evaluación del efecto térmico sobre la actividad de la enzima libre comercialmente disponible como Lipozyme. Previamente, fue necesario comprobar la cantidad y pureza de la proteína soluble en el medio de reacción por lo que se realizó una cuantificación proteica (Bradford) y se verificó la pureza de la proteína mediante un gel de poliacrilamida (ver parte experimental), obteniéndose una concentración de proteína igual a 17.7 mg/mL y una buena pureza al presentarse sólo una banda en el gel. Posteriormente, fue necesario determinar la cantidad necesaria de enzima para llevar a cabo la determinación de su actividad; con este objetivo, se prepararon soluciones a diferentes concentraciones de CALB libre y se analizaron en la reacción modelo (Esquema 16).



Esquema 16. Hidrólisis del sustrato modelo (butirato de 4-nitrofenilo) empleando enzima CALB libre.

La reacción se monitoreó para obtener curvas de actividad enzimática a diferentes concentraciones de enzima, permitiendo el cálculo de la velocidad inicial máxima a partir de la pendiente observada para cada caso (Figura 17, ver también la parte experimental).

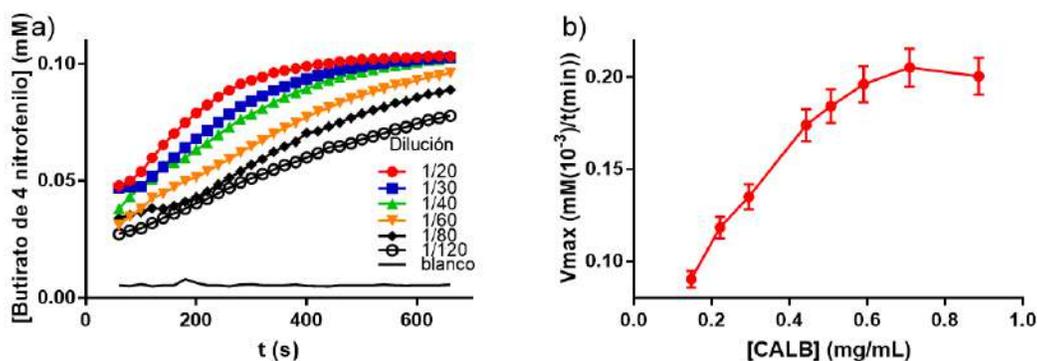


Figura 17. Determinación de la concentración óptima de enzima CALB en la reacción hidrolítica.

Como pudiera anticiparse, la actividad de CALB libre disminuyó conforme se incrementó su dilución (Figura 17a); sin embargo, incluso a la mayor dilución (1/120, 90 μg CALB/ mL) la reacción enzimática concluyó antes de los 10 minutos de reacción. Por otro lado, una vez realizado el cálculo de la velocidad inicial máxima (V_{max}) se logró graficar el proceso respecto a la concentración enzimática para determinar la concentración de CALB óptima, que para el caso estudiado fue de 0.59 mg CALB/mL (dilución 1/30). En este sentido, ya no se observó un incremento en la velocidad de reacción a una mayor concentración enzimática.

Una vez que se determinaron los valores óptimos para llevar a cabo el proceso mecanoenzimático, se prosiguió a examinar el efecto térmico sobre la actividad de CALB libre. Este estudio se realizó a temperaturas superiores a la temperatura operacional de CALB (30-60 $^{\circ}\text{C}$), empleando la reacción modelo (Esquema 16). Para evaluar de manera directa el efecto térmico sobre la actividad de la lipasa, cada solución enzimática fue incubada a temperatura constante (65 $^{\circ}\text{C}$, 75 $^{\circ}\text{C}$ o 85 $^{\circ}\text{C}$) de donde a tiempos determinados se extrajo una alícuota de enzima que fue transferida a un plato de una placa de 96 pozos y fue incubada a 45 $^{\circ}\text{C}$ (temperatura media operacional de CALB) por 5 minutos (ver parte experimental). Finalmente, se agregó el sustrato modelo y se monitoreó la reacción a 405 nm hasta su término (Figura 18).

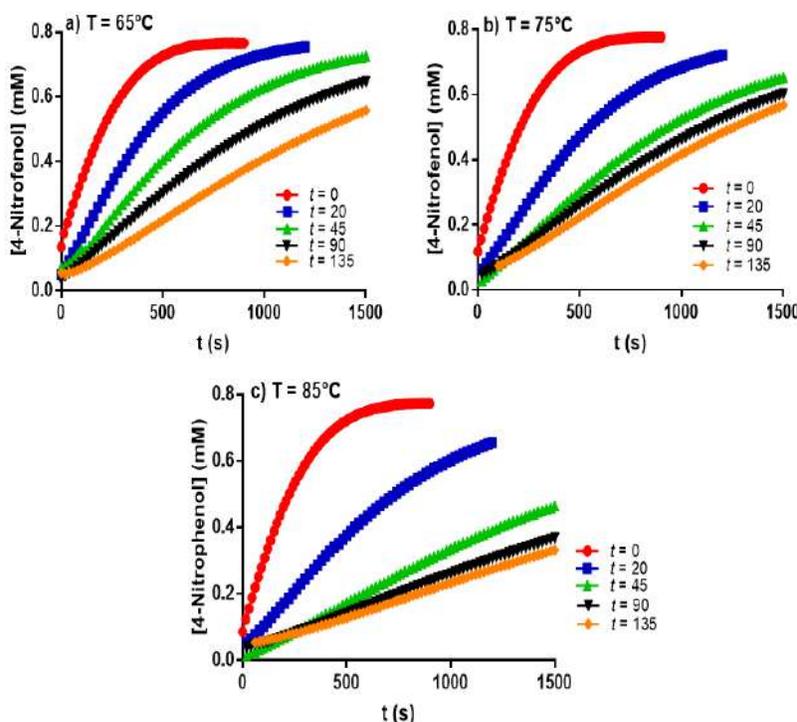


Figura 18. Efecto de la temperatura sobre la actividad de CALB libre incubada a diferentes temperaturas.

Resulta evidente la pérdida de actividad enzimática por efecto térmico y por tiempo de incubación, observándose el mayor decremento de actividad cuando la enzima se incubó a 85 °C por 135 minutos (Figura 18c, línea naranja). Finalmente, al obtener la velocidad máxima (pendiente) para cada tiempo de incubación y al definir la actividad máxima como la velocidad máxima al tiempo de incubación *cero*, puede relacionarse la actividad remanente de los tiempos subsecuentes para obtener el porcentaje de actividad respecto al tiempo de incubación y de esta forma construir la curva de decaimiento térmico (Figura 19).

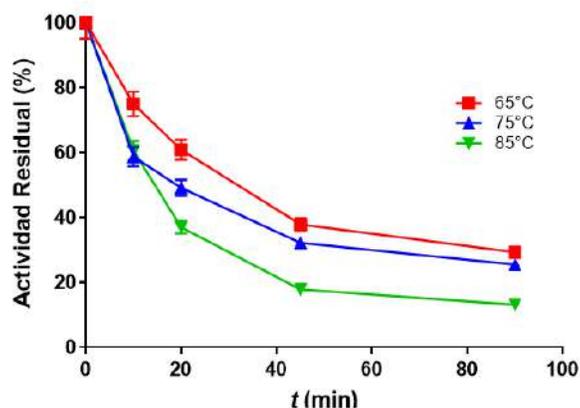


Figura 19. Actividad residual de CALB *libre* incubada a diferentes temperaturas.

Claramente el patrón de decaimiento es similar en las tres temperaturas de incubación estudiadas (Figura 19). En este comportamiento, existe una primera etapa de decaimiento rápido que disminuye a tiempos largos de incubación, hasta llegar a un punto estable en donde la actividad enzimática se mantiene casi constante. Este patrón de comportamiento se ha encontrado con anterioridad en otros sistemas enzimáticos,^{10,11} y se ha definido como un patrón de desactivación complejo, en donde las dos secciones del gráfico representan por separado la inactivación de una sección lábil (L) de la enzima (decaimiento rápido) y una sección resistente (R) que detiene hasta cierto punto la pérdida de actividad enzimática.

Por otro lado, resultó evidente la rápida pérdida de actividad cuando se incrementó la temperatura del proceso de incubación (Figura 19, línea verde). De cualquier modo, independientemente de la temperatura utilizada, se apreció el efecto inactivante de la temperatura sobre la actividad de CALB libre.

Una vez obtenido el patrón de desactivación térmica en CALB libre, se procedió a realizar un análisis similar para obtener la curva de inactivación empleando N435c (enzima soportada comercial). Sin embargo, fue necesario modificar las condiciones del proceso para asegurar una velocidad de reacción que permitiera

cuantificar la pérdida de actividad en un periodo de tiempo suficientemente largo. Por lo tanto, y debido a que la enzima se encuentra adsorbida sobre un soporte de resina acrílica, se decidió, después de una extensa serie de experimentos exploratorios que contempló el uso de 1 mg hasta 0.2 mg e inclusive un solo micropellet de enzima soportada (*vide infra*), emplear solamente 0.3 mg de N435c como concentración óptima de enzima, ya que en los casos utilizando más de esta cantidad la reacción culminó en tiempos de reacción menores a 1 minuto, sin posibilidad de analizar las curvas de actividad. Para la determinación de actividad enzimática se siguió un procedimiento similar al empleado en CALB libre (ver parte experimental). De esta forma fue posible obtener las gráficas del efecto de la temperatura sobre la actividad de N435c (ver parte experimental) y finalmente las curvas de actividad residual para cada temperatura (Figura 20).

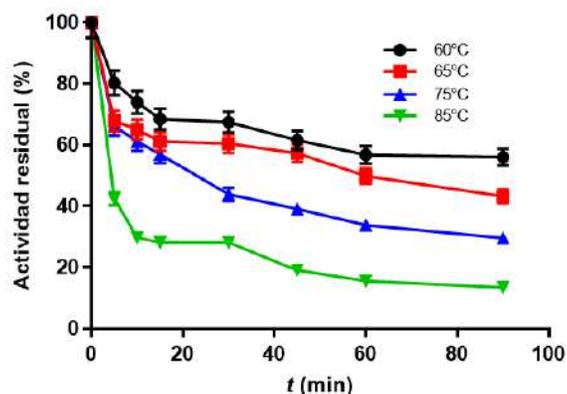


Figura 20. Actividad residual de N435 incubada a diferentes temperaturas.

Se apreció el efecto térmico sobre la actividad de N435 (Figura 20). En este ensayo, se decidió incluir una temperatura adicional (60 °C) debido a la irregularidad (líneas con menor tendencia) de los datos obtenidos en comparación con CALB libre. Al comparar los patrones de desactivación se observó la resistencia a la desactivación térmica que proporciona el soporte al cual está adsorbida la enzima, incrementando la actividad residual de CALB hasta en 14% (comparar Figura 19 y 20, línea roja). No obstante, es claro que temperaturas más altas tienen una notable repercusión negativa en la actividad de la enzima, incluso cuando está soportada (Figuras 19 y 20, línea verde).

Una vez obtenidos los datos que se muestran en la Figura 20 fue posible llevar a cabo la experimentación necesaria para conocer cuál es el efecto del proceso de activación mecánica sobre la actividad enzimática. De esta forma y buscando cuantificar la pérdida de actividad después del proceso de molienda, N435c fue previamente molida empleando molienda de bolas de alta velocidad usando bolas y un reactor de molienda de ágata. Adicionalmente, una muestra de biocatalizador

fue molida manualmente con un mortero y pistilo de porcelana antes de su uso. Sorprendentemente, una vez que se obtuvieron las muestras y se realizó el ensayo de actividad empleando las condiciones descritas para N435c, no se encontró pérdida de actividad alguna como consecuencia del efecto mecánico. Contrariamente a lo anticipado con base en las observaciones hechas en capítulos anteriores, la actividad enzimática se incrementó considerablemente después del proceso de molienda, alcanzando la máxima velocidad de conversión (un orden de magnitud más alto que N435c) a frecuencias moderadas de 10 Hz (Figura 21, línea naranja). No obstante, la actividad parece disminuir un poco a frecuencias altas, aunque se mantiene más alta en comparación con N435c (Figura 21b).

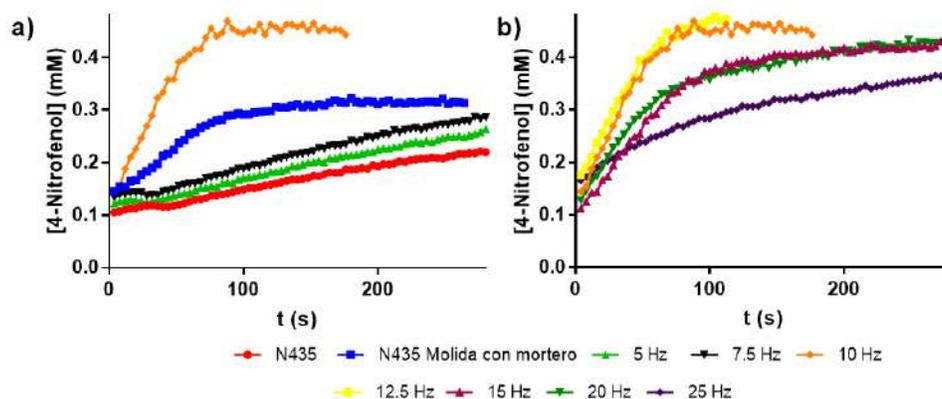


Figura 21. Incremento de la actividad de N435c previamente molida (N435pm).

En este contexto, el tiempo de molienda (10 Hz) juega un papel esencial en el grado de actividad de N435, obteniéndose la mayor velocidad de conversión cuando el biocatalizador había sido previamente molido durante 1.5 h (Figura 22). Cabe destacar el incremento de actividad en un orden de magnitud con relación a la actividad de N435c.

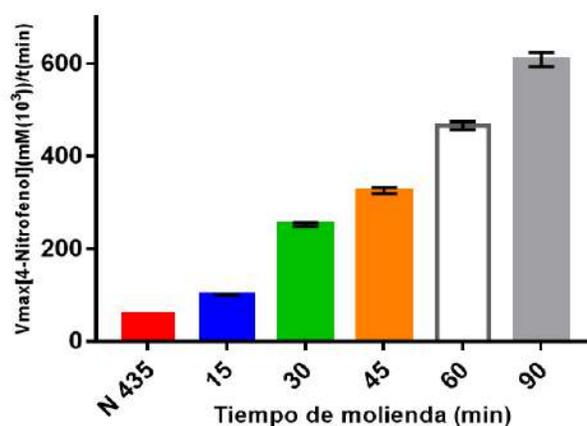


Figura 22. Incremento en la actividad de N435 previamente molida como función del tiempo de molienda a 10 Hz.

Considerando los resultados anteriores que demuestran un incremento de actividad enzimática por efecto mecánico y siguiendo el protocolo descrito para la cuantificación de actividad para N435c, se decidió evaluar la pérdida de actividad del biocatalizador previamente molido (N435pm) por efecto térmico (Figura 23).

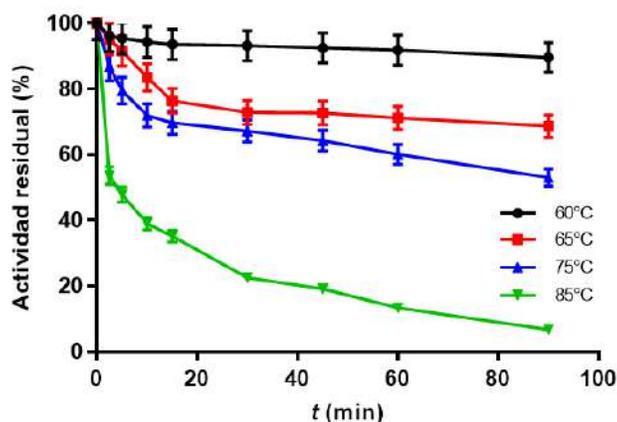


Figura 23. Actividad residual de N435pm (10 Hz, 1.5 h) incubada a diferentes temperaturas.

Al evaluar la pérdida de actividad de N435pm se observó una mayor resistencia a la inactivación térmica cuando el biocatalizador fue molido a 10 Hz por 1.5 h. En especial, se incrementó al doble el porcentaje de actividad residual comparando con CALB libre y en 25% respecto a N435c (Comparar Figuras 19, 20 y 23, línea roja). En contraste, la actividad del biocatalizador molido se vio sustancialmente disminuida cuando se sometió a temperaturas altas (85 °C, Figura 23, línea verde).

5.3 Origen del incremento de la actividad enzimática: Efecto difusional.

De los resultados obtenidos respecto a la inactivación térmica de CALB en sus diferentes presentaciones se concluyó que no existe una relación entre la pérdida de actividad del biocatalizador y la fuerza mecánica aplicada durante el proceso mecanoquímico (Figuras 21, 22 y 23). Este resultado inesperado contribuye al entendimiento de los procesos mediados por activación mecánica y establece pautas que permiten el desarrollo de futuros procedimientos. Sin embargo, incluso cuando los resultados indicaron un aumento en la actividad enzimática como resultado del proceso de activación mecánica, no fue claro cuál es el efecto del proceso de molienda sobre N435 que da lugar a la mayor eficiencia enzimática.

Ante este dilema se plantearon dos hipótesis: la primera en términos de la fragmentación de la partícula de enzima inmovilizada que se microniza hasta alcanzar un tamaño considerablemente menor de partícula que permite incrementar el área de contacto superficial entre los sustratos y la lipasa. La segunda hipótesis se basa en los efectos difusionales de la partícula del biocatalizador que una vez micronizado se aceleran facilitando el acceso del sustrato desde la superficie del biocatalizador hasta el sitio activo de la lipasa. De esta manera, se incrementa la proporción de enzima disponible para la reacción de interés y por lo tanto la eficiencia enzimática.

Con el objetivo de obtener más información acerca del proceso mediante el cual se incrementa la actividad enzimática se llevaron a cabo los experimentos que se describen a continuación. Primeramente, se midió el área superficial de N435c y N435pm a través de un análisis de Brunauer-Emmett-Teller (BET). Inesperadamente, no se encontró un aumento considerable del área del biocatalizador molido respecto a N435c, obteniéndose $83 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ y $81 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$, respectivamente. Este resultado condujo la atención hacia la evaluación del efecto difusional de las partículas de catalizador como posible responsable del incremento de la actividad enzimática.

La evaluación del efecto difusional de N435 se realizó mediante la comparación de la actividad de N435c y de N435pm a través de los datos de su actividad. De esta forma, después de analizar las curvas de actividad y de hacer el cálculo de interpolación de las pendientes para obtener el estimado de actividad observable, fue posible determinar el valor de la enzima disponible en N435c como 7.4 UI/mL (UI = Unidades Internacionales de enzima) y como 98.4 UI/mL para N435pm. Es decir, se apreció un incremento de más de un orden de magnitud en la actividad enzimática después del proceso de molienda. Además, N435c y N435pm se analizaron por microscopía de barrido (SEM, fue necesario recubrir las partículas con una capa de oro), permitiendo la visualización a detalle de las partículas del biocatalizador (Figura 24).

El estudio SEM permitió la descripción plena de N435c y N435pm. En particular, se puede afirmar que N435c está constituida por esferas de resina acrílica con un diámetro que varía entre 330 a $580 \mu\text{m}$ (Figura 24). La superficie de estas esferas no es homogénea exhibiendo zonas externas en donde se pueden apreciar poros que permiten el acceso hacia el interior del soporte y zonas que no presentan porosidad (Figura 25c). Por otro lado, N435pm se compone de partículas de entre 0.5 a $20 \mu\text{m}$ altamente porosas, en comparación con N435c (Figura 26).

Los datos obtenidos de la medición del área superficial (BET) en conjunto con el análisis SEM sugirieron que el aumento de actividad enzimática después del proceso de molienda es resultado de un efecto difusional. Así, se observó que las esferas de N435c presentan una alta porosidad (Figura 25). No obstante, existe una barrera difusional que debe superarse para observar una catálisis eficiente.

Dicha barrera es resultado de que la superficie de las partículas no es homogénea lo que dificulta el acceso del sustrato al interior del biocatalizador disminuyendo la capacidad de CALB para llevar a cabo la biocatálisis. Por otro lado, la capacidad de CALB para penetrar la resina acrílica ha sido estudiada previamente por otros grupos empleando microespectroscopía electrónica;¹² encontrándose que CALB es capaz de penetrar entre un 30% a 40% dentro del material, indicando que la enzima puede introducirse hasta un punto intermedio en el soporte. En este sentido, incluso cuando la parte central de la esfera no contenga enzima, la barrera difusional debe superarse desde la superficie hasta un 30% o 40% del interior del material de soporte para poder generar la catálisis. Es entonces probable que al activar mecanoquímicamente a N435c, la enzima que penetró al material queda expuesta minimizando la barrera difusional y facilitando la catálisis.

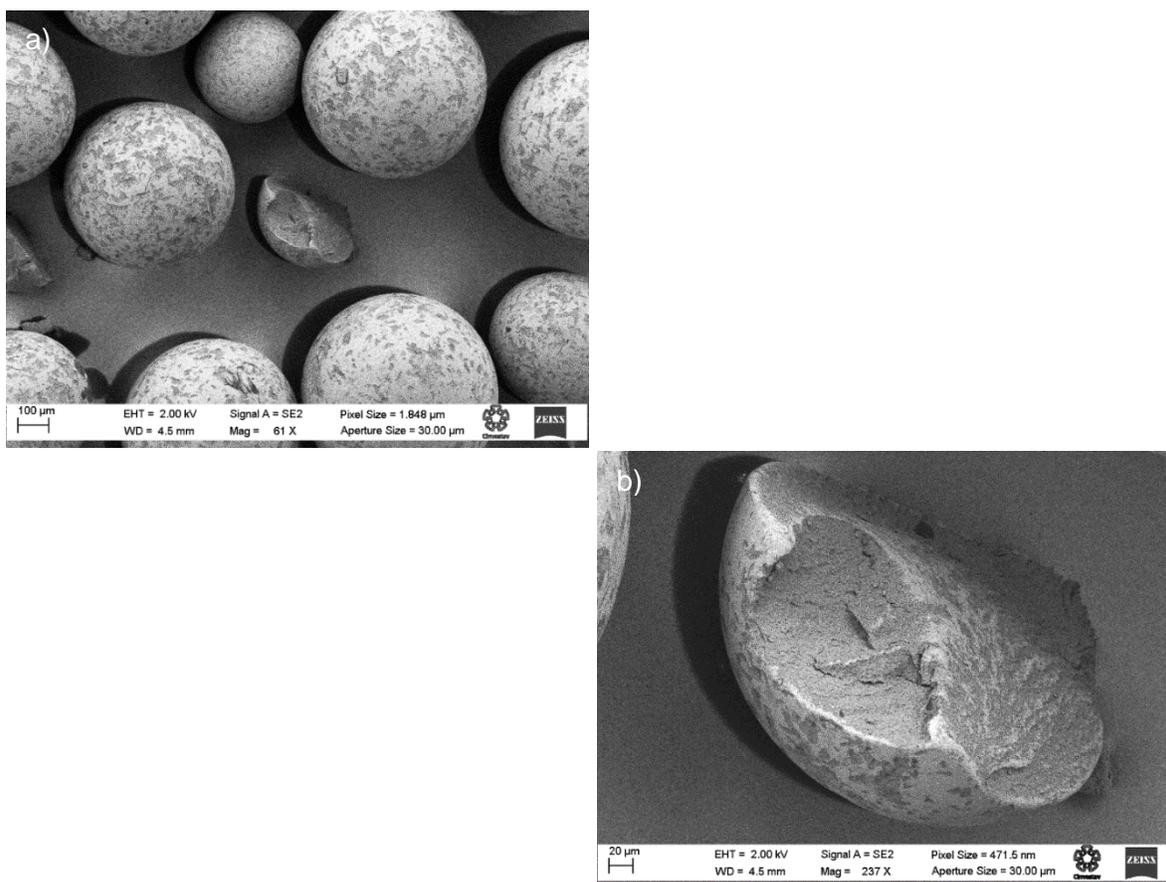


Figura 24. Imágenes SEM de N435c mostrando las diferencias de tamaño de partícula para el biocatalizador y las superficie externa e interna del soporte.

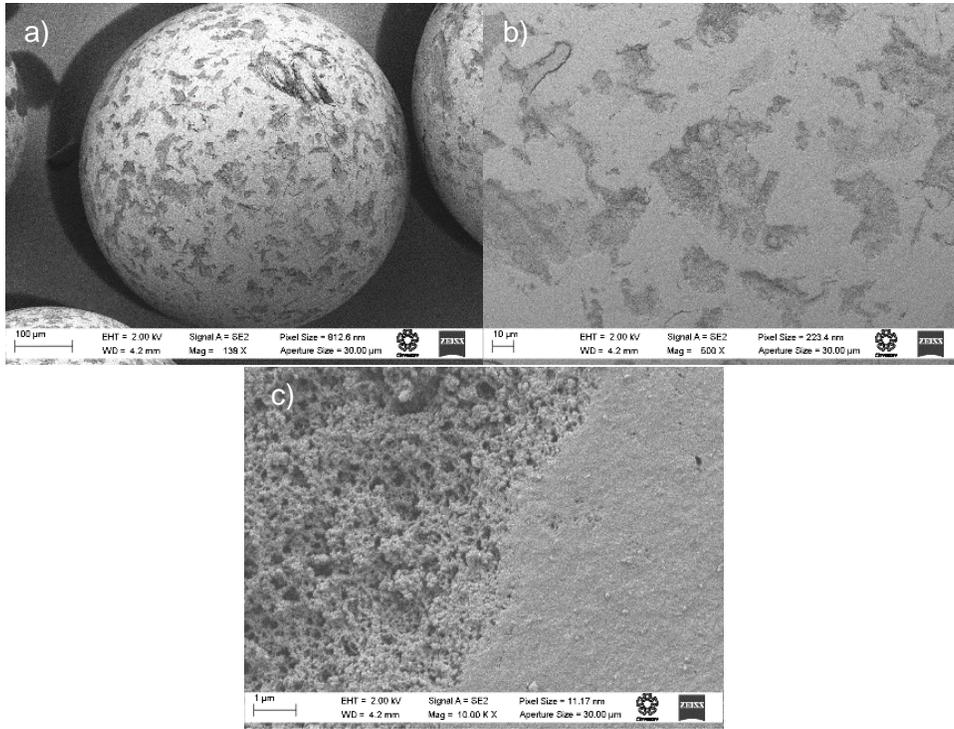


Figura 25. Imágenes SEM de N435c antes del proceso de molienda.

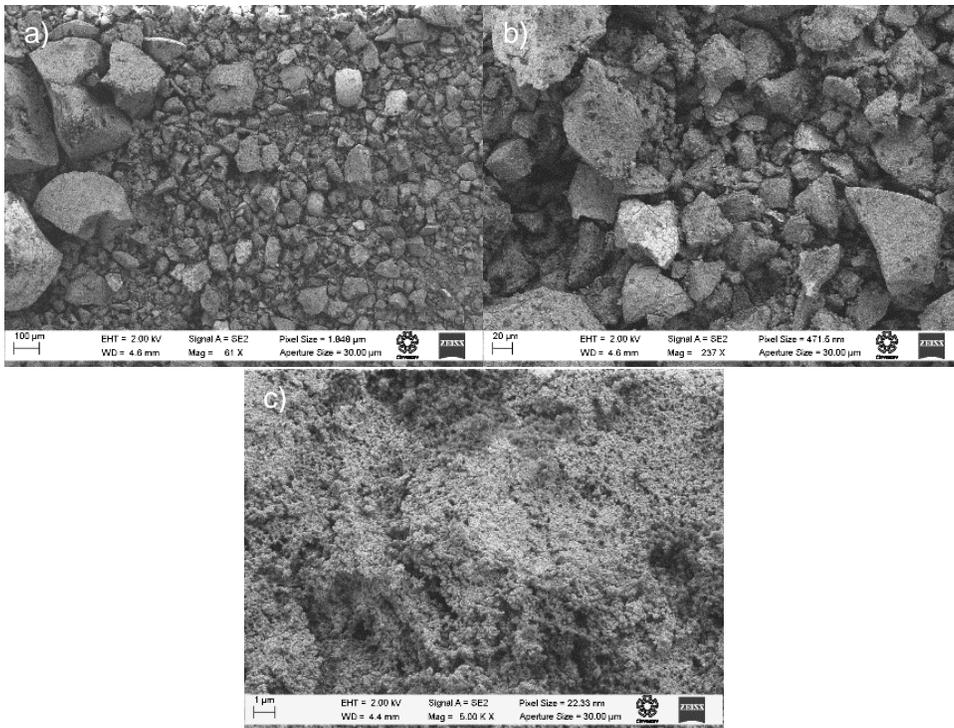


Figura 26. Imágenes SEM de N435pm, activada mecánicamente a 10Hz por 1.5 h.

Utilizando los datos que se presentan en las Figuras 19, 20 y 23 pueden calcularse varios parámetros que permiten analizar cuantitativamente el impacto de la energía térmica sobre la actividad de CALB. Estos parámetros son: (1) la energía de activación (E_a), que puede determinarse empleando la ecuación de Arrhenius. (2) El *tiempo* necesario a temperatura constante para reducir la actividad del biocatalizador en 10% (D) y (3) la *temperatura* necesaria para disminuir D en una unidad logarítmica (z). No obstante, debe considerarse que estos cálculos deben realizarse tanto para la parte lábil (L) como para la parte resistente (R) de la enzima. Las ecuaciones y tratamiento matemático de estos parámetros pueden encontrarse en la parte experimental de este trabajo, mientras que los resultados se presentan a continuación (Tabla 9).

La energía necesaria para llevar a cabo el proceso de desactivación de N435pm es mayor respecto a la energía que requiere CALB libre y N435c. Este efecto puede apreciarse cuantitativamente en el valor de D para ambas preparaciones; mientras que para N435c los tiempos para desactivar 10% del biocatalizador no superan los 2 minutos, para el caso de N435pm los tiempos superan incluso los 7 minutos, demostrando una mayor resistencia térmica. Sin embargo, incluso cuando el biocatalizador molido es más resistente al embate de la temperatura a tiempos considerablemente altos, la destrucción del material de soporte parece provocar inestabilidad en la enzima a temperaturas altas, ocasionando que CALB sufra de sensibilidad térmica: es decir, que se requiere menor temperatura para inactivar a la enzima, un efecto que puede apreciarse en el bajo valor de z .

Tabla 9. Parámetros de inactivación para CALB libre, N435 comercial y N435 previamente molida

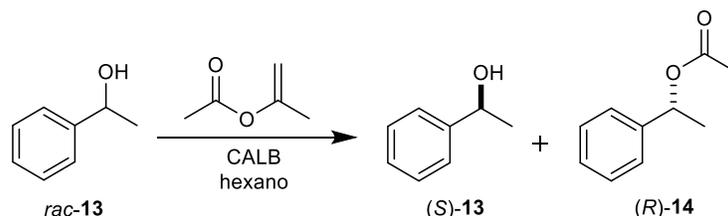
T (°C)	k_R (1/s)	k_L (1/s)	E_{aR} (kcal/mol)	E_{aL} (kcal/mol)	D_R (min)	D_L (min)	z_R (°C)	z_L (°C)
CALB libre								
65	0.414±0.014	0.063±0.000			5.555	36.380		
75	0.258±0.048	0.078±0.003	-11.6±0.3	4.46±0.18	8.920	28.403	47.72±2.5	119.87±6.5
85	0.158±0.048	0.092±0.004			14.580	25.125		
N435c								
60	0.517±0.048	0.517±0.014			1.932	1.623		
65	0.630±0.035	0.630±0.016	6.68±0.36	2.75±0.09	1.588	0.870	31.64±2.6	113.63±3.3
75	0.862±0.117	0.862±0.132			1.160	0.723		
85	1.046±0.114	1.046±0.186			0.955	0.692		
N435pm								
60	0.138±0.014	0.244±0.020			7.249	4.104		
65	0.217±0.037	0.268±0.027	19.25±1.22	18.33±0.12	4.609	3.730	4.11±0.3	6.72±0.6
75	0.486±0.043	0.633±0.036			2.056	1.580		
85	1.058±0.208	1.567±0.274			0.945	0.640		

k_R y k_L = constante de velocidad para los componentes lábil y resistente en CALB libre. E_a = energía de activación. D = Tiempo requerido para disminuir 10% la actividad enzimática. z = Temperatura necesaria para disminuir D una unidad logarítmica.

5.4 Estudio de los cambios energéticos en un proceso mecanoenzimático empleando resolución cinética.

El estudio térmico de la actividad enzimática de CALB libre, N435c y N435pm permitió un análisis más profundo del efecto de la molienda mecánica sobre la actividad y estabilidad del biocatalizador, revelando resultados inesperados. Por un lado, se identificó un aumento en la actividad enzimática de más de un orden de magnitud como consecuencia de la activación mecánica del biocatalizador. Este efecto es provocado por una disminución de la barrera difusional que debe enfrentar el sustrato para acceder a la enzima desde la superficie de la partícula que la soporta hasta el interior activo. De la misma forma, se confirmó un incremento en la energía necesaria para desactivar N435pm, aunque demostrando una disminución en la temperatura necesaria para inactivar el biocatalizador como lo demuestra el valor de z . Sin embargo, estos datos no ofrecen información respecto a la estabilidad conformacional de la enzima cuya pérdida podría traducirse en una pérdida de selectividad del biocatalizador. Por lo tanto, y en vista de los resultados obtenidos en capítulos previos, se decidió evaluar el efecto mecánico sobre la estereoselectividad del proceso al comparar los resultados obtenidos de la desimetrización de un sustrato racémico mediante una técnica mecanoenzimática con los resultados de un procedimiento equivalente en solución, a diferentes temperaturas.

Primeramente, para cuantificar el efecto mecánico sobre la estereoselectividad del biocatalizador se decidió explorar el efecto térmico sobre la actividad y estereoselectividad de N435c en la resolución enzimática modelo (Esquema 17).



Esquema 17. Desimetrización del alcohol α -metilbencílico (*rac*-13) mediante catálisis enzimática con CALB soportada N435.

Esta metodología permitió cuantificar la enantio pureza, conversión y enantio preferencia del sistema mecanoenzimático en un tiempo determinado a través de una sola evaluación por HPLC empleando columna de fase quiral, evitando así la purificación de la mezcla de reacción, facilitando la obtención de datos y disminuyendo errores. A continuación, se muestran las cinéticas de reacción estudiadas empleando la táctica de desimetrización en solución a diferentes temperaturas (Figura 27).

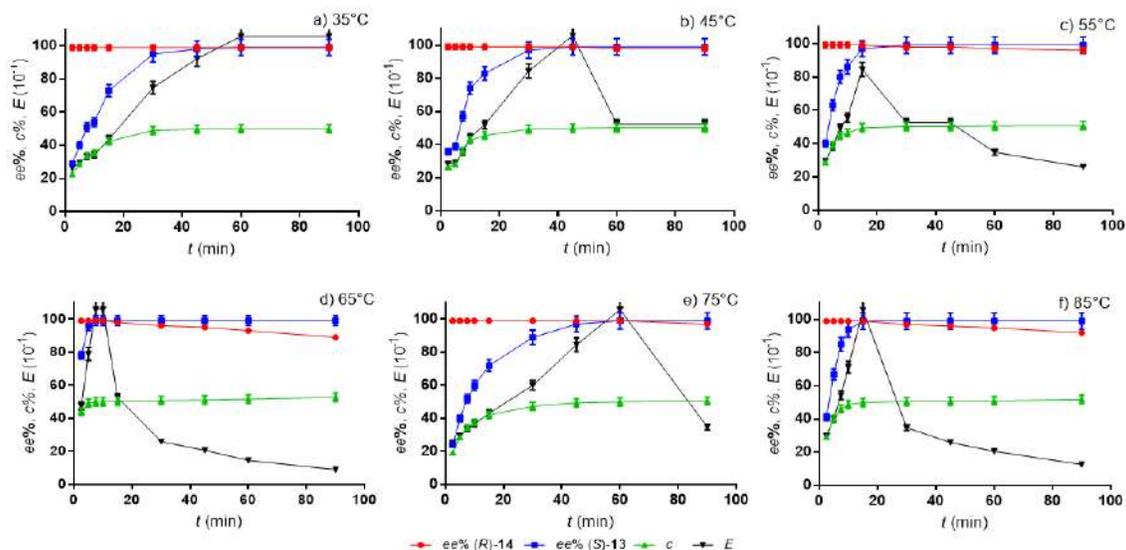


Figura 27. Cinéticas de reacción para la desimetrización de *rac*-13 en solución.

Se observó un proceso completamente estereoselectivo en donde la enantiopureza del producto de biocatálisis (*R*)-14 se mantiene alta ($ee_{(R)-14} > 99\%$) y constante incluso después de 1 h de reacción a 35 °C. Adicionalmente, es evidente que el proceso de desimetrización ocurre de manera gradual hasta alcanzar su punto máximo de conversión ($c = 50\%$) y enantioselectividad ($E >> 500$) después de una hora de reacción (Figura 27).

No obstante, este comportamiento sufre un desajuste cuando se incrementa la temperatura del proceso, incluso trabajando en el intervalo de temperatura estable de CALB (45 °C y 55 °C). Así, el punto de máxima conversión y enantioselectividad se alcanza a tiempos cortos de reacción, concluyendo en una reacción rápida (tan rápida como 7.5 min, Figura 27d). Sin embargo, aun cuando el tiempo de reacción disminuyó de forma considerable al aumentar la temperatura existe el riesgo potencial de sobrepasar este tiempo y disminuir la enantiopureza del producto de biocatálisis (Figura 27b-f).

Este efecto fue estudiado de forma similar empleando N435pm obteniéndose el mismo comportamiento respecto a la temperatura del proceso; es decir, un procedimiento enantiopreferente a temperaturas moderadas que se pierde al aumentar la temperatura, mostrando una mayor pérdida de eficiencia enzimática (Figura 28).

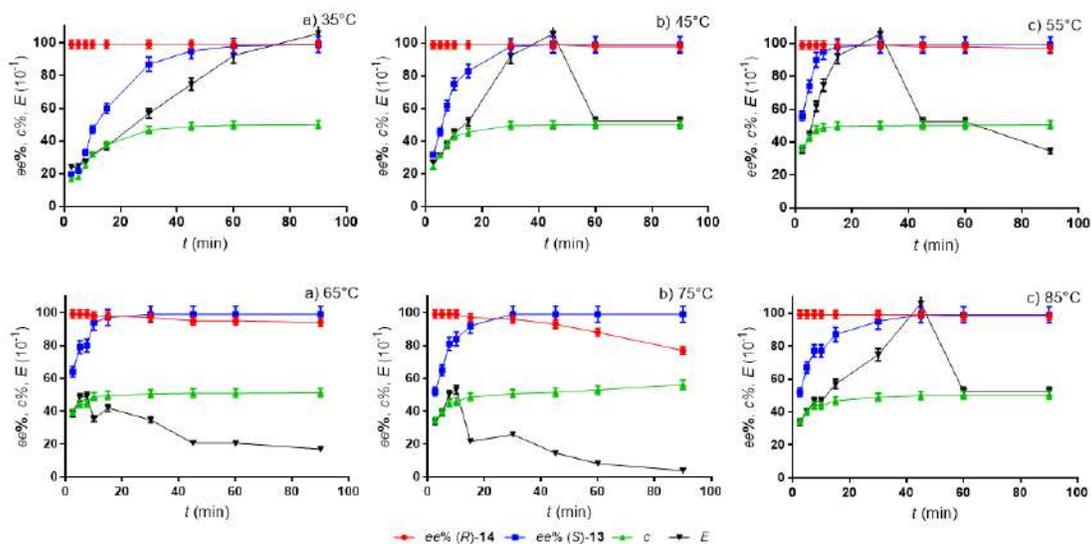


Figura 28. Cinéticas de reacción para la desimetrización de *rac*-13 en solución empleando N435pm.

Una vez analizada la cinética de reacción enzimática en solución, se procedió a llevar a cabo el proceso de resolución empleando activación mecánica aplicada a la reacción modelo (Esquema 17), aunque empleando solamente 0.2 mL de hexano como LAG y un reactor de molienda de ágata y bolas de ágata (Figura 29).

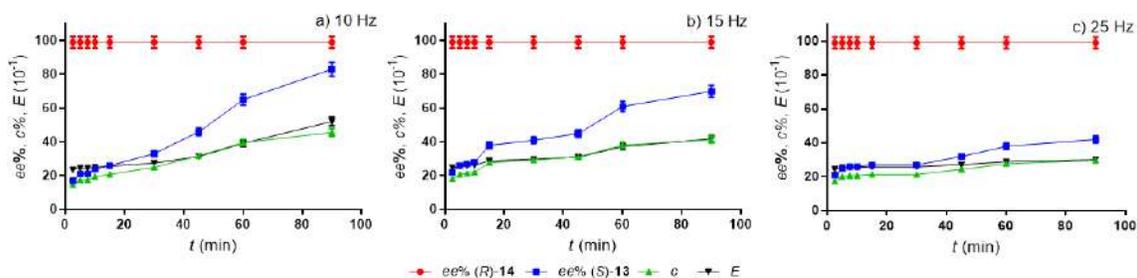


Figura 29. Cinéticas de reacción para la desimetrización de *rac*-13 a través de activación mecánica empleando bolas y un reactor de molienda de ágata.

En contraste con la reacción en solución, cuando se incrementó la frecuencia de reacción el proceso de desimetrización mecanoenzimática procedió de manera más lenta, obteniéndose los mejores resultados cuando se emplearon 10 Hz de frecuencia. Es posible que este efecto se deba a la evaporación del hexano a frecuencias altas lo que inhibe la movilidad de los sustratos dentro del reactor. Con estos resultados se alcanzaron algunas conclusiones del proceso mecanoenzimático respecto a la estabilidad del biocatalizador. Así, el incremento

gradual del exceso enantiomérico del alcohol recuperado enantioenriquecido (S)-**13**, la conversión y la enantioselectividad del proceso indicaron que no hay pérdida de actividad ni de estereoselectividad por parte del biocatalizador. Además, la enantiopureza del producto de biocatálisis (*R*)-**14** se mantuvo extraordinariamente alta ($ee_{(R)-14} > 99\%$) durante todo el proceso, confirmando la estabilidad del sitio activo de la lipasa a pesar de la energía generada por el proceso de molienda (Figura 29).

Al igual que en el proceso en solución, N435c fue activada mecánicamente para obtener N435pm, que fue evaluada en la resolución mecanoenzimática, obteniéndose resultados que demostraron un efecto negativo al incrementar la frecuencia de reacción y un proceso resolutivo incompleto incluso a 90 minutos de reacción.

Como se mencionó en capítulos anteriores, el material de las bolas y el reactor de molienda juega un papel crítico en las transformaciones mediadas por activación mecánica. Por tanto, se decidió utilizar componentes de acero inoxidable o de Teflón® en la reacción de desimetrización a frecuencias moderadas (10 Hz).

Inesperadamente, cuando se cambiaron los componentes de ágata por accesorios de acero inoxidable, la resolución procedió con mayor eficiencia, concluyendo en tan solo 45 minutos al emplear una bola de molienda del mismo material (Figura 30a). Lamentablemente, la adición de una segunda bola de acero inoxidable disminuyó la velocidad de reacción, requiriendo la resolución el doble de tiempo. Es probable que este efecto se deba a un entorpecimiento del movimiento dentro del reactor debido a la limitante de espacio generando una catálisis incompleta. Sorprendentemente, cuando se sustituyó el acero inoxidable por Teflón®, un material más suave (Rockwell para acero inoxidable y Teflón® es C60 y R58, respectivamente) y menos denso (densidad del acero y del Teflón® es 7.67 gcm^{-3} y 2.3 gcm^{-3} , respectivamente),¹ la reacción mecanoenzimática se completó en el menor tiempo reportado hasta ahora para la desimetrización mecanoenzimática del alcohol α -metilbencílico (30 minutos).¹³ Se obtuvieron así dos productos enantiopuros en un proceso altamente eficiente. Nuevamente, la incorporación de una bola adicional de molienda solo entorpeció la catálisis (Figura 30d).

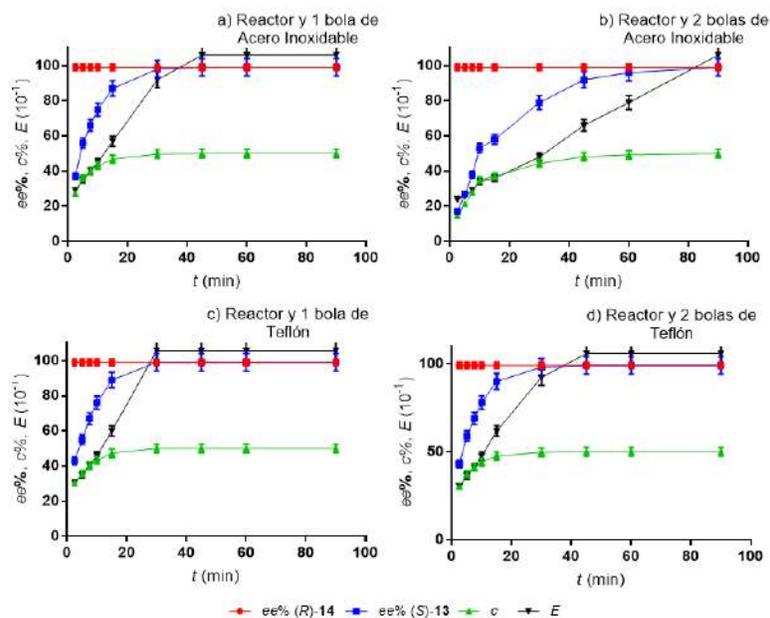


Figura 30. Cinéticas de reacción para la desimetrización de *rac*-13 a través de activación mecánica empleando bolas y reactores de diversos materiales.

Es difícil entender el incremento observado en la eficiencia catalítica de CALB inmovilizada cuando se emplearon materiales suaves como el Teflón®. Sin embargo, este efecto podría estar relacionado con la naturaleza del golpeteo dentro del reactor, que se vuelve altamente elástico cuando se emplean materiales más deformables. Por otro lado, las cinéticas de reacción ofrecen la pauta para confirmar el efecto benéfico generado por la técnica mecanoquímica (Figuras 29 y 30). En especial, se obtuvieron cinéticas de reacción en donde se consigue plenamente la resolución cinética ($c = 50\%$, $E \gg 500$) y no existe pérdida de enantiopureza después de alcanzar la máxima conversión (Figura 30a, 30c y 30d) como ocurre en la técnica en solución a temperaturas altas (Figuras 27 y 28). Este resultado podría indicar, por comparación con las cinéticas mostrada en la Figura 27d, que la temperatura del proceso es cercana a 35 °C (temperatura más baja estudiada en solución), debido a que no existe pérdida de pureza del producto de biocatálisis. Así mismo, la energía que se generó dentro del reactor de molienda no supera la barrera de activación necesaria para comenzar a catalizar al enantiómero menos preferido (S)-13 y, por tanto, la reacción puede activarse mecanoquímicamente sin pérdida de enantioselectividad.

En este sentido, conociendo la relación que existe entre la enantioselectividad del sistema y la diferencia de energías de activación entre ambos estados de transición diastereoméricos ($\Delta\Delta G^\ddagger$), establecida por la Ecuación 8, fue posible calcular esta diferencia para las resoluciones en solución empleando N435c y N435pm (Figura 31):

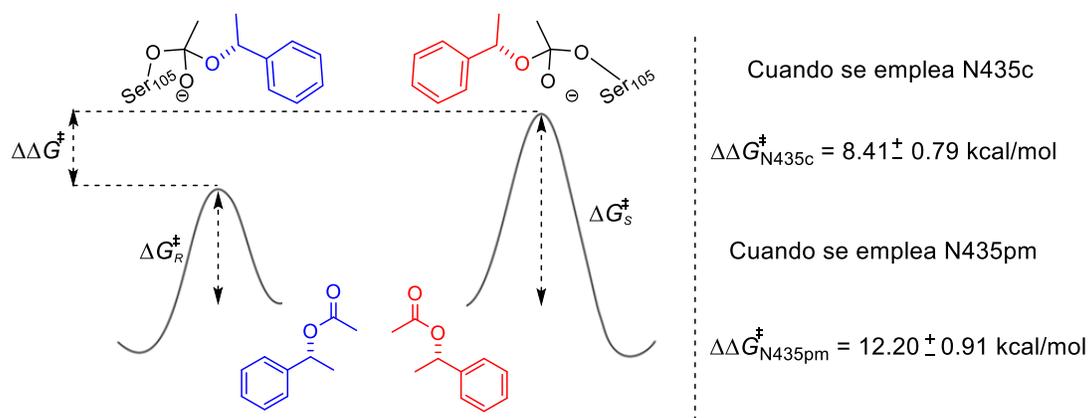


Figura 31. Diferencia en las energías de activación diastereoméricas para el proceso de resolución en solución empleando N435c y N435pm.

La mayor diferencia en la diferencia de energía de activación cuando se emplea N435pm, $\Delta\Delta G^{\ddagger} = 12.20 \pm 0.91$ kcal/mol, en comparación con $\Delta\Delta G^{\ddagger} = 8.41 \pm 0.79$ kcal/mol cuando se emplea N435c, facilitó la comprensión de la mejora en enantioselectividad cuando se lleva a cabo el proceso de resolución mediante activación mecánica.

5.5. Efecto del proceso de molienda exhaustivo sobre la actividad de CALB en N435.

La experimentación conducida hasta ahora ha demostrado que la activación mecánica repercute de manera positiva sobre la actividad y estereoselectividad de N435. Sin embargo, los capítulos I y II de este trabajo revelaron que al recuperar el catalizador después de ciclos sucesivos de molienda la actividad de CALB en N435 se abatió de manera significativa, indicando un efecto negativo ocasionado por la molienda consecutiva. Por tanto, y con el objetivo de explorar con más detalle el efecto de la activación mecánica sobre la actividad del biocatalizador, se decidió moler sucesivamente el biocatalizador soportado. En particular, se decidió evaluar la actividad, la estereoselectividad y la enantioselectividad en la reacción modelo (Esquema 17), empleando componentes de Teflón[®] para la molienda.

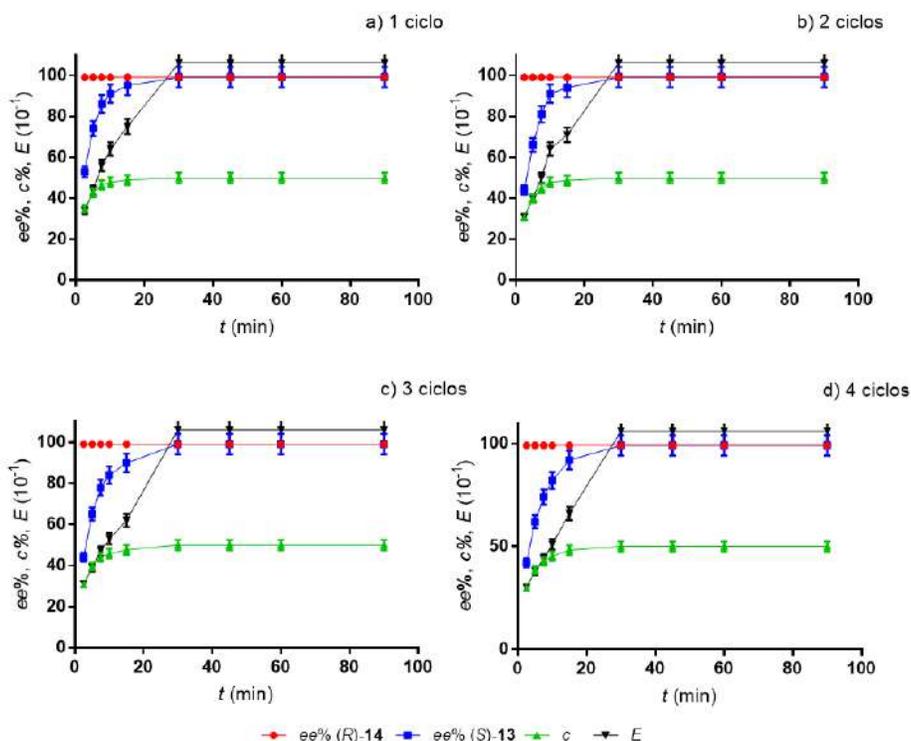


Figura 32. Efecto de moler sucesivamente el biocatalizador soportado sobre la actividad de N435.

Sorpresivamente, incluso después de 4 ciclos de molienda consecutivos, no se observó una diferencia significativa entre el proceso empleando N435 sin activar y N435pm molido hasta 4 veces (comparar Figura 30c con Figura 32d). Este resultado muestra que la pérdida de actividad enzimática no está asociada al proceso de molienda.

De esta forma, se puede asegurar que el efecto de activación mecánica generado por el proceso de molienda repercute positivamente en la actividad enzimática del biocatalizador, sin comprometer su estabilidad. No obstante, es claro que existe un cambio estructural perjudicial provocado por la molienda durante el proceso resolutivo que impide la recuperación eficiente del biocatalizador.

En este trabajo también fue posible confirmar un decremento en actividad enzimática inducido por el aditivo que se emplea para conducir la reacción (LAG) y para recuperar los materiales del reactor de molienda. Este efecto ha sido estudiado concluyendo que incluso cuando las lipasas puedan conducir procesos biocatalíticos en disolvente orgánicos estos aditivos afectan de manera directa la estabilidad enzimática, repercutiendo incluso en el sitio activo de la enzima.¹⁴⁻¹⁷ Este decremento en la actividad del biocatalizador es ajeno al proceso mecanoquímico, por tanto, no fue evaluado en el presente estudio.

5.6. Conclusiones

Los datos mostrados en este capítulo permitieron descartar que la pérdida de actividad enzimática sea consecuencia directa de la fuerza mecánica aplicada al proceso resolutorio. Existe una clara inactivación térmica preponderante que puede visualizarse en CALB libre, N435 comercial y N435 previamente molida y que conduce a una reducción sustancial de la actividad del biocatalizador. No obstante, existe un incremento de un orden de magnitud entre la actividad de N435 comercial y N435 previamente molida. Por otro lado, apoyados por los datos cinéticos de la resolución en solución y vía activación mecánica, puede concluirse que la energía que se genera dentro del reactor de molienda no es suficiente para desactivar térmicamente el biocatalizador. Así mismo, dicha energía no es lo suficientemente alta para sobrepasar la barrera energética que permitiría a la lipasa catalizar la reacción en ambos enantiómeros de la mezcla racémica. Se concluye así que los métodos de molienda a frecuencias moderadas presentan perfiles energéticos bajos, incapaces de perturbar la estabilidad de la enzima, incluso después de ciclos sucesivos de activación.

Referencias

- 1.- McKissic, K. S.; Caruso, J. T.; Blair, R. G.; Mack, J. Comparison of shaking *versus* baking: further understanding the energetics of a mechanochemical reaction. *Green Chem.* **2014**, *16*, 1628-1632.
- 2.- Andersen, J. M.; Mack, J. Decoupling the Arrhenius equation *via* mechanochemistry. *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 5447-5453.
- 3.- Andersen, J.; Mack, J. Insights Into Mechanochemical Reactions at Targetable and Stable, Sub-ambient Temperatures. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, *57*, 13062-13065.
- 4.- Julien, P. A.; Užarević, K.; Katsenis, A. D.; Kimber, S. A. J.; Wang, T.; Farha, O. K.; Zhang, Y.; Casaban, J.; Germann, L. S.; Etter, M.; Dinnebier, R. E.; James, S. L.; Halasz, I.; Friščić, T. *In Situ* Monitoring and Mechanism of the Mechanochemical Formation of a Microporous MOF-74 Framework. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 2929-2932.
- 5.- Julien, P. A.; Germann, L. S.; Titi, H. M.; Etter, M.; Dinnebier, R. E.; Sharma, L.; Baltrusaitis, J.; Friščić, T. *In situ* monitoring of mechanochemical synthesis of calcium urea phosphate fertilizer cocrystal reveals highly effective water-based autocatalysis. *Chem. Sci.* **2020**, *11*, 2350-2355.
- 6.- Andersen, J.; Mack, J. Mechanochemistry and organic synthesis: from mystical to practical. *Green Chem.* **2018**, *20*, 1435-1443.
- 7.- Kulla, H.; Wilke, M.; Fischer, F.; Röllig, M.; Maierhofer, C.; Emmerling, F. Warming up for mechanosynthesis-temperature development in ball mills during synthesis. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 1664-1667.

-
- 8.- Polizzi, K. M.; Bommarius, A. S.; Broering, J. M.; Chaparro-Riggers, J. F. Stability of biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 220-225.
 - 9.- Sheldon, R. A.; Woodley, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 801-838.
 - 10.- Yamamoto, H. Y.; Steinberg, M. P.; Nelson, A. I. Kinetic Studies on the Heat Inactivation of Peroxidase in Sweet Corn. *J. Food Sci.* **1962**, *27*, 113-119.
 - 11.- Ling, A. C.; Lund, D. B. Determining kinetic parameters for thermal inactivation of heat resistant and heat-labile isozymes from thermal destruction curves. *J. Food Sci.* **1978**, *43*, 1307-1310.
 - 12.- Chen, B.; Miller, E. M.; Miller, L.; Maikner, J. J.; Gross, R. A. Effects of Macroporous Resin Size on *Candida antarctica* Lipase B Adsorption, Fraction of Active Molecules, and Catalytic Activity for Polyester Synthesis. *Langmuir* **2007**, *23*, 1381-1387.
 - 13.- Hernández, J. G.; Frings, M.; Bolm, C. Mechanochemical Enzymatic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols under Ball-Milling Conditions. *ChemCatChem* **2016**, *8*, 1769-1772.
 - 14.- Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, *30*, 81-87.
 - 15.- Köse, Ö.; Tüter, M.; Aksoy, H. A. Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium. *Bioresource Technol.* **2002**, *83*, 125-129.
 - 16.- Kumar, A.; Dhar, K.; Kanwar, S. S.; Arora, P. K. Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. *Biol. Proced. Online* **2016**, *18*, DOI: 10.1186/s12575-0.
 - 17.- Li, C.; Tan, T.; Zhang, H.; Feng, W. Analysis of the Conformational Stability and Activity of *Candida antarctica* Lipase B in Organic Solvent. Insight from molecular dynamics and quantum mechanics/simulations. *Biol. Chem.* **2010**, *285*, 28434-28441.

6. Capítulo IV

Resolución mecanoenzimática dual del (±)-Ketorolaco

6.1 Impacto del (\pm)-Ketorolaco en el sector farmacéutico: Dos *eutómeros* en una mezcla racémica

El (\pm)-Ketorolaco es un agente antiinflamatorio no esteroideo (AINE) introducido al mercado a inicios de la década de los noventa del siglo pasado por la empresa *Syntex* como sal de trometamina y bajo el nombre comercial de *Toradol*[®] (Figura 33).¹ El mecanismo de acción del (\pm)-Ketorolaco, al igual que el de otros AINEs, se focaliza en la inhibición no selectiva de las isoformas de la ciclooxigenasa (COX), responsables del metabolismo del ácido araquidónico y la concomitante producción de prostaglandinas y tromboxanos, biomoléculas encargadas de la señalización del dolor.²

Las excelentes propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias del (\pm)-Ketorolaco han permitido la explotación de este fármaco para el alivio del dolor ocasionado por cirugías mayores, tales como cirugías abdominales, ortopédicas, ginecológicas y dentales,³ entre otras.⁴ De esta manera, el Ketorolaco es uno de los analgésicos más exitosos, incluso sobre otros AINEs comerciales como son el ácido acetilsalicílico (*Aspirina*[®]) o el (\pm)-*Etodolaco*.

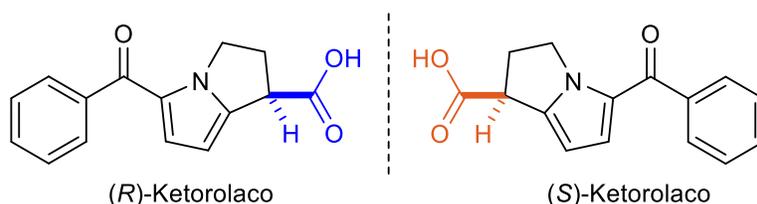


Figura 33. Enantiómeros del (\pm)-Ketorolaco.

Naturalmente, se han conducido estudios farmacológicos para entender mejor el efecto que tiene este principio activo en el cuerpo concluyendo que la forma (S) del (\pm)-Ketorolaco es el enantiómero responsable de la actividad analgésica;^{3,5-7} es decir, es el *eutómero*. No obstante, la formulación farmacéutica que se distribuye comercialmente corresponde a la mezcla racémica. En este contexto, es posible encontrar el Ketorolaco en diferentes presentaciones como son: comprimidos, comprimidos sublinguales, cápsulas de gelatina blanda, gel, soluciones oftálmicas e inyectables.

A diferencia de otros IFAs como la Talidomida,⁸ la comercialización de la forma racémica del Ketorolaco no representa un riesgo potencial a la salud humana. La forma no activa tiende a acumularse en el cuerpo, aunque sin repercusiones serias.⁷ De esta manera, incluso cuando la forma (R) del Ketorolaco no presente actividad analgésica, su ingesta tampoco causa afectaciones importantes y por lo tanto puede formularse y dosificarse con seguridad a pacientes que sufren dolor.

De especial interés resultó el empleo de la forma racémica del Ketorolaco como analgésico en mujeres que se sometieron a cirugías para el tratamiento contra el cáncer de mama, así como a mujeres sometidas a intervenciones para el tratamiento de cáncer de ovario. En un estudio retrospectivo de estos pacientes se logró identificar una menor mortalidad respecto a pacientes a los que no se les administró este medicamento durante el periodo perioperatorio de su intervención, indicando que la administración de este analgésico podría tener un efecto beneficioso que ayudaría a la supervivencia del paciente durante el periodo postoperatorio.⁹ No obstante, incluso cuando la inhibición de las isoformas de COX (que se sobreexpresan en tumores ováricos) por efecto del enantiómero con actividad antiinflamatoria (*S*) del Ketorolaco conduce a una reducción en la señalización que promueve la proliferación y metástasis de células en distintos tejidos, no fue claro si este efecto era lo suficientemente robusto para incrementar la supervivencia de los pacientes.⁹

Fue necesario llevar a cabo un estudio enfocado a la búsqueda de inhibidores selectivos de proteínas tumorales para finalmente identificar a la forma (*R*) del Ketorolaco como inhibidor alostérico de las proteínas Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate) y Cdc42 (cell division control protein 42), dos GTPasas reguladoras de diferentes funciones tumorales como el crecimiento/progresión, metástasis y resistencia a los medicamentos.⁹ Así, el enantiómero con baja actividad analgésica puede ser empleado como una opción para el *manejo* de cáncer, especialmente cáncer de ovario.^{9,10} Es decir, el (*R*)-Ketorolaco puede considerarse en realidad como un segundo *eutómero* del ingrediente farmacéutico activo (Figura 34).

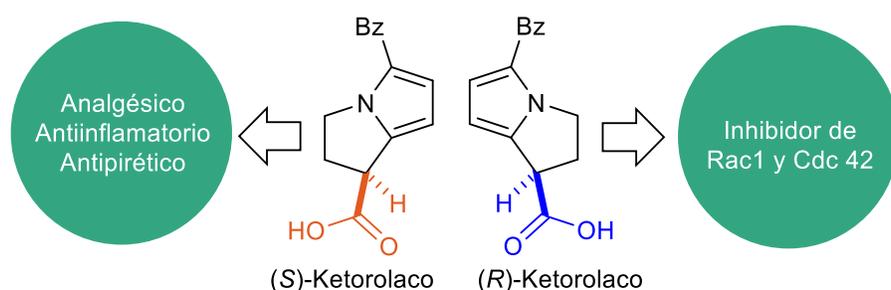


Figura 34. Dualidad de la actividad biológica del (\pm)-Ketorolaco.

El empleo de un medicamento para tratar una condición para la que no fue estudiado con anterioridad es una práctica relativamente común en la industria farmacéutica y se le conoce como *reposicionamiento de fármacos*.^{11,12} Ejemplos exitosos de reposicionamiento incluyen a la Talidomida, reposicionada del

tratamiento de los malestares diurnos en el embarazo hacia el tratamiento de mieloma múltiple, y al Sildenafil (Viagra®) del tratamiento de la angina de pecho hacia el manejo de la disfunción eréctil.¹²

Así, aunque de forma rutinaria se administre el racemato del Ketorolaco en pacientes que sufren dolor, en realidad la forma (S) del IFA es el *eutómero* responsable del efecto analgésico. En contraste, el enantiómero (R) del Ketorolaco que funge como *distómero* en el tratamiento del dolor, fue recientemente reposicionado como *eutómero* en el manejo de cáncer de ovario.

De esta forma, la dualidad en la actividad biológica del (±)-Ketorolaco hace muy atractivo el desarrollo de métodos que permitan sintetizar eficientemente o separar las dos formas enantioméricas del fármaco (Figura 34). Dicha metodología abre el campo para la comercialización de ambas formas enantioméricas evitando la ingesta de la forma ópticamente activa no deseada.

Efectivamente, se han desarrollado estrategias para la síntesis o para la resolución (separación de ambos enantiómeros) del (±)-Ketorolaco. No obstante, los métodos descritos en la literatura no cumplen con los doce principios de la química verde ya que emplean sustratos o reactivos tóxicos o cantidades elevadas de disolvente.^{13,14} Cabe también señalar que se han explorado estrategias enzimáticas enfocadas en la resolución de la mezcla racémica del principio activo, con especial interés en el uso de lipasas como es la CALB.¹⁵⁻¹⁷

En este sentido, y considerando la experimentación descrita en este trabajo relacionada con la aplicación de biocatálisis en conjunto con activación mecánica para llevar a cabo la desimetrización de mezclas racémicas (ver capítulos I y II de esta tesis), así como los estudios de estabilidad mecánica del biocatalizador que demuestran un efecto positivo al activar mecanoquímicamente a N435 (ver capítulo III de esta tesis), se propuso la separación de ambos enantiómeros del (±)-Ketorolaco vía un protocolo mecanoenzimático. Dicha estrategia confirmaría la utilidad de los métodos mecanoenzimáticos en la síntesis de compuestos con actividad farmacológica utilizando metodologías que están en línea con los principios de la química verde.

6.2 Resolución mecanoenzimática de (±)-Ketorolaco empleando una estrategia dual: hidrólisis o esterificación enantioselectiva.

Los métodos de resolución aplicados al (±)-Ketorolaco se han enfocado en biotransformaciones sobre el grupo carboxílico en posición α al centro de quiralidad a través de una estrategia dual (Figura 35).

De esta forma, se buscó emplear el (±)-Ketorolaco como sustrato en un proceso de resolución a través de esterificación enantioselectiva. Obteniendo el enantiómero (S) con actividad analgésica en forma de ácido libre, mientras que la

forma (*R*) activa para el manejo de cáncer se obtuvo en forma de éster.^{16, 17} Por el contrario, cuando se empleó algún éster derivado del (\pm)-Ketorolaco como sustrato la resolución procede a través de hidrólisis enantioselectiva, obteniendo el éster derivado de la forma analgésica (*S*) y el ácido carboxílico libre del enantiómero complementario (*R*) (Figura 35).^{16, 17}

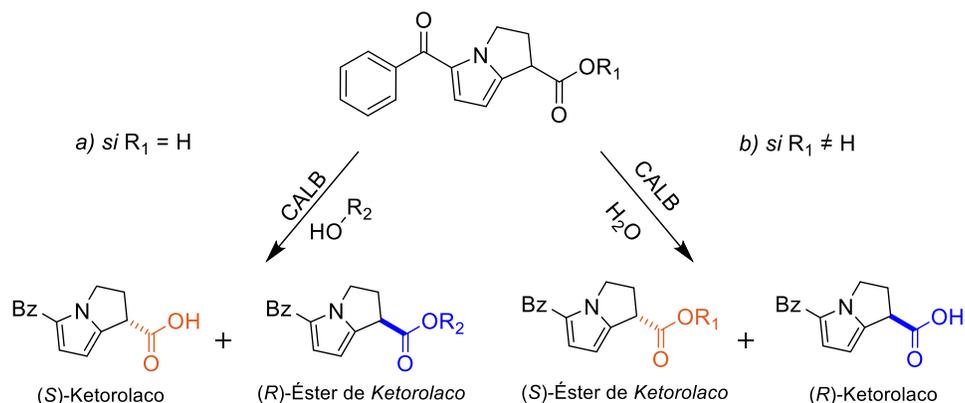
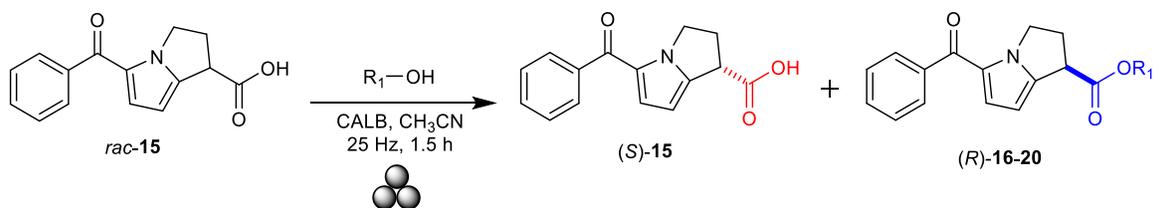


Figura 35. Resolución enzimática de (\pm)-Ketorolaco mediante una estrategia enantioselectiva dual.

En particular, se decidió explorar una estrategia mecanoenzimática utilizando bolas y un reactor de molienda de ágata. Primeramente, se decidió explorar la esterificación enantioselectiva del (\pm)-Ketorolaco (*rac*-**15**) empleando el protocolo descrito en el Esquema 18 y las condiciones reportadas previamente en la literatura (0.1 mmol de (\pm)-Ketorolaco, 1 mmol de agente esterificante y acetonitrilo como LAG).¹⁷



Esquema 18. Esterificación enantioselectiva del (\pm)-Ketorolaco empleando activación mecánica. CH_3CN = Acetonitrilo (0.2 mL)

Con el objetivo de analizar el efecto de la cadena alifática del alcohol sobre la resolución de *rac*-**15**, se estudió la estrategia mecanoenzimática empleando 10 equivalentes de diferentes alcoholes (Figura 36).

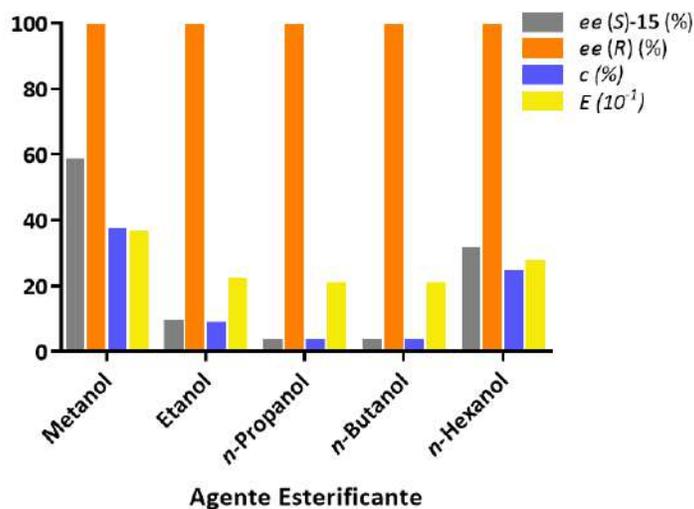


Figura 36. Efecto del alcohol como agente esterificante sobre la actividad de CALB en la resolución mecanoenzimática.

Debido a que los productos de reacción pueden analizarse en conjunto por HPLC con columna de fase estacionaria quiral, las mezclas de reacción no fueron purificadas, excepto por las reacciones donde metanol es empleado como agente esterificante, en este caso los productos se aislaron mediante purificación por columna con sílica gel como fase estacionaria y una mezcla de hexano y acetato de etilo (95:5) y cloruro de metileno como fase móvil (ver parte experimental). Así, la diferencia entre las áreas de las señales obtenidas por HPLC condujo a la obtención de los excesos enantioméricos para las mezclas de reacción. Es claro que la resolución mecanoenzimática de *rac-15* se llevó a cabo con alta enantioselectividad para obtener el enantiómero (*R*) del Ketorolaco, como éster de forma enantiopura ($ee_{(R)} > 99\%$).

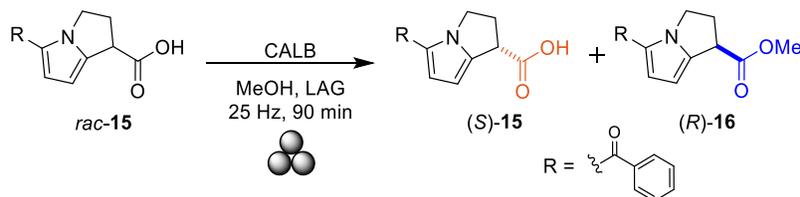
Se puede apreciar que los mejores valores de exceso enantiomérico para el isómero con actividad analgésica ($ee_{(S)-15} = 58\%$), conversión de reacción ($c = 37\%$) y enantiopreferencia ($E > 300$) se obtuvieron cuando se empleó el alcohol de menor peso molecular (metanol) como agente de esterificación, una observación que ya había sido reportada previamente, precisamente con CALB.¹⁸ No obstante, se observó también un incremento en enantioselectividad del enantiómero con actividad analgésica cuando se intercambié el alcohol etílico ($ee_{(S)-15} = 9\%$) por *n*-hexanol ($ee_{(S)-15} = 31\%$). Por otro lado, se exploró el efecto de la frecuencia y tiempo de molienda sobre la eficiencia del proceso resolutivo, encontrando que una disminución en estos parámetros condujo a un proceso de desimetrización ineficiente.

Una vez seleccionado el metanol como el mejor agente esterificante, se decidió evaluar el material de los componentes de molienda en la reacción. Así, cuando se intercambiaron los componentes de ágata por acero inoxidable, la enantiopureza

del éster obtenido disminuyó ligeramente ($ee_{(R)-16} = 98\%$), lo que tiene una repercusión directa en la enantioselectividad del sistema biocatalítico ($E > 200$ en comparación con $E > 300$). Por otro lado, cuando se evaluó un reactor de Teflón® con una bola del mismo material la enantioselectividad del éster obtenido se mantuvo sin cambios; sin embargo, se encontró una conversión química sustancialmente menor ($c = 15\%$) comparada con el uso de componentes de ágata ($c = 37\%$). Por esta razón, se decidió continuar la optimización de esta desimetrización utilizando bolas y un reactor de molienda minerales (ágata).

Como ya se ha señalado, el aditivo LAG desempeña un papel fundamental en los procesos de resolución, por lo que se evaluaron diferentes aditivos en la desimetrización del (\pm)-Ketorolaco asistida por LAG (Tabla 10).

Tabla 10. Optimización del aditivo LAG en el proceso de resolución enzimática del (\pm)-Ketorolaco mediante activación mecánica.



ensayo ^a	LAG ^b	(S)-15 ee (%) ^c	(R)-16 ee (%) ^c	c ^d (%)	E ^e
1	CH ₃ CN	58	>99	37	>300
2	dioxano	57	98	37	>100
3	2M2B	57	>99	37	>300
4	DIPE	89	67	57	15
5	MTBE	72	>99	42	>400

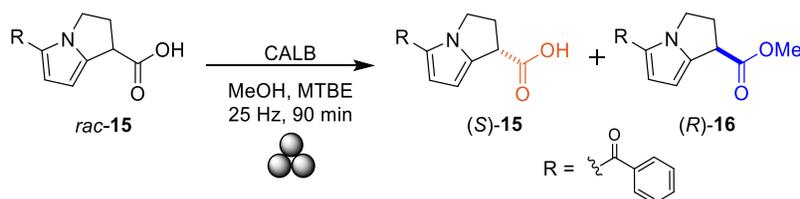
^aLas reacciones se llevaron a cabo empleando activación mecánica a 25 Hz por 1.5 h, así como 10 equivalentes de metanol. ^bSe emplearon 0.2 mL de cada disolvente como LAG. ^cDeterminado después del proceso de purificación usando HPLC y empleando columna con fase estacionaria quiral. ^dCalculada empleando la Ecuación 6. ^eCalculada empleando la Ecuación 7. 2M2B = 2-metil-2-butanol. CH₃CN = acetonitrilo. DIPE = éter diisopropílico. MTBE = éter metil *ter*-butílico.

Notablemente, cuando se emplearon aditivos LAG con alto punto de ebullición (dioxano y 2M2B) que podrían permanecer más tiempo en el reactor de molienda sin volatilizarse los resultados fueron similares respecto al uso de acetonitrilo, manteniendo una buena pureza del enantiómero con actividad analgésica ($ee_{(S)-15} > 57\%$) y con buena conversión ($c = 37$, ensayos 1, 2 y 3, Tabla 10). No obstante, cuando se utilizó éter metil *ter*-butílico (MTBE), un disolvente con bajo punto de ebullición (55 °C) respecto a los LAGs empleados anteriormente, la pureza del enantiómero con actividad analgésica se incrementó casi 25% respecto al uso de acetonitrilo ($ee_{(S)-15} = 72\%$). Así mismo se incrementó sustancialmente la conversión ($c = 42\%$) y enantioselectividad del proceso biocatalítico ($E > 400$). Ante

estos resultados, se decidió mantener el uso de MTBE como agente LAG en la reacción de desimetrización de *rac*-15.

Finalmente, las cargas de catalizador y agente acilante fueron evaluadas en la resolución mecanoenzimática en donde se observó que un aumento en la cantidad de N435 puede conducir a un mejor proceso de resolución (ensayo 3, Tabla 11). Por otro lado, al aumentar el número de equivalentes de agente esterificante, se incrementó notablemente la conversión ($c = 46\%$) y la enantioselectividad de la desimetrización ($E > 500$). En consecuencia, se decidió continuar con la experimentación empleando las condiciones optimizadas (cf. ensayo 9 de la Tabla 11).

Tabla 11. Optimización de la carga de catalizador y agente esterificante en el proceso de resolución mecanoenzimático de (\pm)-Ketorolaco



ensayo ^a	N435 (mg)	Metanol (equiv.)	(S)-15 ee (%) ^b	(R)-16 ee (%) ^b	c ^c (%)	E ^d
Evaluación de la carga del catalizador						
1	10	1	17	98	15	>100
2	20	1	60	>99	38	>300
3	30	1	72	>99	42	>400
4	40	1	76	98	44	>200
5	50	1	82	98	46	>200
Evaluación de la carga de agente esterificante						
6	30	5	68	>99	41	>400
7	30	7.5	73	>99	42	>400
8	30	10	72	>99	42	>400
9	30	12.5	83	>99	46	>500
10	30	15	78	>99	44	>400

^aLas reacciones se llevaron a cabo empleando activación mecánica a 25 Hz por 1.5 h, así como 0.2 mL de TBME y 1 equivalente de metanol, a menos que se indique otro valor. ^bDeterminado después del proceso de purificación usando HPLC con columna de fase estacionaria quiral. ^cCalculada empleando la Ecuación 6. ^dCalculada empleando la Ecuación 7.

Con el objetivo de comparar los parámetros optimizados de la reacción mecanoenzimática con un procedimiento similar en solución, se llevaron a cabo dos cinéticas de reacción. La primera, bajo condiciones convencionales en solución usando MTBE y agitación a 45 °C (temperatura media operacional de CALB) y la segunda mediante la técnica mecanoenzimática optimizada (Figura 37).

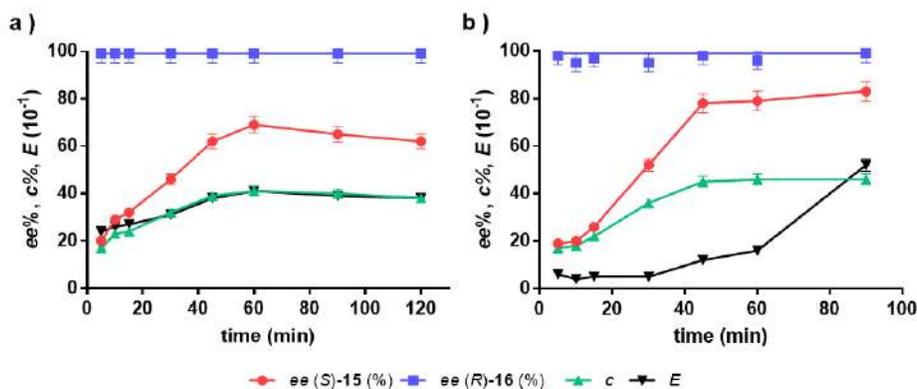


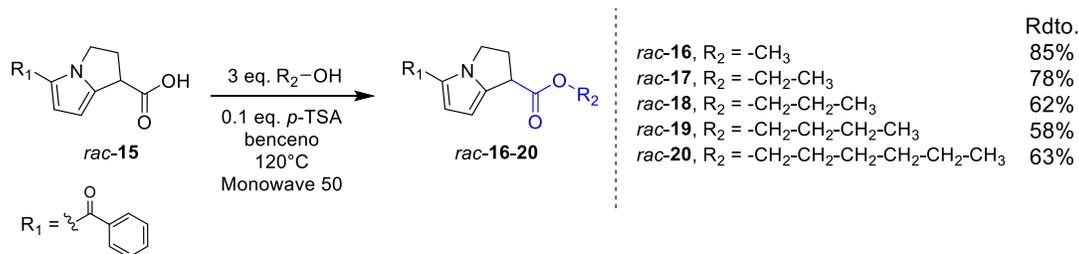
Figura 37. Resolución cinética de (±)-Ketorolaco empleando a) Condiciones convencionales de solución y agitación. b) Condiciones mecanoenzimáticas.

Como puede apreciarse en la Figura 37, la resolución cinética en solución procedió con alta estereoselectividad respecto al enantiómero (R) del Ketorolaco. Además, existió un punto máximo en el proceso que se alcanzó después de una hora de reacción a 45 °C; en este punto, la conversión y enantioselectividad ascendieron hasta buenos valores ($c = 41\%$, $E > 300$, respectivamente). Lamentablemente, después de este punto, la enantioselectividad del enantiómero (S), la conversión y la enantioselectividad de la reacción disminuyeron gradualmente. La alta pureza enantiomérica del producto de configuración (R) y la disminución de la forma (S) del Ketorolaco sugieren que existe un proceso reversible en donde el producto de biocatálisis (éster) sufre un proceso hidrolítico que entorpece el proceso de resolución. En este contexto, el agua requerida para hidrolizar el éster se puede encontrar fácilmente en el medio de reacción como subproducto del procedimiento resolutorio, o debido a la humedad del ambiente.

Por otro lado, el procedimiento mecanoenzimático procedió de forma más homogénea, presentando una excelente enantioselectividad por la forma (R) de *rac-15*, y un aumento gradual en la enantioselectividad del enantiómero con actividad analgésica (S), así como en la conversión y enantioselectividad. Finalmente, la reacción alcanzó un máximo de avance a los 90 minutos de reacción presentando un producto de biocatálisis enantiopuro ($ee_{(R)-16} > 99\%$), un ácido libre enantioenriquecido ($ee_{(S)-15} = 83\%$), una conversión casi ideal ($c = 46\%$) en un proceso altamente enantioselectivo ($E \gg 500$). Se demostró así la superioridad del proceso por activación mecánica, respecto a la técnica en solución.

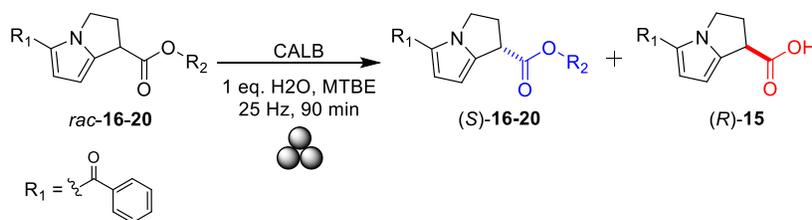
De esta manera, las condiciones optimizadas que emplean activación mecánica condujeron a la obtención del enantiómero (R) del Ketorolaco de forma enantiopura, aunque sólo se logró enantioenriquecer la enantioselectividad del enantiómero con actividad analgésica (S). No obstante, como se mencionó en la introducción de este apartado, es posible emplear una estrategia análoga a través de la hidrólisis enantioselectiva de ésteres derivados del (±)-Ketorolaco, para llevar

a cabo la separación de la mezcla racémica (Figura 34). Se procedió entonces a explorar esta metodología como alternativa para incrementar la enantio pureza del enantiómero (*S*) del Ketorolaco. Así, se sintetizaron diferentes ésteres derivados del (\pm)-Ketorolaco, empleando alcoholes alifáticos de cadena corta, con buenos rendimientos (58%-85%, Esquema 19).



Esquema 19. Síntesis de ésteres racémicos derivados del (\pm)-Ketorolaco.

Los derivados *rac*-16 a *rac*-20, fueron entonces hidrolizados empleando las condiciones óptimas que se habían establecido para la desimetrización por esterificación enantioselectiva, aunque omitiendo el uso de agente esterificante y añadiendo 1 equivalente de agua (Esquema 20). De la misma forma que para la esterificación enantioselectiva, las mezclas de reacción fueron analizadas por HPLC con columna de fase estacionaria quiral, excepto por el éster metílico, como se indicó en la sección previa.



Esquema 20. Resolución mecanoenzimática de ésteres derivados del (\pm)-Ketorolaco, mediante hidrólisis enantioselectiva.

Como se había anticipado, por los resultados obtenidos durante la desimetrización del (\pm)-Ketorolaco por esterificación enantioselectiva donde se obtenía de forma enantiopura la forma (*R*) que no es activa desde el punto de vista analgésico, CALB presentó una mayor preferencia para hidrolizar el enantiómero (*R*) de los ésteres derivados de *rac*-15. Sin embargo, el grado de enantio preferencia del sistema hidrolítico depende de la longitud de la cadena hidrocarbonada del éster (Figura 38).

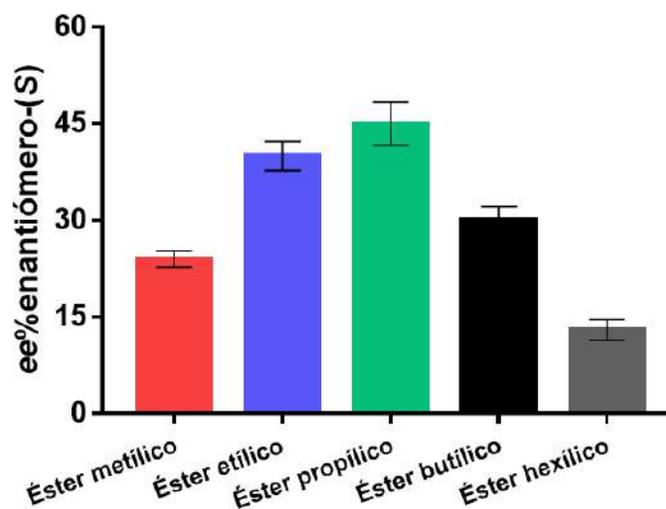


Figura 38. Enantioenriquecimiento del enantiómero (S) del Ketorolaco por efecto del tamaño de la cadena hidrocarbonada del éster.

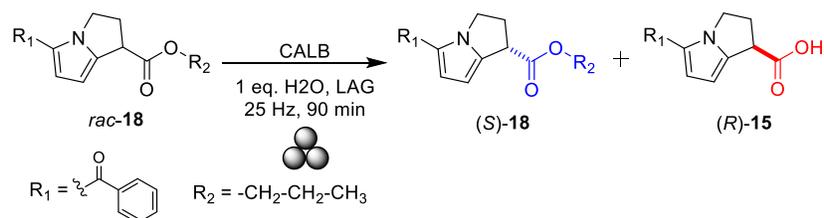
Fue también posible evaluar la dependencia que existe entre la eficiencia de la reacción de desimetrización y la longitud de la cadena hidrocarbonada del éster, obteniéndose el máximo enantioenriquecimiento ($ee_{(S)} = 45\%$) cuando se resuelve el éster *n*-propílico del Ketorolaco (*rac*-**18**, Figura 38). Sin embargo, con cadenas de mayor tamaño se observó una reducción en la enantioselectividad de la hidrólisis, posiblemente debido a interacciones no favorables entre la cadena hidrocarbonada y el sitio activo de la enzima.¹⁹

Finalmente se exploró también la dependencia de la reacción por el aditivo LAG, el material de los componentes de molienda, la carga de agente de resolución y la carga enzimática en el proceso de resolución mediado por esterificación enantioselectiva (Tabla 12).

A diferencia del proceso de esterificación, se encontró que el mejor aditivo LAG fue el 2M2B, un disolvente verde empleado con anterioridad en el proceso de desimetrización de β -aminoésteres (capítulo I en esta tesis).

Así mismo, es de interés notar que la reacción depende de la cantidad de agua presente en el proceso. Efectivamente, cuando se incrementó 6 veces la cantidad de agua empleada en el proceso se alcanzó la máxima pureza enantiomérica para la forma (S) del éster derivado del Ketorolaco ($ee_{(S)-18} = 85\%$). Por último, la carga de catalizador no tuvo un efecto significativo en el proceso de desimetrización, alcanzando un excelente valor cuando se emplearon 30 mg de N435 (Tabla 12).

Tabla 12. Optimización de parámetros en la reacción mecanoenzimática de hidrólisis enantioselectiva.



ensayo ^a	LAG ^b	Material de molienda	H ₂ O (equiv.)	N435 (mg)	(S)-18 ee (%) ^c	(R)-15 ee (%) ^c	c ^d (%)	E ^e
Evaluación del aditivo LAG								
1	DIPE	Ágata	1	30	45	>99	31	>300
2	2M2B	Ágata	1	30	75	>99	43	>400
3	Dioxano	Ágata	1	30	20	94	18	>300
4	CH ₃ CN	Ágata	1	30	26	94	22	>400
5	MTBE	Ágata	1	30	45	>99	31	>300
Evaluación del material de los componentes de molienda								
6	2M2B	Ágata	1	30	75	>99	43	>400
7	2M2B	Ac. Inox.	1	30	74	>99	43	>400
8	2M2B	Teflón [®]	1	30	72	>99	42	>400
Evaluación de la carga de H ₂ O								
9	2M2B	Ágata	0.5	30	71	>99	42	>400
10	2M2B	Ágata	1	30	75	>99	43	>400
11	2M2B	Ágata	1.5	30	77	>99	44	>400
12	2M2B	Ágata	3	30	80	>99	45	>400
13	2M2B	Ágata	6	30	85	>99	46	>500
14	2M2B	Ágata	10	30	86	>99	46	>500
Evaluación de la carga del catalizador								
15	2M2B	Ágata	6	20	83	>99	46	>500
16	2M2B	Ágata	6	30	85	>99	46	>500
17	2M2B	Ágata	6	40	84	>99	46	>500
18	2M2B	Ágata	6	50	87	>99	47	>500

^aLas reacciones se llevaron a cabo empleando activación mecánica a 25 Hz por 1.5 h, así como 0.2 mL de LAG, 1 equiv. De agua y 30 mg de N435, a menos que se indique otro valor. ^bSe emplearon 0.2 mL de LAG. ^cDeterminado después del proceso de purificación usando HPLC con columna con fase estacionaria quiral. ^dCalculada empleando la Ecuación 6. ^eCalculada empleando la Ecuación 7. DIPE = Éter diisopropílico. 2M2B = 2-metil-2-butanol. CH₃CN = Acetonitrilo. MTBE = Éter metil *ter*-butílico.

Finalmente, se llevó a cabo la cinética de resolución empleando las condiciones óptimas encontradas para la desimetrización mediada por activación mecánica y el sustrato *rac*-18, así como bajo condiciones convencionales de calentamiento (45 °C) y agitación (Figura 39).

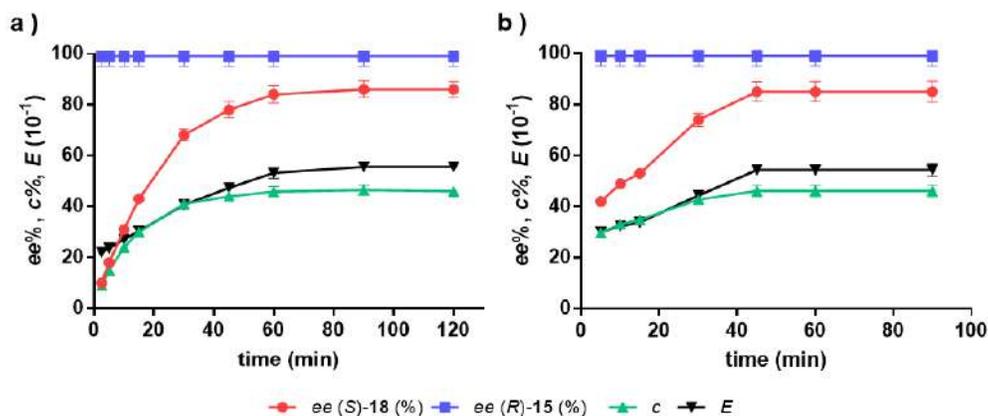


Figura 39. Resolución cinética de *rac*-**18** empleando a) Condiciones convencionales de solución y agitación y b) Condiciones mecanoenzimáticas.

La resolución vía hidrólisis enantioselectiva empleando condiciones convencionales de agitación y temperatura, procedió gradualmente alcanzando una máxima conversión a los 90 minutos de reacción (Figura 39a). Así mismo se alcanzaron excelentes valores de enantiopureza para el enantiómero (*R*) del Ketorolaco ($ee_{(R)-15} > 99\%$) así como para el éster recuperado (*S*)-**18** ($ee_{(S)-18} = 86\%$), con una buena conversión ($c = 46\%$) y enantiopreferencia ($E > 500$). Sorprendentemente, la cinética de resolución mediante activación mecánica procedió en la mitad de tiempo (45 min) obteniéndose valores similares en cuanto a estereoselectividad ($ee_{(R)-15} > 99\%$, $ee_{(S)-18} = 85\%$, $c = 46\%$, $E \gg 500$). Estos resultados muestran la superioridad en términos de tiempo de la técnica mecanoenzimática respecto a las técnicas en solución.

Al comparar las dos técnicas mecanoenzimáticas que se muestran en las Figuras 37b y Figura 39b, es posible confirmar la eficiencia de ambas estrategias para separar de forma enantioenriquecida tanto al producto enantiomérico modificado como el sustrato enantiomérico recuperado. La conversión y la enantiopreferencia son similares para ambas técnicas ($c = 46\%$, $E \gg 500$).

Una vez establecidas las condiciones mecanoenzimáticas óptimas para la esterificación enantioselectiva (*EE*) y la hidrólisis enantioselectiva (*HE*) se llevó a cabo la determinación de la relación enantiomérica de los productos a diferentes temperaturas (35-55 °C) para obtener el valor de $\Delta\Delta G^\ddagger$ empleando la Ecuación 8.

$$\ln E = \frac{-\Delta\Delta G^\ddagger}{RT} \quad (8)$$

Finalmente, con los resultados de las determinaciones experimentales (ver parte experimental) se pudo obtener de forma gráfica los siguientes valores para cada proceso resolutorio.

$$\Delta\Delta G_{EE}^{\ddagger} = 1.44 \text{ kcal mol}^{-1}$$

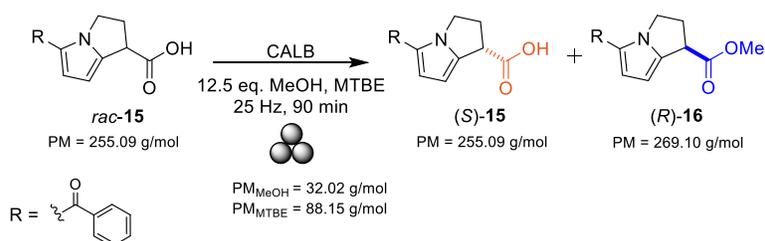
y

$$\Delta\Delta G_{HE}^{\ddagger} = 1.06 \text{ kcal mol}^{-1}$$

Se puede apreciar que existe una mayor diferencia en energías de activación para los estados de transición diastereoméricos cuando se lleva a cabo el proceso de esterificación enantioselectiva.

6.3 Medición de EA en la resolución mecanoenzimática de (±)-Ketorolaco considerando ambas estrategias resolutorias.

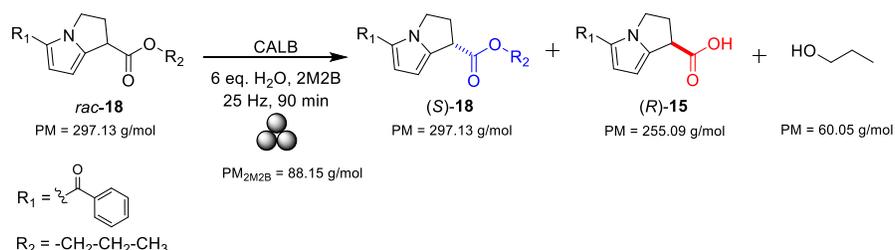
Para el cálculo de la *economía atómica* EA en ambas estrategias mecanoenzimáticas se emplearon las consideraciones previamente descritas, es decir, considerando a ambos enantiómeros al final del proceso de resolución como productos de reacción. Debe destacarse que el cálculo del factor-*E* no se llevó a cabo debido a que no fueron purificados los productos de reacción. Por tanto, la Ecuación 1 para el proceso optimizado de resolución vía esterificación enantioselectiva puede escribirse con la ayuda del Esquema 21.



Esquema 21. Datos necesarios para el cálculo de la EA para la desimetrización por esterificación enantioselectiva.

$$EA = \frac{255.09 \frac{\text{g}}{\text{mol}} + 269.10 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{255.09 \frac{\text{g}}{\text{mol}} + 255.09 \frac{\text{g}}{\text{mol}} + 32.02 \frac{\text{g}}{\text{mol}} + 88.15 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} * 100 \approx 83\%$$

Por otro lado, para la desimetrización por hidrólisis enantioselectiva, la Ecuación 1 se escribió siguiendo lo establecido en capítulos anteriores; es decir, considerando a ambos enantiómeros como productos del proceso de desimetrización. Así, con la ayuda del Esquema 22 puede encontrarse el valor de EA para el proceso de esterificación enantioselectiva.



Esquema 22. Datos necesarios para el cálculo de la EA en la desimetrización por esterificación enantioselectiva.

$$EA = \frac{297.13 \frac{g}{mol} + 255.09 \frac{g}{mol}}{297.13 \frac{g}{mol} + 297.13 \frac{g}{mol} + 88.15 \frac{g}{mol}} * 100 \approx 81\%$$

6.4 Conclusiones

Se diseñó una metodología dual para la resolución de (\pm)-Ketorolaco a través de dos estrategias enzimáticas resolutorias que consistieron en: (1) la esterificación enantioselectiva del grupo carboxílico presente en el principio activo, y (2) la hidrólisis enantioselectiva de los ésteres derivados del (\pm)-Ketorolaco. Ambas estrategias fueron realizadas mediante técnicas mecanoenzimáticas con una elevada enantioselectividad: $ee_{(R)} > 99\%$ y $ee_{(S)} > 83\%$. La conversión química y la enantioselectividad fueron similares: $c = 46\%$, $E \gg 500$. Al comparar los resultados de los procesos mecanoenzimáticos con los procesos realizados en solución se constata la superioridad de las técnicas mecanoenzimáticas al reducirse el tiempo de reacción en un 50% y permitiendo la obtención de los *dos* enantiómeros altamente enantioenriquecidos.

Referencias

- 1.- Resman-Targoff, B. H. Ketorolac: A Parental Nonsteroidal Antiinflammatory Drug. *DICP* **1990**, *24*, 1098-1104.
- 2.- Bingham, S.; Beswick, P. J.; Blum, D. E.; Gray, N. M.; Chessell, I. P. The role of the cyclooxygenase pathway in nociception and pain. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2006**, *17*, 544-554.
- 3.- Evans, A. M. Enantioselective Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Chiral Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1992**, *42*, 237-256.
- 4.- Gillis, J. C.; Brogden, R. N. Ketorolac. A Reappraisal of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use in Pain Management. *Drugs* **1997**, *53*, 139-188.
- 5.- Hayball, P. J.; Wrobel, J.; Tamblyn, J. G.; Nation, R. L. The pharmacokinetics of ketorolac enantiomers following intramuscular administration of the racemate. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **1994**, *37*, 75-78.
- 6.- Hayball, P. J. Chirality and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Drugs*. **1996**, *52*, 47-58.
- 7.- Handley, D. A.; Cervoni, P.; McCray, J. E.; McCullough, J. R. Preclinical Enantioselective Pharmacology of (R)- and (S)- Ketorolac. *J. Clin. Pharmacol.* **1998**, *38*, 25-35.
- 8.- Vergesson, N. Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. *Birth Defects Res. C.* **2015**, *105*, 140-156.
- 9.- Hudson, L. G.; Cook, L. S.; Grimes, M. M.; Muller, C. Y.; Adams, S. F.; Wandinger-Ness, A. Dual Actions of Ketorolac in Metastatic Ovarian Cancer. *Cancers* **2019**, *11*, 1049-1065.
- 10.- Hudson, L. G.; Gillette, J. M.; Kang, H.; Rivera, M. R.; Wandinger-Ness, A. Ovarian Tumor Microenvironment Signaling: Convergence on the Rac1 GTPase. *Cancers* **2018**, *10*, 358-384.
- 11.- Ashburn, T. T.; Thor, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 673-683.
- 12.- Novac, N. Challenges and opportunities of drug repositioning. *Trends Pharmacol. Sci.* **2013**, *34*, 267-272.
- 13.- Baran, P. S.; Richter, J. M.; Lin, D. W. Direct Coupling of Pyrroles with Carbonyl Compounds: Short Enantioselective Synthesis of (S)-Ketorolac. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 609-612.

-
- 14.- Malik, P.; Bhushan, R. Synthesis of diastereomeric anhydrides of (*RS*)-ketorolac and (*RS*)-etodolac, semi-preparative HPLC enantioseparation, establishment of molecular asymmetry and recovery of pure enantiomers. *New J. Chem.* **2017**, *41*, 13681-13691.
- 15.- Fuelling, G.; Sih, C. J. Enzymatic second-order asymmetric hydrolysis of ketorolac esters: in situ racemization. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2845-2846.
- 16.- Kim, Y. H.; Cheong, C. S.; Lee, S. H.; Kim, K. S. Enzymatic kinetic resolution of ketorolac. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 1865-1869.
- 17.- Shinde, S. D.; Yavad, G. D. Insight into microwave assisted immobilized *Candida antarctica* lipase B catalyzed kinetic resolution of RS-(±)-ketorolac. *Process Biochem.* **2015**, *50*, 230-236.
- 18.- Pan, Y.; Tang, K.-W.; He, C.-Q.; Yi, W.; Zhu, W.; Liu, Y.-N. Effect of alcohol chain length on the enzymatic resolution of racemic mandelic acid and kinetic study. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2014**, *61*, 274-279.
- 19.- Varma, M. N.; Madras, G. Effect of Chain Length on Enzymatic Hydrolysis of *p*-Nitrophenyl Esters in Supercritical Carbon Dioxide. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2008**, *144*, 213-223.

7 Conclusiones generales

Como se ha descrito a lo largo de este trabajo de tesis la química verde o química sustentable es de gran relevancia tanto en ámbitos industriales como académicos para llevar a cabo reacciones más limpias, evitando el uso de sustancias peligrosas y la generación de residuos tóxicos para los seres vivos y para el medio ambiente.

El objetivo principal del trabajo experimental que se describe en los capítulos I, II, III y IV de esta tesis consistió en el desarrollo de técnicas que permitieran la separación de mezclas racémicas a través de estrategias empleando activación mecánica en conjunto con procesos biocatalíticos. La combinación de estas técnicas disminuye el uso de disolventes, incrementa la eficiencia energética de la transformación y permite la aplicación de energías limpias no convencionales. Así mismo, estas tácticas emplean componentes renovables y biodegradables, hacen uso del acervo de quiralidad natural, disminuyen el tiempo de reacción respecto a las técnicas en solución, y conducen a procesos con alta estereoselectividad.

El estudio del efecto de la fuerza mecánica sobre la actividad y estabilidad del biocatalizador (capítulo III) resultó contraintuitivo con respecto a los escenarios establecidos *a priori* y dio lugar a nuevos paradigmas. En particular, se encontró un incremento sustancial en la actividad del catalizador después del proceso de molienda sin pérdida de enantioselectividad. El incremento en actividad del biocatalizador se adscribió a la superación de un efecto difusional que permite el acceso del sustrato hasta la ubicación de la enzima dentro del soporte. Esta barrera se elimina después del proceso de molienda. Finalmente, se comprobó la estabilidad del biocatalizador después del proceso de activación mecánica al moler exhaustivamente a N435 y llevar a cabo cinéticas de reacción que no mostraron cambio aparente de actividad enzimática, corroborando la estabilidad de CALB durante el proceso de activación mecánica. La certeza de la estabilidad del biocatalizador durante el proceso mecanoquímico fue el detonante para el desarrollo de un protocolo resolutivo enfocado a la obtención de un principio farmacéutico cuyas formas enantioméricas tienen efectos biológicos diferentes. En particular, se logró la separación de las dos formas enantioméricas del Ketorolaco, con excelentes resultados en contraste con metodologías similares en solución.

Finalmente, aunque la experimentación mostrada en este trabajo ha explorado algunos escenarios concernientes al uso de la fuerza mecánica en conjunto con procesos biocatalíticos, la versatilidad de ambas técnicas abre la posibilidad al desarrollo de procesos aún más interesantes y valiosos que podrían converger en la generación de metodologías sintéticas con suficiente potencial para sustituir a las ya existentes o ayudar al desarrollo en conjunto de protocolos en síntesis orgánica, incrementando así el interés por el estudio y desarrollo de tácticas basadas en la activación mecánica.

8 Parte experimental

8.1 Información general

Todos los materiales necesarios para llevar a cabo la síntesis, separación, aislamiento y purificación de los compuestos sintetizados fueron previamente lavados y secados en una estufa a 100°C.

Todos los reactivos comerciales fueron utilizados sin purificación previa y fueron adquiridos de la empresa Sigma-Aldrich (Merck). Los disolventes usados para llevar a cabo las reacciones, extracción y purificación de los compuestos fueron adquiridos con pureza grado reactivo. Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C fueron adquiridos en los equipos Bruker DP300 (300MHz) y Bruker 400 Advance III HD (400MHz), utilizando disolventes deuterados como CDCl_3 , D_2O , CD_3OD . Los espectros de masas de alta resolución se adquirieron en un equipo HPLC 1100 acoplado a MS/TOF Agilent Series HR-MSTOF modelo 1969 A.

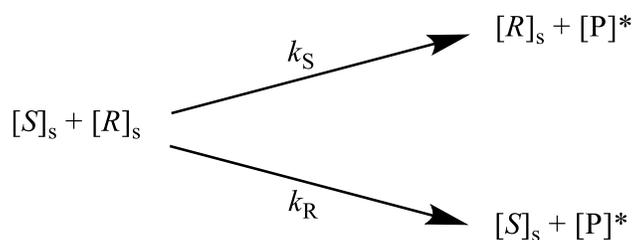
Los cromatogramas fueron obtenidos en un equipo Dionex HPLC Ultimate 3000 con un detector de UV/VIS con arreglo de diodos a 210 nm y 254 nm, empleando columnas con fase estacionaria quiral de la marca Chiralpak. La columna específica, condiciones y tiempo de elución se muestran en el anexo de este trabajo de tesis.

Las reacciones mediadas por activación mecánica se llevaron a cabo en un equipo de la marca Retsch, modelo MixerMill MM200. Los contenedores de reacción y las bolas de molienda fueron adquiridos directamente de la empresa Retsch. La actividad enzimática fue analizada en un equipo Biotek Synergy H4 Hybrid Reader a 405nm.

CALB libre (Lypozyme) y N435 (Novozym 435[®], 10000 UI/g) fueron adquiridas de la empresa Novozymes.

8.1.1 Desarrollo matemático para obtener las ecuaciones que describen el grado de conversión (*c*) y enantioselectividad (*E*) de las resoluciones empleando resolución cinética.

Una resolución cinética puede definirse como un proceso en el cual uno de los enantiómeros que constituyen la mezcla racémica se transforma con mayor rapidez que el otro enantiómero.^{1,2} Se desarrollan así las siguientes ecuaciones:



La velocidad con la que cada enantiómero es biocatalizado desde su origen en la mezcla racémica hasta el producto de interés está determinado por la constante de velocidad k_S o k_R . Para que un proceso sea altamente enantioselectivo debe cumplirse que la velocidad de transformación de un enantiómero sea muy superior respecto al otro enantiómero, es decir $k_S \gg k_R$ o viceversa.^{1,2} A la relación que existe entre las constantes de velocidad de una reacción se le denomina factor de estereoselectividad y se expresa de la siguiente forma:

$$s = \frac{k_R}{k_S}$$

En el presente trabajo, se ha denominado al factor de estereoselectividad como enantiopreferencia (E).^{1,2}

Durante el desarrollo experimental, la evaluación de las constantes de velocidad para cada enantiómero es compleja; no obstante, se puede hacer uso del álgebra y de ecuaciones definidas asociadas con exceso enantiomérico para encontrar una expresión que permita calcular E a partir de datos experimentales

El exceso enantiomérico (ee) se determina con base en a las cantidades de ambas formas enantioméricas (S , R) de un sustrato a un tiempo determinado t , de forma tal que:

$$ee = \frac{[S] - [R]}{[S] + [R]}$$

Además, asumiendo que se parte de una mezcla racémica se tiene que:

$$[R]_0 = [S]_0 = 0.5$$

Por otro lado, la conversión puede expresarse como $0 < c < 1$, de forma tal que, si la conversión describe la disminución ideal de uno de los enantiómeros en una resolución cinética, es posible establecer que a un tiempo determinado t :

$$[R] + [S] = 1 - c$$

Esta expresión de c es útil para la determinación de E ; así al despejar $[R]$ y $[S]$ se tiene:

$$[R] = (1 - c) - [S]$$

$$[S] = (1 - c) + [R]$$

Al sustituir la ecuación que define el exceso enantiomérico con las aproximaciones anteriores se tiene que:

$$ee = \frac{[S] - [R]}{[S] + [R]} = \frac{[S] - ((1 - c) - [S])}{1 - c} = \frac{2[S] - (1 - c)}{1 - c}$$

Con el objetivo de encontrar una ecuación que permita calcular la cantidad de $[S]$ se tiene que:

$$2[S] = (1 - c) + (1 - c)ee$$

Finalmente:

$$[S] = \frac{(1 + ee)(1 - c)}{2}$$

Un análisis similar para $[R]$ resulta en:

$$[R] = \frac{(1 - ee)(1 - c)}{2}$$

Cuando se tiene un caso en donde la resolución se describe a través de ecuaciones de pseudo-primer orden respecto de $[R]$ y $[S]$ se tiene que:

$$\frac{d[R]}{dt} = -k_R[R] \quad y \quad \frac{d[S]}{dt} = -k_S[S]$$

Al separar los componentes de cada ecuación e integrar desde $[R]_0$ o $[S]_0$ hasta $[R]$ o $[S]$ y de t_0 hasta t , se tiene que:

$$k_R = \frac{\ln \frac{[R]}{[R]_0}}{(t_0 - t)} \quad y \quad k_S = \frac{\ln \frac{[S]}{[S]_0}}{(t_0 - t)}$$

De esta forma, al sustituir en la ecuación de la enantiopreferencia se tiene que:

$$s = E = \frac{k_R}{k_S} = \frac{\ln \frac{[R]}{[R]_0}}{\ln \frac{[S]}{[S]_0}}$$

Sin embargo:

$$[R]_0 = [S]_0 = \frac{1}{2}$$

Entonces:

$$E = \frac{\ln 2[R]}{\ln 2[S]}$$

Finalmente, al hacer uso de las ecuaciones que describen a $[R]$ y $[S]$ respecto a la conversión, se tiene que:

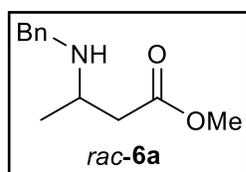
$$E = \frac{\ln 2[R]}{\ln 2[S]} = \frac{\ln 2 \left(\frac{(1 - ee)(1 - c)}{2} \right)}{\ln 2 \left(\frac{(1 + ee)(1 - c)}{2} \right)} = \frac{\ln (1 - ee)(1 - c)}{\ln (1 + ee)(1 - c)}$$

8.2 Parte experimental del Capítulo I

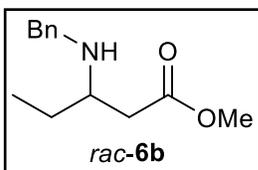
Procedimiento general para la síntesis de β -aminoésteres N-bencilados

En un matraz de fondo redondo de 250 mL se colocaron 7.86 g de trifenilfosfina (0.03 mmol) y 100 mL de tolueno grado reactivo. A esta solución se agregó bromoacetato de metilo (5.01 g, 0.03 mmol) y la mezcla de reacción se agitó toda la noche a temperatura ambiente. El sólido obtenido fue filtrado y resuspendido en agua, el pH se ajustó a 9 usando KOH (2 M, fenolftaleína como indicador). Una vez basicada la reacción, se llevó a cabo un proceso de extracción empleando CH_2Cl_2 (150 mL x 2). Las fracciones orgánicas se combinaron antes de ser secadas con Na_2SO_4 anhidro y concentradas para obtener 9.3 g (93% rendimiento) de un sólido blanco correspondiente al compuesto **3**. El intermediario **3** (10.02 g, 0.03 mmol) fue colocado en un matraz de fondo redondo de 250 mL y fue disuelto en THF anhidro con la ayuda de una barra de agitación magnética. La solución resultante se trató con el aldehído correspondiente (0.03 mmol) para la síntesis de cada β -aminoéster. Se removieron las sales del crudo de reacción por filtración y se evaporó el THF para purificar el producto crudo obtenido empleando una mezcla de hexano:acetato de etilo (9:1) como fase móvil y sílica gel como fase estacionaria. De esta forma fue posible obtener los acrilatos **4a-f** en buenos rendimientos.

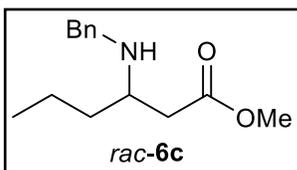
El acrilato correspondiente (0.03 mmol) se colocó en un matraz de fondo redondo de 25 mL y se trató con nitrato de bismuto pentahidratado (0.8 g). La mezcla de reacción se agitó por 5 min a 0°C y posteriormente se adicionó bencilamina (0.03 mmol). La reacción se agitó toda la noche para obtener un producto oleoso del que fueron retiradas las sales por filtración usando CH_2Cl_2 (25 mL x 2). La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na_2SO_4 anhidro y se purificó empleando hexano:acetato de etilo (95:5) como fase móvil y sílica gel como fase estacionaria para obtener el β -aminoéster correspondiente (*rac*-**6a-f**).



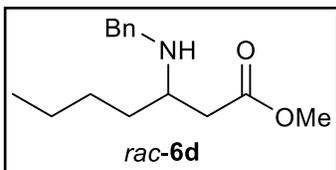
rac-**6a**³: líquido ámbar, 63% Rdto. MS-TOF: $[\text{M}+1]^+$ calculado para $[\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{NO}_2]^+$ 208.1332, encontrado 208.1331 (error 0.48 ppm, 0.0004%). RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7.32 (d, $J = 4.2$ Hz, 4H), 7.26 (m, 1H), 3.79 (q, $J = 12.3$ Hz, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.16 (m, $J = 6.3$ Hz, 1H), 2.51 (dd, $J = 6.9, 15.3$, 1H), 2.39 (dd, $J = 6, 15$, 1H), 1.83 (br s, 1H), 1.43 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H). RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 20.58, 41.5, 49.8, 51.3, 51.7, 127.1, 128.3, 128.6, 140.4, 173.0.



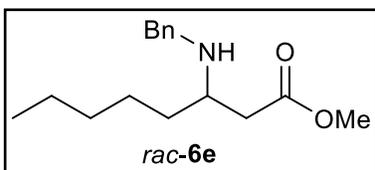
*rac-6b*⁴: líquido ámbar, 67% Rdto. MS-TOF: [M+1]⁺ calculado para [C₁₃H₂₀NO₂]⁺ 222.1499, encontrado 222.1489 (error 4.5 ppm, 0.0004%). RMN de ¹H (300MHz, CDCl₃): δ 7.32 (m, 5H), 3.78 (s, 2H), 3.67 (s, 3H), 2.97 (quint, *J* = 6 Hz, 1H), 2.46 (m, 2H), 1.53 (m, 2H) + (br, 1H), 0.92 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). RMN de ¹³C{¹H} (75 MHz, CDCl₃): δ 10.0, 26.9, 38.8, 51.0, 51.6, 55.6, 127.0, 128.3, 128.5, 140.7, 173.2.



*rac-6c*⁵: líquido ámbar, 57% Rdto. MS-TOF: [M+1]⁺ calculado para [C₁₄H₂₂NO₂]⁺ 236.1656, encontrado 236.1647 (error 3.8 ppm, 0.0003%). RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.27 (m, 5H), 3.78 (s, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.03 (quint, *J* = 6.3 Hz, 1H), 2.46 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 1.43 (m, 4H) + (br, 1H), 0.91 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H). RMN de ¹³C{¹H} (75 MHz, CDCl₃): δ 14.3, 19.1, 36.7, 39.2, 51.1, 51.6, 54.1, 127.0, 128.2, 128.5, 140.7, 173.2.

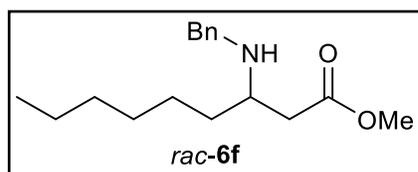


rac-6d: líquido ámbar, 79% Rdto. MS-TOF: [M+1]⁺ calculado para [C₁₅H₂₄NO₂]⁺ 250.1812, encontrado 250.1803 (error 3.6 ppm, 0.0004%). RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.28 (m, 5H), 3.78 (s, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.01 (quint, *J* = 6.3 Hz, 1H), 2.46 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 1.42 (m, 6H) + (br, 1H), 0.89 (t, *J* = 6.6 Hz, 3H). RMN de ¹³C{¹H} (75 MHz, CDCl₃): δ 14.2, 22.9, 28.0, 34.2, 39.2, 51.1, 51.7, 54.4, 127.0, 128.3, 128.5, 140.7, 173.2.



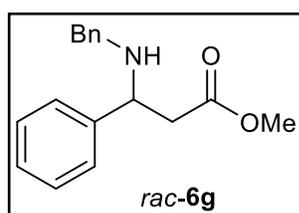
rac-6e: líquido ámbar, 60% Rdto. MS-TOF: [M+1]⁺ calculado para [C₁₆H₂₆NO₂]⁺ 264.1969, encontrado 264.1956 (error 4.9 ppm, 0.0005%). RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 7.27 (m, 5H), 3.78 (s, 2H), 3.67 (s,

3H), 3.02 (quint, $J = 6$ Hz, 1H), 2.46 (d, $J = 6$ Hz, 2H), 1.46 (m, 8H) + (br, 1H), 0.89 (t, $J = 6$ Hz, 3H). RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 14.1, 22.7, 25.5, 32.0, 34.4, 39.2, 51.1, 51.6, 54.3, 127.0, 128.2, 128.5, 140.7, 173.2.



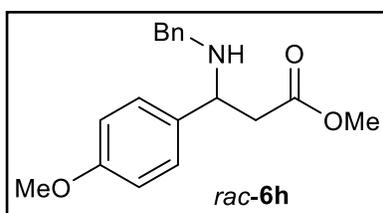
rac-6f: líquido ámbar, 50% Rdto. MS-TOF: $[\text{M}+1]^+$ calculado para $[\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{NO}_2]^+$ 278.2125, encontrado 278.1156 (error 348.3 ppm, 0.034%). RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7.26 (m, 5H), 3.78 (s, 2H),

3.67 (s, 3H), 3.01 (quint, $J = 6$ Hz, 1H), 2.46 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 1.46 (m, 10H) + (br, 1H), 0.88 (t, $J = 5.7$ Hz, 3H). RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 14.2, 22.7, 25.8, 29.5, 31.9, 34.5, 39.2, 51.1, 51.6, 54.4, 127.0, 128.3, 128.5, 140.7, 173.2.



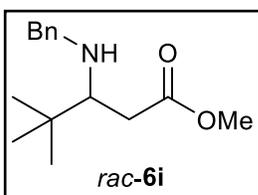
*rac-6g*⁶: líquido ámbar. MS-TOF: $[\text{M}+1]^+$ calculado para $[\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{NO}_2]^+$ 270.1499, encontrado 270.1501 (error 0.74 ppm, 0.00007%). RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3): δ 7.39-7.25 (m, 10H), 4.15 (dd, $J = 5.2, 8.6$ Hz, 1H), 3.71-3.55 (m, 5H),

2.77 (dd, $J = 8.8, 15.6$ Hz, 1H), 2.55 (dd, $J = 5.2, 15.6$ Hz, 1H). RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (100 MHz, CDCl_3): δ 42.8, 51.3, 58.8, 65.3, 126.9, 127.1, 127.5, 128.1, 128.3, 128.6, 140.2, 142.4, 172.2.



*rac-6h*⁷: líquido ámbar. 50% Rdto. MS-TOF: $[\text{M}+1]^+$ calculado para $[\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{NO}_3]^+$ 300.1605, encontrado 300.1601 (error 1.3 ppm, 0.0001%). RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 7.33-7.23 (m, 7H), 6.85 (d, $J = 9$ Hz, 2H), 4.06 (q, $J = 5.4$ Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.67-3.50 (m, 5H), 2.76-2.57 (m, 2H),

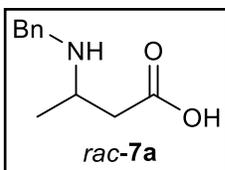
1.97 (br s, 1H). RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 43.1, 51.4, 51.8, 55.4, 58.2, 114.1, 127.0, 128.3, 128.5, 134.6, 140.4, 159.0, 172.6.



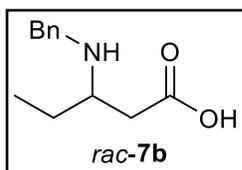
*rac-6i*⁶: líquido ámbar. MS-TOF: [M+1]⁺ calculado para [C₁₅H₂₄NO₂]⁺ 250.1813, encontrado 250.1812 (error 0.4 ppm, 0.00004%). RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 7.32-7.23 (m, 5H), 3.90-3.68 (m, 5H), 2.80 (q, *J* = 4.2 Hz, 1H), 2.57 (dd, *J* = 4.2, 14.7 Hz, 1H), 2.29 (dd, *J* = 8.4, 14.7 Hz, 1H), 1.29 (br s, 1H), 0.92 (s, 9H). RMN de ¹³C{¹H} (100 MHz, CDCl₃): δ 26.7, 35.6, 37.0, 51.8, 54.3, 64.1, 127.0, 128.4, 141.2, 174.3.

Procedimiento general para la síntesis de β-aminoácidos N-bencilados

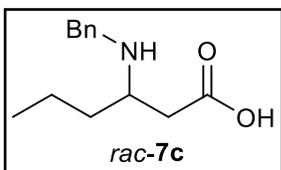
En un matraz de fondo redondo de 50 mL conteniendo agua (10 mL) se agregó el β-aminoéster *N*-bencilado correspondiente (0.01 mmol) y NaOH (1 equiv.). La mezcla de reacción se calentó a reflujo por 4 horas y al finalizar el tiempo de reacción, el crudo fue neutralizado y el agua se evaporó a presión reducida. El producto se lavó con CH₂Cl₂ (15 mL x 2), se filtró y se decantó con MeOH para obtener un polvo blanco correspondiente al β-aminoácido *N*-bencilado (*rac-7a-i*).



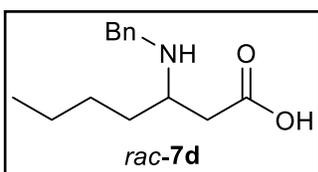
*rac-7a*⁶: polvo blanco. 86% Rdto. MS-TOF: [M+1]⁺ calculado para [C₁₁H₁₆NO₂]⁺ 194.1186, encontrado 194.1175 (error 5.7 ppm, 0.0006%). RMN de ¹H (400MHz, D₂O): δ 7.42 (s, 5H), 4.18 (q, *J* = 16.8 Hz, 2H), 3.52 (m, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.28 (br s, 1H), 2.59 (dd, *J* = 4.8, 13 Hz, 1H), 2.54 (dd, *J* = 4.5, 12.8 Hz, 1H), 1.32 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H). RMN de ¹³C{¹H} (100 MHz, D₂O): δ 15.9, 38.2, 48.1, 51.2, 129.3, 129.6, 130.9, 176.4.



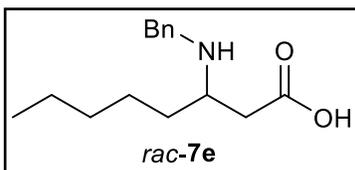
*rac-7b*⁸: polvo blanco. 89% Rdto. MS-TOF: [M+1]⁺ calculado para [C₁₂H₁₈NO₂]⁺ 208.1343, encontrado 208.1331 (error 4.3 ppm, 0.0004%). RMN de ¹H (400 MHz, D₂O): δ 7.40 (s, 5H), 4.17 (q, *J* = 9, 1 Hz, 2H), 3.31 (m, 1H), 2.56 (dd, *J* = 3.6, 12.9 Hz, 1H), 2.40 (dd, *J* = 5.4, 12.7 Hz, 1H), 1.78 (m, 1H), 1.59 (m, 1H), 0.88 (t, *J* = 7.6Hz, 3H). RMN de ¹³C{¹H} (100 MHz, D₂O): δ 8.8, 23.3, 35.3, 47.9, 56.7, 129.3, 129.5, 131.2, 178.2.



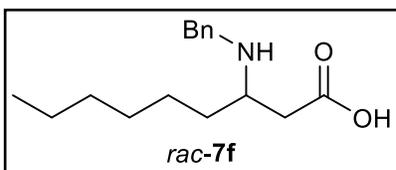
*rac-7c*⁸: polvo blanco. 97% Rdto. MS-TOF: [M+1]⁺ calculado para [C₁₃H₂₀NO₂]⁺ 222.1499, encontrado 222.1488 (error 5 ppm, 0.0005%). RMN de ¹H (400 MHz, D₂O): δ 7.40 (s, 5H), 4.18 (q, *J* = 10.2 Hz, 2H), 3.55 (m, 1H), 2.56 (dd, *J* = 3.6, 12.6 Hz, 1H), 2.40 (dd, *J* = 5.7, 12.6 Hz, 1H), 1.70 (m, 1H), 1.55 (m, 1H), 1.30 (m, 2H), 0.83 (t, *J* = 5.7 Hz, 3H). RMN de ¹³C{¹H} (100 MHz, D₂O): δ 12.9, 18.0, 32.3, 35.9, 47.8, 55.1, 129.3, 129.4, 129.5, 131.4, 178.3.



*rac-7d*⁹: polvo blanco. 84% Rdto. MS-TOF: [M+1]⁺ calculado para [C₁₄H₂₂NO₂]⁺ 236.1656, encontrado 236.1644 (error 5.0 ppm, 0.0005%). RMN de ¹H (400 MHz, D₂O): δ 7.26 (s, 5H), 4.0 (t, *J* = 10.2 Hz, 2H), 3.32 (m, 1H), 2.68 (dd, *J* = 4.8, 17.8 Hz, 1H), 2.28 (dd, *J* = 6.8, 18 Hz, 1H), 1.60 (m, 1H), 1.47 (m, 1H), 1.08 (m, 4H), 0.63 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H). RMN de ¹³C{¹H} (100 MHz, D₂O): δ 12.9, 21.4, 26.4, 29.5, 34.0, 48.5, 54.1, 129.1, 129.5, 129.7, 130.3, 137.9.

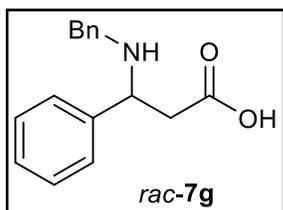


rac-7e: polvo blanco. 80% Rdto. MS-TOF: [M+1]⁺ calculado para [C₁₅H₂₄NO₂]⁺ 250.1812, encontrado 250.1803 (error 3.6 ppm, 0.0004%). RMN de ¹H (400 MHz, D₂O): δ 7.25 (s, 5H), 4.03 (s, 2H), 3.32 (m, 1H), 2.67 (dd, *J* = 4.8, 18 Hz, 1H), 2.28 (dd, *J* = 6.8, 17.6 Hz, 1H), 1.58 (m, 1H), 1.46 (m, 1H), 1.03 (m, 6H), 0.60 (t, *J* = 6.4 Hz, 3H). RMN de ¹³C{¹H} (100 MHz, D₂O): δ 13.0, 21.4, 23.9, 29.7, 30.3, 34.0, 48.5, 54.1, 129.1, 129.5, 129.7, 130.2, 137.9.



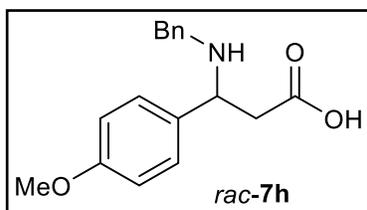
rac-7f: polvo blanco. 83% Rdto. MS-TOF: [M+1]⁺ calculado para [C₁₆H₂₆NO₂]⁺ 264.1969, encontrado 264.2005 (error 13.63 ppm, 0.0014%). RMN de ¹H (400 MHz, D₂O): δ 7.36 (s, 5H), 4.18 (s, 2H), 3.41 (m, 1H), 2.76 (dd, *J* = 4.8, 17.8 Hz, 1H), 2.67 (dd, *J* = 6.8, 17.6 Hz, 1H), 1.69 (m, 1H),

1.56 (m, 1H), 1.16 (m, 8H), 0.72 (t, $J = 6$ Hz, 3H). RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (100 MHz, D_2O): δ 13.2, 21.7, 24.2, 27.8, 29.7, 30.6, 34.1, 48.6, 54.0, 129.2, 129.7, 129.8, 130.3, 174.0.



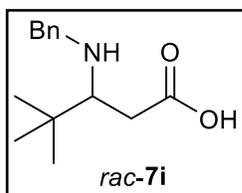
*rac-7g*⁶: polvo blanco. 80% Rdto. RMN de ^1H (CD_3OD , gotas NH_4OH , 200 MHz): δ 7.42-7.22 (m, 10H), 4.95 (dd, $J = 4.4$, 10.4, 1H), 3.33 (s, 2H), 2.63 (dd, $J = 10.4$, 16.8, 1H), 2.48 (dd, $J = 4.4$, 17.2, 1H). RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CD_3OD , gotas

NH_4OH , 50 MHz): δ 45.3, 50.9, 60.3, 126.6, 126.9, 127.3, 128.0, 128.1, 139.3, 142.6, 178.3.



rac-7h: polvo blanco. 54% Rdto. RMN de ^1H (CD_3OD , 400 MHz): δ 7.26 (d, $J = 9.6$ Hz, 7H), 7.04 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 4.45 (dd, $J = 3.2$, 10.2 Hz 1H), 2.76 (dd, $J = 4.8$, 17.8 Hz, 1H), 4.00 (dd, $J = 13.2$, 25.2 Hz, 2H), 3.85 (s,

3H), 2.86 (dd, $J = 10.8$, 16.6 Hz, 1H), 2.65 (dd, $J = 3.6$, 16.8 Hz, 2H). RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (CD_3OD , 100 MHz): δ 38.5, 48.1, 54.4, 59.3, 14.4, 126.4, 128.9, 128.9, 129.0, 129.1, 131.8, 160.7, 176.0.



*rac-7i*⁶: polvo blanco. 88% Rdto. MS-TOF: $[\text{M}+1]^+$ calculado para $[\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{NO}_2]^+$ 236.1656, encontrado 236.1638 (error 7.6 ppm, 0.0008%). RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) δ 7.27 (s, 5H), 4.28 (m, 1H), 4.04 (m, 1H), 3.14 (m, 1H), 2.69 (m, 1H), 2.53 (m, 1H), 0.75 (m, 9H). RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (100 MHz, D_2O): δ 24.6, 32.0, 33.3, 50.6, 62.6, 129.1, 129.8, 130.2, 174.3.

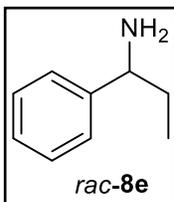
Procedimiento general para la desimetrización mecanoenzimática de β -aminoésteres N-bencilados empleando CALB

En un recipiente de molienda de ágata (12 mm de diámetro, 4.6 mL de capacidad) conteniendo una bola de ágata (6 mm de diámetro, 480 mg de peso), o en un recipiente de molienda de acero inoxidable (15 mm de diámetro, 4.6 mL de capacidad) conteniendo una bola de acero inoxidable (8 mm de diámetro, 1.5 g de peso), o en un recipiente de Teflón® (10 mm de diámetro, 6.5 mL de capacidad) conteniendo una bola de Teflón® (8 mm de diámetro, 1.2 g de peso), se colocó el sustrato racémico a resolver (0.4 mmol) y N435 (40 mg), antes de adicionar el aditivo LAG (0.2 mL), y agua (0.2 mmol, 3.6 μ L). El reactor se cerró y fue colocado en un equipo Mixer Mill MM200 programado para conducir la reacción a frecuencia constante durante el periodo de tiempo requerido. Una vez que finalizó la reacción, se extrajo el contenido del reactor con MeOH (2 x 2.5 mL) y el producto crudo se transfirió a un tubo Falcon de 50 mL. La suspensión resultante se centrifugó a 3500 rpm por dos periodos de 5 minutos. El sobrenadante se recuperó y se concentró para su purificación usando sílica gel como fase estacionaria y hexano:acetato de etilo (9:1) para la recuperación del sustrato y MeOH:CH₂Cl₂ (8:2) para recuperar el producto de biocatálisis.

8.3 Parte experimental del Capítulo II

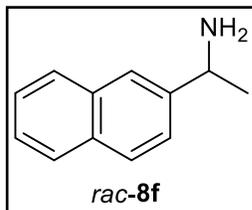
Procedimiento general para la síntesis de aminas quirales, aplicable para rac-8e y rac-8f

Un en matraz de fondo redondo de 50 mL se colocó el aldehído correspondiente (7 mmol) y formiato de amonio (0.07 mmol), antes de añadir 25 mL de una mezcla MeOH:H₂O (9:1) y de agitar la reacción. Después de comprobar la completa disolución de los componentes, se adicionó Pd/C (10%, 300 mg) y la reacción se agitó toda la noche a temperatura ambiente empleando atmosfera de H₂. Al finalizar el tiempo de reacción, se removió el catalizador por filtración sobre Celita y la solución filtrada se concentró y se purificó empleando gel de sílice como fase estacionaria y una mezcla de hexano:acetato de etilo (8:2) como fase móvil, para obtener la amina deseada.



*rac-8e*¹⁰: aceite amarillo. 87% Rdto. MS-TOF: [M+1]⁺ calculado para [C₈H₁₁C]⁺ 119.0866, encontrado 119.0862 (error 3.36 ppm, 0.0003%). RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.38-7.25 (m, 5H), 4.56 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 2.29 (br, 2H), 1.89-1.66 (m, 2H), 0.91 (t, *J* =

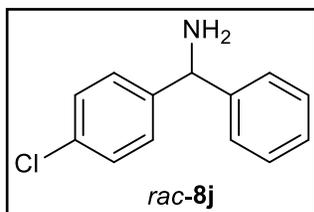
7.2 Hz, 3H). RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (75 MHz, CDCl_3): δ 10.31, 31.98, 76.09, 126.14, 127.59, 128.50, 144.74.



*rac-8f*¹⁰: sólido verdoso. 75% Rdto. MS-TOF: $[\text{M}+1]^+$ calculado para $[\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{C}]^+$ 155.0866, encontrado 155.0847 (error 12.25 ppm, 0.0012%). RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.03-6.98(m, 4H), 6.69-6.67 (m, 3H), 4.23 (q, J = 6.3, 1H), 1.44 (s, 1H), 0.76 (d, J = 6.6, 3H). RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 25.29, 70.64, 123.90, 125.95, 126.31, 127.84, 128.10, 128.45, 133.04, 133.45, 143.34.

Procedimiento para la síntesis de la amina racémica rac-8j

En un matraz de fondo redondo de 100 mL se colocó 4-clorobenzofenona (10 mmol) y una mezcla de formamida y ácido fórmico (2:1, 30 mL). La mezcla resultante se calentó a 100°C por 18 h. Una vez concluido el tiempo de reacción, el crudo se enfrió hasta temperatura ambiente y se trató con agua (30 mL). El producto crudo se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 30 mL), se combinaron las fases orgánicas y se lavaron con salmuera, se secaron con Na_2SO_4 anhidro y se concentraron para su purificación empleando sílica gel como fase estacionaria y una mezcla de hexano:acetato de etilo (9:1) como fase móvil.

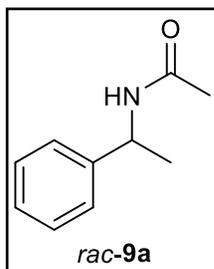


*rac-8j*¹¹: aceite amarillo. 94% Rdto. MS-TOF: $[\text{M}+1]^+$ calculado para $[\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClC}]^+$ 201.0466, encontrado 201.0465 (error 0.49 ppm, 0.00005%). RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.37-7.25 (m, 9H), 5.19 (s, 1H), 1.89 (s, 2H). RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 59.27, 126.93, 127.34, 128.42, 128.71, 128.74, 132.75, 144.11, 145.27.

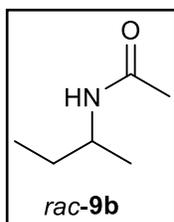
Procedimiento general para la síntesis de las amidas quirales rac-8a y rac-8j.

En un matraz de fondo redondo de 25 mL se colocó la amina correspondiente (2 mmol) y CH_2Cl_2 (10 mL). La mezcla de reacción se agitó vigorosamente y se colocó en un baño de hielo a 0°C. Posteriormente, se adicionó gota a gota anhídrido acético glacial (3.5 mmol) y la reacción se agitó toda la noche

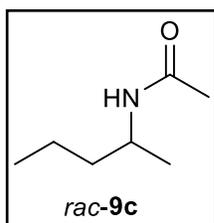
permitiéndole alcanzar la temperatura del ambiente. El producto crudo se secó a presión reducida y se extrajo empleando acetato de etilo y solución saturada de carbonato de sodio. La fracción orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro, se concentró a presión reducida y se purificó empleando gel de sílice como fase estacionaria y hexano:acetato de etilo (9:1) como fase móvil para obtener la amida deseada.



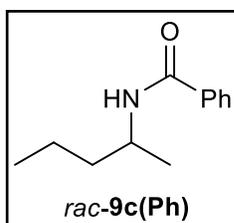
*rac-9a*¹²: sólido blanco. 100% Rdto. MS-TOF: [M+1]⁺ calculado para [C₁₀H₁₄NO]⁺ 164.1080, encontrado 164.1070 (error 6.09 ppm, 0.0006%). RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.32-7.22 (m, 5H), 6.12 (br, 1H), 5.10 (q, *J* = 7.5 Hz, 1H), 1.94 (s, 1H), 1.46 (d, *J* = 6.9, 3H). RMN de ¹³C{¹H} (75 MHz, CDCl₃): δ = 21.91, 23.52, 48.90, 126.33, 127.46, 128.78, 143.38, 169.40.



*rac-9b*¹³: líquido incoloro. 94% Rdto. MS-TOF: [M+1]⁺ calculado para [C₆H₁₄NO]⁺ 116.1080, encontrado 116.1070 (error 8.61 ppm, 0.0009%). RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 5.73 (br, 1H), 3.90-3.76 (m, 1H), 1.91 (s, 1H), 1.45-1.35 (m, 2H), 1.06 (d, *J* = 6.6, 3H), 0.85 (t, *J* = 7.5, 3H). RMN de ¹³C{¹H} (75 MHz, CDCl₃): δ = 10.49, 20.48, 29.70, 46.74, 169.72.

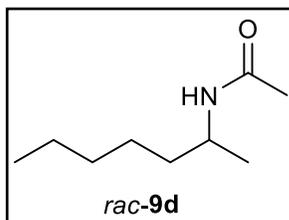


*rac-9c*¹⁴: líquido incoloro. 95% Rdto. MS-TOF: [M+1]⁺ calculado para [C₇H₁₆NO]⁺ 130.1237, encontrado 130.1226 (error 8.45 ppm, 0.0008%). RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 3.72-3.58 (m, 1H), 1.70 (s, 3H), 1.16-1.09 (m, 4H), 0.83 (d, *J* = 6.6, 3H), 0.61 (t, *J* = 6.9, 3H). RMN de ¹³C{¹H} (75 MHz, CDCl₃): δ = 13.50, 18.95, 20.26, 22.51, 38.40, 44.66, 169.96.

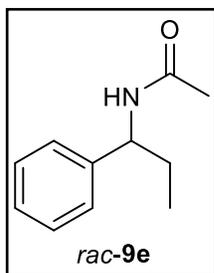


*rac-9c(Ph)*¹⁵: sólido blanco. 87% Rdto. MS-TOF: [M+1]⁺ calculado para [C₁₂H₁₈NO]⁺ 192.1393, encontrado 192.1383

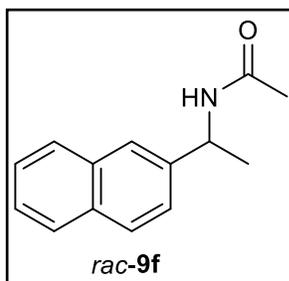
(error 5.20 ppm, 0.0005%). RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.75 (d, J = 6.9, 2H), 7.47-7.37 (m, 3H), 6.01 (br, 1H), 4.26-4.12(m, 1H), 1.53-1.47 (m, 2H), 1.44-1.32 (m, 2H), 1.21 (d, J = 6.3, 3H), 0.92 (t, J = 7.2, 3H). RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.16, 19.51, 21.22, 39.40, 45.69, 127.00, 128.67, 131.41, 135.35, 167.03



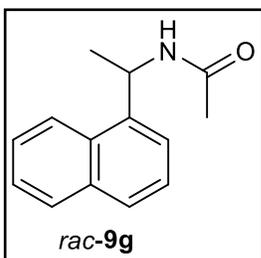
*rac-9d*¹⁶: sólido blanco. 94% Rdto. MS-TOF: $[\text{M}+1]^+$ calculado para $[\text{C}_9\text{H}_{20}\text{NO}]^+$ 158.1550, encontrado 158.1543 (error 4.42 ppm, 0.0004%). RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ = 5.58 (bs, 1H), 3.98-3.85 (m, 1H), 1.93 (s, 3H), 1.41-1.24 (m, 8H), 1.08 (d, J = 6.6, 3H), 0.84 (t, J = 6.9, 3H). RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 1.18, 21.08, 22.72, 23.65, 25.85, 31.85, 37.01, 45.48, 169.61.



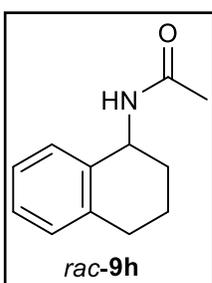
*rac-9e*¹⁷: sólido blanco. 99% Rdto. MS-TOF: $[\text{M}+1]^+$ calculado para $[\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}]^+$ 119.0866, encontrado 119.0862 (error 3.36 ppm, 0.0003%). RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.35-7.26 (m, 5H), 5.67 (t, J = 6.6, 1H), 2.08 (s, 3H), 1.98-1.77 (m, 2H), 0.89 (t, J = 7.5, 3H). RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 10.10, 21.45, 29.47, 126.74, 127.99, 128.55, 140.70, 170.63.



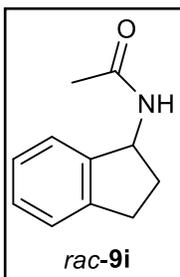
*rac-9f*¹²: sólido blanco. 85% Rdto. MS-TOF: $[\text{M}+1]^+$ calculado para $[\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}]^+$ 155.0866, encontrado 155.0840 (error 16.76 ppm, 0.0002%). RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ = 7.87-7.82 (m, 4H), 7.51-7.48 (m, 3H), 6.07 (q, J = 6.3, 1H), 2.12 (s, 3H), 1.64 (d, J = 6.6, 3H). RMN de $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 21.60, 22.39, 72.63, 124.27, 125.20, 126.25, 126.41, 127.84, 128.20, 128.54, 133.18, 133.32, 139.16, 170.59.



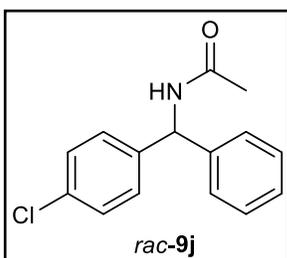
*rac-9g*¹²: sólido blanco. 71% Rdto. MS-TOF: [M+1]⁺ calculado para [C₁₄H₁₆NO]⁺ 214.1237, encontrado 214.1228 (error 4.20 ppm, 0.0004%). RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 8.08 (d, *J* = 8.1, 1H), 7.85 (d, *J* = 7.2, 1H), 7.78 (d, *J* = 7.27.8, 1H), 7.56-7.41 (m, 4H), 5.94-5.85 (m, 1H), 1.93 (s, 3H), 1.64 (d, *J* = 6.6, 3H). RMN de ¹³C{¹H} (75 MHz, CDCl₃): δ = 20.80, 23.45, 44.78, 122.72, 123.57, 125.35, 126.03, 126.74, 128.51, 128.92, 131.23, 134.03, 138.33, 169.32.



*rac-9h*¹⁵: sólido blanco. 85% Rdto. MS-TOF: [M+1]⁺ calculado para [C₁₂H₁₆NO]⁺ 190.1237, encontrado 190.1162 (error 39.45 ppm, 0.004%). RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.26-7.23 (m, 1H), 7.17-7.14 (m, 2H), 7.09-7.06 (m, 1H), 5.90 (br, 1H), 5.18-5.11 (m, 1H), 2.83-2.70 (m, 2H), 1.99 (s, 4H), 1.86-1.76 (m, 3H). RMN de ¹³C{¹H} (75 MHz, CDCl₃): δ = 20.05, 23.64, 29.36, 30.23, 47.59, 126.38, 127.43, 128.90, 129.31, 136.80, 137.73, 169.48.



*rac-9i*¹⁸: sólido blanco. 95% Rdto. MS-TOF: [M+1]⁺ calculado para [C₈H₉C]⁺ 117.0709, encontrado 117.0698 (error 9.40 ppm, 0.0009%). RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.25-7.15 (m, 4H), 6.13 (bs, 1H), 5.40 (q, *J* = 8.1, 1H), 2.96-2.76 (m, 2H), 2.57-2.46 (m, 1H), 1.97 (s, 3H), 1.83-1.70 (m, 1H). RMN de ¹³C{¹H} (75 MHz, CDCl₃): δ = 23.41, 30.31, 34.04, 54.75, 124.11, 124.86, 126.79, 128.01, 143.27, 143.47, 170.13.



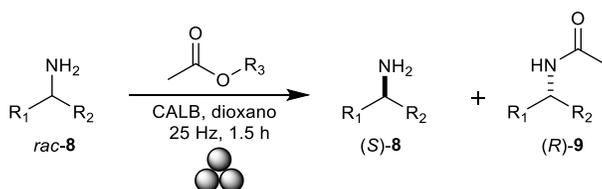
*rac-9j*¹⁹: sólido blanco. 84% Rdto. MS-TOF: [M+1]⁺ calculado para [C₁₂H₉ClC]⁺ 201.0466, encontrado 201.0465 (error 0.50 ppm, 0.00005%). RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.34-7.24 (m, 9H), 5.19 (s, 1H), 1.90 (s, 3H). RMN de ¹³C{¹H} (CDCl₃, 75 MHz): δ = 25.4, 59.29, 126.95, 127.36, 128.45,

128.73, 145.23, 144.09, 169.23.

Procedimiento general para la desimetrización mecanoenzimática de aminas racémicas empleando CALB

En un recipiente de molienda de ágata (12 mm de diámetro, 4.6 mL de capacidad) conteniendo una bola de ágata (6 mm de diámetro, 480 mg de peso), o en un recipiente de molienda de acero inoxidable (15 mm de diámetro, 4.6 mL de capacidad) conteniendo una bola de acero inoxidable (8 mm de diámetro, 1.5 g de peso), o en un recipiente de Teflón® (10 mm de diámetro, 6.5 mL de capacidad) conteniendo una bola de Teflón® (8 mm de diámetro, 1.2 g de peso), se colocó la amina correspondiente (0.82 mmol), el aditivo LAG (0.2 mL), el agente acilante (6 equivalentes) y N435 (100 mg). El reactor se cerró y se colocó en un equipo de molienda MM200 programado a la frecuencia necesaria por el tiempo requerido. Cuando terminó el proceso mecanoenzimático el producto crudo de la reacción se extrajo con metanol (5 mL) y se centrifugó dos veces a 3800 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue recuperado y concentrado para su purificación empleando sílica gel como fase estacionaria y una mezcla de hexano:acetato de etilo (9:1) como fase móvil.

Exploración del mejor agente acilante en la desimetrización de aminas quirales

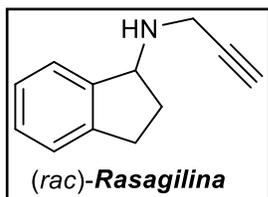


ensayo ^a	Amina	Agente acilante	(<i>S</i>)-8		(<i>R</i>)-9		c ^c (%)	E ^d
			Rdto (%)	ee (%) ^b	Rdto (%)	ee (%) ^b		
1	<i>rac</i> -8b	AE	60	4	30	66	6	5
2	<i>rac</i> -8b	AIPr	46	<i>rac</i>	40	<i>rac</i>	-	-
3	<i>rac</i> -8b	AIPrn	48	<i>rac</i>	32	<i>rac</i>	-	-
4	<i>rac</i> -8c	AE	70	27 ^e	26	94	22	42
5	<i>rac</i> -8c	AIPr	50	68 ^e	38	93	42	56
6	<i>rac</i> -8c	AIPrn	58	67 ^e	46	51	57	6
7	<i>rac</i> -8d	AE	48	17	32	96	15	58
8	<i>rac</i> -8d	AIPr	40	21	36	94	18	40
9	<i>rac</i> -8d	AIPrn	13	<i>rac</i>	67	<i>rac</i>	-	-
10	<i>rac</i> -8e	AE	97	<i>rac</i>	-	-	-	-
11	<i>rac</i> -8e	AIPr	81	8	12	>99	7	>200
12	<i>rac</i> -8e	AIPrn	73	18	20	>99	15	>200
13	<i>rac</i> -8f	AE	98	<i>rac</i>	-	-	-	-
14	<i>rac</i> -8f	AIPr	96	<i>rac</i>	-	-	-	-
15	<i>rac</i> -8f	AIPrn	41	88	48	>99	47	>500
16	<i>rac</i> -8g	AE	87	<i>rac</i>	-	-	-	-
17	<i>rac</i> -8g	AIPr	60	4	21	>99	4	>200
18	<i>rac</i> -8g	AIPrn	80	3	20	23	12	2
19	<i>rac</i> -8h	AE	91	<i>rac</i>	-	-	-	-
20	<i>rac</i> -8h	AIPr	46	39	42	>99	28	>200
21	<i>rac</i> -8h	AIPrn	67	<i>rac</i>	20	<i>rac</i>	-	-
22	<i>rac</i> -8i	AE	48	93	47	>99	48	>600
23	<i>rac</i> -8i	AIPr	36	33	40	>99	25	>200
24	<i>rac</i> -8i	AIPrn	30	<i>rac</i>	25	<i>rac</i>	-	-
25	<i>rac</i> -8j	AE	67	<i>rac</i>	20	<i>rac</i>	-	-
26	<i>rac</i> -8j	AIPr	45	<i>rac</i>	38	<i>rac</i>	-	-
27	<i>rac</i> -8j	AIPrn	10	<i>rac</i>	89	<i>rac</i>	-	-

^aLas reacciones se llevaron a cabo mediante agitación magnética y calentamiento a 55°C por 1.5 h, así como 100mg de N435, 6 equiv. del agente acilante y 5 mL de dioxano, a menos que se especifique otra condición. ^bDeterminado después del proceso de purificación usando HPLC empleando columna con fase estacionaria quiral. ^cCalculada empleando la Ecuación 6. ^dCalculada empleando la Ecuación 7. ^eDeterminado por derivatización con cloruro de benzoilo. AE= Acetato de Etilo. AIPr= Acetato de Isopropilo. AIPrn= Acetato de Isopropenilo.

Procedimiento general para la síntesis de (R) y (S)-Rasagilina vía resolución mecanoenzimática.

La desimetrización de Rasagilina se llevó a cabo como se indica en el *procedimiento general para la desimetrización mecanoenzimática de aminas empleando CALB* para la desimetrización de *rac-8i*; no obstante, en este caso fue necesario utilizar 10% más de biocatalizador. Después de concluir este proceso mecanoenzimático, se agregó mesilato de propargilo (1.64 mmol, 220 mg) al reactor de molienda, que fue cerrado nuevamente y agitado mecánicamente durante 15 minutos a 25 Hz. El producto crudo de reacción se extrajo con metanol (5 mL) y se purificó empleando gel de sílice como fase estacionaria y hexano:acetato de etilo (9:1) como fase móvil para obtener la forma (S) de la Rasagilina y la amida (R)-9i. Esta última fue disuelta en HCl 3 M (5 mL) y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 3 horas. La mezcla de reacción se basificó hasta pH 12 y se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 mL), la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró para obtener la amina (R)-8i, que se colocó en el reactor de molienda con 2 equivalentes de mesilato de propargilo y se activó mecanoquímicamente durante 15 minutos a 25 Hz para de esta forma obtener la forma (R) del fármaco Rasagilina.

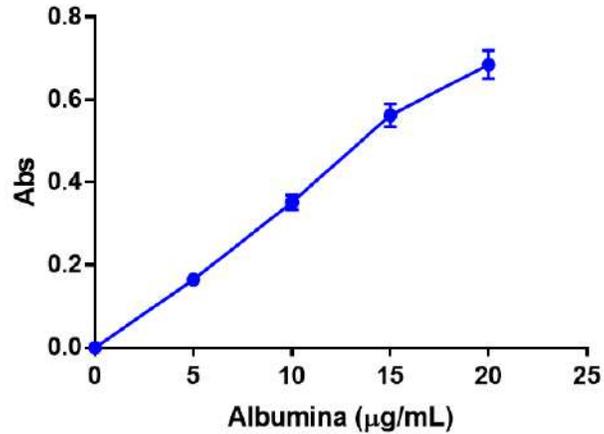


*rac-Rasagilina*²⁰: aceite amarillo. 86% Rdto. MS-TOF: [M+1]⁺ calculado para [C₈H₉C]⁺ 117.0709, encontrado 117.0696 (error 11.10 ppm, 0.001%). RMN de ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ = 7.35 (m, 1H), 7.22 (m, 3H), 4.42 (t, J = 6, 1H), 3.52 (s, 2H), 3.05 (m, 1H), 2.83 (m, 1H), 2.40 (m, J = 6.6, 1H), 2.27 (s, 1H), 1.87 (m, 2H). RMN de ¹³C{¹H} (CDCl₃, 75 MHz): δ = 30.31, 33.13, 36.02, 61.66, 71.37, 82.24, 124.07, 124.76, 126.13, 127.54, 143.70, 144.26.

8.4 Parte experimental del Capítulo III

Ensayo de Bradford para cuantificar la cantidad de CALB presente en la preparación líquida y gel de poliacrilamida

El análisis de la concentración de proteína en la preparación líquida se llevó a cabo construyendo una curva de calibración empleando albumina a diferentes concentraciones. Las diferentes muestras se analizaron mediante espectrofotometría UV/Vis midiendo la absorbancia (Abs) de cada muestra en conjunto con el reactivo de Bradford para obtener el siguiente gráfico.

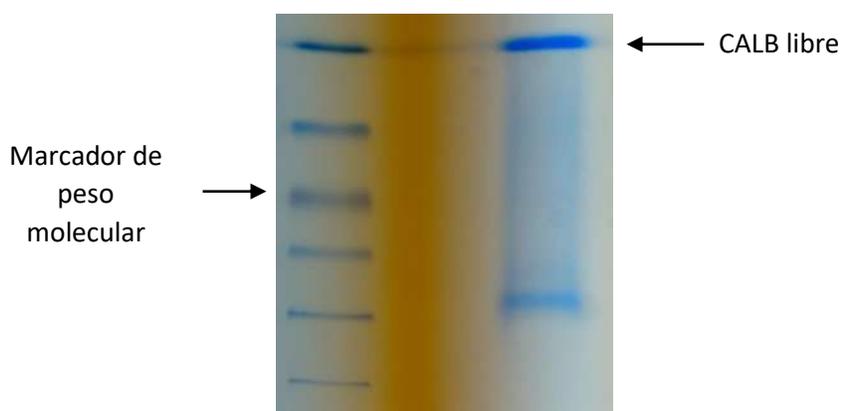


De este grafico puede obtenerse la siguiente ecuación:

$$Abs = 0.0353 \pm 0.0014(Albumina) - 0.0006 \pm 0.018$$

Al realizar la determinación de absorbancia de una muestra de CALB libre con una dilución 1/1000, se obtuvo el dato de Abs = 0.6253 que, sustituido en la ecuación anterior y despejando la cantidad de proteína, demostró que en cada mililitro de la presentación líquida de CALB están presentes 17.7 mg de enzima.

Adicionalmente, es posible observar una buena pureza de la proteína el gel de poliacrilamida al corroborar la presencia de una sola banda predominante en el carril donde se aplicó CALB libre.



Procedimiento general para la medición de actividad empleando CALB libre.

Para llevar a cabo la determinación de actividad en CALB libre fue necesario preparar una solución de butirato de 4-nitrofenilo (200 mM) empleando 2M2B como disolvente. Posteriormente, 230 μ L de este sustrato fueron colocados en un plato de una placa de 96 pozos previamente incubada a 45°C antes de agregar 20 μ L de una dilución enzimática (usando buffer Tris HCl 10 mM, pH 7, 2% Tritón) en el pozo. La reacción fue monitoreada a 405 nm en un equipo Synergy H4 Hybrid reader durante 20 minutos. Los datos colectados se graficaron para generar los gráficos correspondientes a la actividad enzimática.

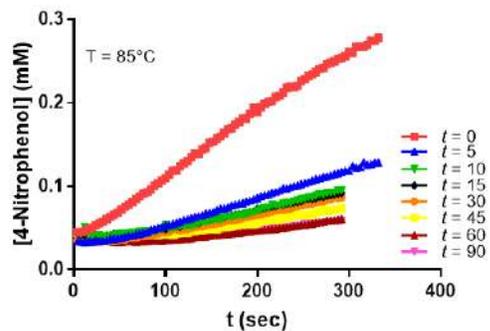
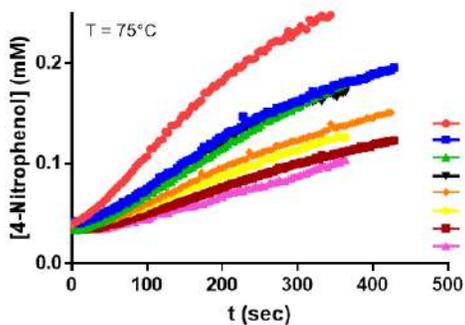
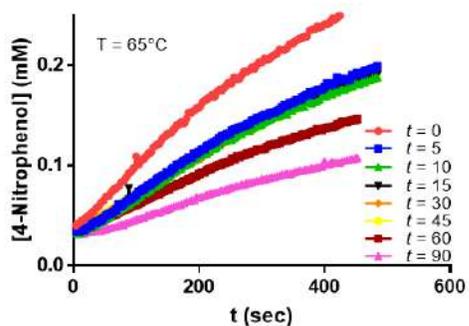
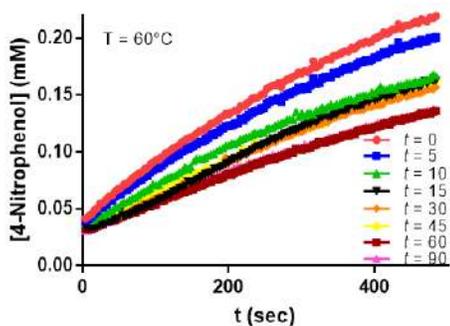
Procedimiento general para la medición de la desactivación enzimática por efecto térmico en CALB libre

La enzima libre o sus diluciones fueron incubadas con la ayuda de tubos Eppendorf de 1.5 mL y equipos Thermomixer programados a la temperatura deseada y con agitación constante a 300 rpm. De estos tubos fueron extraídas muestras (20 μ L) a tiempos pre-establecidos, que fueron sometidas a una evaluación de actividad empleando el *procedimiento general para la medición de actividad empleando CALB libre*.

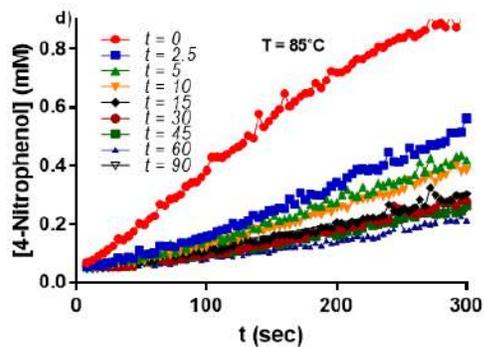
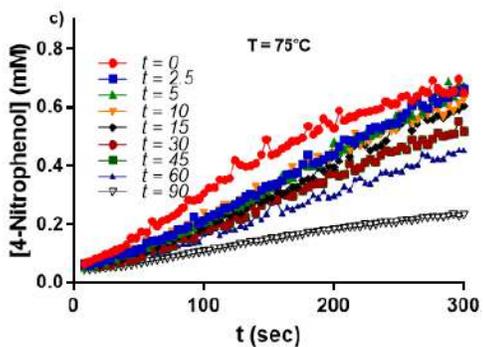
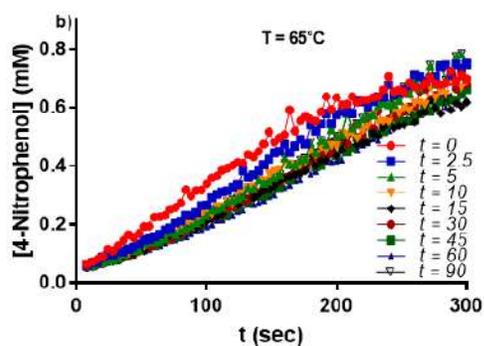
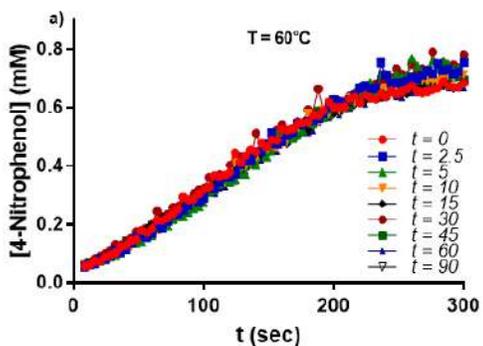
Procedimiento general para la medición de la desactivación por efecto térmico de N435c y N435pm

A una serie de tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad conteniendo 300 μ g de N435c o N435 previamente molida (ágata, 10 Hz, 1.5 h) se les adicionó 1.4 mL de buffer Tris (10 mM Tris HCl, pH 7, 2% Tritón) y la mezcla resultante se incubó a temperatura constante en un equipo Thermomixer a 300 rpm. Los tubos se retiraron entonces del proceso de incubación a tiempos determinados y el contenido se vertió sobre un pozo de una placa de 6 pozos. Adicionalmente, se emplearon 1.6 mL de buffer fresco para terminar la extracción del tubo Eppendorf y alcanzar el volumen operacional requerido. El plato de 6 pozos fue incubado a 45°C durante 5 minutos en un equipo Synergy H4 Hybrid reader antes de adicionar 20 μ L del sustrato. El plato fue monitoreado a 405 nm durante 20 minutos y los datos fueron colectados y graficados para obtener las curvas que se muestran a continuación para N435c y N435pm.

Para N435c se tiene que:



N435pm se tiene que:



Ecuaciones y cálculos para obtener los parámetros de desactivación térmicos de CALB libre, N435 y N435 previamente molida.

Como se mencionó en el cuerpo principal de este trabajo, los gráficos de desactivación por efecto térmico se componen de dos secciones y por tanto no pueden evaluarse a través del modelo lineal propuesto por Arrhenius.^{21,22} No obstante, existen aproximaciones matemáticas que pueden usarse para analizar el comportamiento de las gráficas obtenidas durante el desarrollo experimental.^{21,22}

El primer parámetro que puede evaluarse a través de los gráficos de desactivación es la energía de activación (E_a) para la destrucción térmica de los componentes lábil y resistente en CALB. Como se indica en la literatura las curvas de desactivación térmica, cuando se presentan dos componentes,^{21,22} pueden interpretarse empleando las siguientes ecuaciones:

Cuando el tiempo de calentamiento es largo:

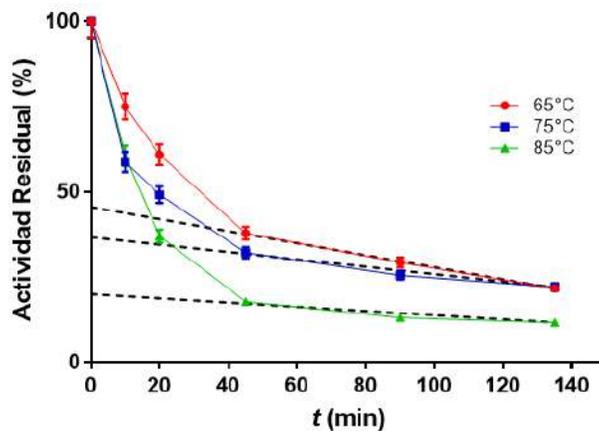
$$\%Actividad\ Residual = \frac{K_R E_{R0}}{K_L E_{L0} + K_R E_{R0} e^{-k_R t}}$$

Por otro lado, cuando el tiempo de calentamiento es corto:

$$\%Actividad\ Residual = \frac{K_L E_{L0}}{K_L E_{L0} + K_R E_{R0} e^{-k_L t}} + \frac{K_R E_{R0}}{K_L E_{L0} + K_R E_{R0}}$$

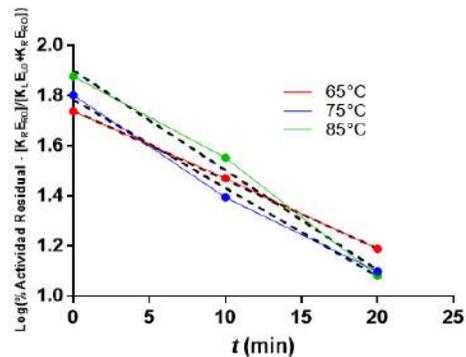
El decaimiento en actividad de la porción resistente está gobernado por la ecuación a tiempo de calentamiento largo, con una pendiente igual a $-k_R/2.303$. Así, extrapolando a tiempo 0 la intercepción con el eje de las ordenadas será $K_R E_{R0}/(K_L E_{L0} + K_R E_{R0})$. De esta forma, la parte inicial de las curvas puede corregirse y graficarse nuevamente usando la ecuación a tiempo de calentamiento corto en una escala semilogarítmica graficando la actividad residual vs el tiempo. La pendiente de estas curvas será igual a $-k_L/2.303$.^{21,22}

De esta forma, para CALB libre se tienen los siguientes datos:



T (°C)	k_R (1/s)	$K_R E_{RO} / (K_L E_{LO} + K_R E_{RO})$
65	0.4144 ±0.0144	45.4992 ±0.608
75	0.2581 ±0.048	36.6781 ±2.027
85	0.1579 ±0.0481	24.5135 ±2.032

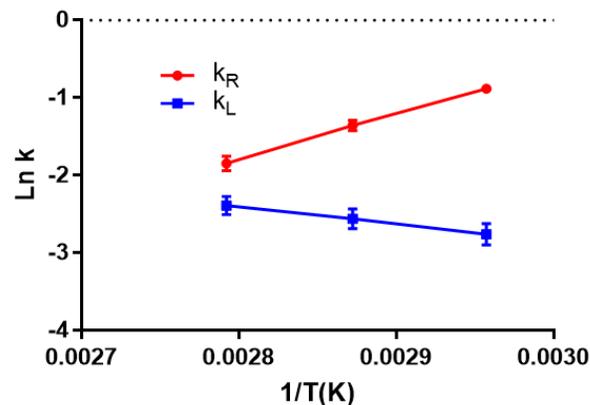
Cuando se grafica nuevamente considerando las descripciones anteriores se tiene que:



Y puede obtenerse:

T (°C)	k_L (1/s)
65	0.0633 ±0.0004
75	0.0775 ±0.0032
85	0.0916 ±0.0042

Finalmente, para obtener la energía de activación para la destrucción térmica de CALB se puede emplear la ecuación de Arrhenius para graficar los datos obtenidos de k_L y k_R respecto a la temperatura, de forma que:



Las pendientes de cada curva están reportadas en el cuerpo de este trabajo (Tabla 9).^{21, 22}

Con los valores de k para ambas fracciones es posible calcular D y z , empleando las siguientes ecuaciones:

$$D = \frac{\ln(10)}{k}$$

$$\log(D) = \frac{T}{z}$$

Finalmente, este procedimiento se repitió para N435 y N435pm, a continuación, se reportan los valores de k_L y k_R para cada caso.^{21, 22}

Para N435:

T (°C)	k_R (1/s)	$K_{RERO}/(K_{LELO}+K_{RERO})$
60	0.5174 ±0.0480	72.517 ±2.904
65	0.6296 ±0.0348	65.829 ±1.900
75	0.8620 ±0.1167	60.496 ±4.796
85	1.0464 ±0.1142	38.016 ±4.69

T (°C)	k_L (1/s)
60	0.2436 ±0.0140
65	0.2680 ±0.0163
75	0.6333 ±0.1319
85	1.5667 ±0.1852

Para N435pm:

T (°C)	k_R (1/s)	$K_{RERO}/(K_{LELO}+K_{RERO})$
60	0.1379 ±0.0137	93.161 ±0.359
65	0.2169 ±0.0367	76.917 ±0.870
75	0.4861 ±0.0433	70.244 ±0.772
85	1.0577 ±0.2082	39.766 ±3.714

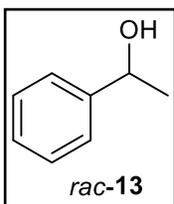
T (°C)	k_L (1/s)
60	0.2436 ±0.0202
65	0.2680 ±0.0272
75	0.6333 ±0.0272
85	1.5667 ±0.2738

Procedimiento general para la desimetrización del alcohol α -metilbencílico bajo condiciones estándar en agitación y calentamiento.

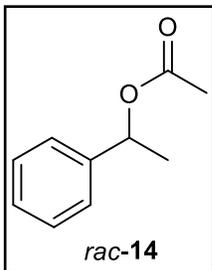
En un matraz de fondo redondo de 25 mL conteniendo hexano grado HPLC (10 mL), se colocó alcohol α -metilbencílico (500 μ L) y acetato de isopropenilo (450 μ L). La solución resultante se incubó a la temperatura deseada durante 5 minutos y posteriormente se adicionó N435c o N435pm (300 mg). El avance de la reacción se monitoreó a diferentes tiempos tomando alícuotas de 40 μ L del crudo de reacción, que fue resuspendido en 1.5 mL de hexano grado HPLC. La solución resultante se filtró y se analizó por HPLC empleando una columna con fase estacionaria quiral.

Procedimiento general para la desimetrización del alcohol α -metilbencílico bajo condiciones de resolución mecanoenzimática.

En un recipiente de molienda de ágata (12 mm de diámetro, 4.6 mL de capacidad) conteniendo una bola de ágata (6 mm de diámetro, 480 mg de peso), o en un recipiente de molienda de acero inoxidable (15 mm de diámetro, 4.6 mL de capacidad) conteniendo una bola de acero inoxidable (8 mm de diámetro, 1.5 g de peso), o en un recipiente de Teflón® (10 mm de diámetro, 6.5 mL de capacidad) conteniendo una bola de Teflón® (8 mm de diámetro, 1.2 g de peso), se colocó alcohol α -metilbencílico (50 μ L), hexano grado HPLC (0.2 mL), acetato de isopropenilo (41 μ L) y N435c o N435pm (30 mg). El reactor se cerró y la reacción se condujo a la frecuencia indicada, evaluando diferentes tiempos operacionales. Una vez concluido el tiempo de molienda, el crudo de reacción se extrajo empleando hexano grado HPLC (1.3 mL). La suspensión resultante se filtró y se analizó mediante HPLC empleando una columna con fase estacionaria quiral.



*rac-13*²³: líquido incoloro. MS-TOF: $[M+1]^+$ calculado para $[C_8H_{11}O]^+$ 123.0815, encontrado 123.0752 (error 51.19 ppm, 0.005%). RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.41-7.25 (m, 5H), 4.90 (q, J = 6 Hz, 1H), 1.51 (d, J = 3 Hz, 3H). RMN de ^{13}C $\{^1H\}$ (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 25.16, 70.38, 125.43, 127.46, 128.15, 145.86.



rac-**14**²³: líquido incoloro. MS-TOF: $[M+1]^+$ calculado para $[C_{10}H_{13}O_2]^+$ 165.0921, encontrado 165.0902 (error 11.51 ppm, 0.001%). RMN de 1H (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 7.41-7.28 (m, 5H), 5.92 (q, J = 3 Hz, 1H), 2.10 (s, 3H), 1.58 (d, J = 3 Hz, 3H). RMN de ^{13}C $\{^1H\}$ (75 MHz, $CDCl_3$): δ = 21.36, 22.23, 72.33, 126.11, 127.89, 128.52, 141.71, 170.34.

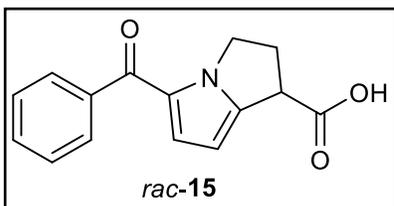
8.5 Parte experimental del Capítulo IV

Procedimiento general para la desimetrización de (\pm)-Ketorolaco bajo condiciones de resolución mecanoenzimática empleando la estrategia de esterificación enantioselectiva.

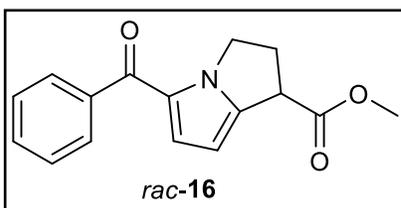
En un recipiente de molienda de ágata (12 mm de diámetro, 4.6 mL de capacidad) conteniendo una bola de ágata (6 mm de diámetro, 480 mg de peso), o en un recipiente de molienda de acero inoxidable (15 mm de diámetro, 4.6 mL de capacidad) conteniendo una bola de acero inoxidable (8 mm de diámetro, 1.5 g de peso), o en un recipiente de Teflón® (10 mm de diámetro, 6.5 mL de capacidad) conteniendo una bola de Teflón® (8 mm de diámetro, 1.2 g de peso), se colocó Ketorolaco racémico (0.1 mmol, 25 mg), N435 (30 mg), agente esterificante (12.5 equiv.) y MTBE (0.2 mL). El recipiente de molienda se cerró y se colocó en un equipo MixerMill MM200 programado para conducir el proceso de molienda a 25 Hz por 1.5 h. El contenido del reactor de molienda se extrajo con acetona (5 mL) y la suspensión resultante se centrifugó a 3800 rpm por 10 min. El sobrenadante se concentró y se analizó mediante HPLC empleando una columna con fase estacionaria quiral. Cuando se empleó metanol como agente esterificante, el crudo de reacción se purificó empleando gel de sílice como fase estacionaria y hexano:acetato de etilo (95:5) como fase móvil para la recuperación del éster derivado del Ketorolaco y CH_2Cl_2 para la recuperación del *Ketorolaco* libre.

Procedimiento general para la síntesis de los ésteres derivados del (\pm)-Ketorolaco

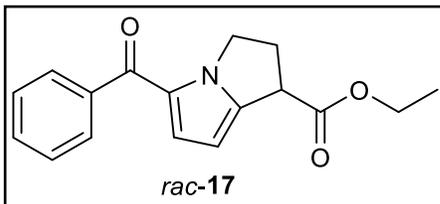
Una solución de benceno (5 mL), Ketorolaco racémico (0.1 mmol), el alcohol correspondiente (3 equivalentes) y ácido *para*-toluensulfónico (0.1 mmol) se colocó en un reactor de vidrio y se calentó a 120°C a presión constante durante 20 minutos en un equipo *Monowave* 50. Al finalizar el tiempo de reacción, se evaporó el disolvente y la reacción fue resuspendida en acetato de etilo, se lavó con salmuera, se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró para su purificación empleando sílica gel como fase estacionaria y una mezcla de hexano:acetato de etilo (9:1) para obtener el correspondiente éster derivado del Ketorolaco racémico.



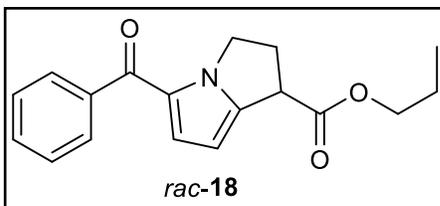
rac-15:²⁴ sólido blanco. MS-TOF: $[M+1]^+$ calculado para $[C_{15}H_{14}NO_3]^+$ 256.0979, encontrado 256.1 (error 8.2 ppm, 0.0008%). RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.85-7.83 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7.56 (m, 1H), 7.47 (m, 2H), 6.87 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 6.18-6.1 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 4.64-4.57 (m, 1H), 4.52-4.46 (m, 1H), 4.14 (dd, $J_1 = 3.2$ Hz, $J_2 = 8$ Hz, 1H), 3.00-2.81 (m, 2H) ppm. RMN de ^{13}C $\{^1H\}$ (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 185.19, 176.4, 141.8, 139.1, 131.5, 128.9, 128.2, 127.3, 125.2, 103.4, 47.5, 42.4, 31.0 ppm.



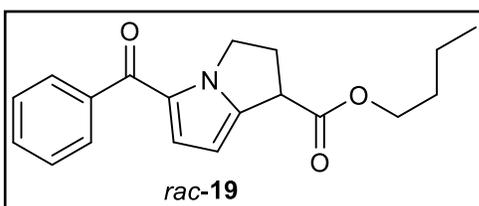
rac-16:²⁴ MS-TOF: $[M+1]^+$ calculado para $[C_{16}H_{16}NO_3]^+$ 270.1135, encontrado 270.1 (error 49.98 ppm, 0.005%). RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.85-7.82 (m, 2H), 7.56-7.52 (m, 1H), 7.49-7.45 (m, 2H), 6.85 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 6.13 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 4.63-4.47 (m, 1H), 4.50-4.43 (m, 1H), 4.10 (dd, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 16$ Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 2.99-2.91 (m, 1H), 2.87-2.78 (m, 1H). RMN de ^{13}C $\{^1H\}$ (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 185.0, 171.8, 142.3, 139.3, 131.4, 128.9, 128.2, 127.2, 125.0, 103.1, 52.6, 47.6, 42.5, 31.0 ppm.



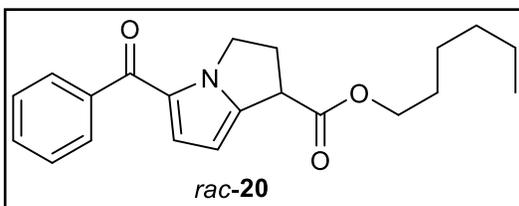
rac-17:²⁴ MS-TOF: $[M+1]^+$ calculado para $[C_{17}H_{18}NO_3]^+$ 284.1293, encontrado 284.1 (error 103.12 ppm, 0.01%). RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.84 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7.57-7.53 (m, 1H), 7.47 (t, $J = 8$ Hz, 2H), 6.85 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 6.13 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 4.64-4.57 (m, 1H), 4.50-4.43 (m, 1H), 4.31-4.19 (m, 2H), 4.09 (dd, $J_1 = 4$ Hz, $J_2 = 12$ Hz, 1H), 3.00-2.92 (m, 1H), 2.86-2.77 (m, 1H), 1.33 (t, $J = 8$ Hz, 3H). RMN de ^{13}C $\{^1H\}$ (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 185.0, 171.2, 142.5, 139.3, 131.4, 128.9, 128.2, 127.2, 125.0, 103.1, 61.5, 47.6, 42.7, 30.9, 14.2 ppm.



rac-18:²⁴ MS-TOF: $[M+1]^+$ calculado para $[C_{18}H_{20}NO_3]^+$ 298.1448, encontrado 298.1 (error 150.26 ppm, 0.015%). RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.84 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7.55-7.52 (m, 1H), 7.49-7.45 (m, 2H), 6.85 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 6.13 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 4.63-4.57 (m, 1H), 4.50-4.43 (m, 1H), 4.17-4.07 (m, 3H), 2.99-2.92 (m, 1H), 2.86-2.78 (m, 1H), 1.73 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 0.99 (t, $J = 8$ Hz, 3H). RMN de ^{13}C $\{^1H\}$ (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 185.0, 171.3, 142.6, 139.3, 131.4, 128.9, 128.1, 127.2, 125.0, 103.1, 67.1, 47.6, 42.7, 30.9, 22.0, 10.4 ppm.



rac-19:²⁴ MS-TOF: $[M+1]^+$ calculado para $[C_{19}H_{22}NO_3]^+$ 312.1605, encontrado 312.2 (error 126.53 ppm, 0.012%). RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.84 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7.57-7.53 (m, 1H), 7.49-7.45 (m, 2H), 6.85 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 6.13 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 4.62-4.57 (m, 1H), 4.50-4.45 (m, 1H), 4.21-4.17 (m, 2H), 4.09 (dd, $J_1 = 2.5$ Hz, $J_2 = 8$ Hz, 1H), 2.98-2.92 (m, 1H), 2.86-2.79 (m, 1H), 1.71-1.64 (m, 2H), 1.45-1.39 (q, $J = 4$ Hz, 2H), 0.97 (t, $J = 4$ Hz, 3H) ppm. RMN de ^{13}C $\{^1H\}$ (75 MHz, $CDCl_3$) δ : 185.0, 171.3, 142.6, 139.3, 131.4, 129.0, 128.9, 128.3, 128.2, 127.2, 125.0, 103.1, 63.4, 47.6, 42.7, 30.9, 30.6, 19.1, 13.7 ppm.



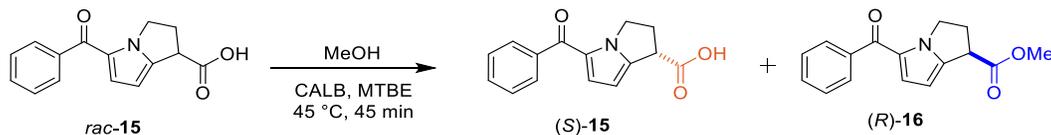
rac-20: MS-TOF: $[M+1]^+$ calculado para $[C_{21}H_{26}NO_3]^+$ 340.1918, encontrado 340.1906 (error 3.53 ppm, 0.004%). RMN de 1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.84-7.82 (m, 2H), 7.56-7.52 (m, 1H), 7.48-7.44 (m, 2H), 6.84 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 6.12 (d, $J = 4$ Hz, 1H), 4.61-4.56 (m, 1H), 4.49-4.44 (m, 1H), 4.21-4.14 (m, 2H), 4.10-4.06 (dd, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 16$ Hz, 1H), 2.98-2.92 (m, 1H), 2.83-2.78 (m, 1H), 1.70-1.64 (m, 2H), 1.40-1.28 (m, 6H), 0.92 (t, $J = 4$ Hz, 3H). RMN de ^{13}C $\{^1H\}$ (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 185.0,

171.3, 142.6, 139.3, 131.4, 128.9, 128.1, 127.2, 125.0, 103.1, 65.6, 47.6, 42.7, 31.4, 30.9, 28.5, 25.5, 22.5, 14.0 ppm.

Procedimiento general para la desimetrización de (±)-Ketorolaco bajo condiciones de resolución mecanoenzimática empleando la estrategia de hidrólisis enantioselectiva.

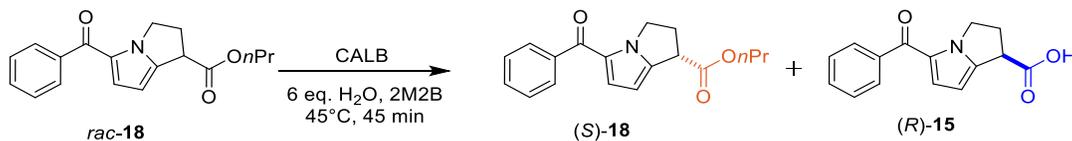
En un recipiente de molienda de ágata (12 mm de diámetro, 4.6 mL de capacidad) conteniendo una bola de ágata (6 mm de diámetro, 480 mg de peso), o en un recipiente de molienda de acero inoxidable (15 mm de diámetro, 4.6 mL de capacidad) conteniendo una bola de acero inoxidable (8 mm de diámetro, 1.5 g de peso), o en un recipiente de Teflón® (10 mm de diámetro, 6.5 mL de capacidad) conteniendo una bola de Teflón® (8 mm de diámetro, 1.2 g de peso), se colocó el éster racémico derivado del Ketorolaco (0.08 mmol), N435 (30 mg), H₂O (6 equiv.) y 2M2B (0.2 mL) como LAG. Se cerró el recipiente de molienda y se colocó en un equipo MixerMill MM200 programado para conducir el proceso de molienda a 25 Hz por 1.5 h. El contenido del reactor de molienda se extrajo con acetona (5 mL) y la suspensión resultante se centrifugó a 3800 rpm por 10 min. Se concentró el sobrenadante y se analizó mediante HPLC empleando una columna con fase estacionaria quiral. Cuando se resolvió el éster metílico derivado del (±)-Ketorolaco, el crudo de reacción se purificó empleando gel de sílice como fase estacionaria y hexano:acetato de etilo (95:5) como fase móvil para la recuperación del éster derivado del Ketorolaco y CH₂Cl₂ para la recuperación del Ketorolaco.

Evaluación del $\Delta\Delta G^\ddagger$ para los procesos resolutivos en solución empleando la estrategia de esterificación enantioselectiva e hidrólisis enantioselectiva



ensayo ^[a]	Temperatura (K)	ee(S)-15 (%) ^[b]	ee(R)-16 (%) ^[b]	c (%) ^[c]	E (%) ^[d]
1	308	45	> 99	31	> 300
2	313	51	> 99	34	> 300
3	318	53	> 99	35	> 300
4	323	57	> 99	37	> 300
5	328	58	> 99	37	> 300

[a] Condiciones de reacción: *rac-15* (0.10 mmol), metanol (1.00 mmol), CALB (30 mg), MTBE (5 mL). [b] Determinado por HPLC con columna de fase estacionaria quiral. [c] Calculado de $c = ee_s/(ee_s+ee_p)$. [d] $E = \ln[1 - c(1 + ee_p)]/\ln[1 - c(1 - ee_p)]$.

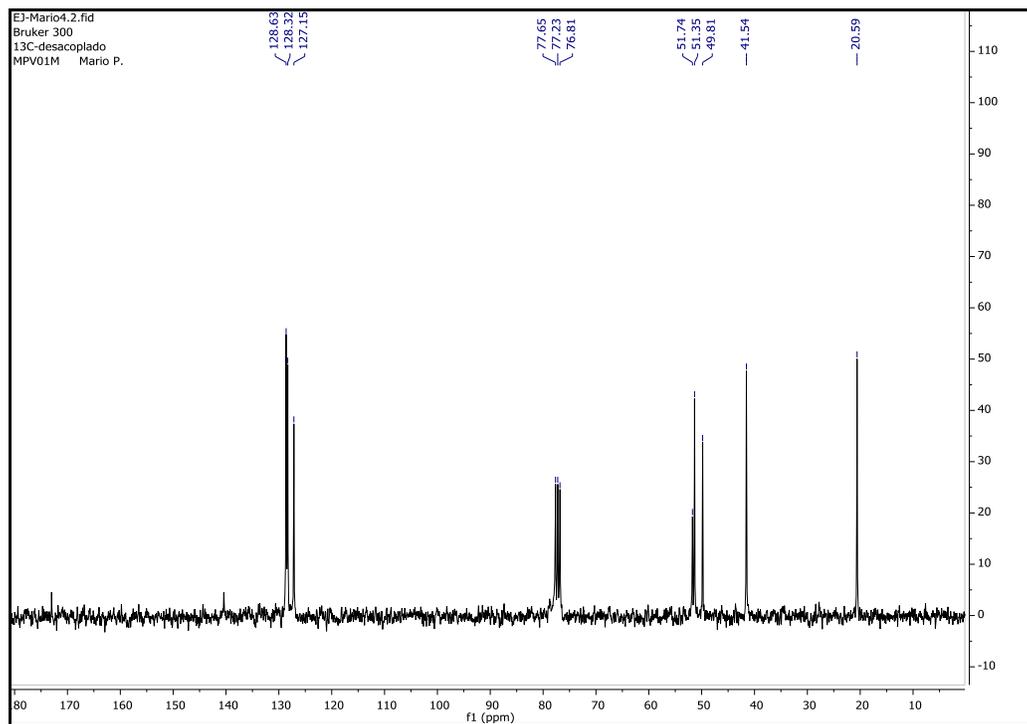
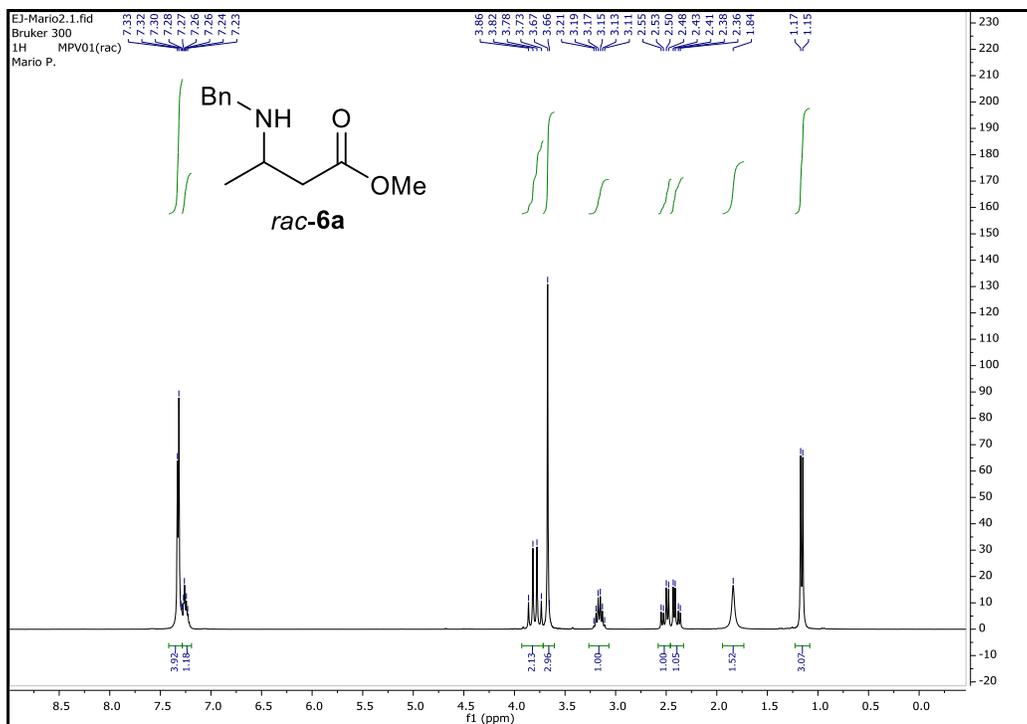


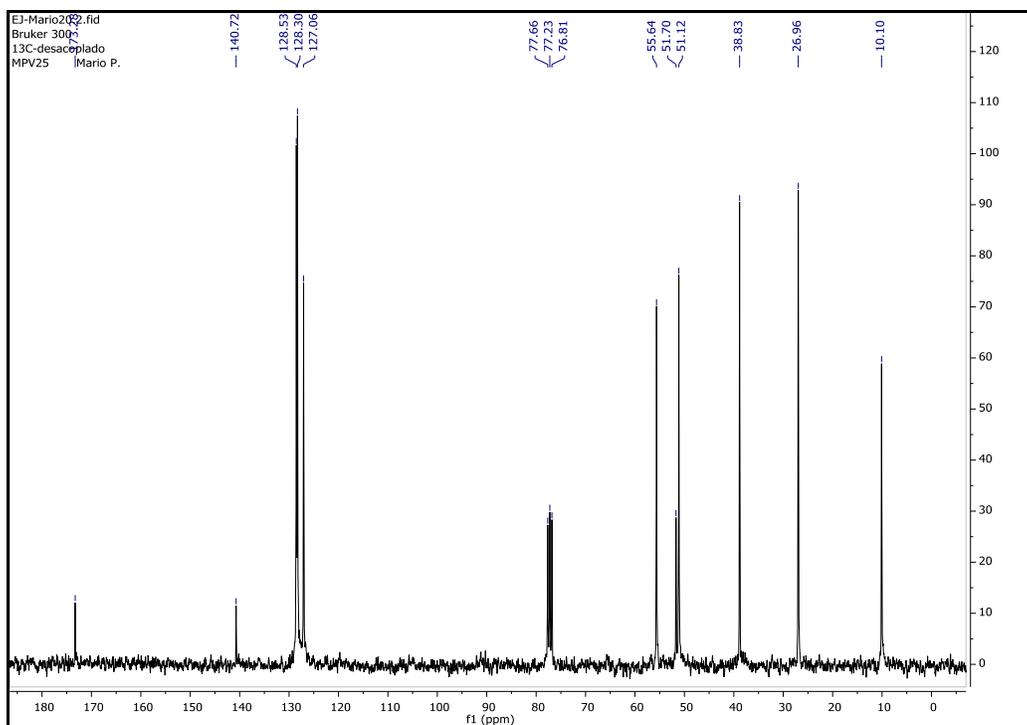
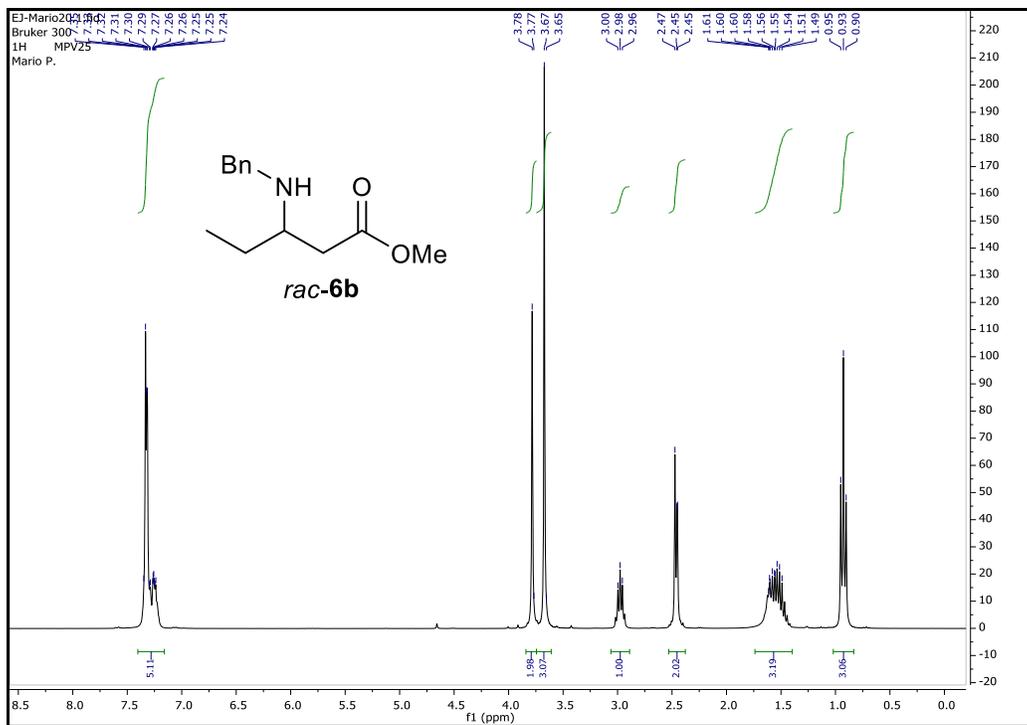
ensayo ^[a]	Temperatura (K) ^[a]	ee(S)-18 (%) ^[b]	ee(R)-15 (%) ^[b]	c (%) ^[c]	E (%) ^[d]
1	305	5	> 99	5	> 200
2	308	8	> 99	8	> 200
3	313	11	> 99	10	> 200
4	318	14	> 99	12	> 200
5	323	16	> 99	14	> 200

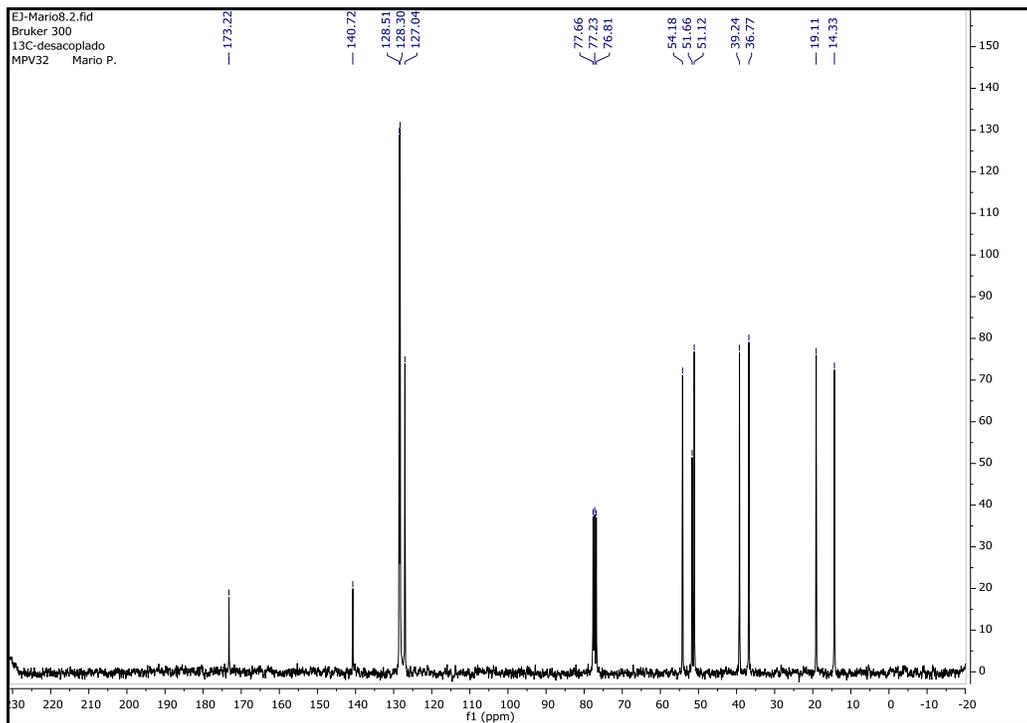
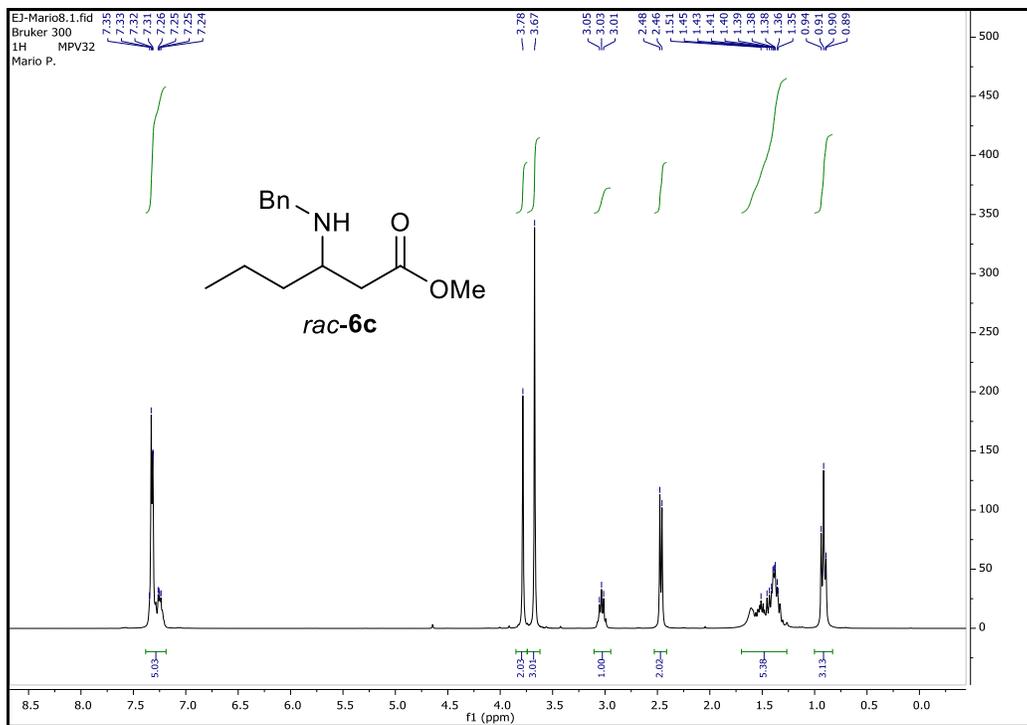
[a] Condiciones de reacción: *rac-18* (0.08 mmol), agua (6 eq.), CALB (30 mg), 2M2B (5 mL). [b] Determinado por HPLC con columna de fase estacionaria quiral. [c] Calculado por $c = ee_s/(ee_s+ee_p)$. [d] $E = \ln[1 - c(1 + ee_p)]/\ln[1 - c(1 - ee_p)]$.

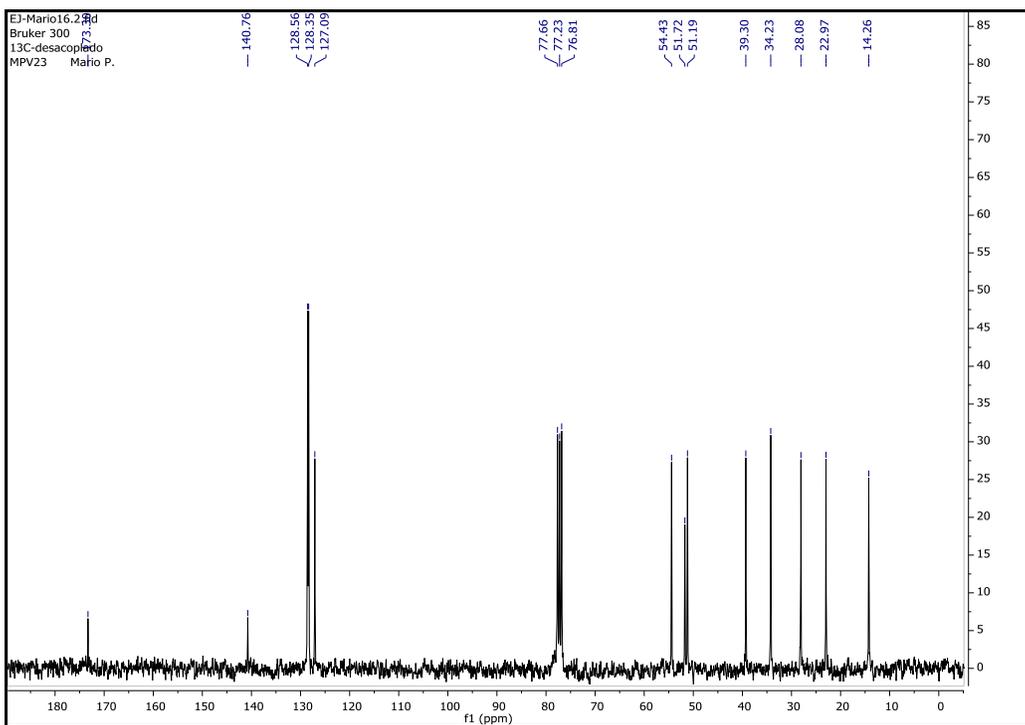
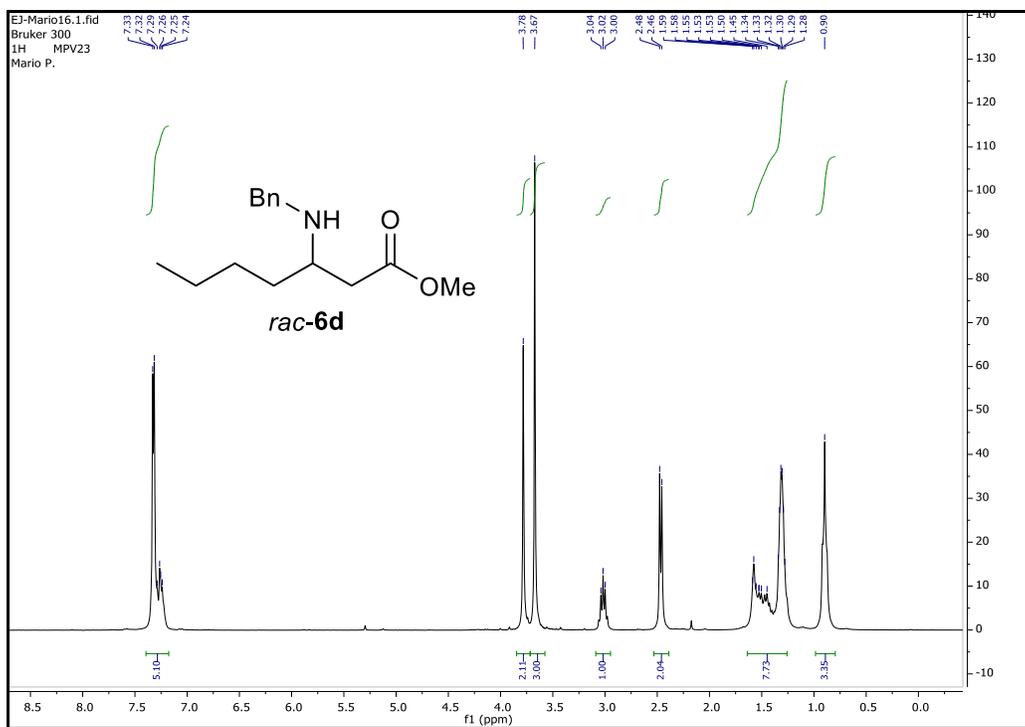
9 Anexos

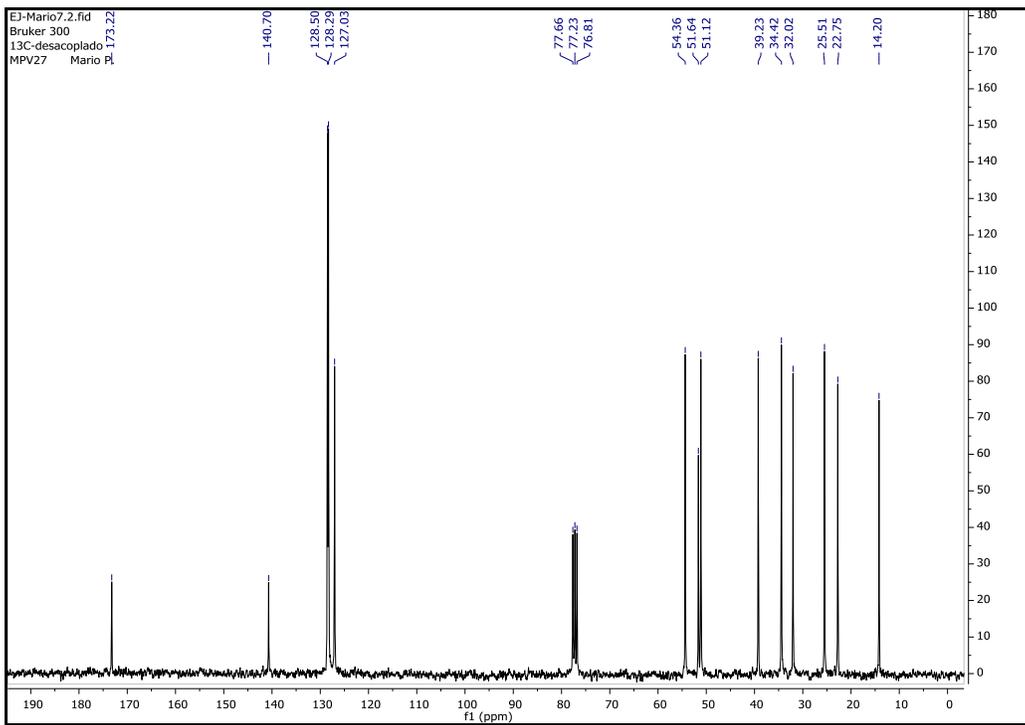
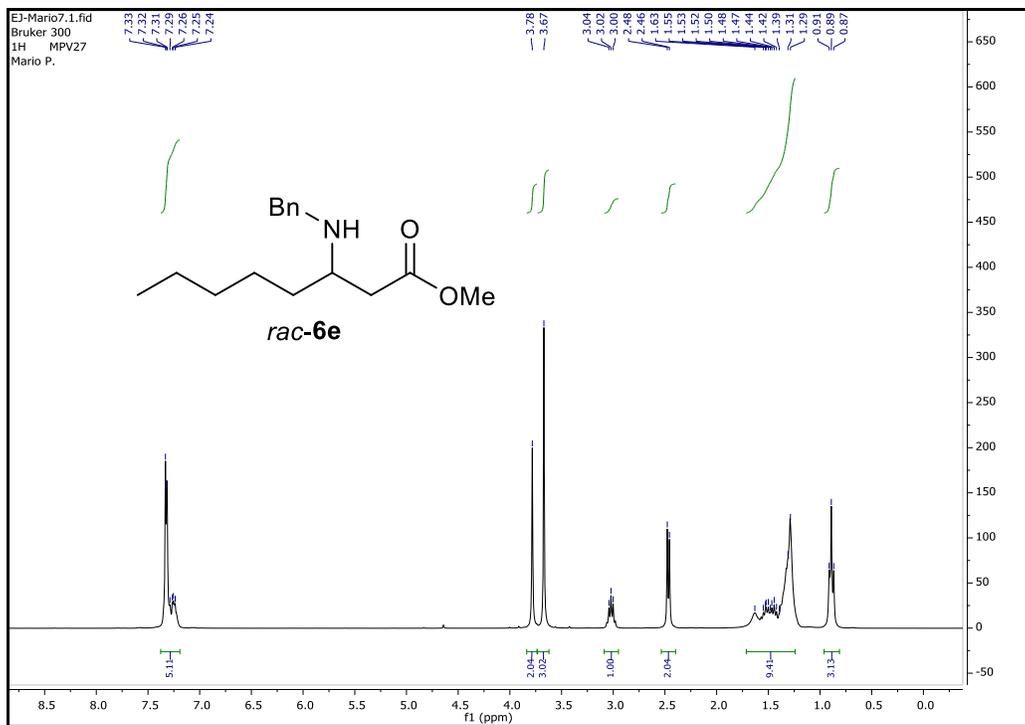
Espectros de RMN de ^1H , ^{13}C y cromatogramas seleccionados.

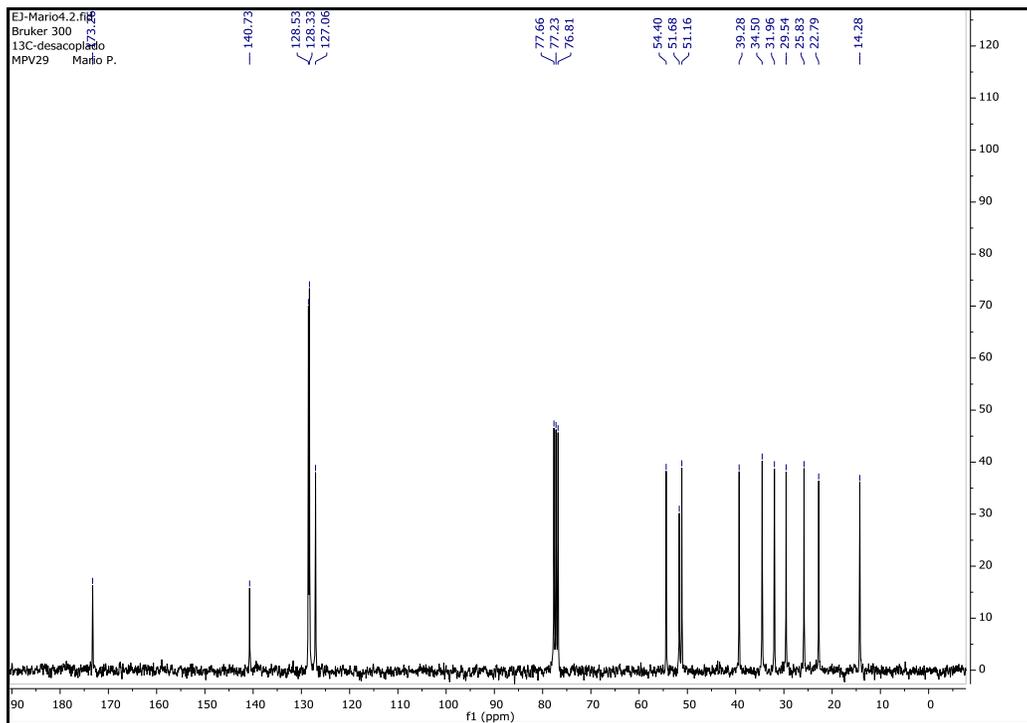
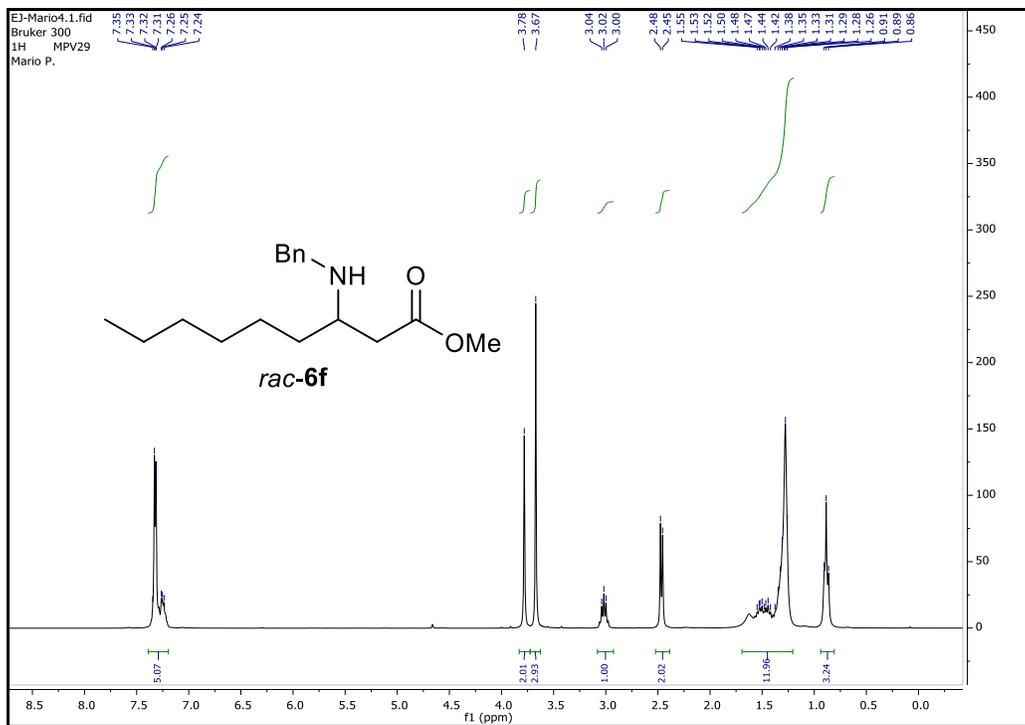


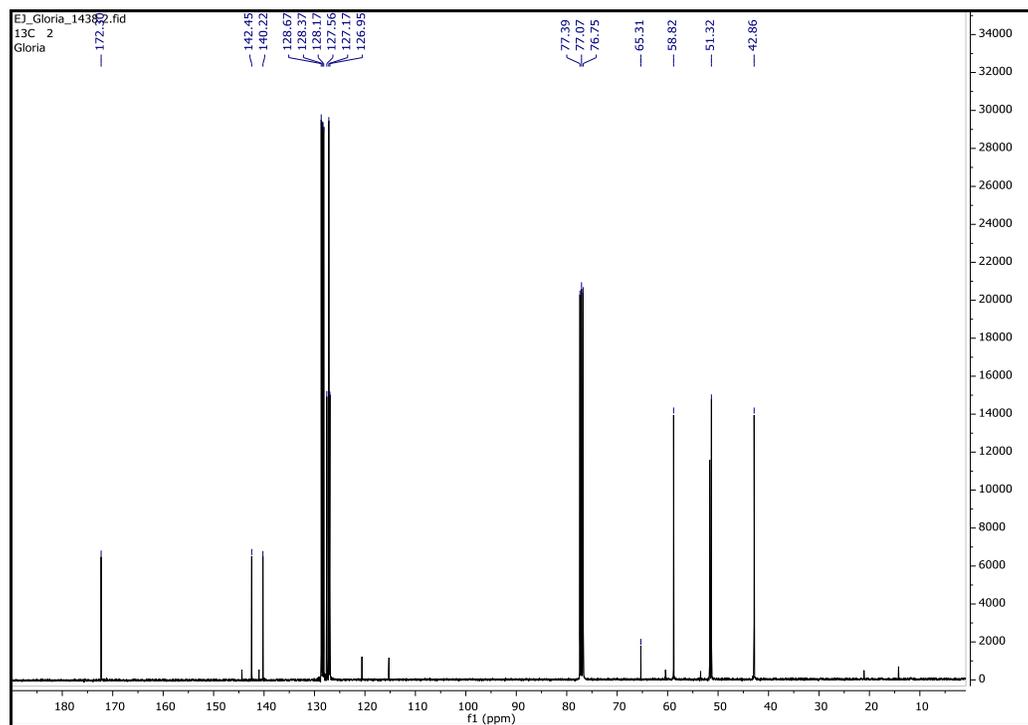
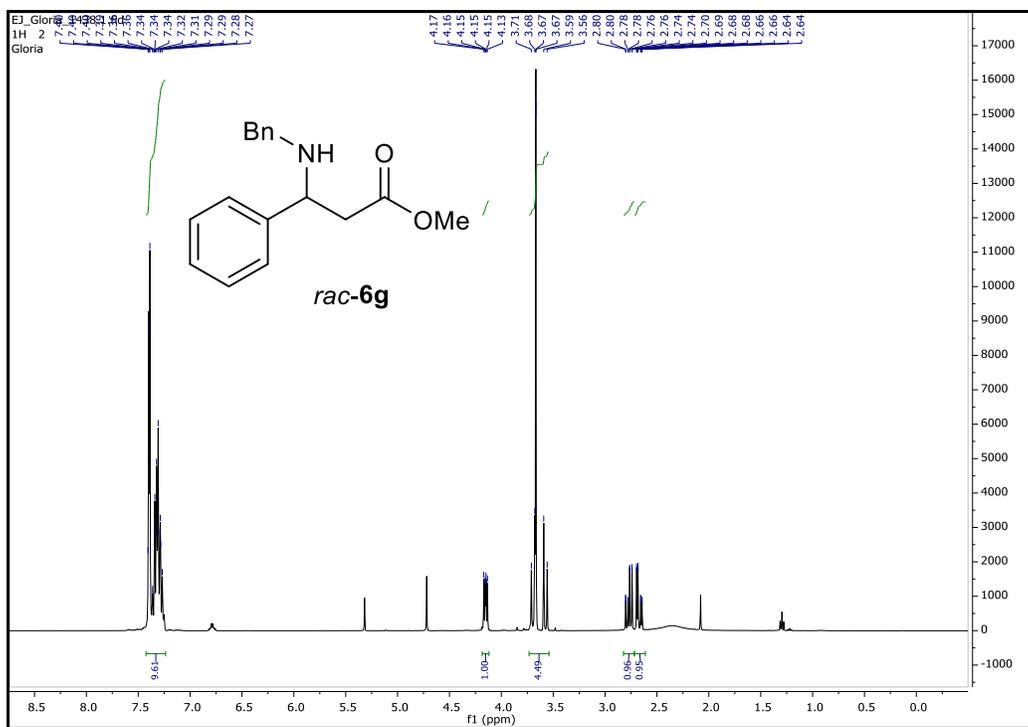


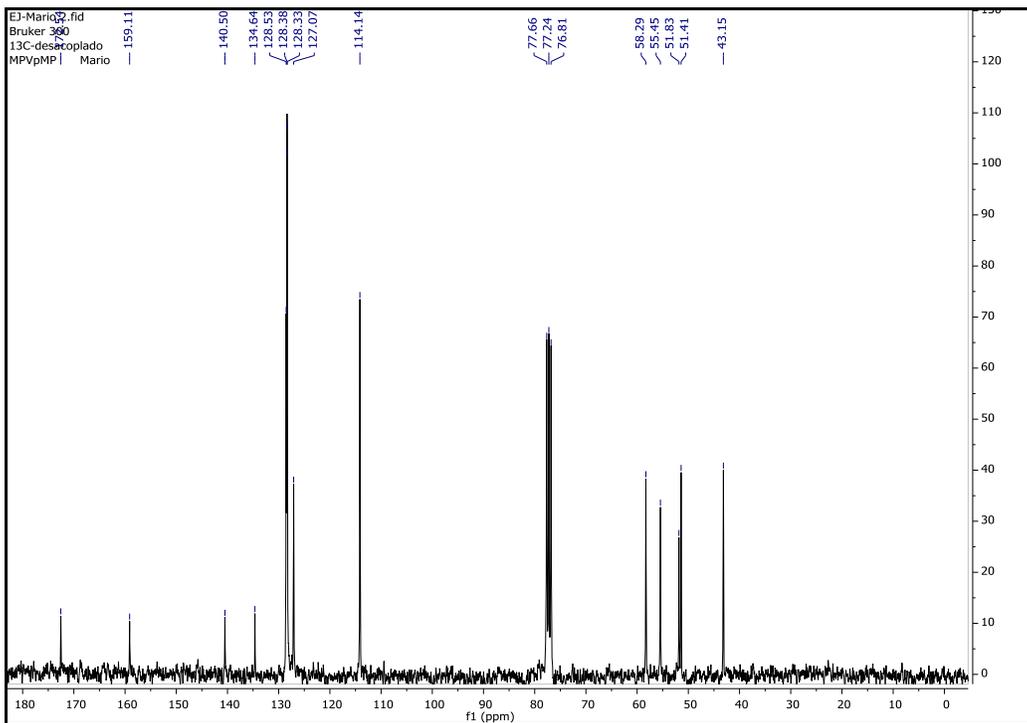
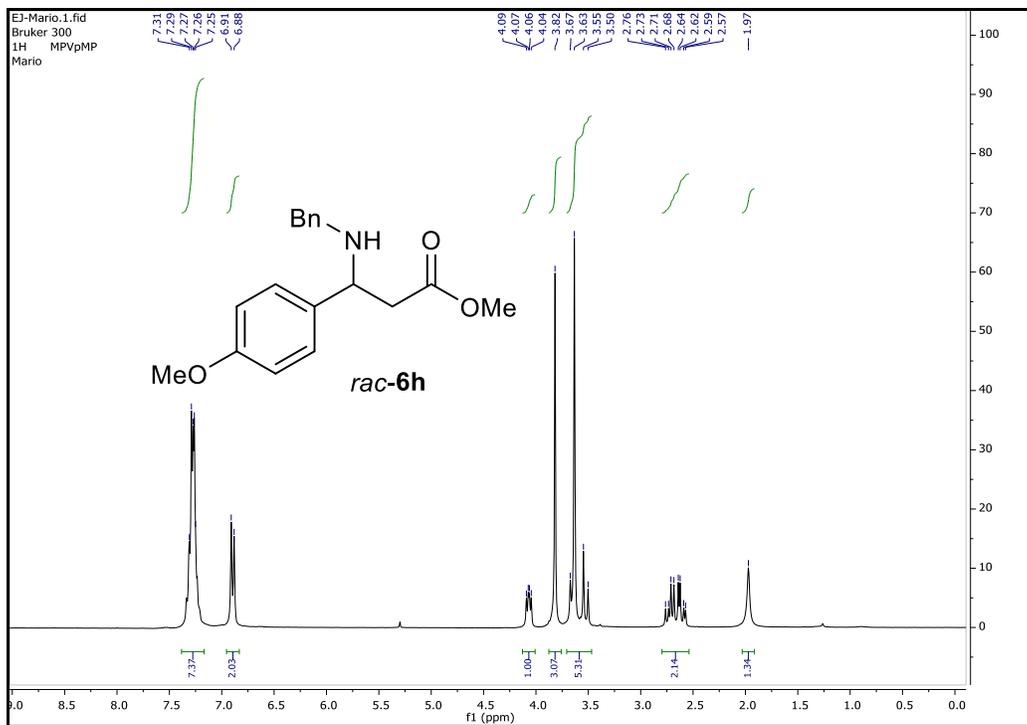


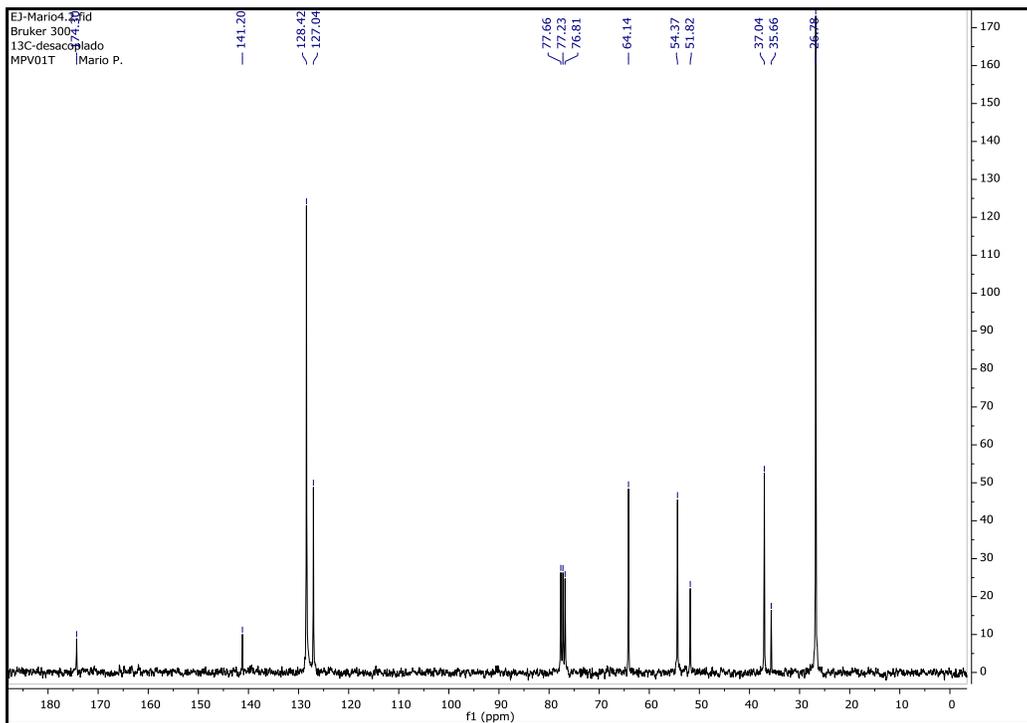
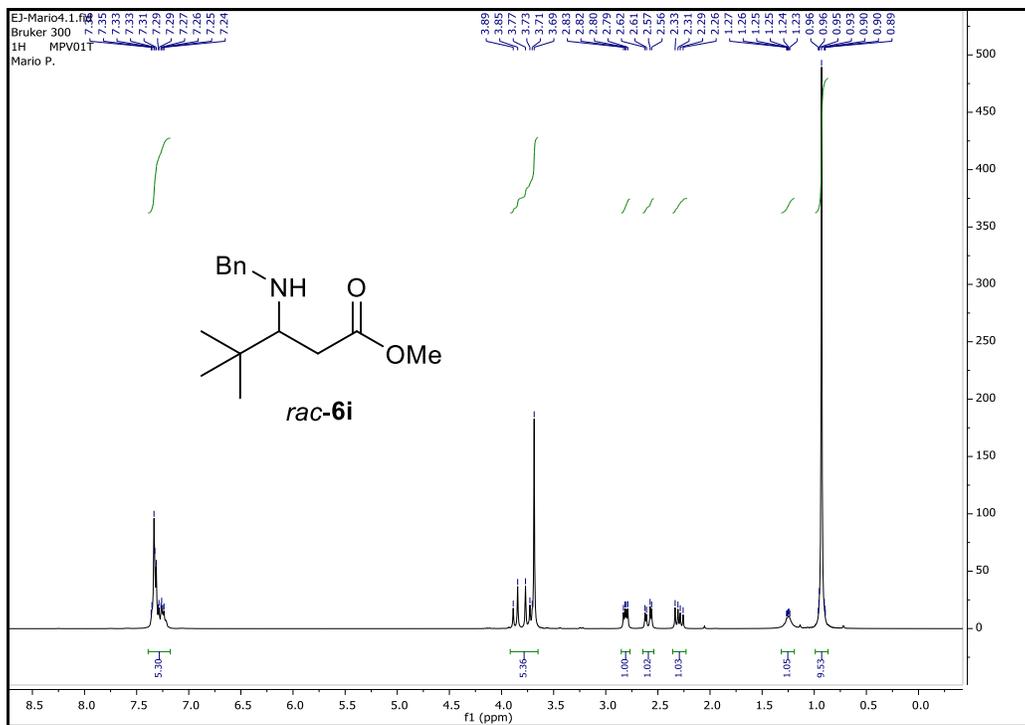


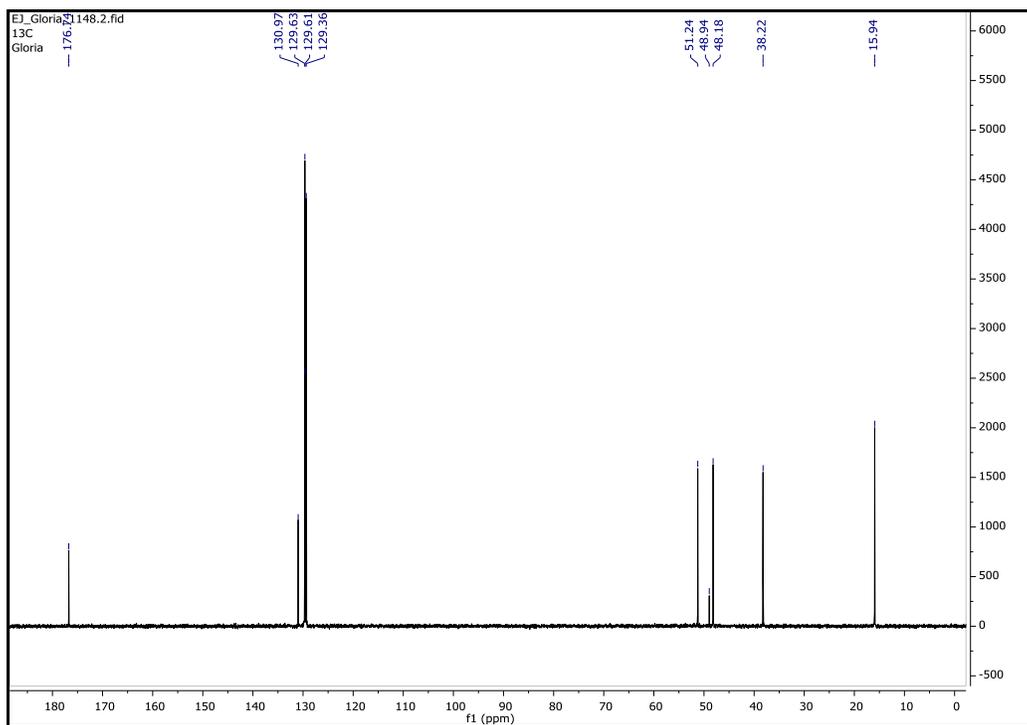
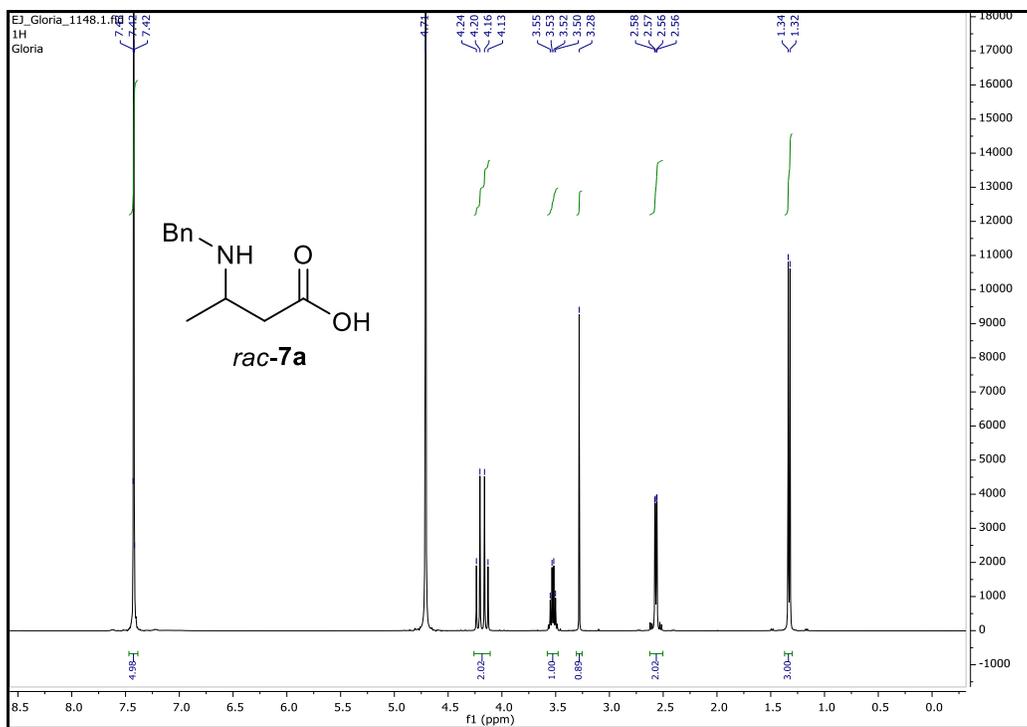


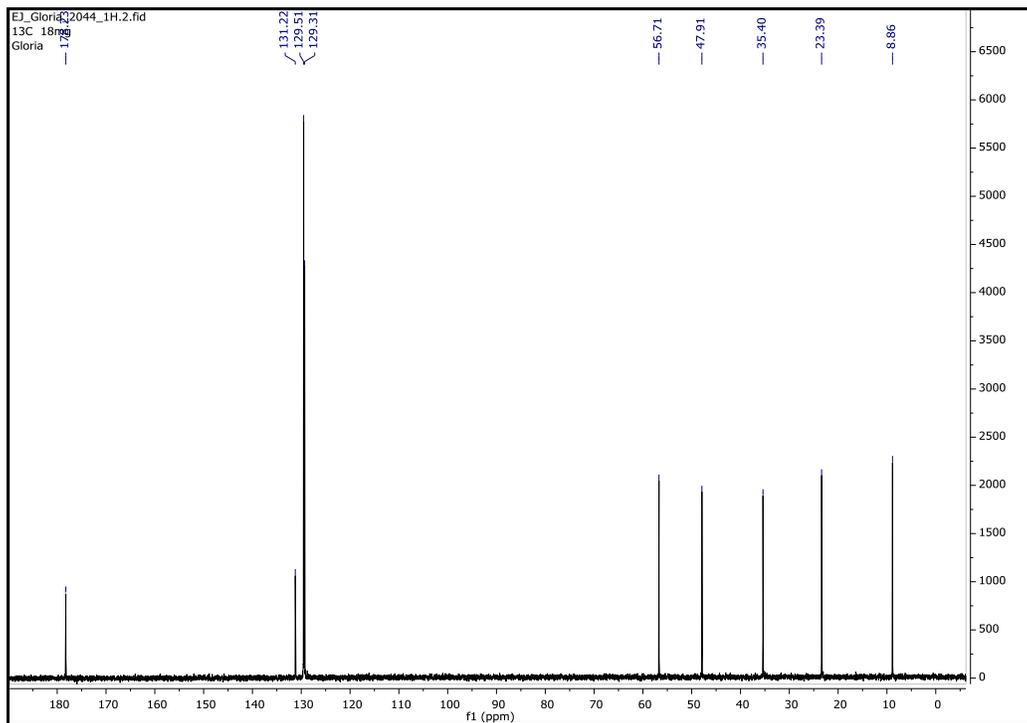
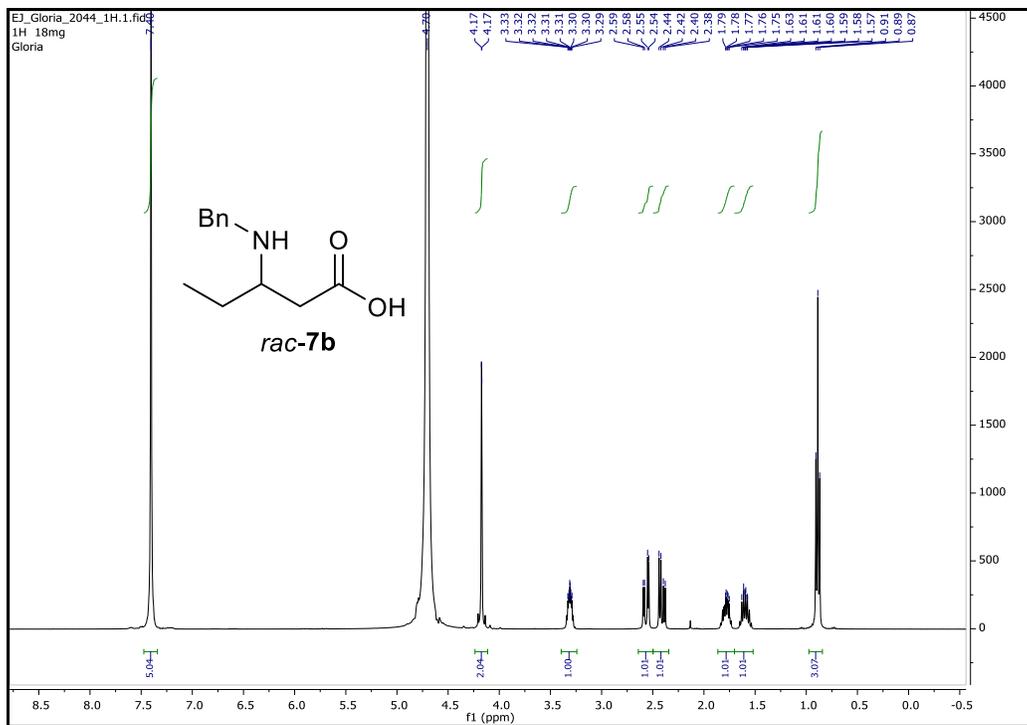


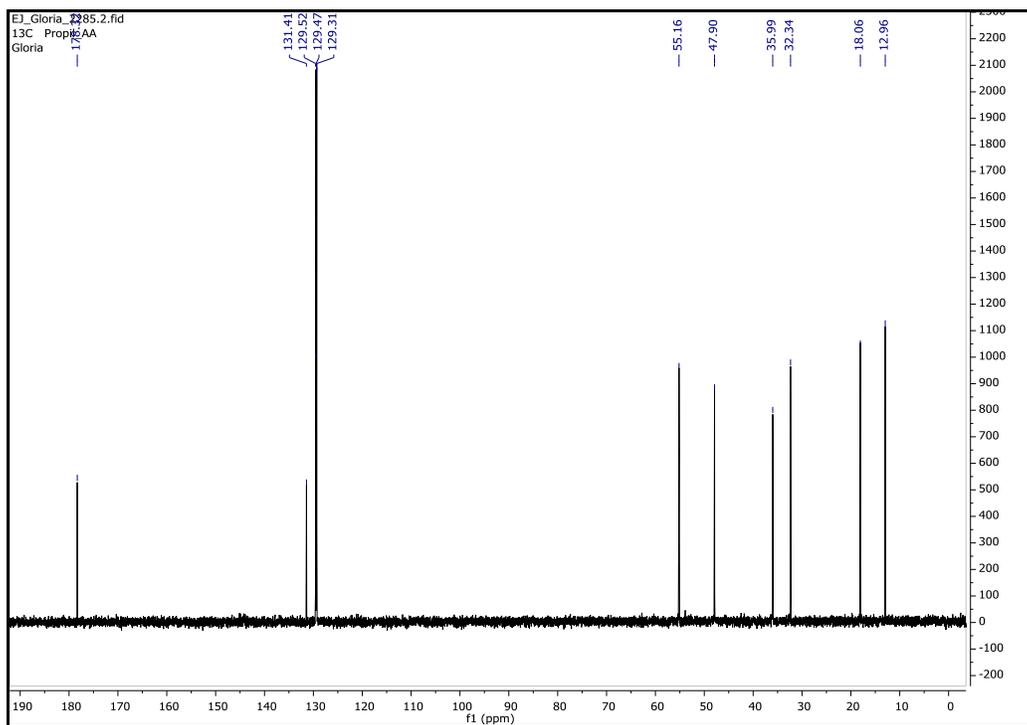
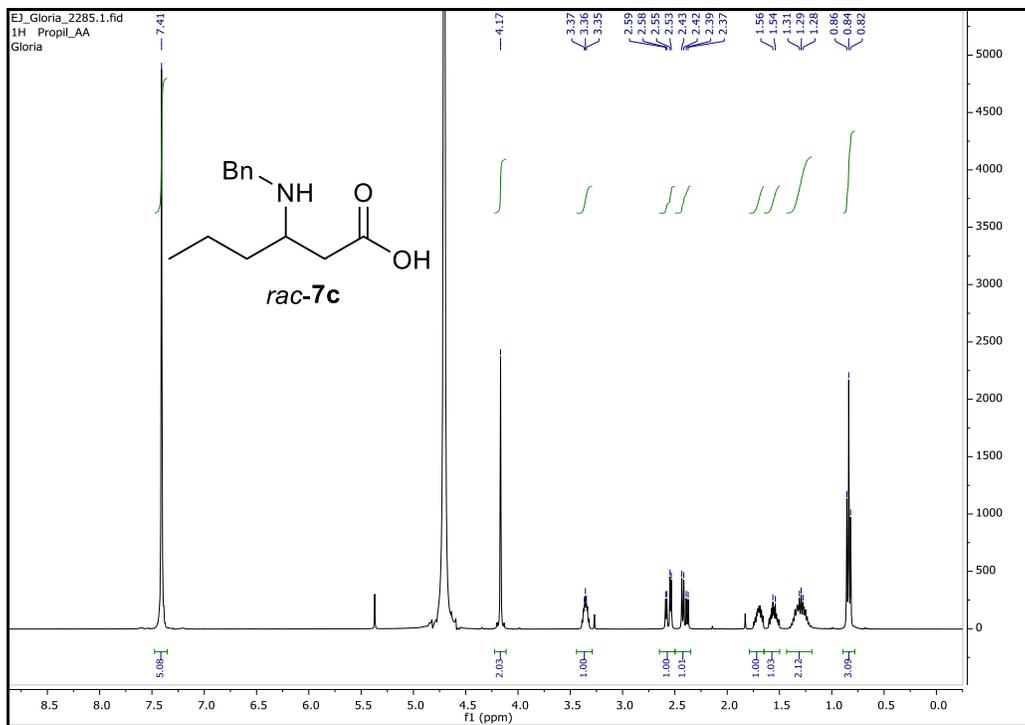


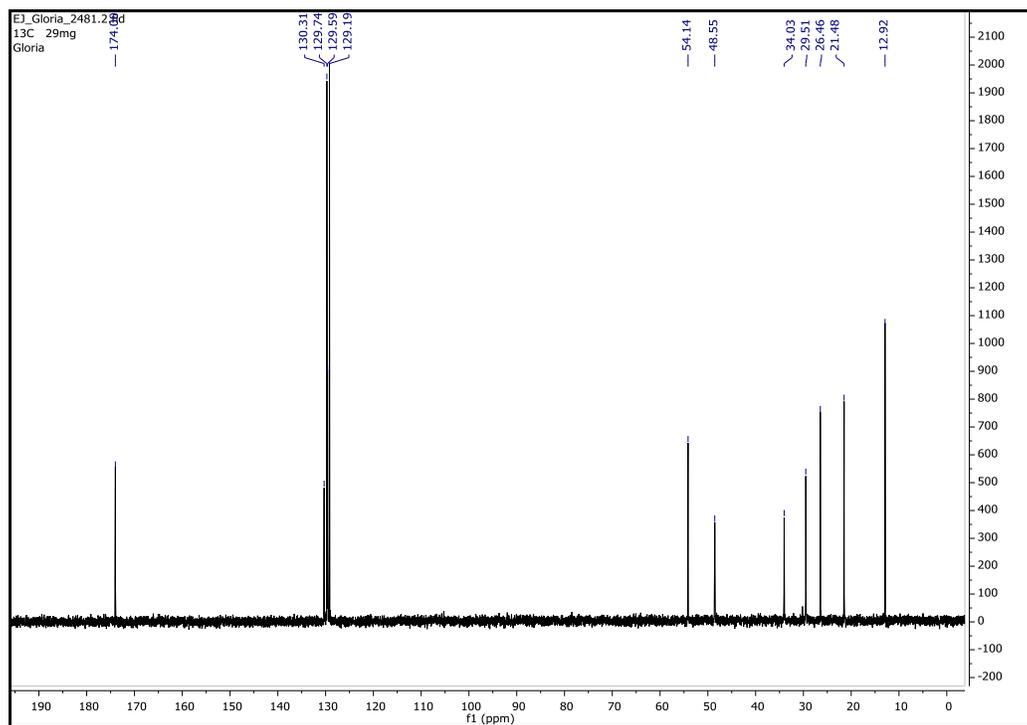
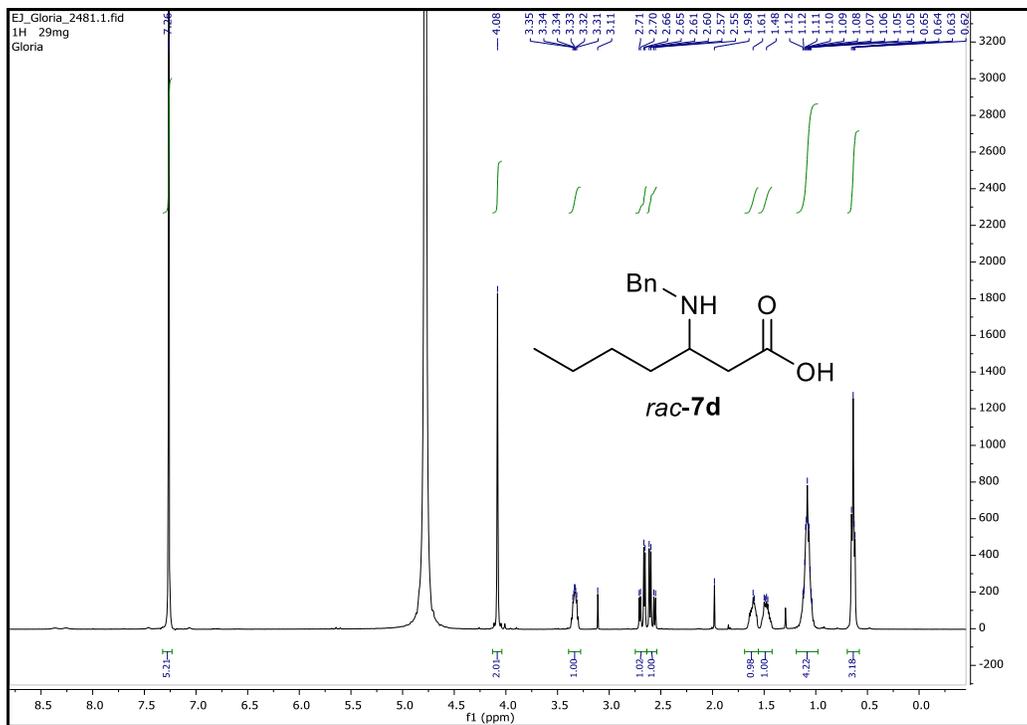


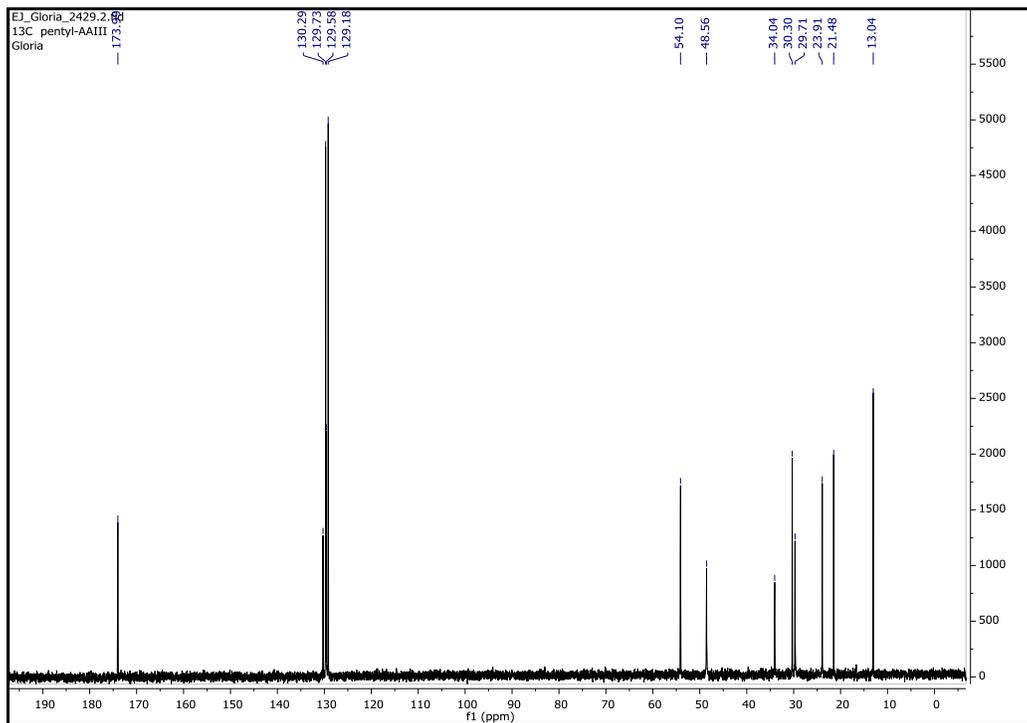
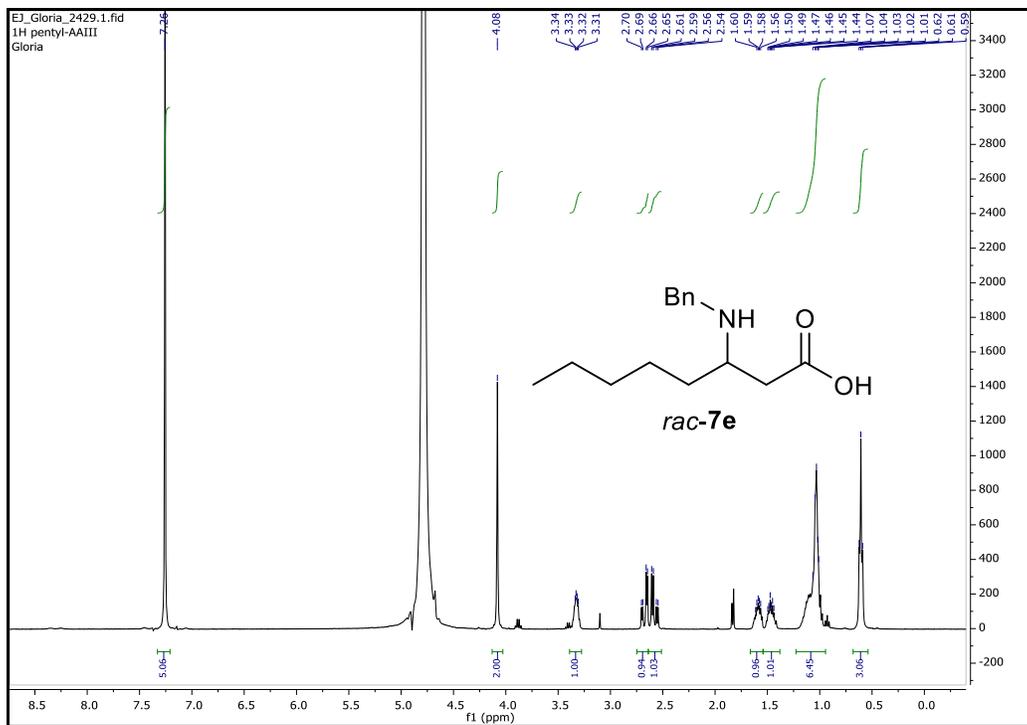


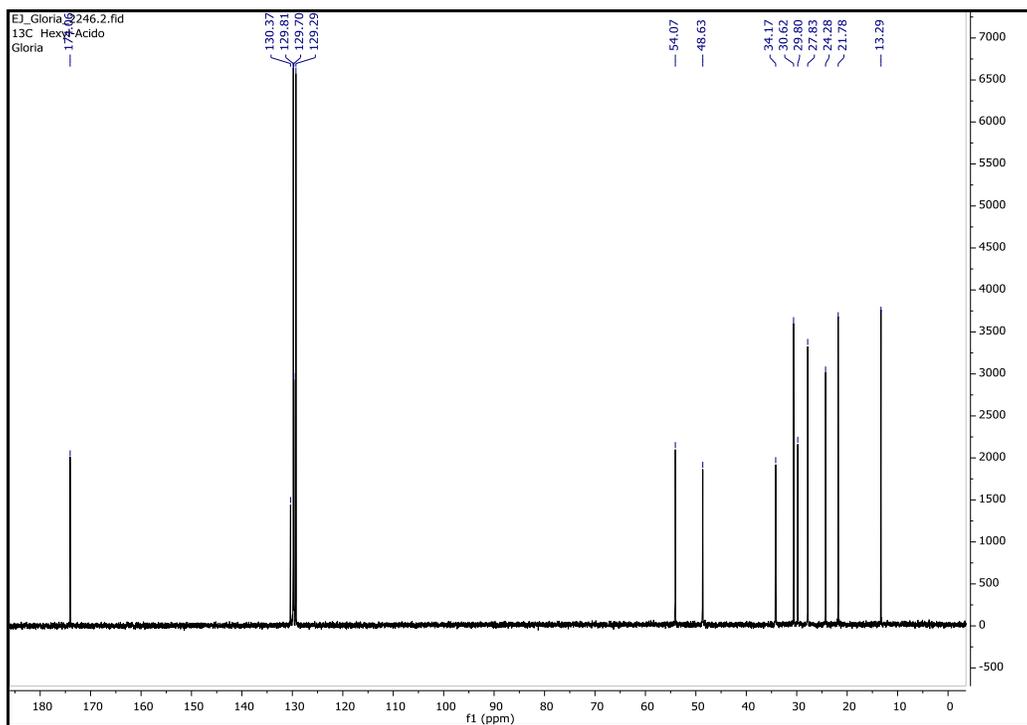
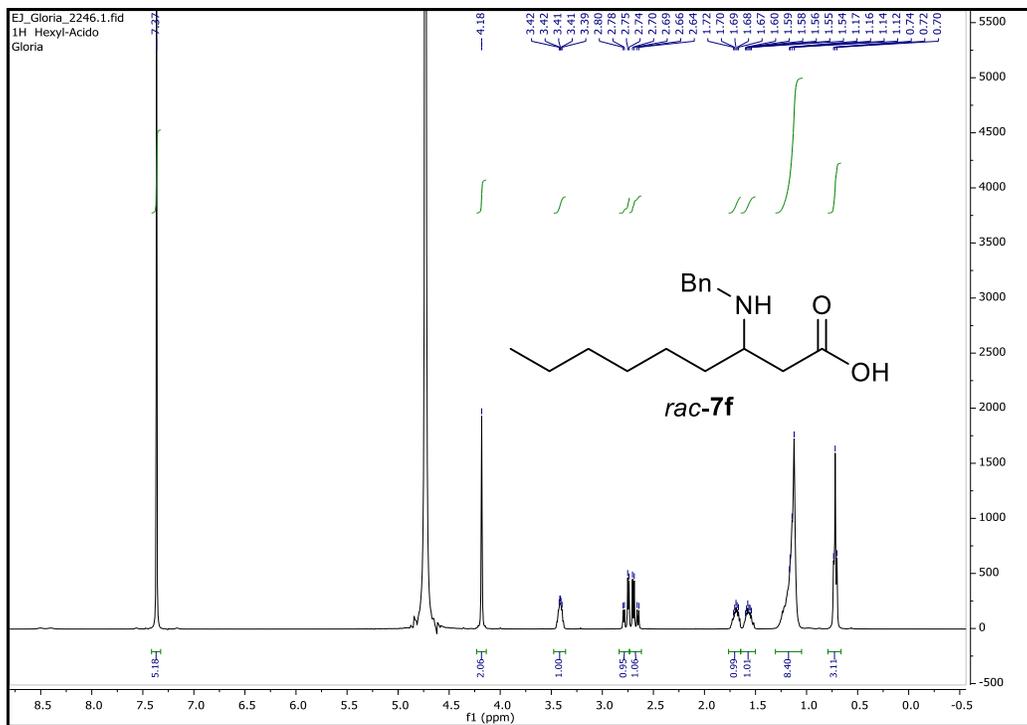


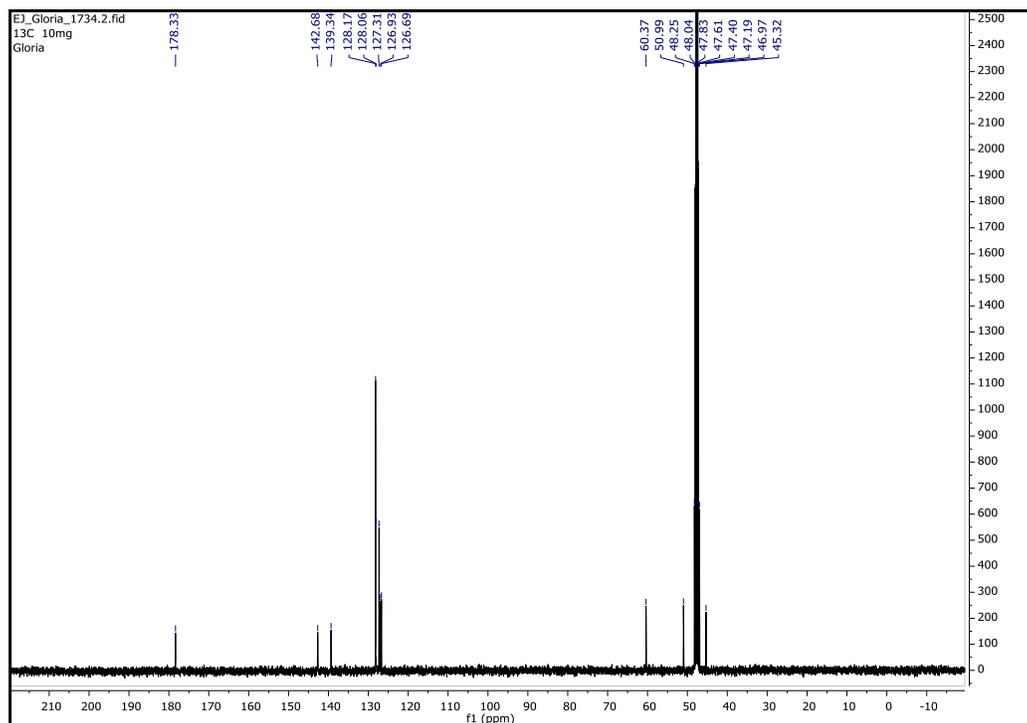
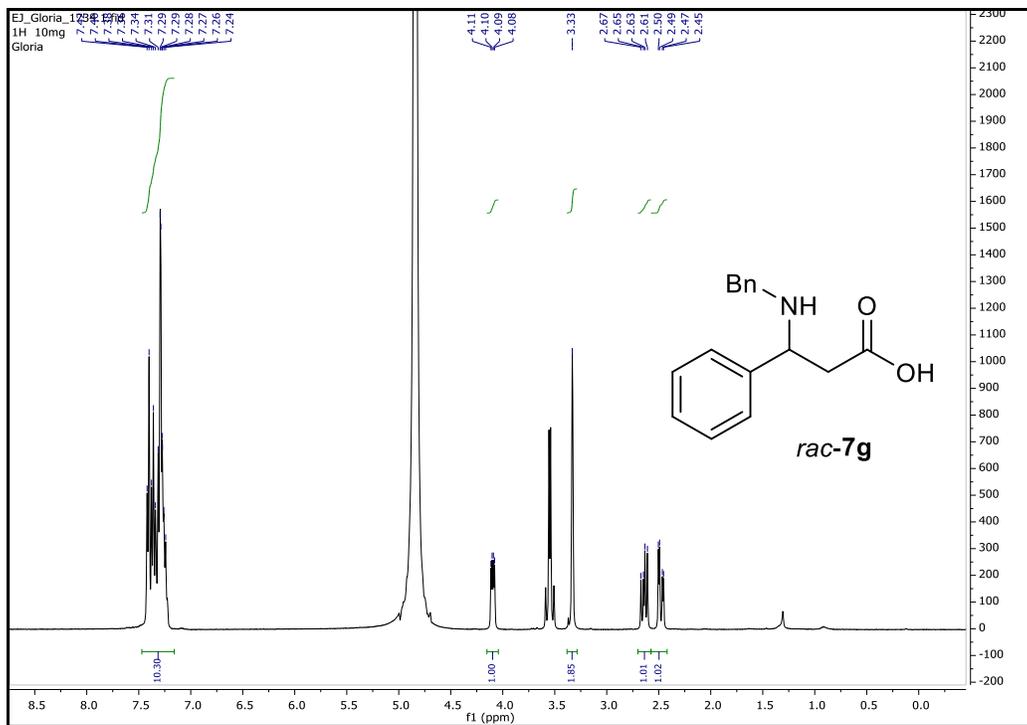


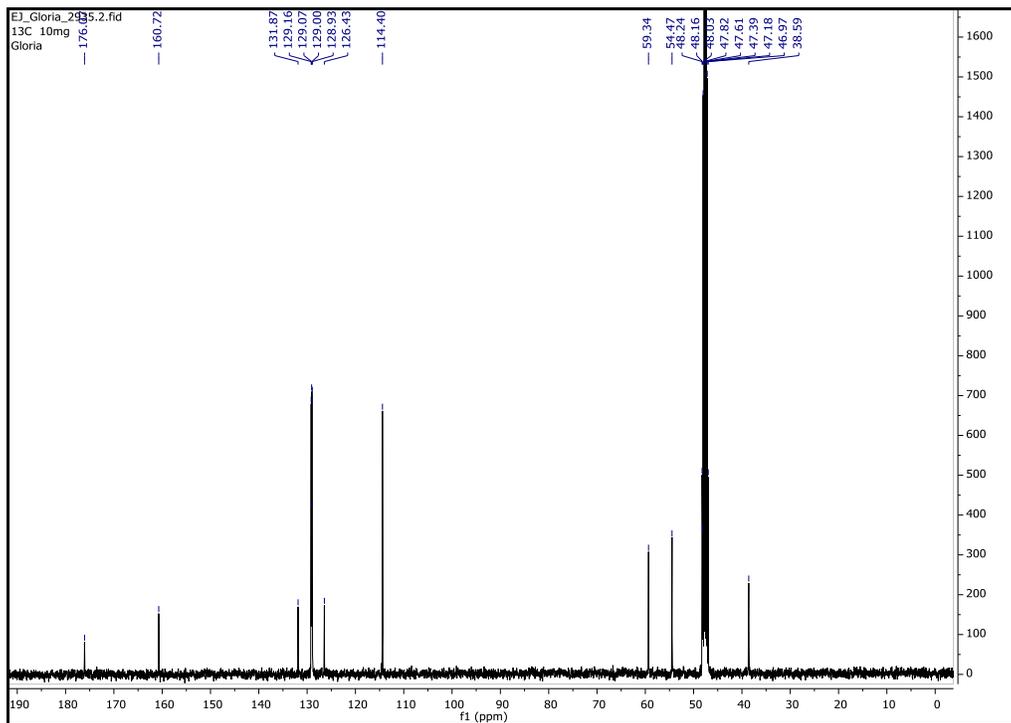
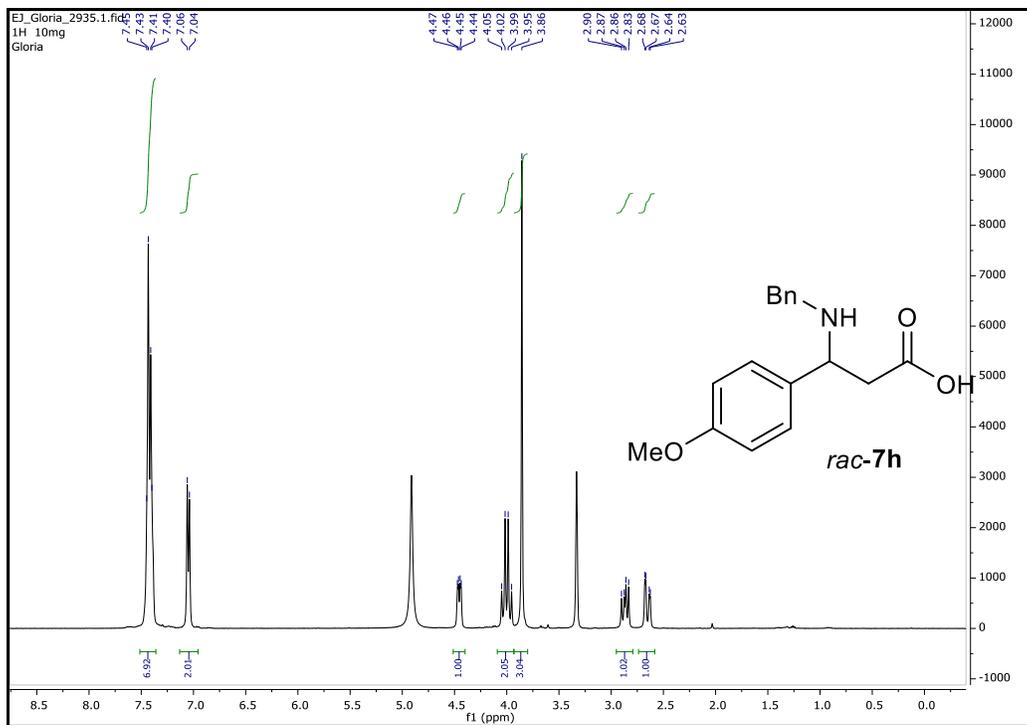


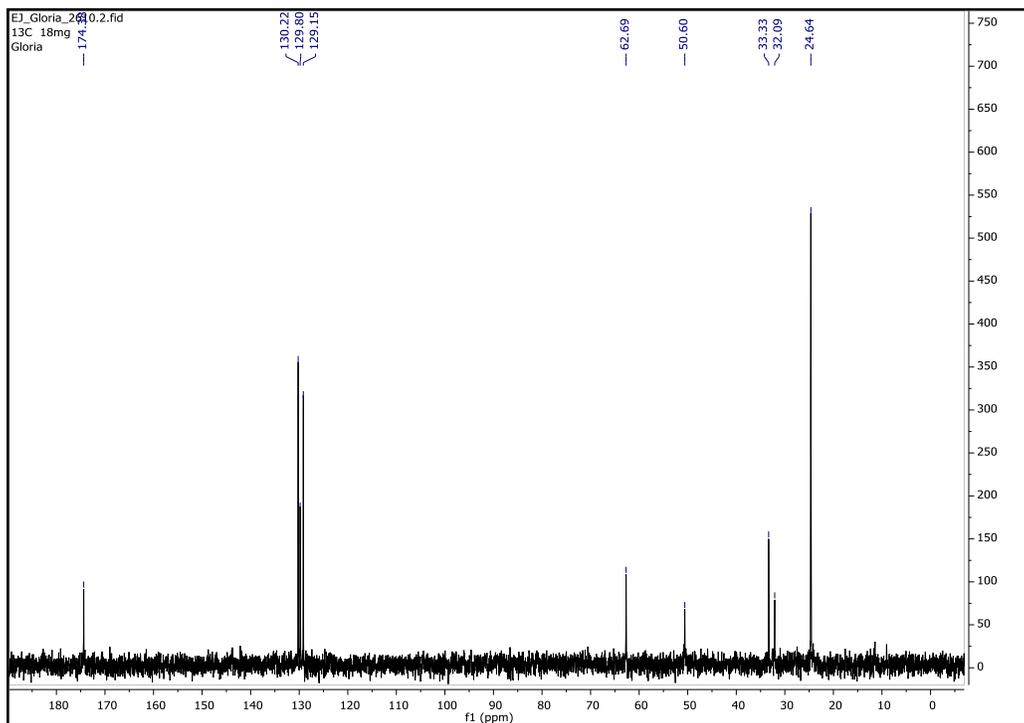
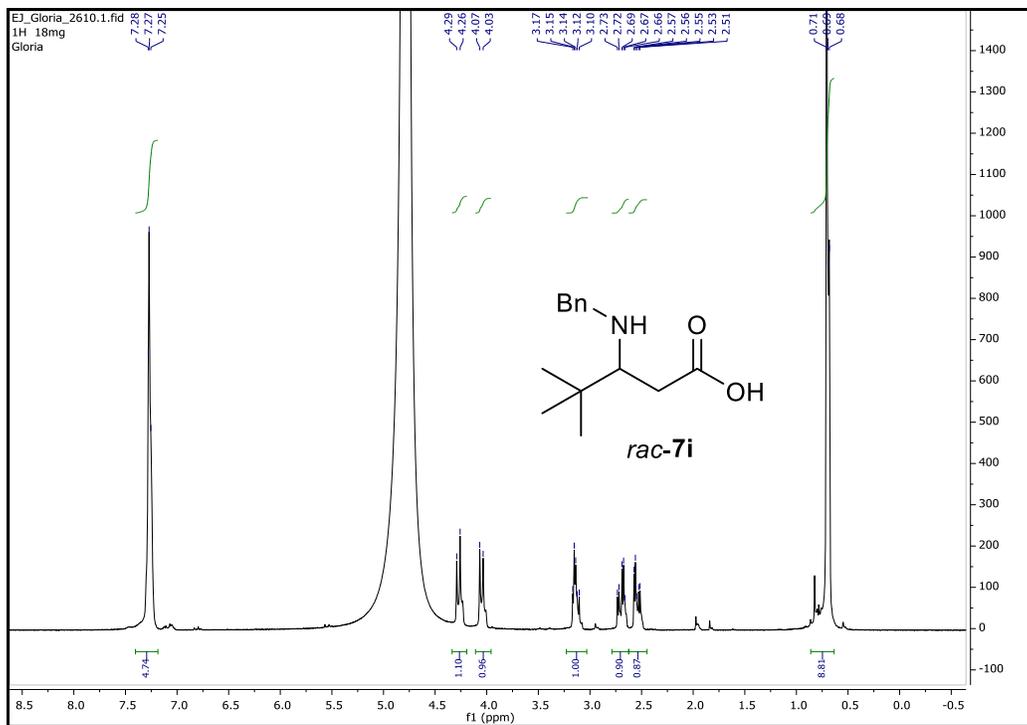


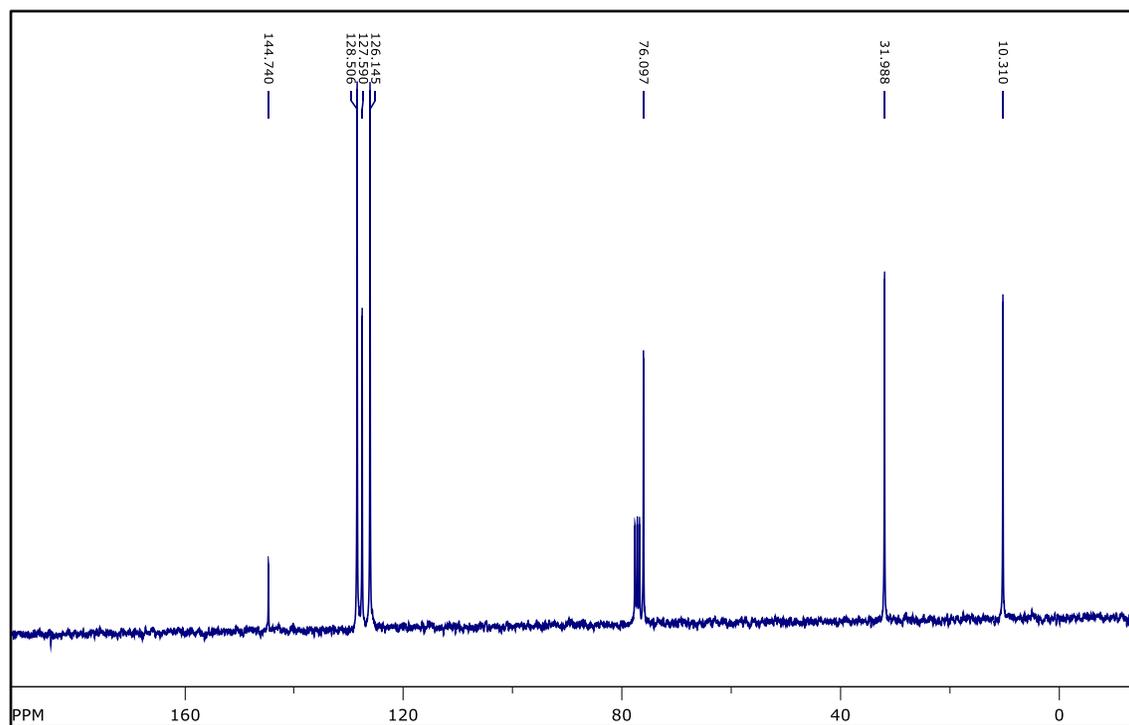
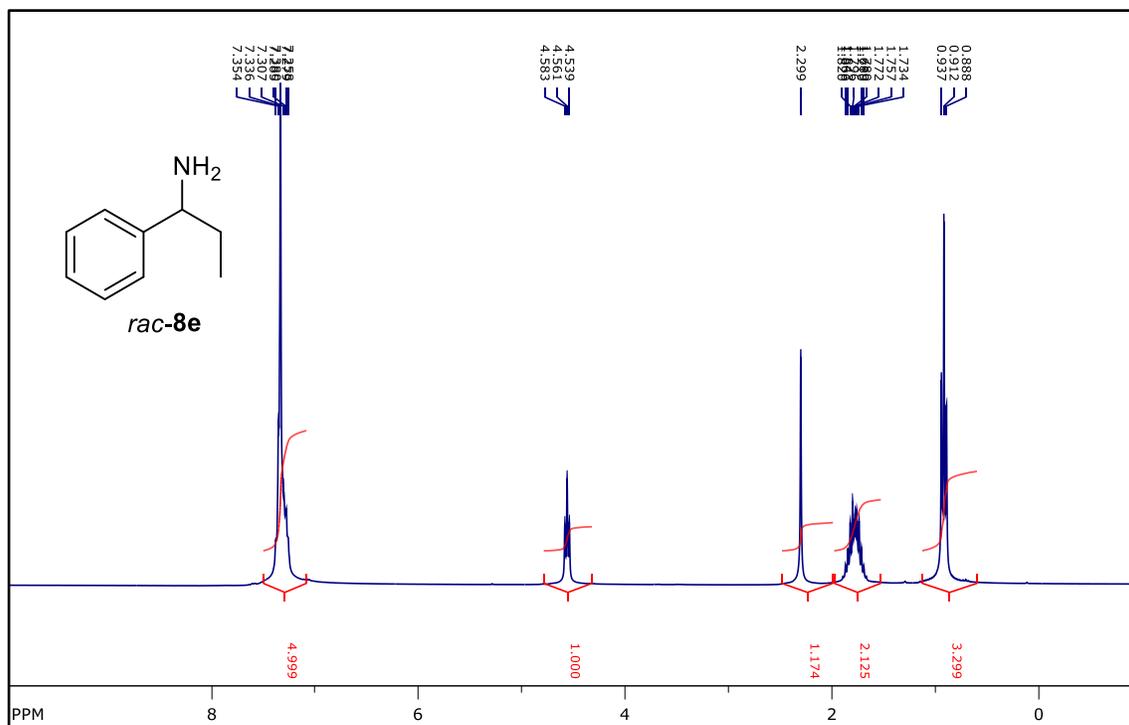


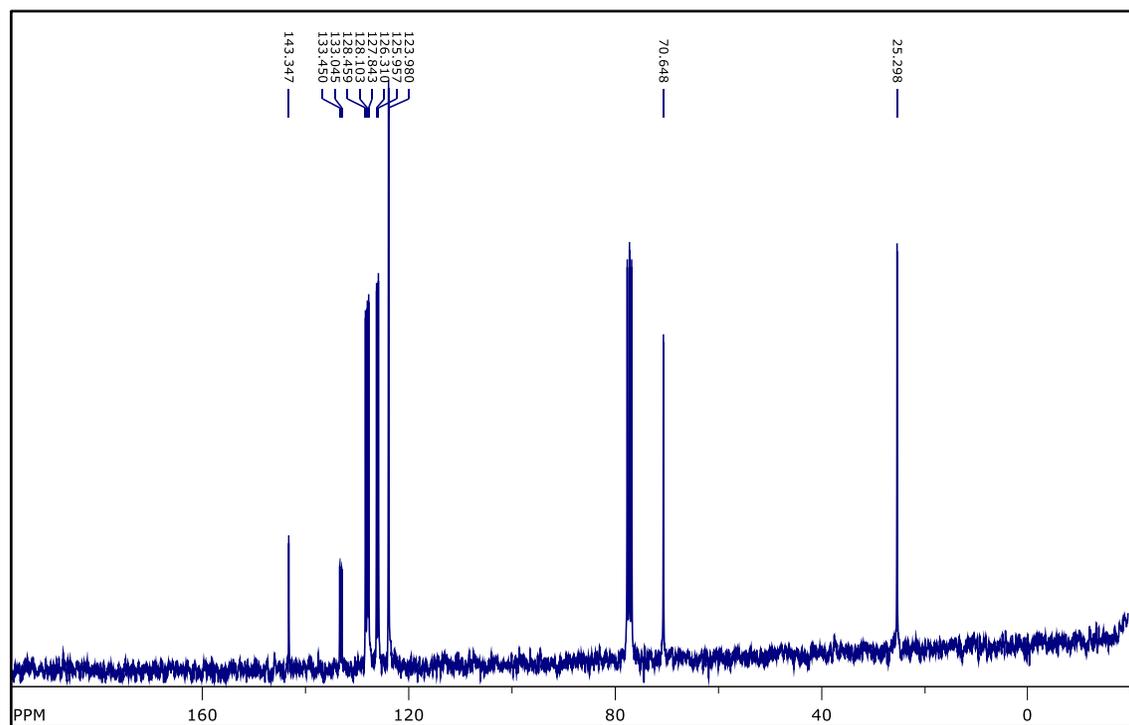
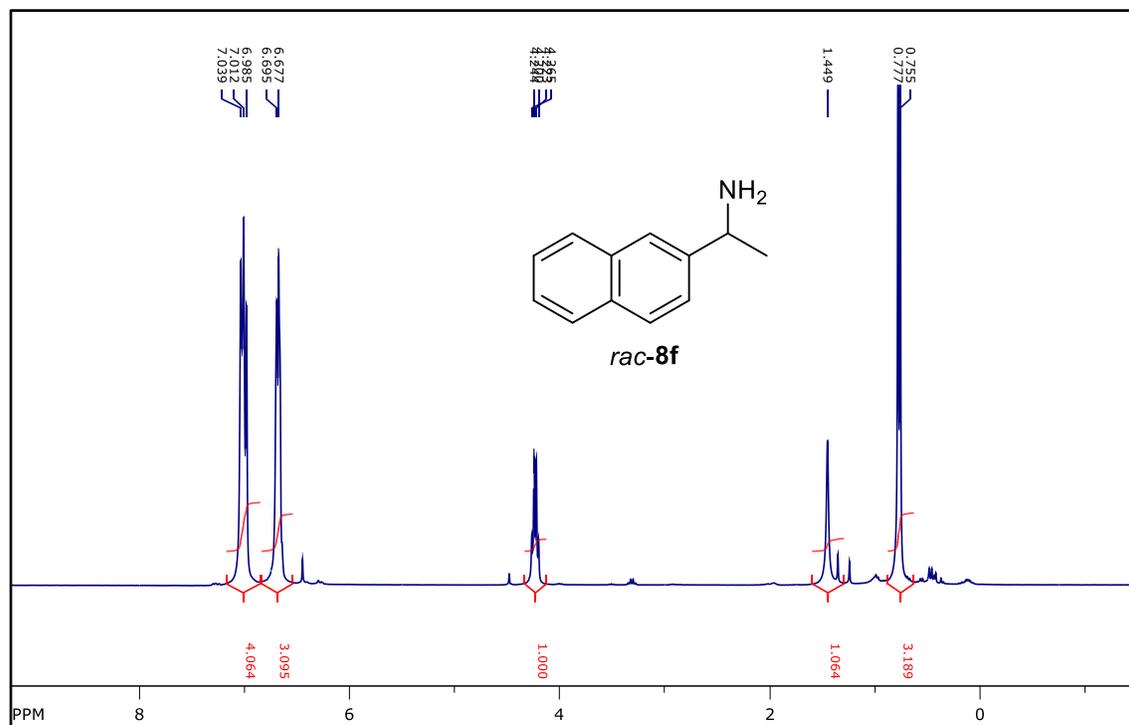


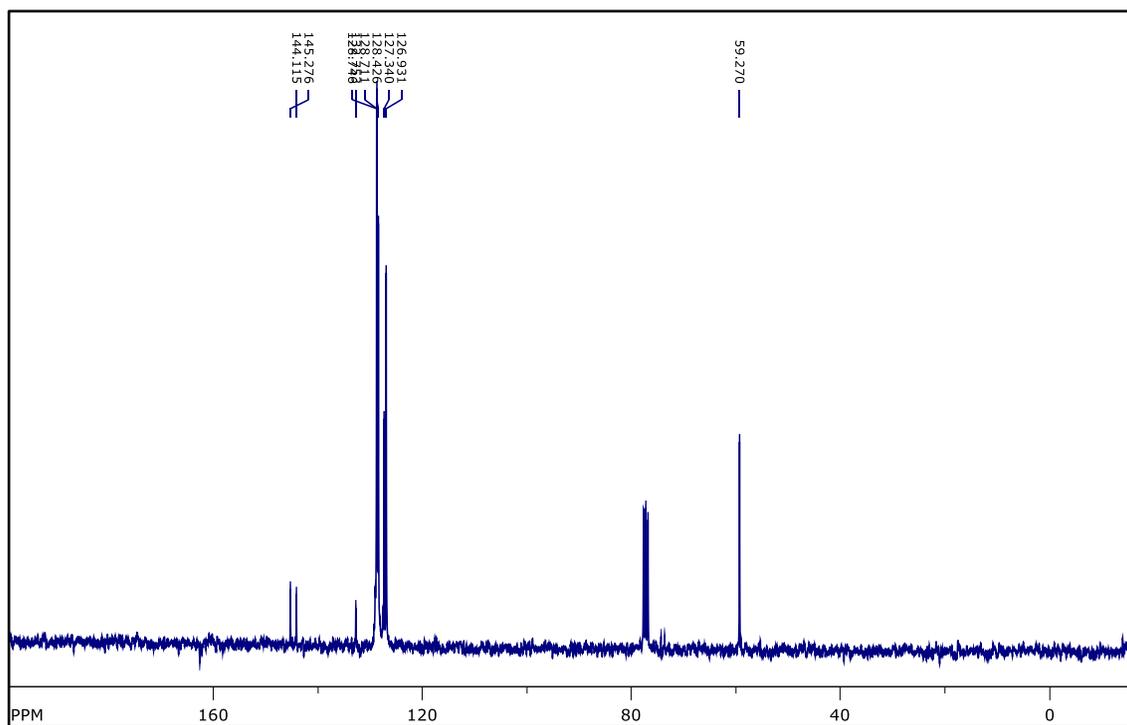
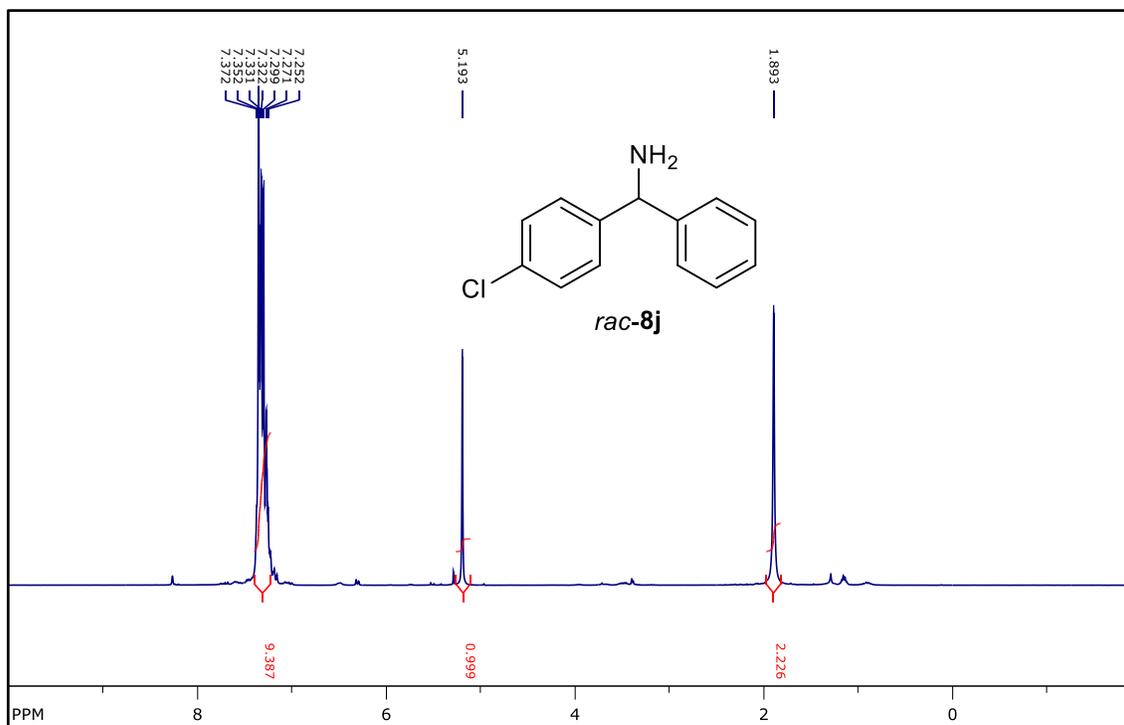


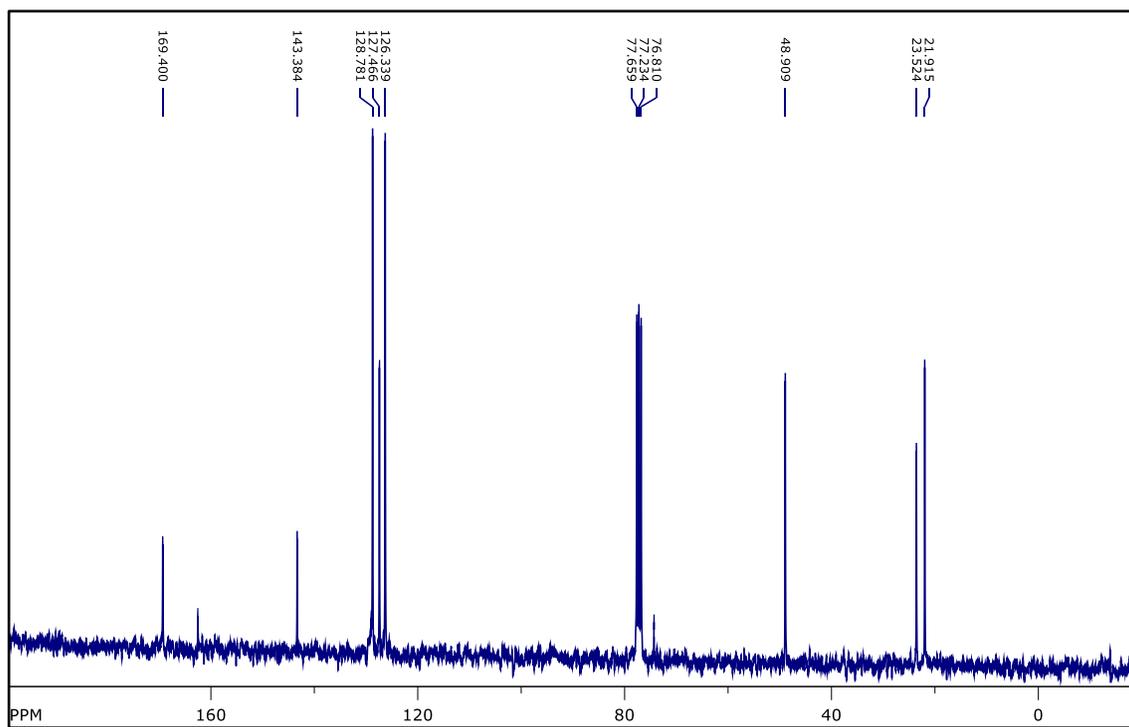
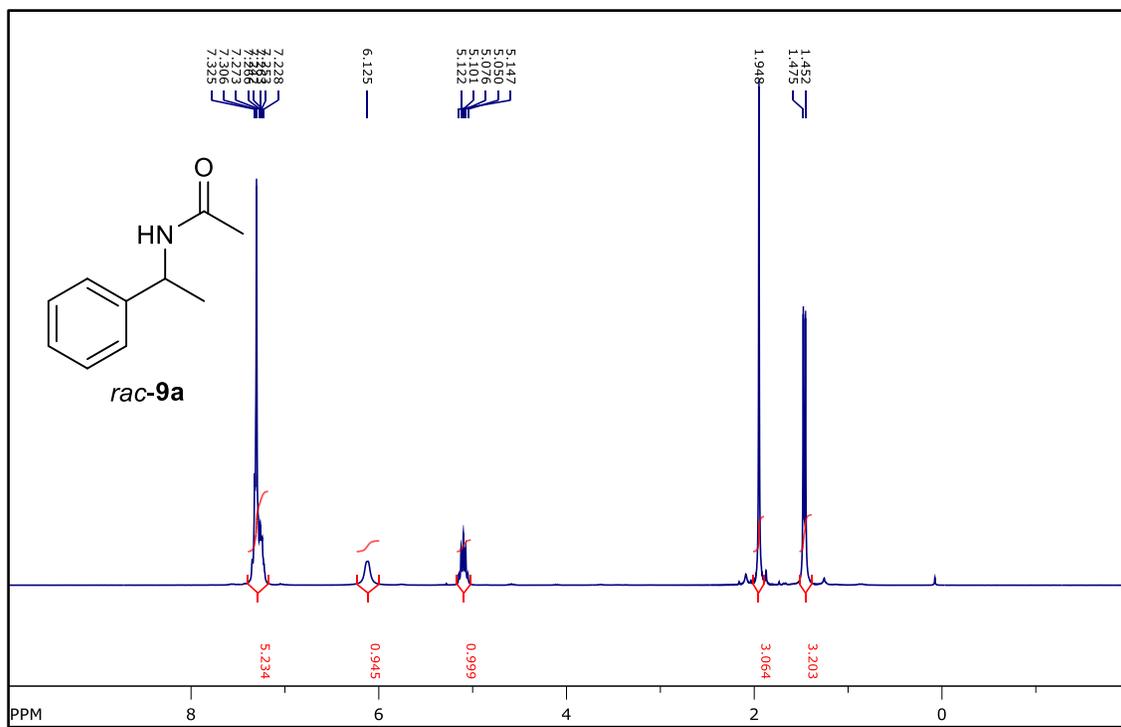


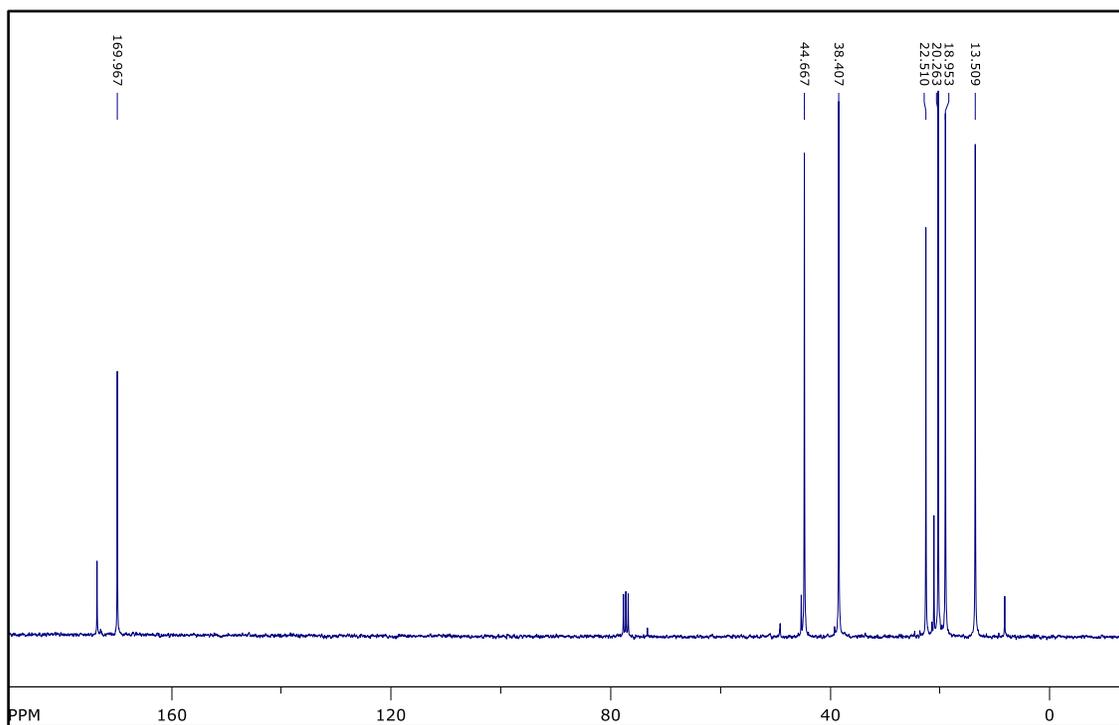
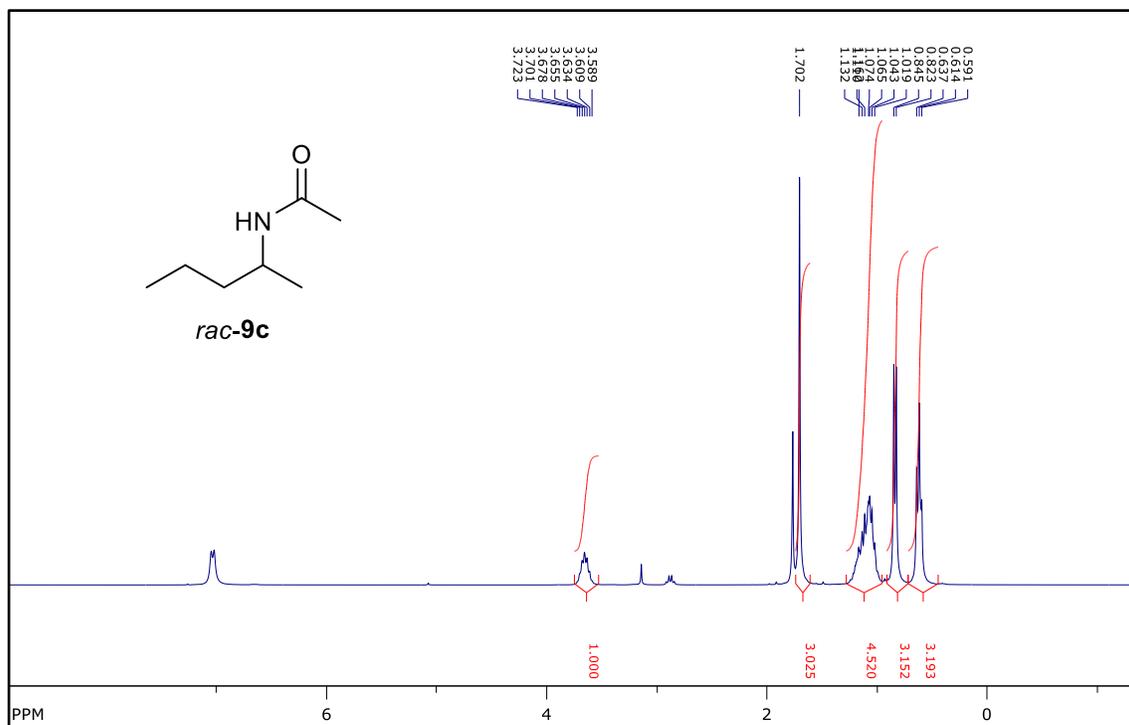


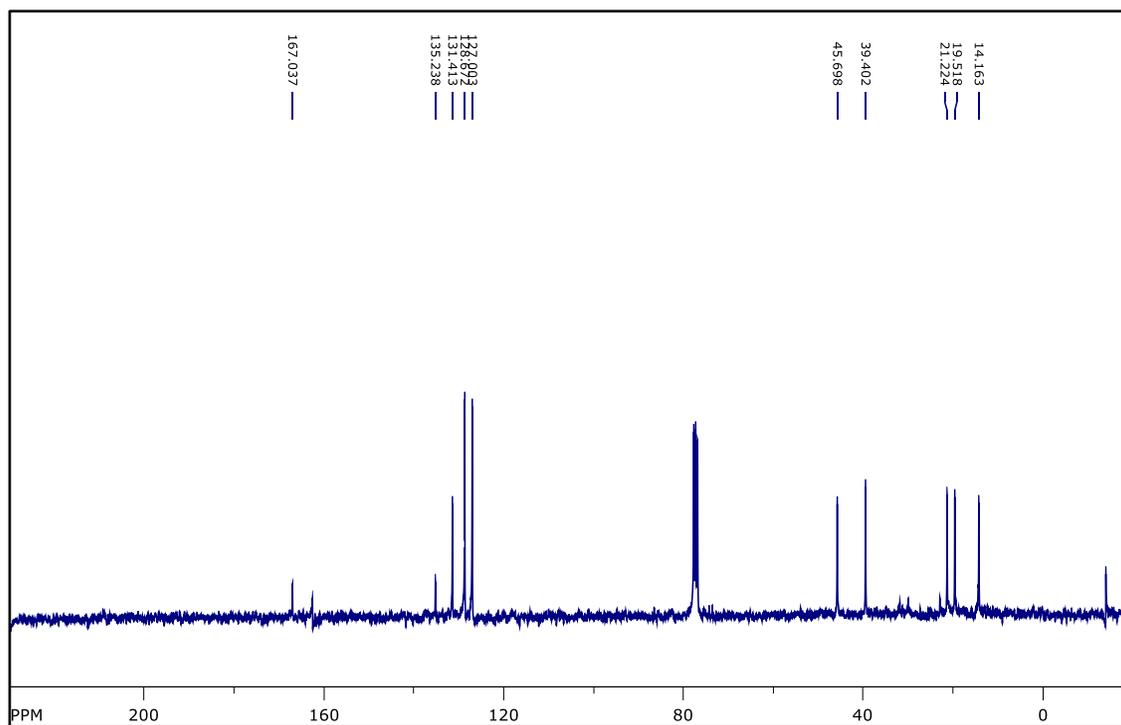
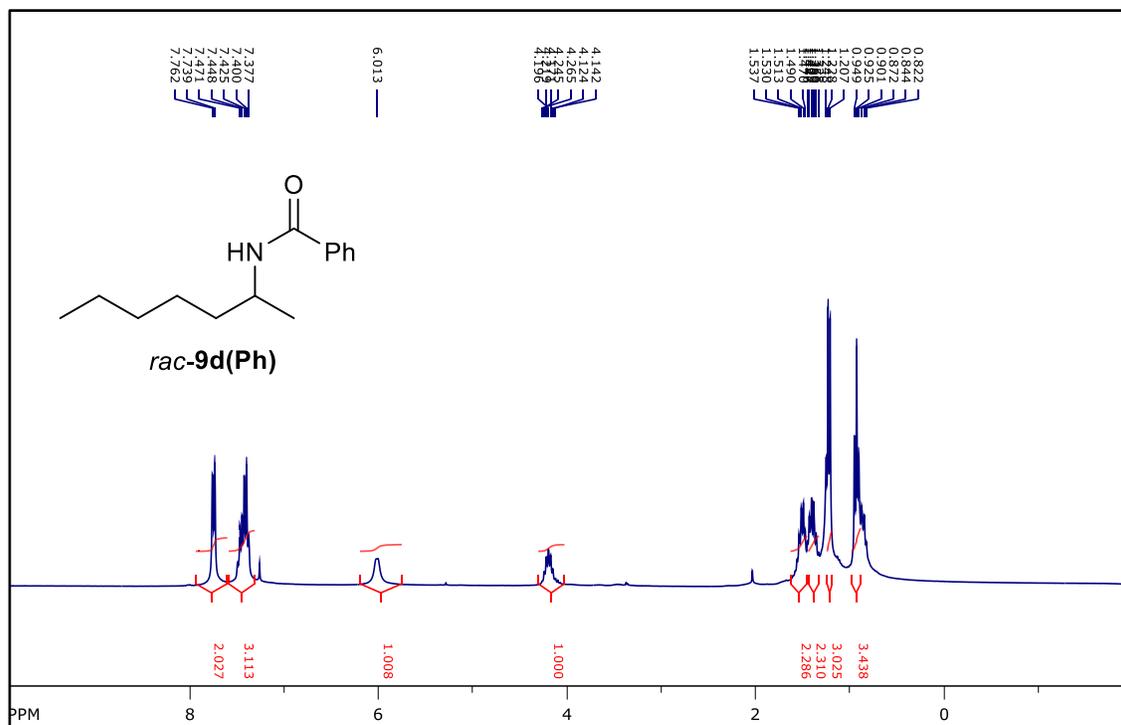


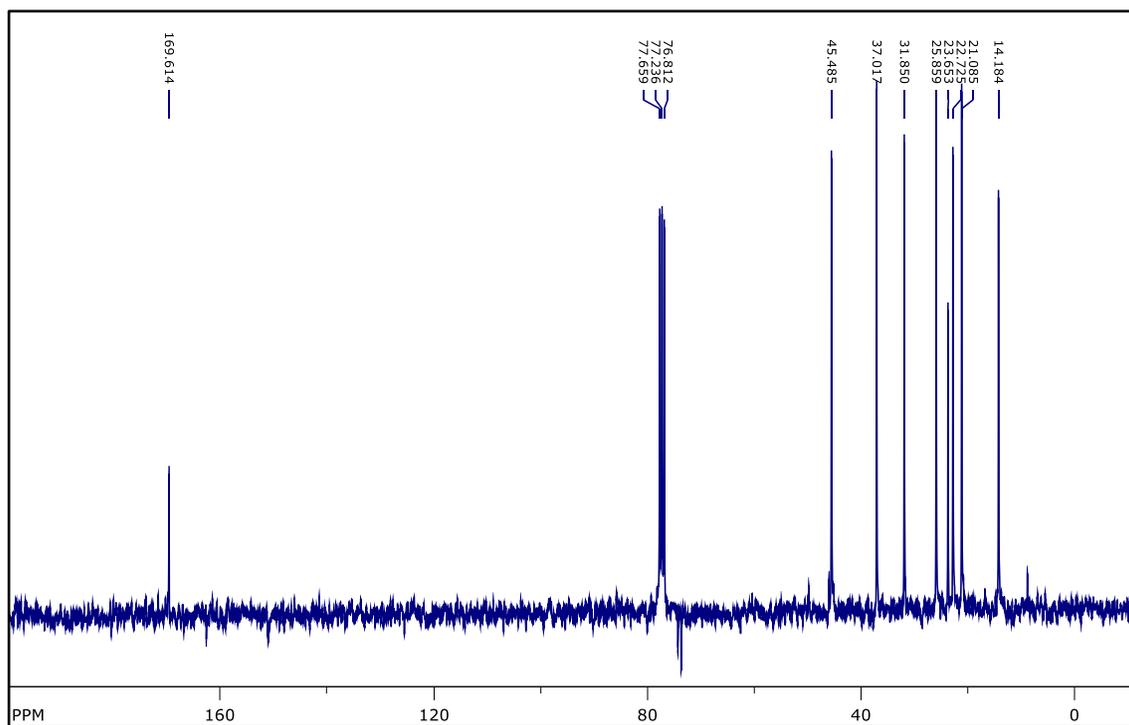
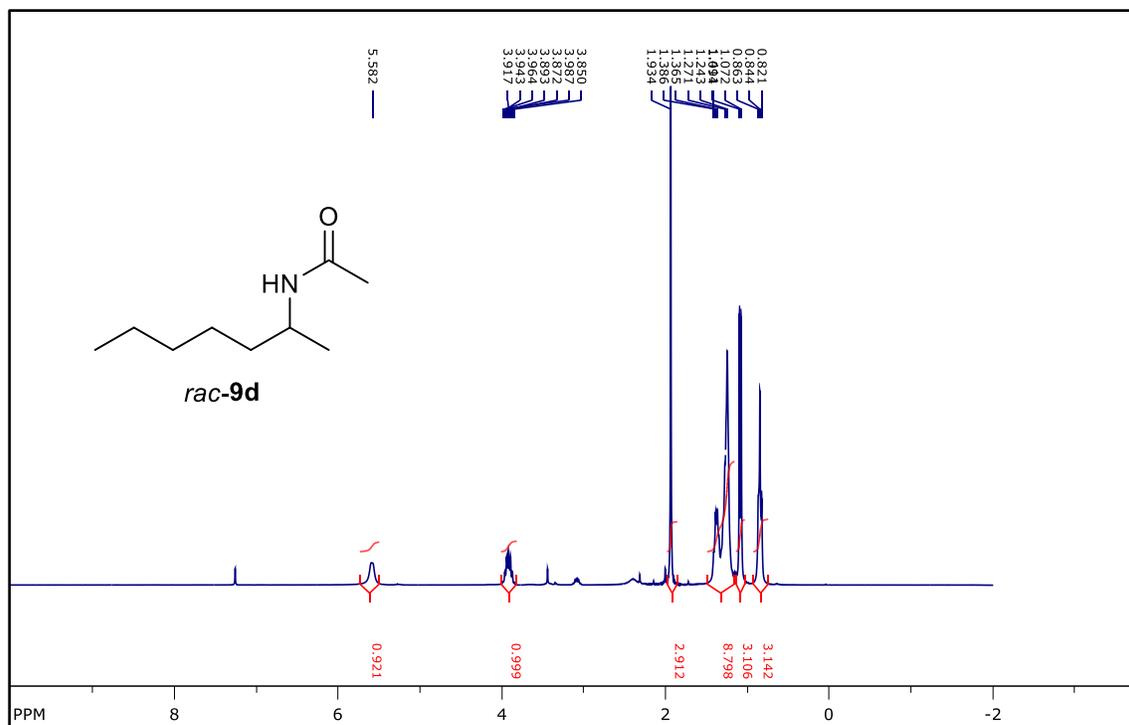


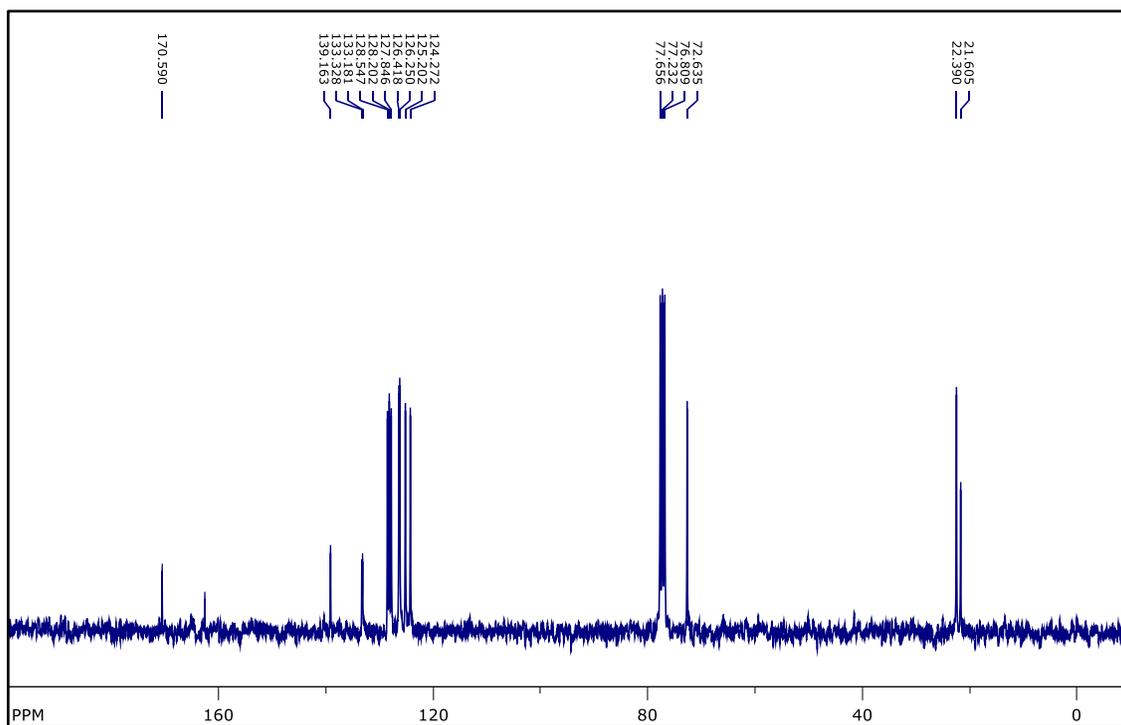
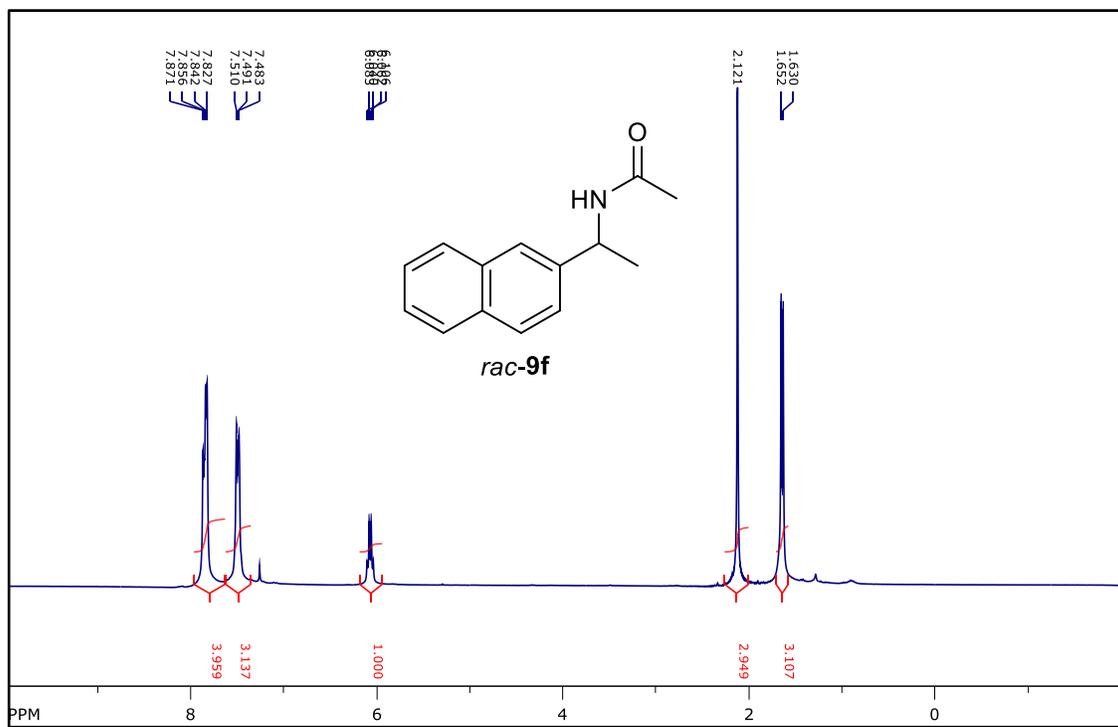


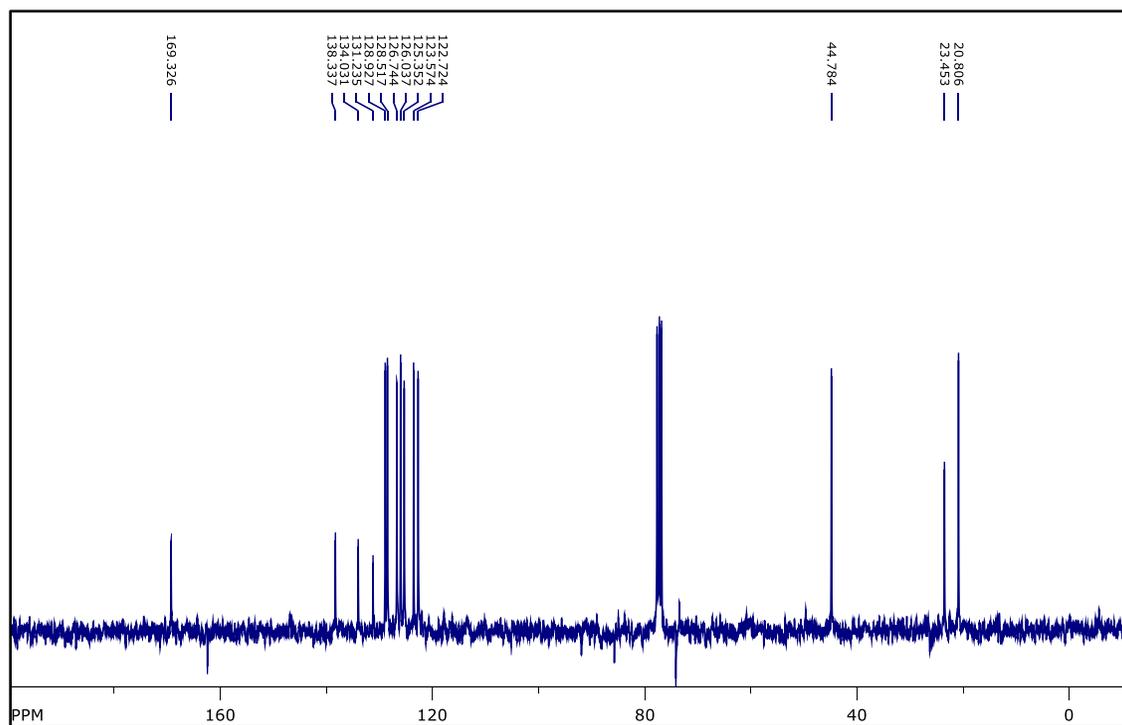
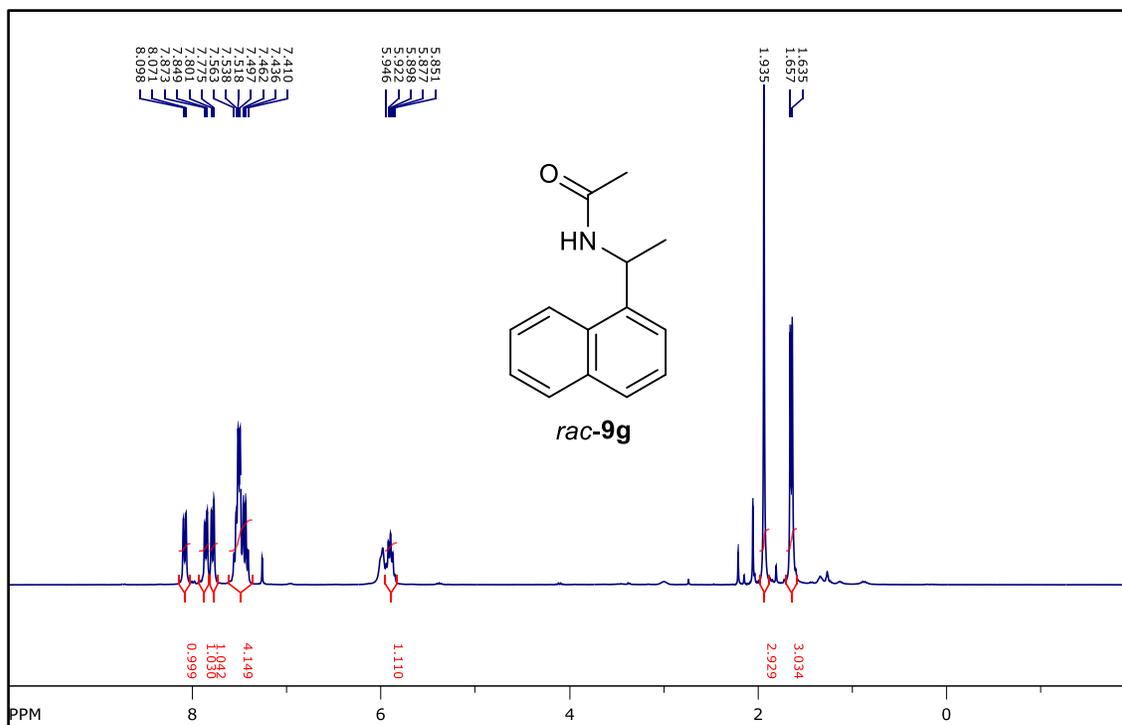


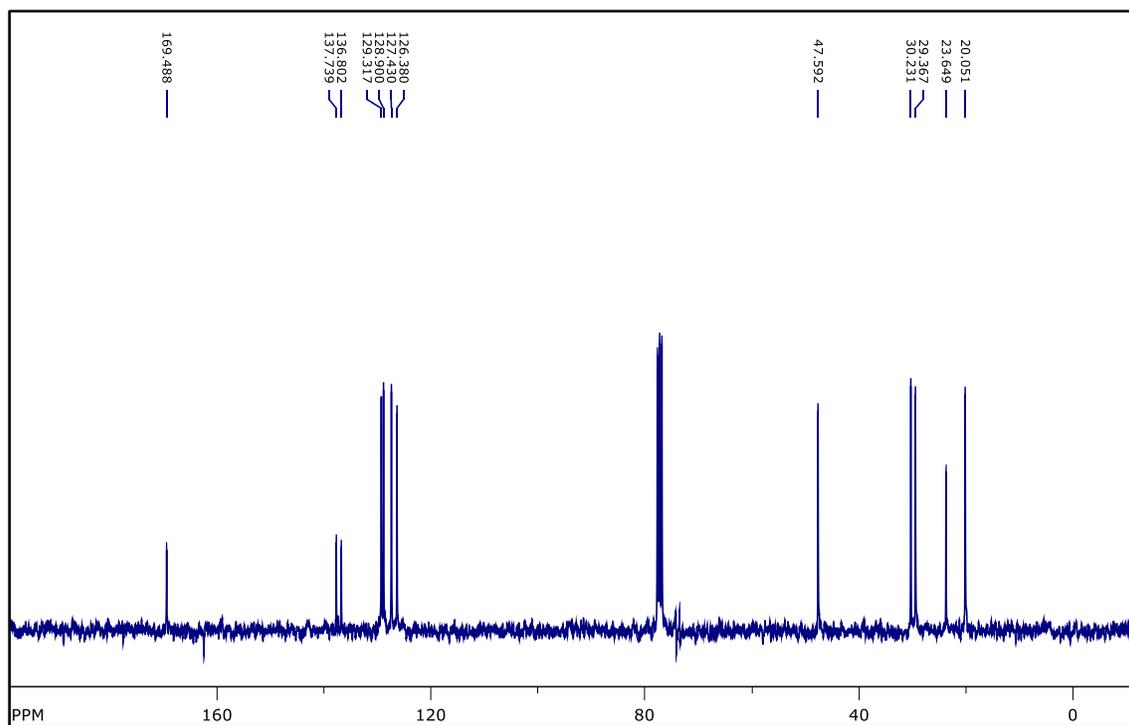
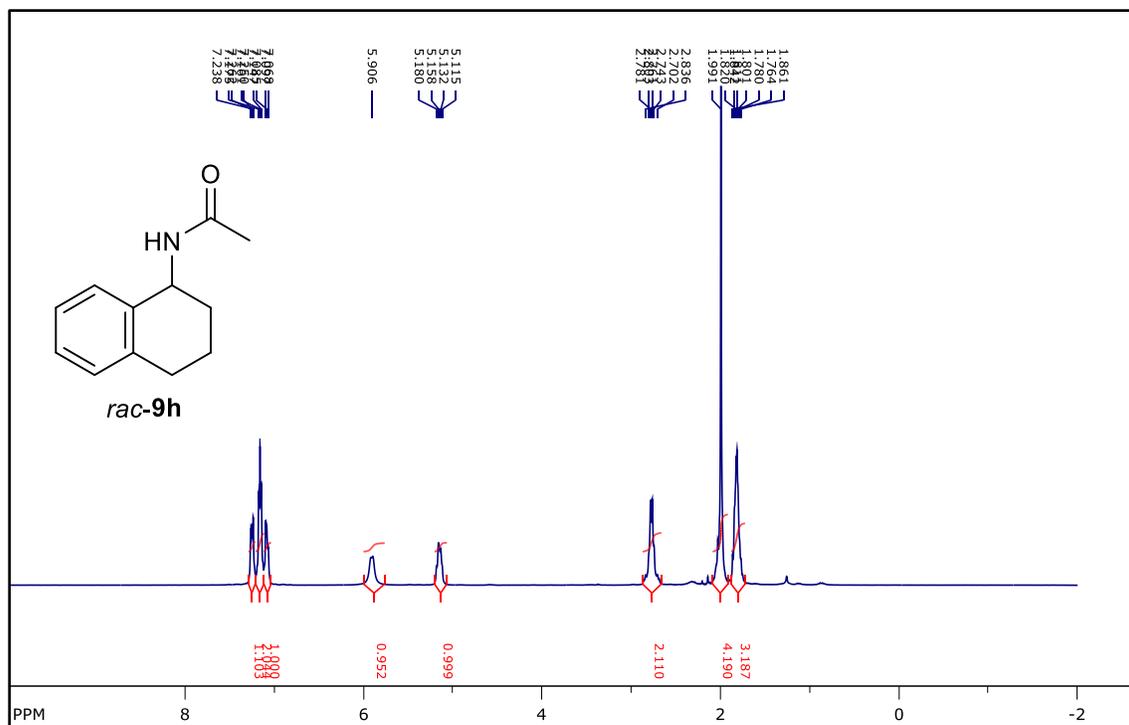


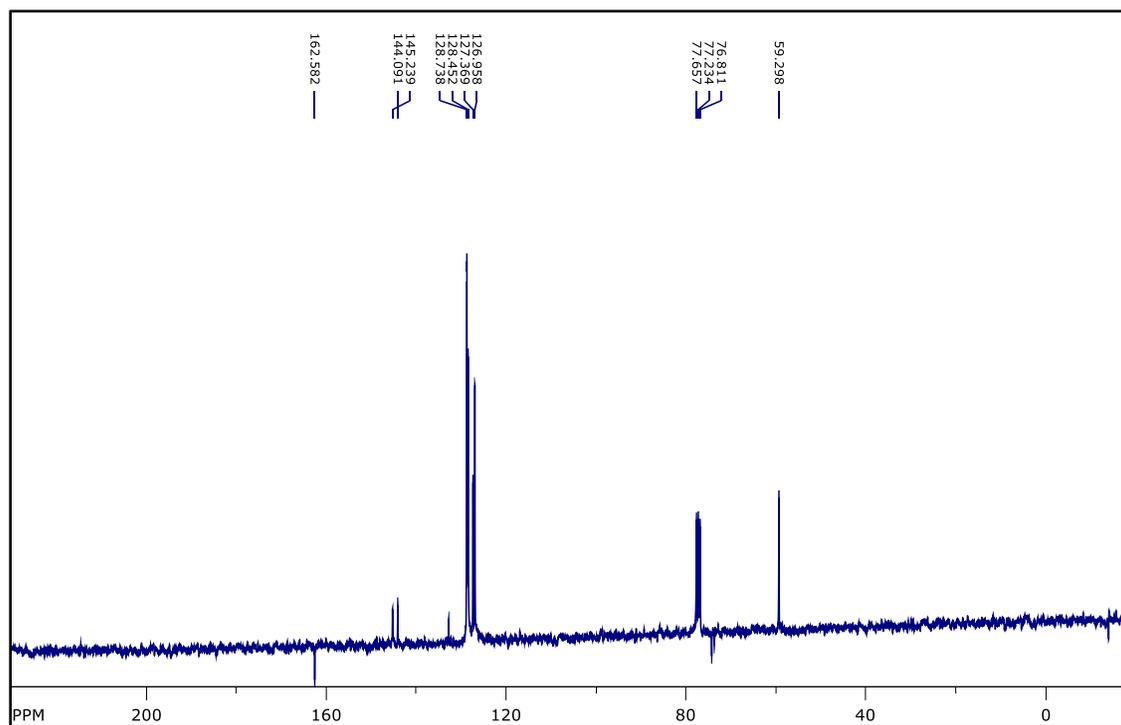
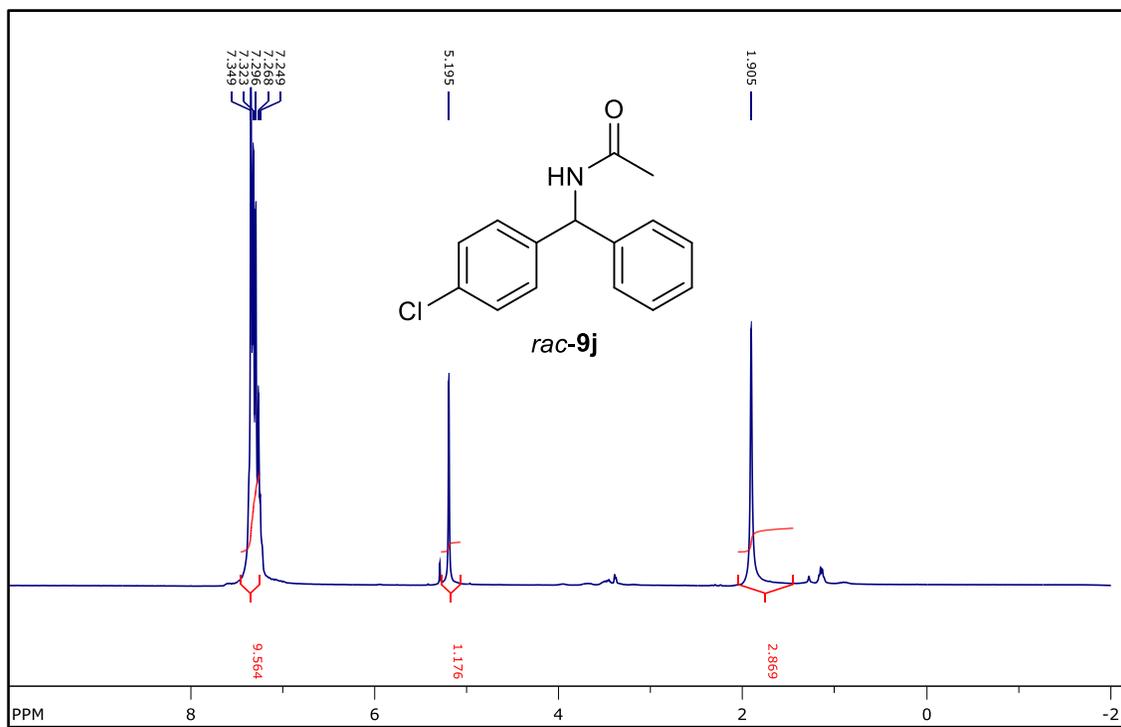


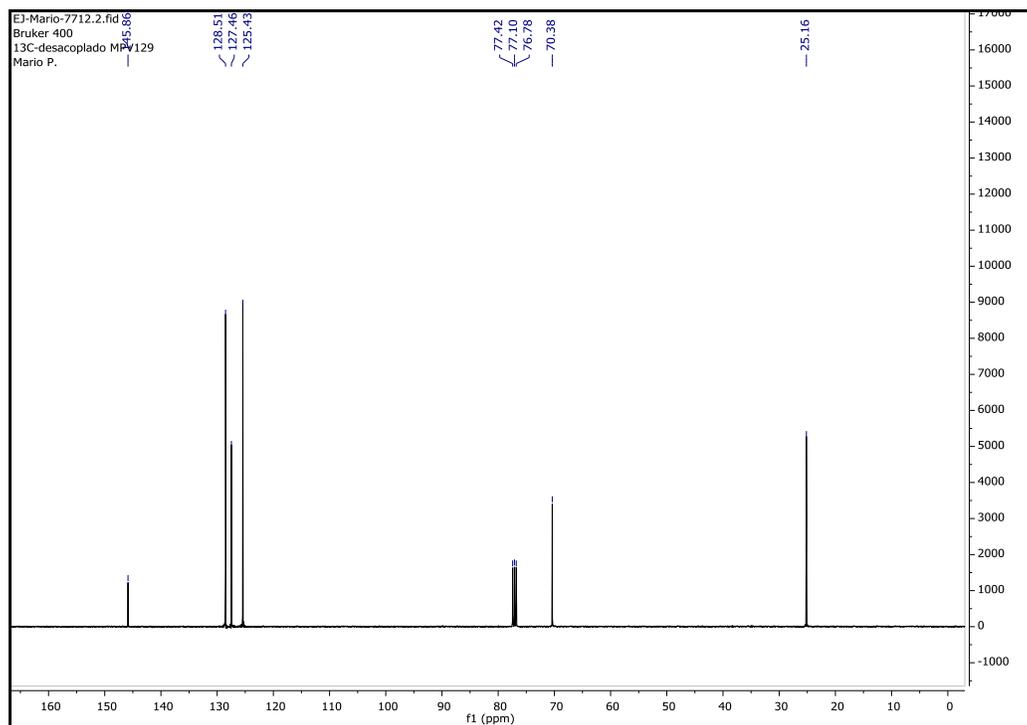
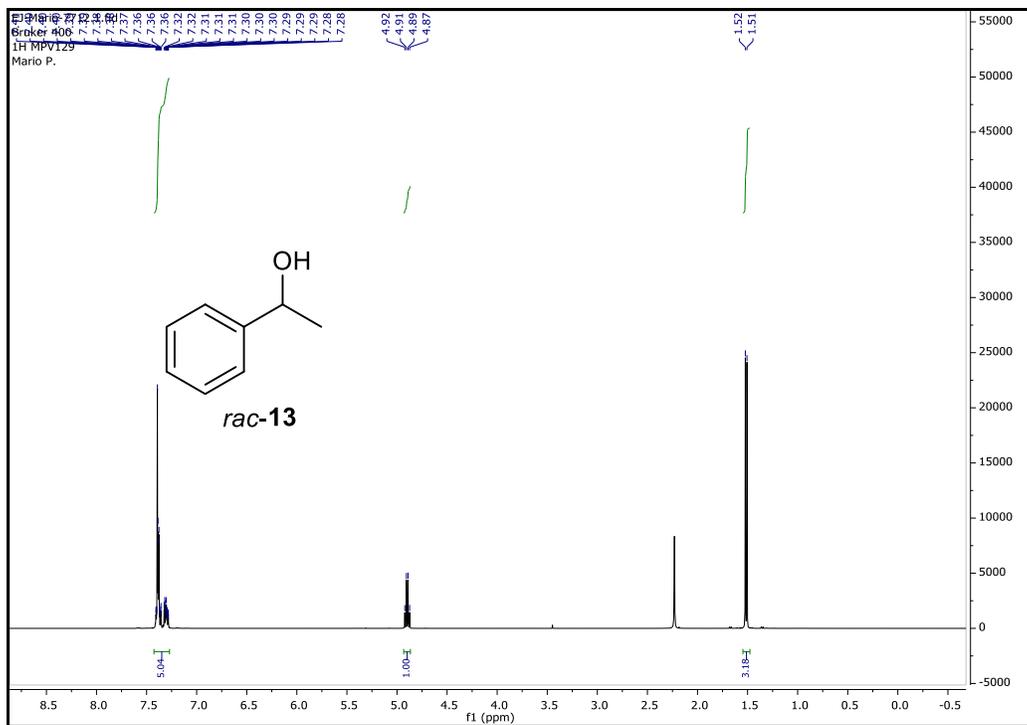


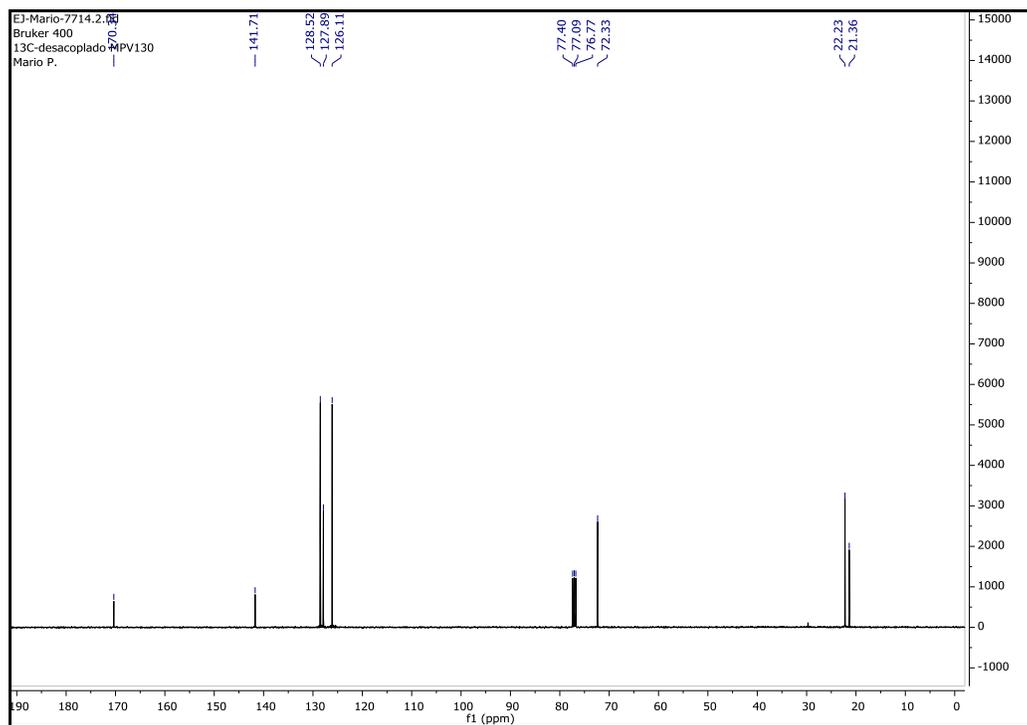
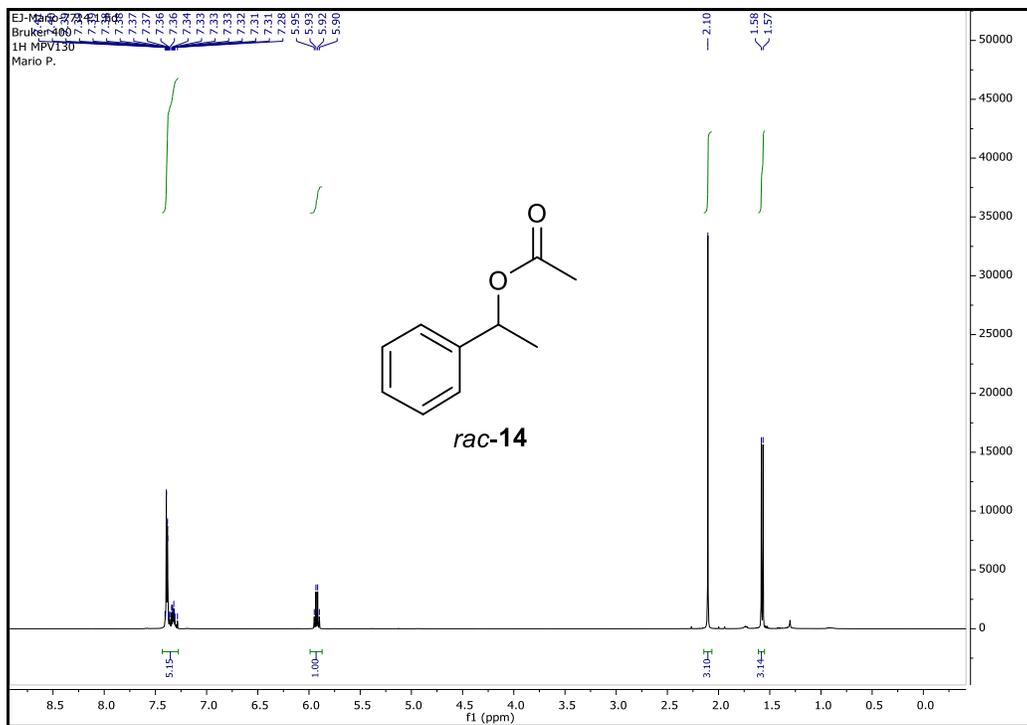


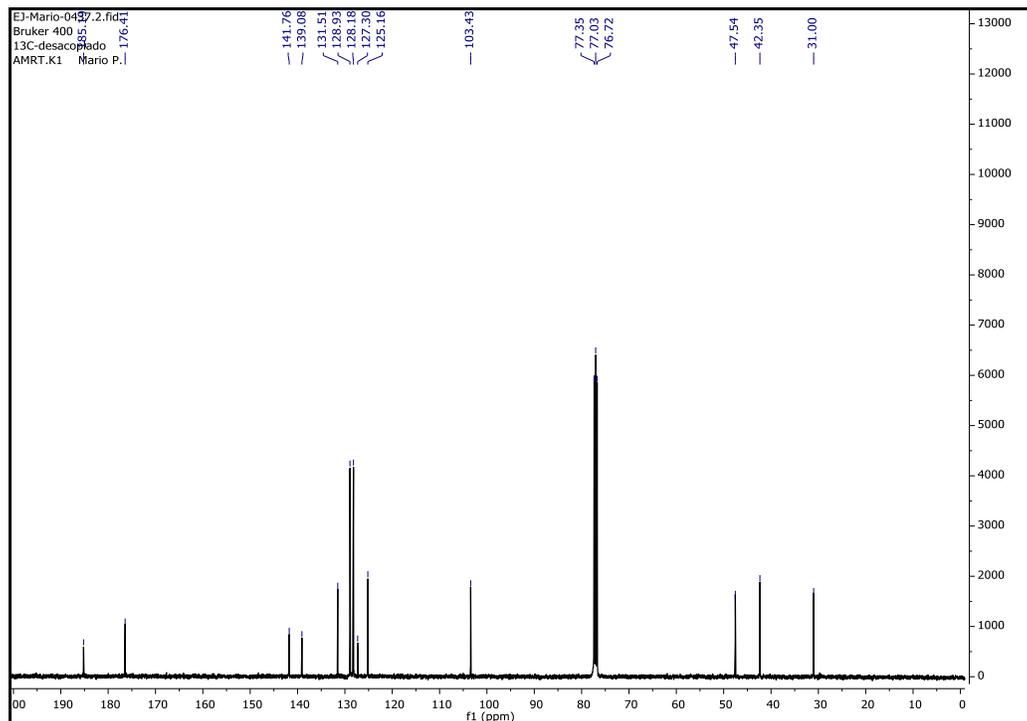
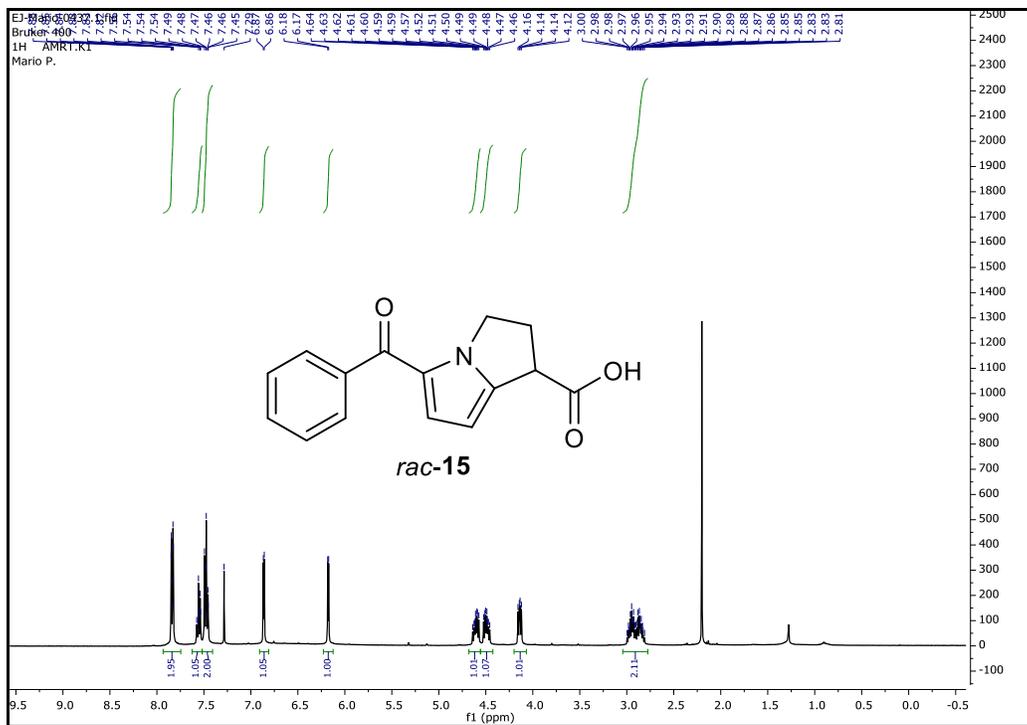


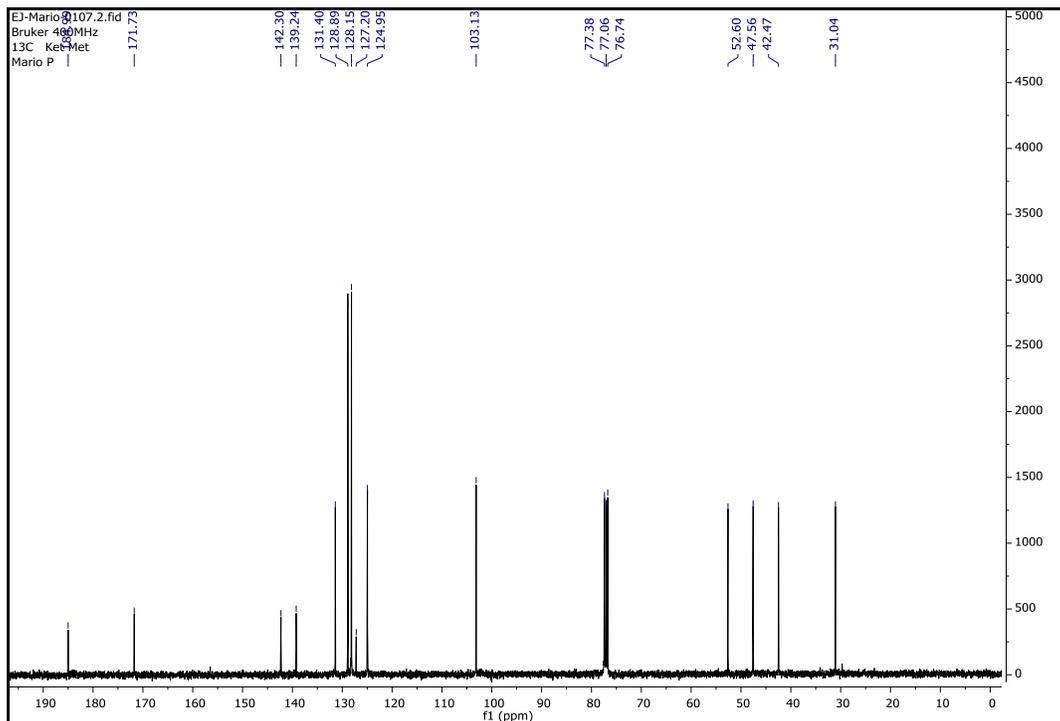
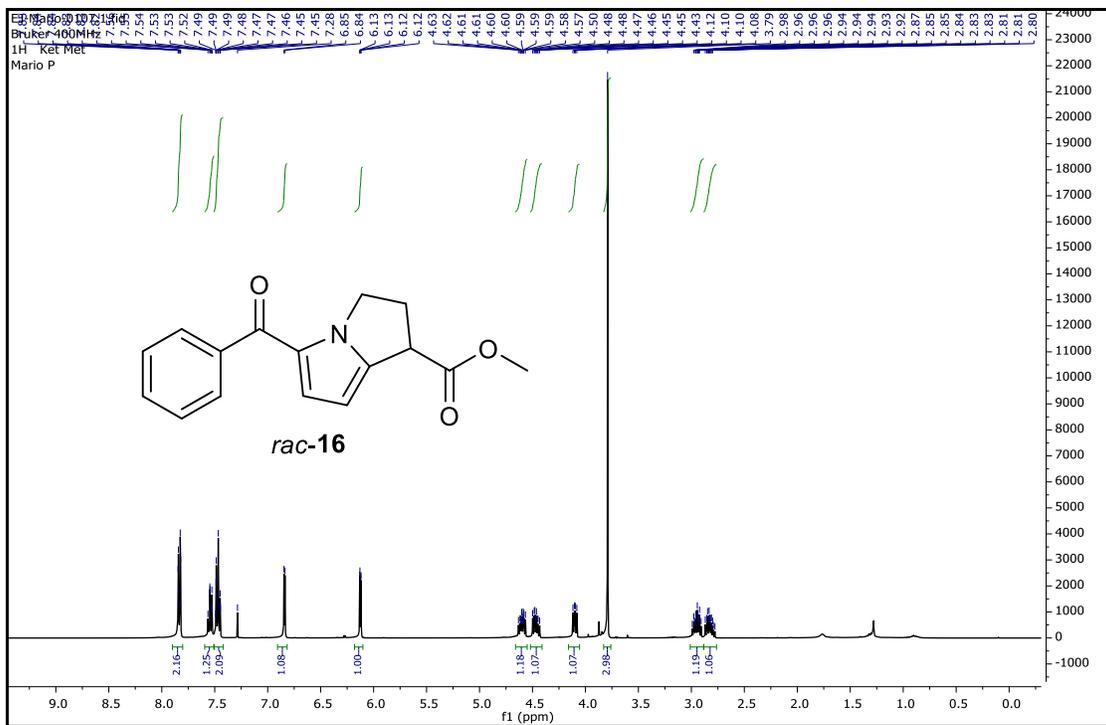


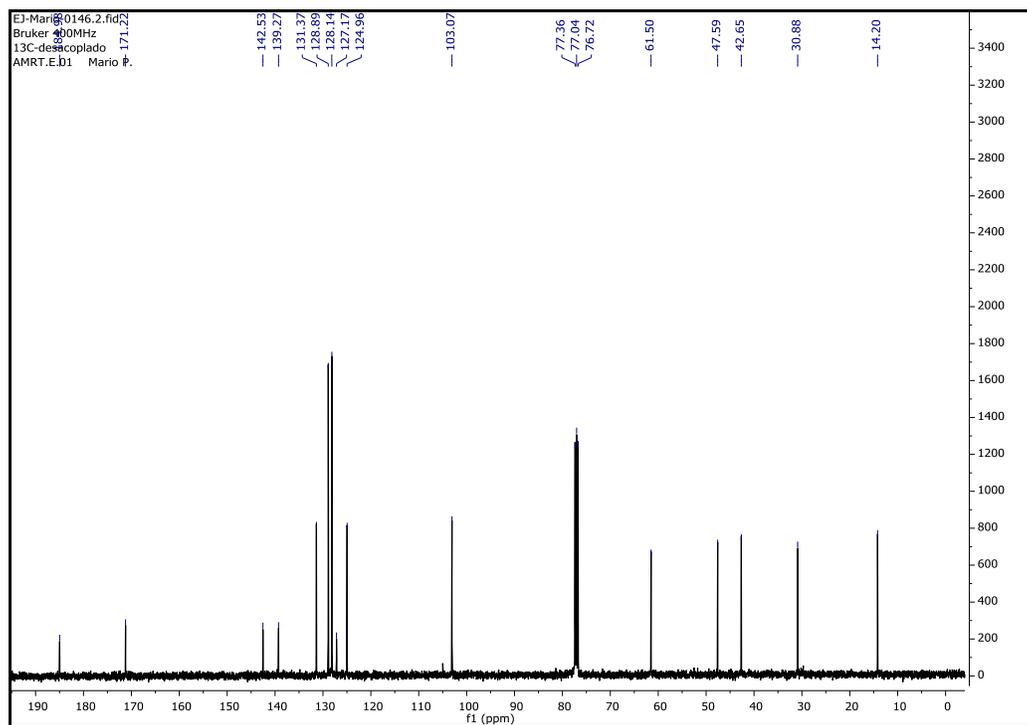
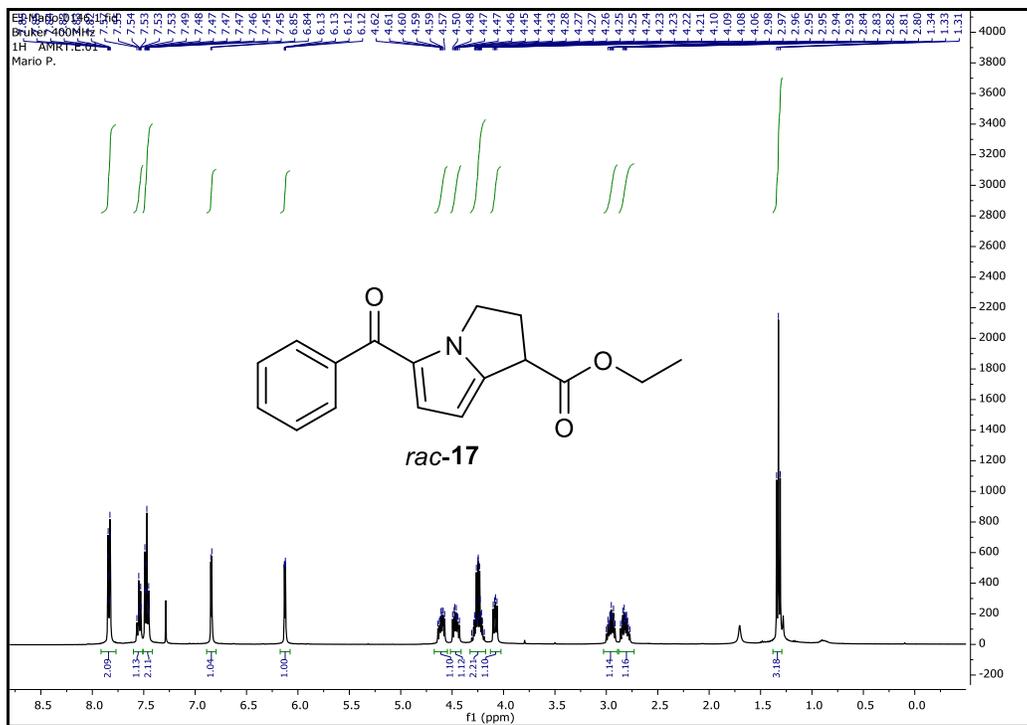


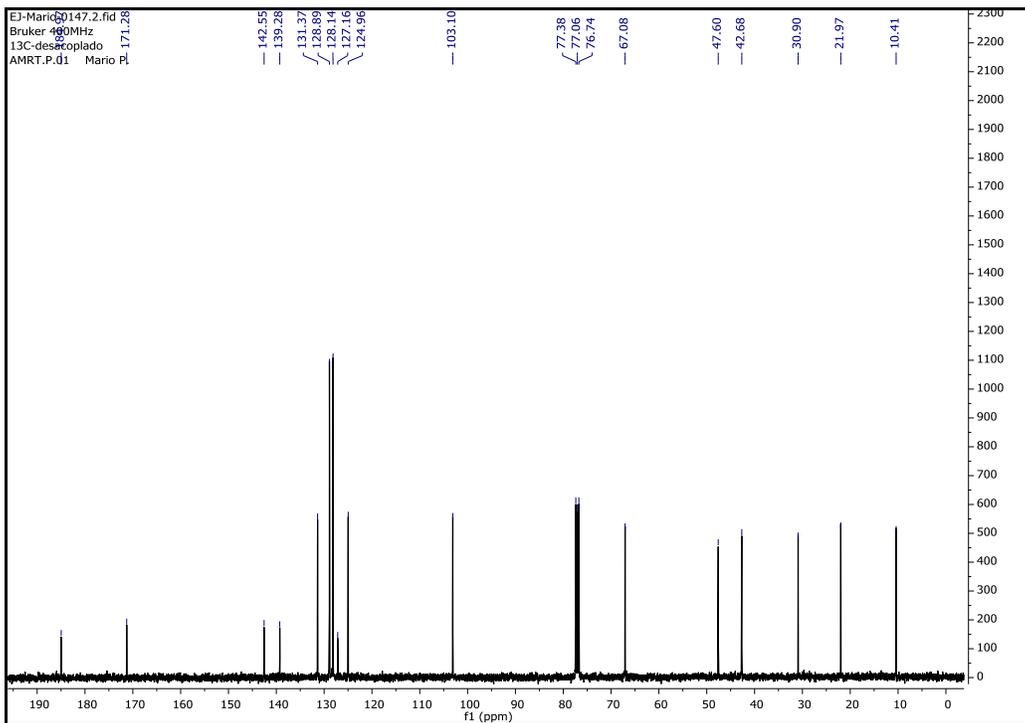
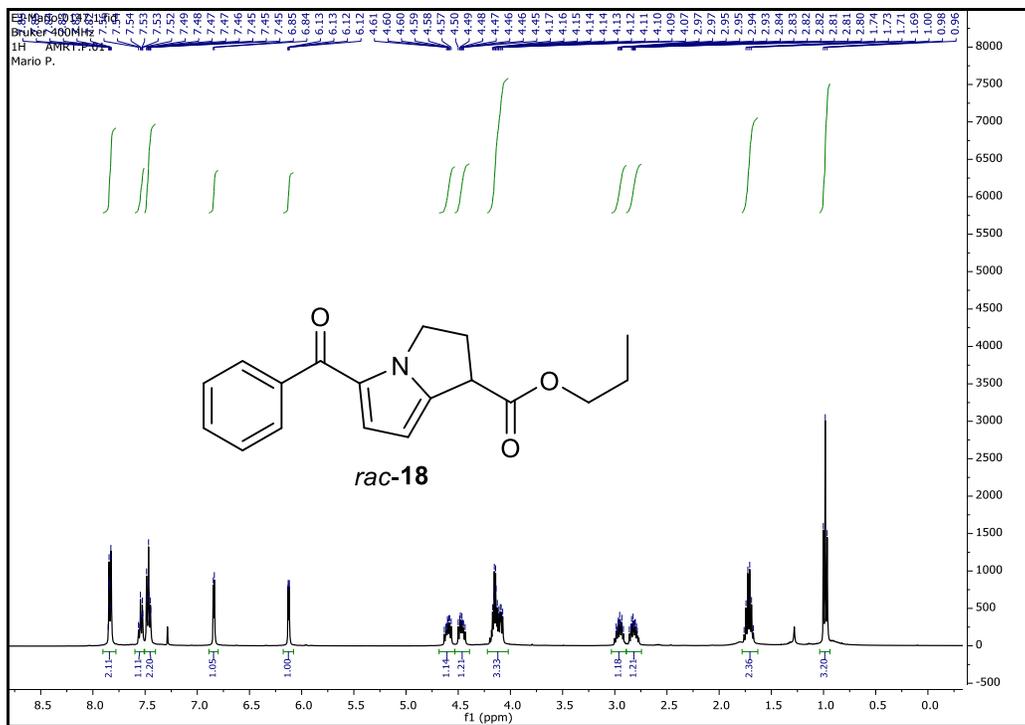


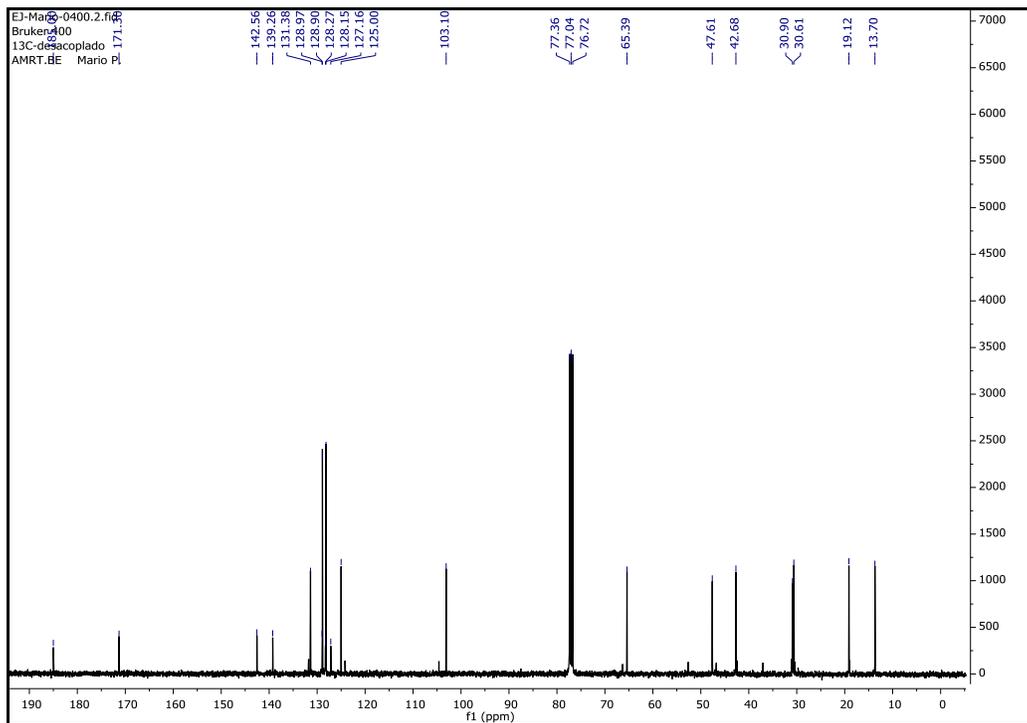
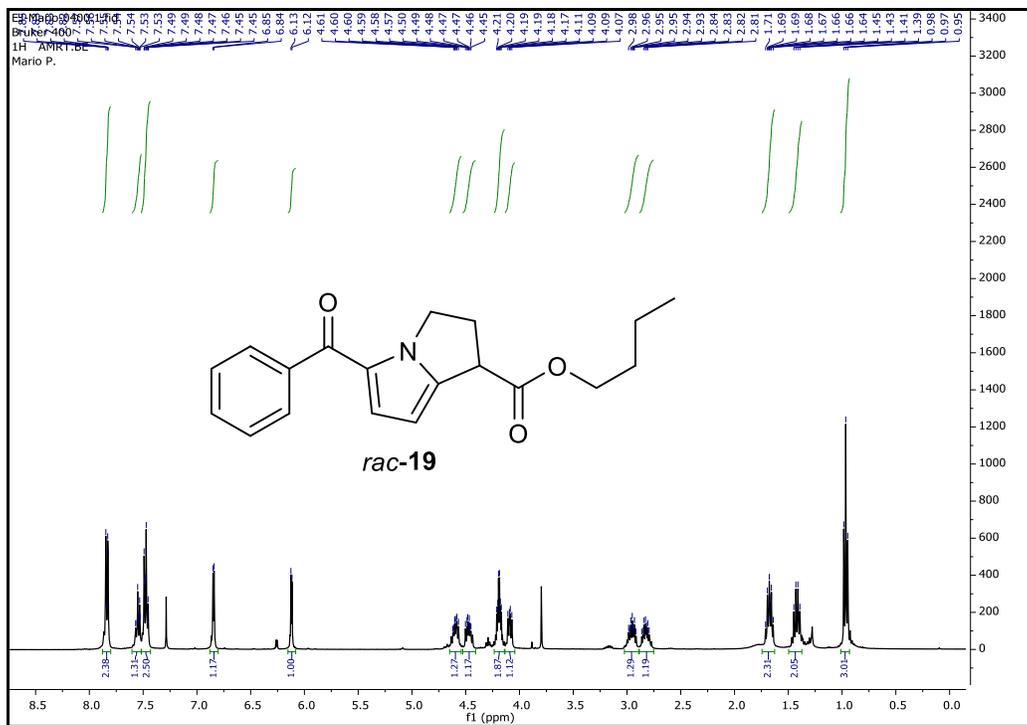


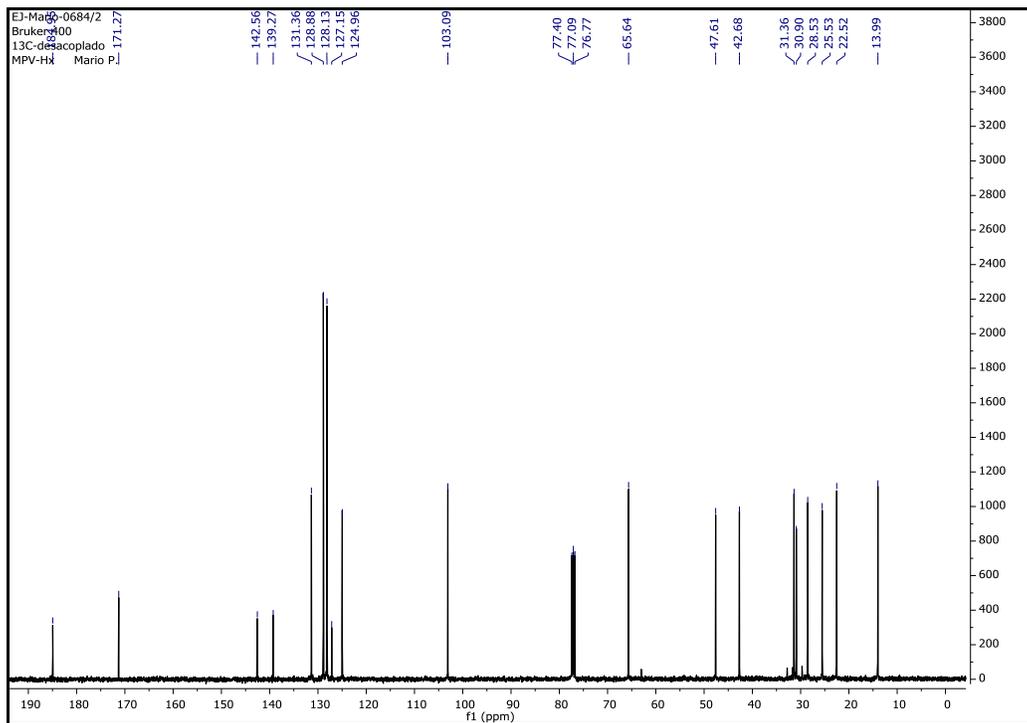
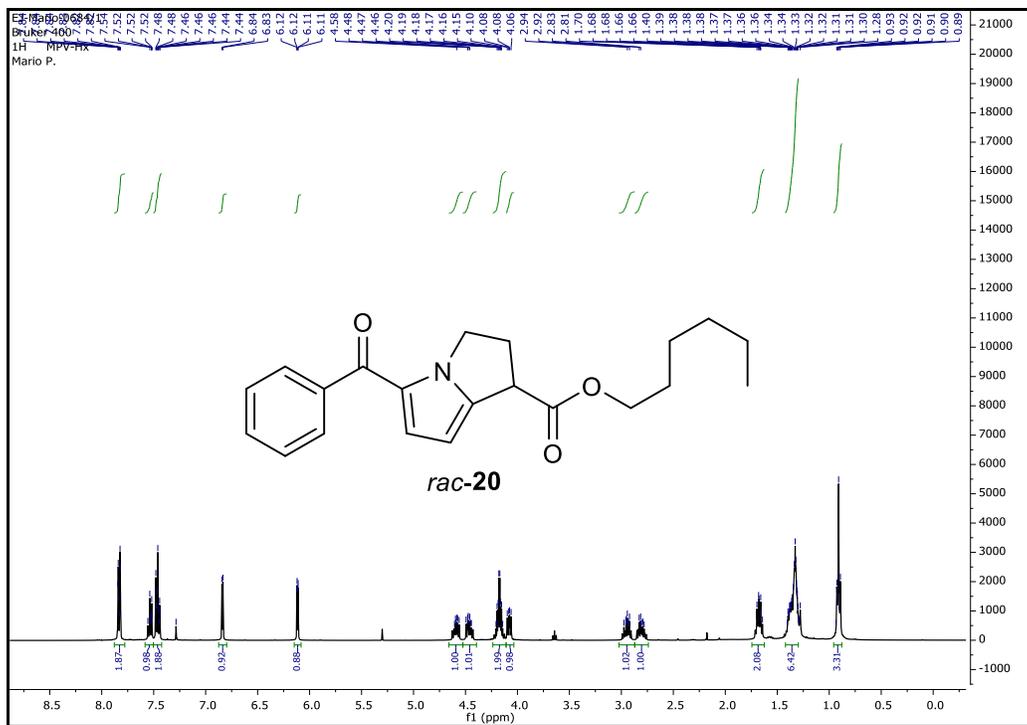








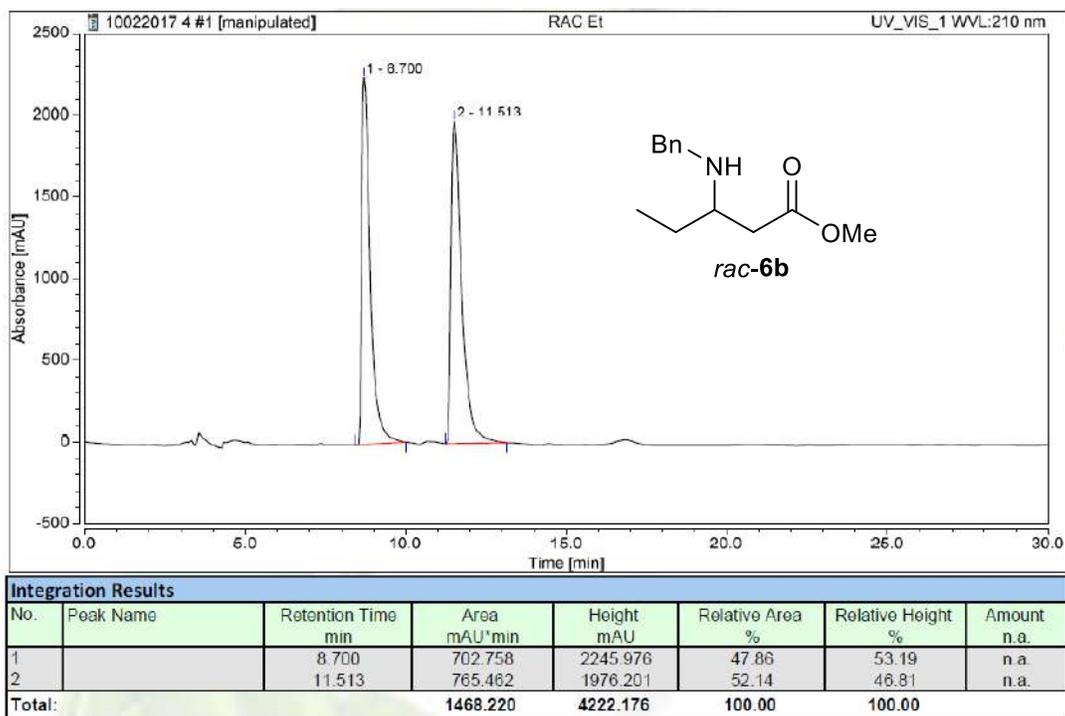
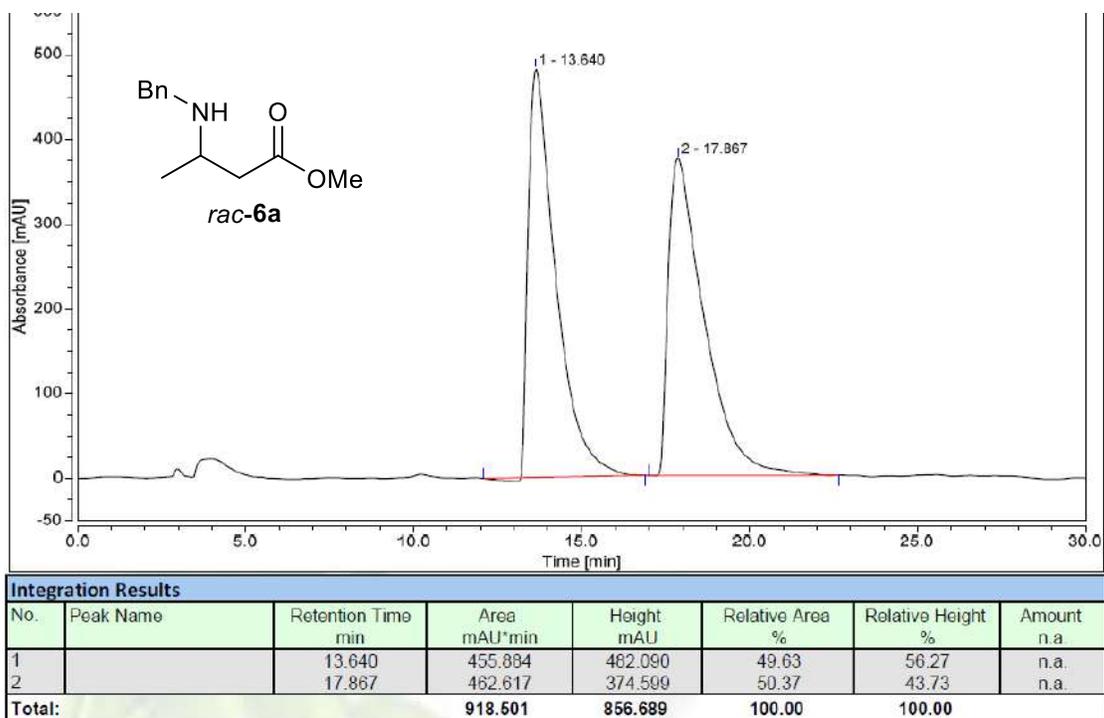


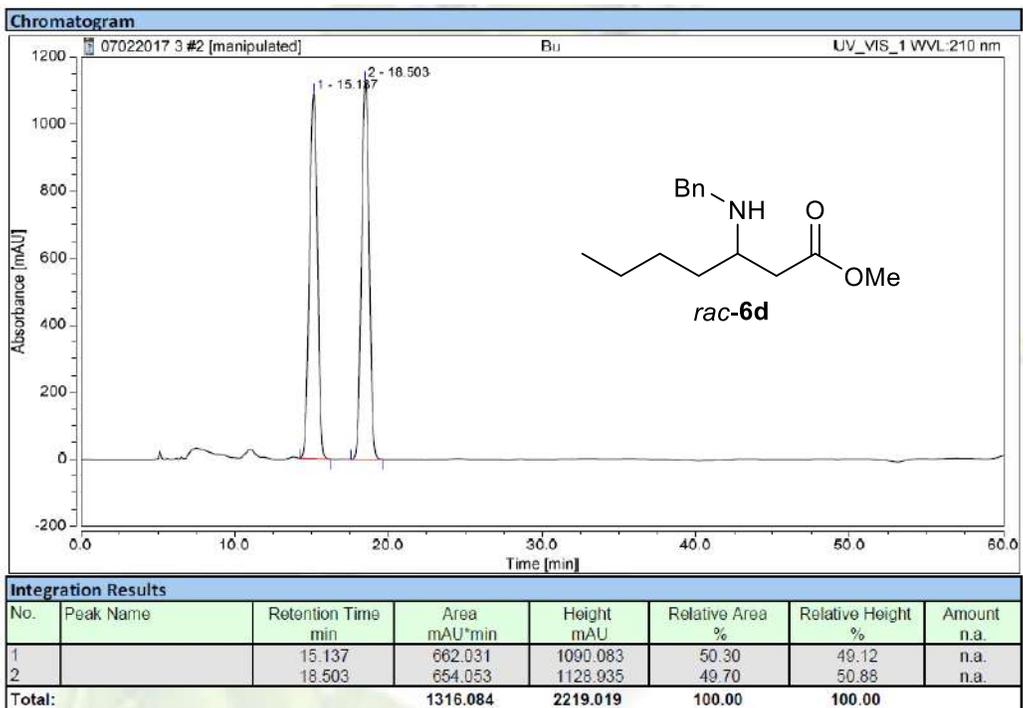
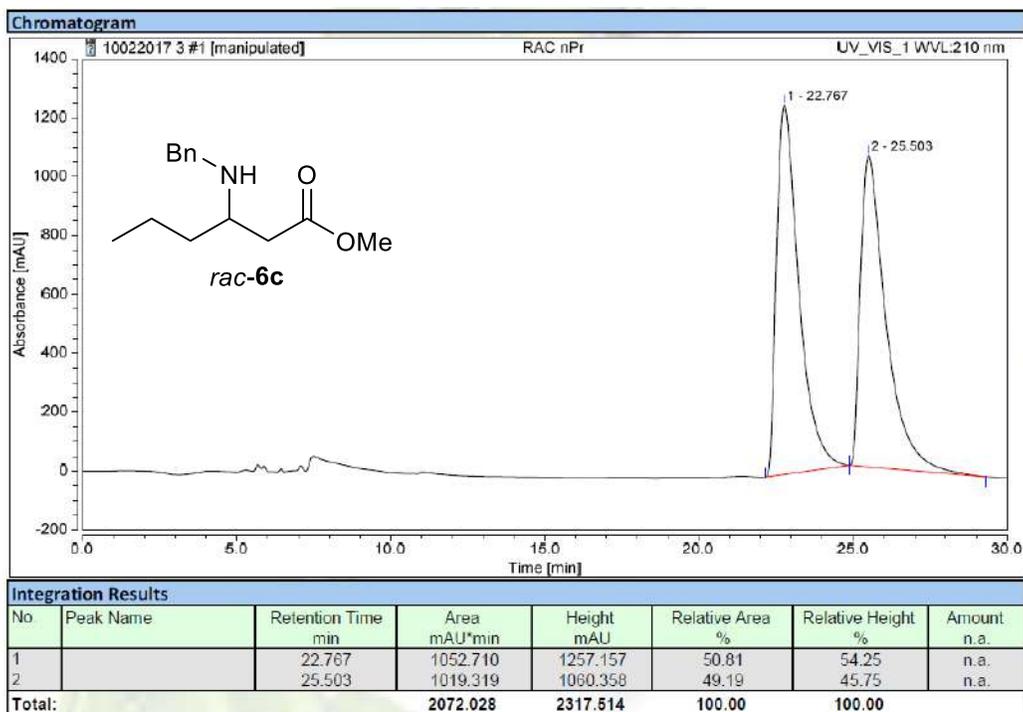


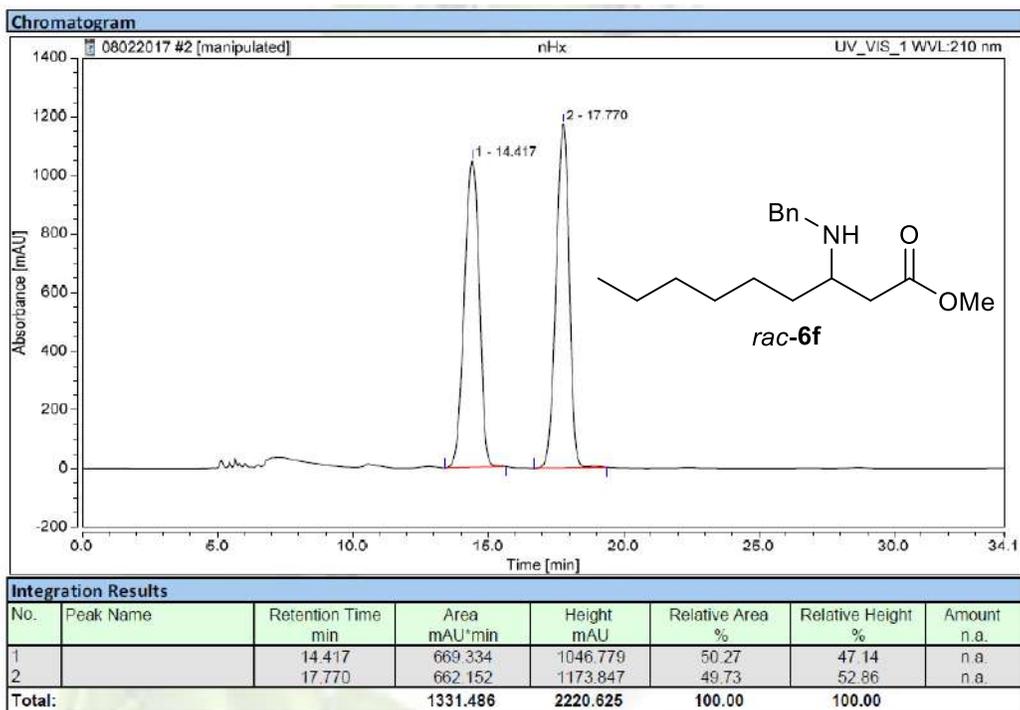
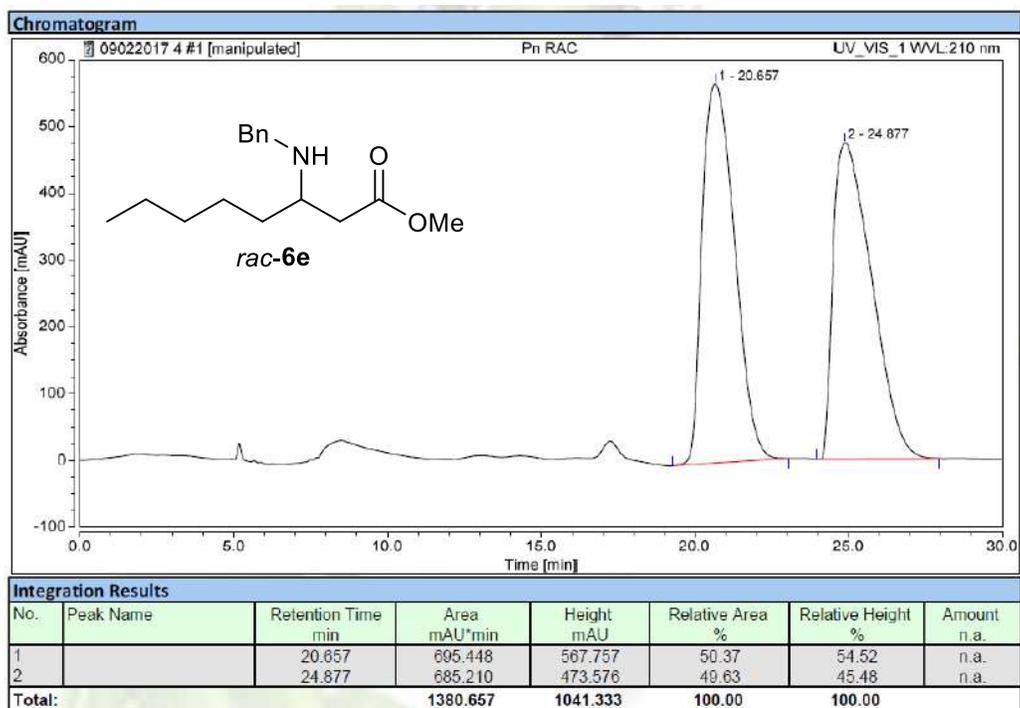
Condiciones de elución de HPLC para la separación enantiomérica de las mezclas racémicas analizadas en este trabajo de tesis

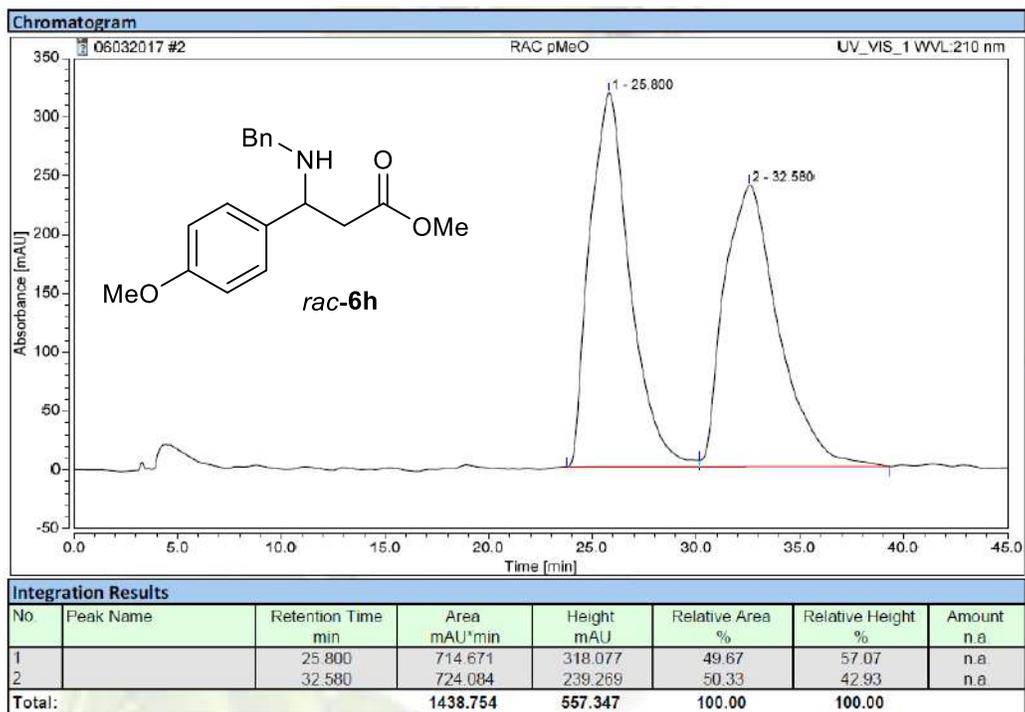
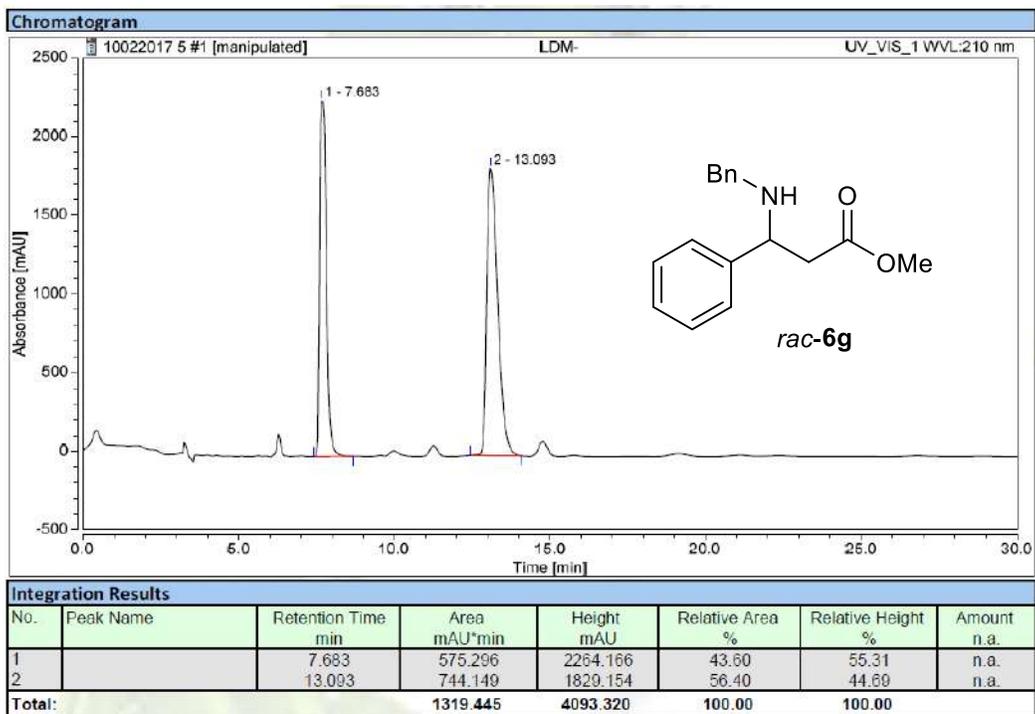
sustrato	Columna de fase quiral	Condiciones de separación Solvente, flujo (mL/min)	Tiempo de corrida (min)	Tiempo de elución (min)	
				(S)	(R)
<i>rac-6a</i>	CP OD	Hex/IPA (99:1), 1	30	17.86	13.64
<i>rac-6b</i>	CP OD-H	Hex/IPA (98:2), 1	30	11.51	8.70
<i>rac-6c</i>	CP OD-H	Hex/IPA (99:1), 0.6	30	25.50	22.76
<i>rac-6d</i>	CP AD-H	Hex/IPA (99:1), 0.6	30	18.50	15.13
<i>rac-6e</i>	CP AD-H	Hex/IPA (99:1), 0.6	30	24.87	20.65
<i>rac-6f</i>	CP AD-H	Hex/IPA (99:1), 0.6	30	17.70	14.41
<i>rac-6g</i>	CP OD-H	Hex/IPA (95:5), 1	30	7.68	13.09
<i>rac-6h</i>	CP OD	Hex/IPA (99:1), 0.9	45	32.58	24.58
<i>rac-6i</i>	CP AD-H	Hex/IPA (99:1), 1	15	7.03	4.93
<i>rac-7a</i>	CB TAG	MeOH, 1	30	21.91	17.08
<i>rac-7b</i>	CB T	EtOH/H ₂ O (70:30), 0.5	30	20.50	17.14
<i>rac-7c</i>	CB T	EtOH/H ₂ O (70:30), 0.5	30	19.50	16.31
<i>rac-7d</i>	CB T	EtOH/H ₂ O (70:30), 0.5	30	17.58	14.93
<i>rac-7e</i>	CB T	EtOH/H ₂ O (70:30), 0.5	30	16.96	14.03
<i>rac-7f</i>	CB T	EtOH/H ₂ O (70:30), 0.5	30	15.69	13.21
<i>rac-7g</i>	CB T	MeOH/H ₂ O (95:5), 0.8	20	10.05	10.97
<i>rac-7h</i>	CB TAG	MeOH, 0.8	30	7.13	7.96
<i>rac-7i</i>	CB T	EtOH/H ₂ O (70:30), 0.5	40	29.07	17.46
<i>rac-8e</i>	CP OD-H	Hex/IPA (90:10), 0.4	20	15.05	13.97
<i>rac-8f</i>	CP AD-H	Hex/IPA (95:5), 0.8	25	18.43	17.70
<i>rac-9a</i>	CP AD-H	Hex/IPA (90:10), 0.8	20	7.57	6.57
<i>rac-9b</i>	CP AS-H	Hex/IPA (95:5), 1	60	38.27	40.55
<i>rac-9c</i>	CP AS-H	Hex/IPA (90:10), 1	30	16.51	13.39
<i>rac-9d</i>	CP AD-H	Hex/IPA (95:5), 0.7	20	8.71	8.10
<i>rac-9e</i>	CP OD-H	Hex/IPA (90:10), 0.4	20	10.71	9.67
<i>rac-9f</i>	CP AD-H	Hex/IPA (90:10), 0.8	20	6.06	5.20
<i>rac-9g</i>	CP AS-H	Hex/IPA (85:15), 1	30	17.15	21.64
<i>rac-9h</i>	CP OD-H	Hex/IPA (90:10), 0.5	30	19.36	25.46
<i>rac-9i</i>	CP OD-H	Hex/IPA (90:10), 1	30	14.15	18.04
<i>rac-Ras</i>	CP AD-H	Hex/IPA (90:10), 1	30	14.21	16.71
<i>rac-13</i>	CP AD-H	Hex/IPA (95:5), 0.5	25	20.29	16.59
<i>rac-14</i>	CP AD-H	Hex/IPA (95:5), 0.5	25	9.57	8.93
<i>rac-15</i>	CP AD-H	Hex/IPA/TFA (90:10:0.1), 25	25	16.0	13.8
<i>rac-16</i>	CP AS-H	Hex/IPA/TFA (95:5:0), 1	25	18.8	20.9
<i>rac-17</i>	CP AD-H	Hex/IPA/TFA (90:10:0.1), 1	25	11.4	10.5
<i>rac-18</i>	CP AD-H	Hex/IPA/TFA (90:10:0.1), 1	25	10.5	9.3
<i>rac-19</i>	CP AD-H	Hex/IPA/TFA (90:10:0.1), 1	25	10.0	8.6
<i>rac-20</i>	CP AD-H	Hex/IPA/TFA (90:10:0.1), 1	25	9.3	7.7

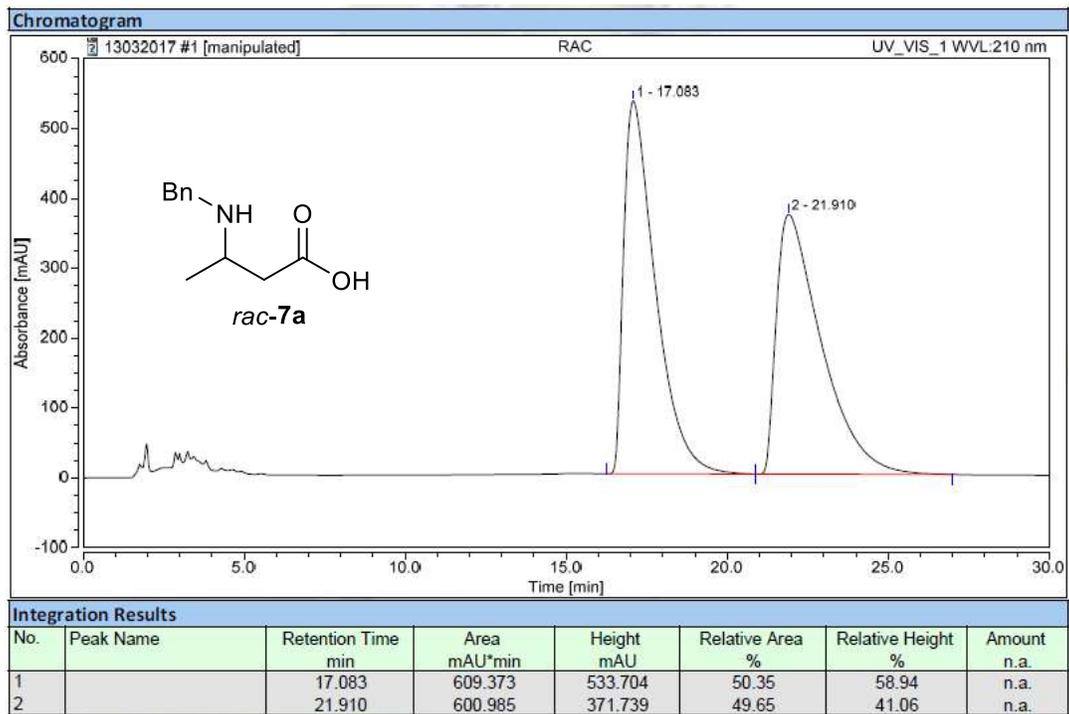
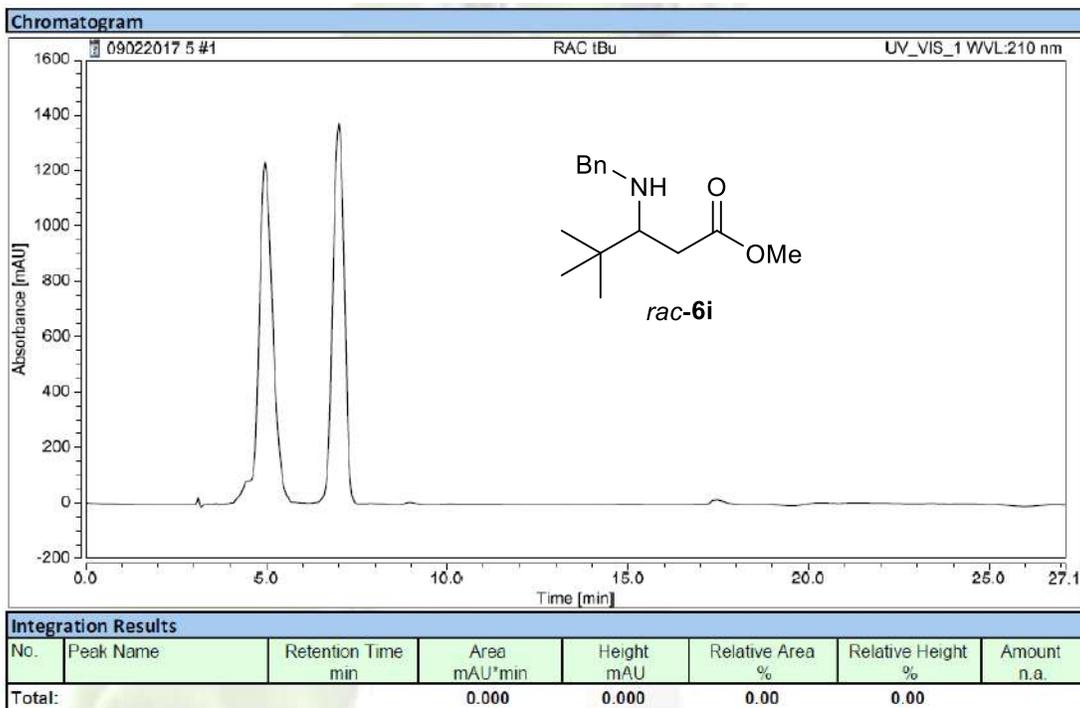
CP = Chiralpack. CB = Chirobiotic.

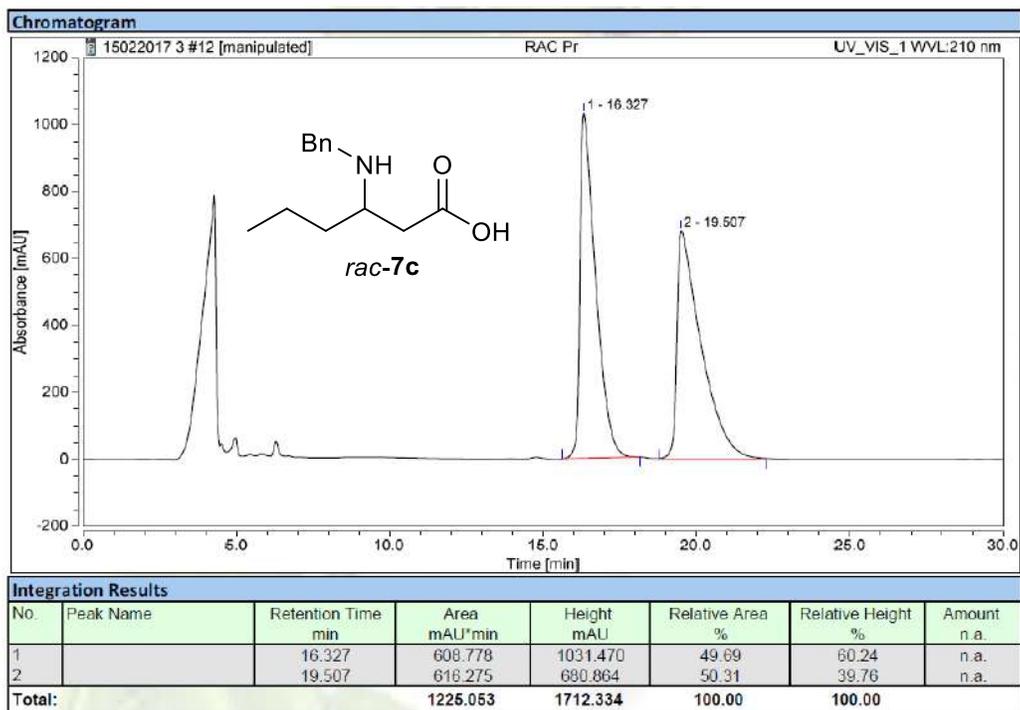
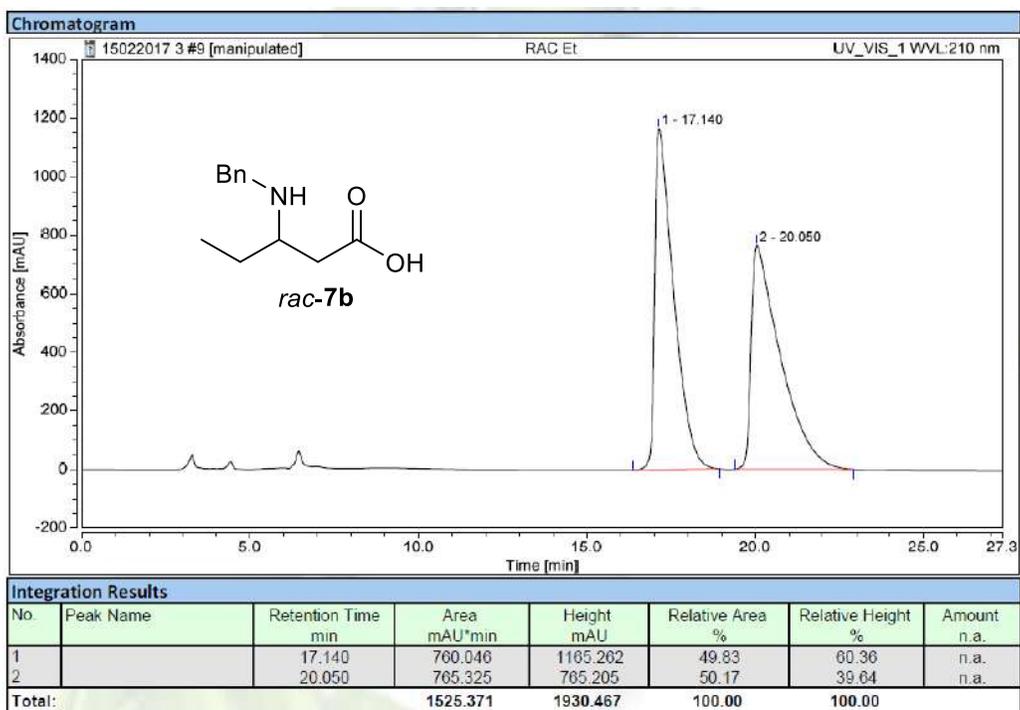


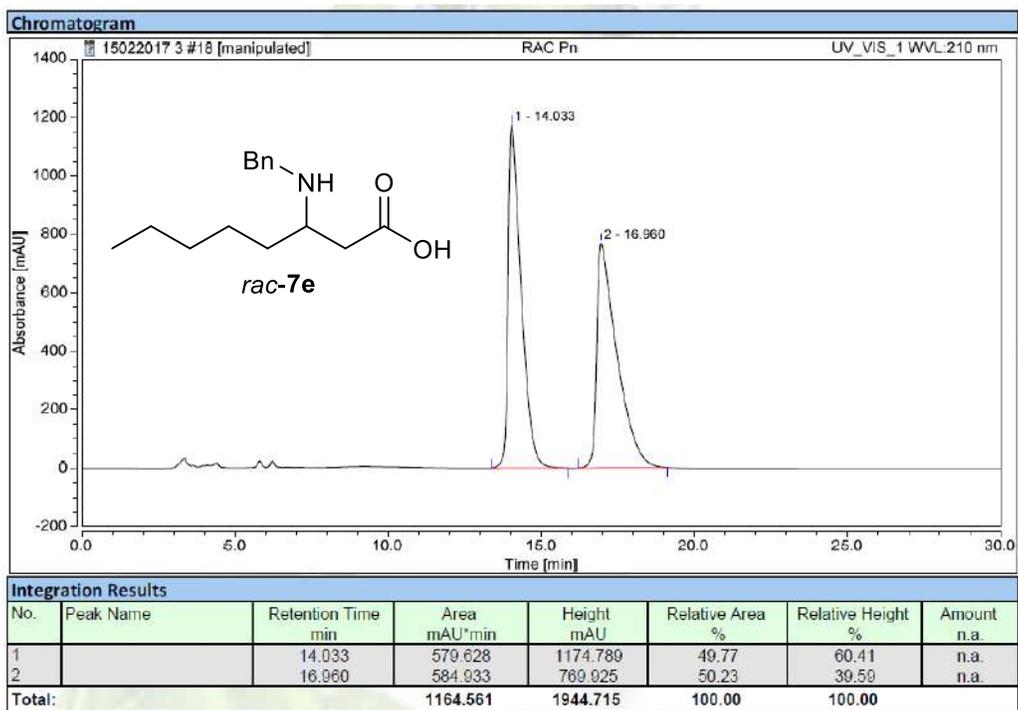
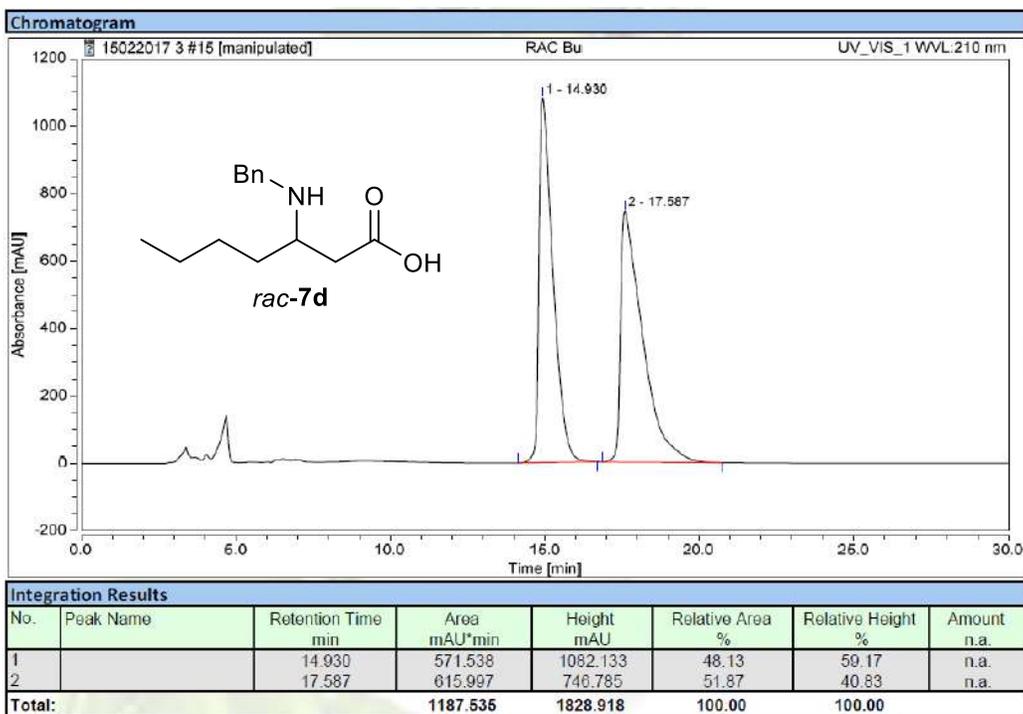


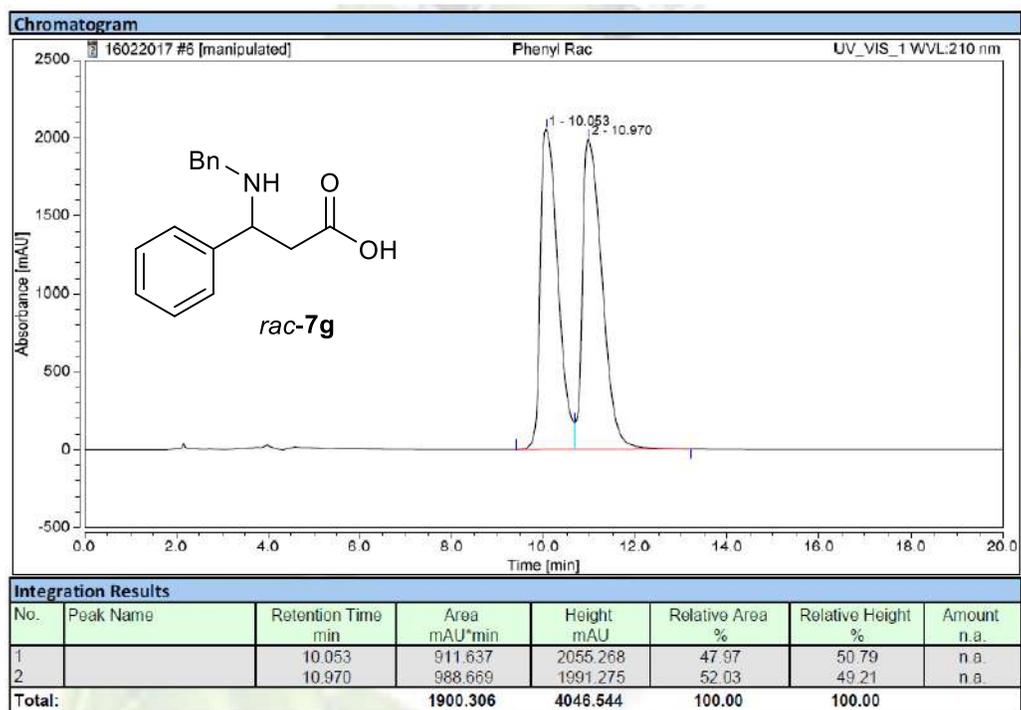
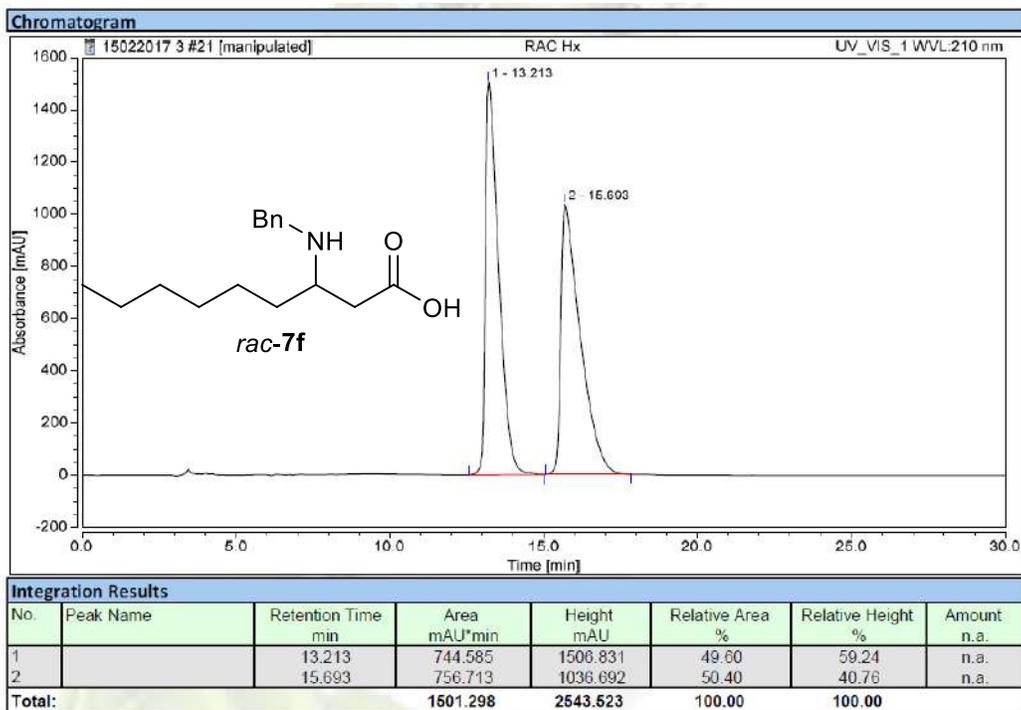


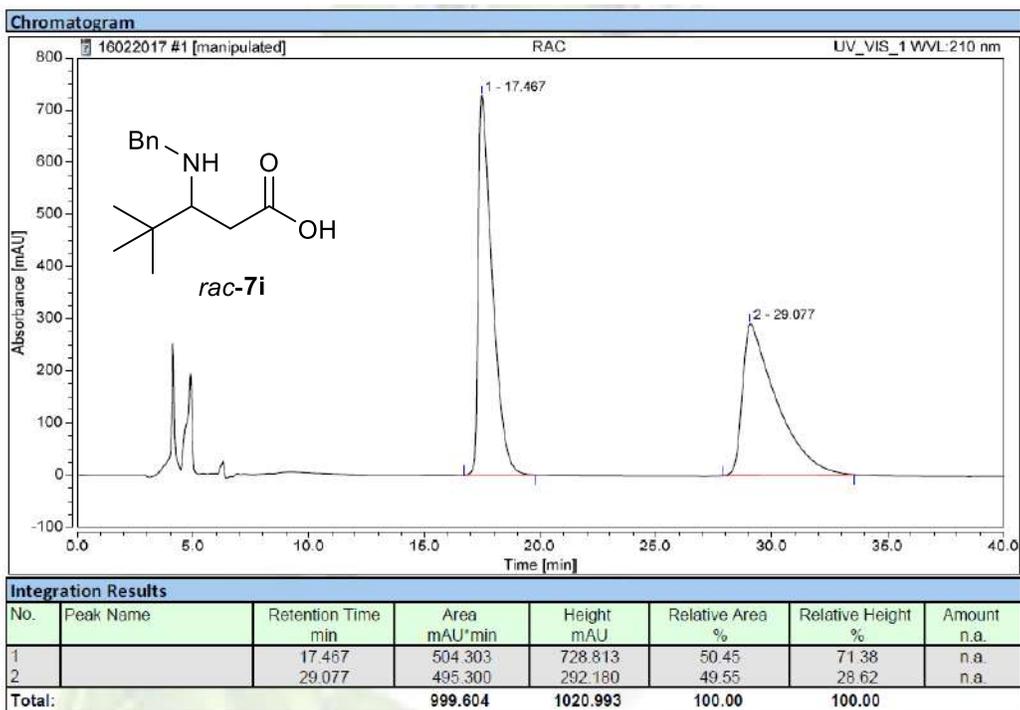
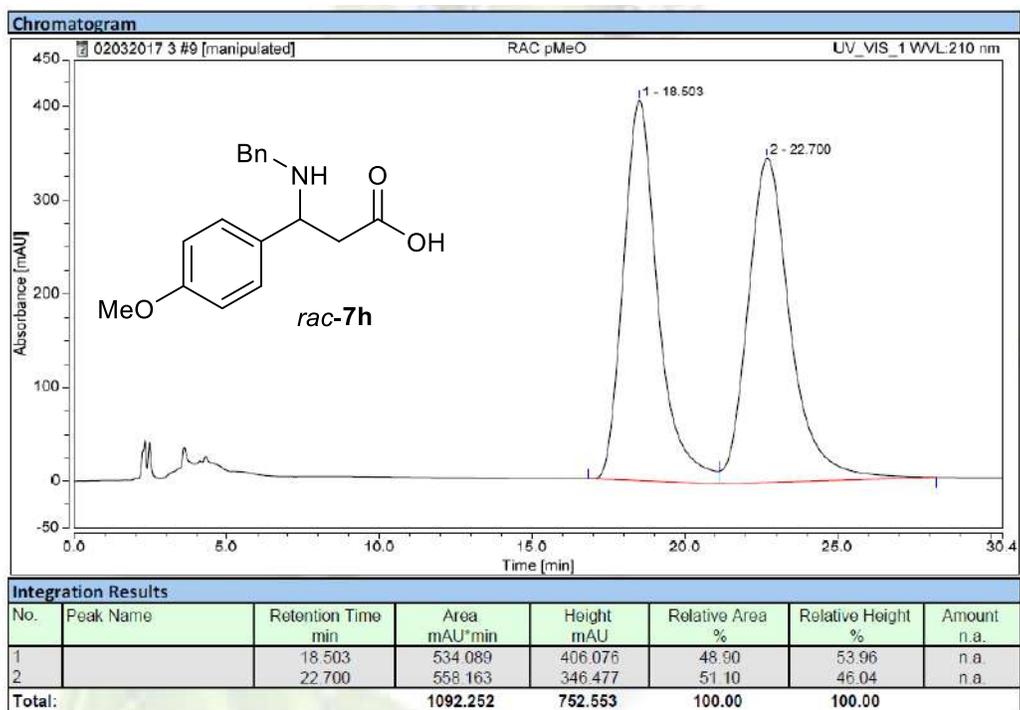


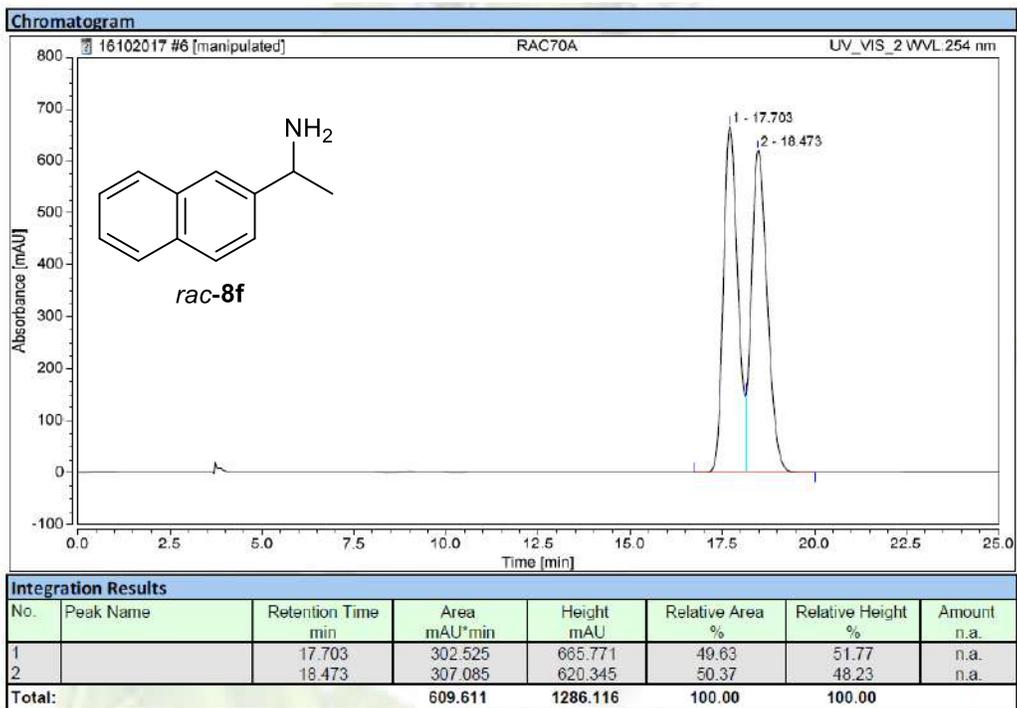
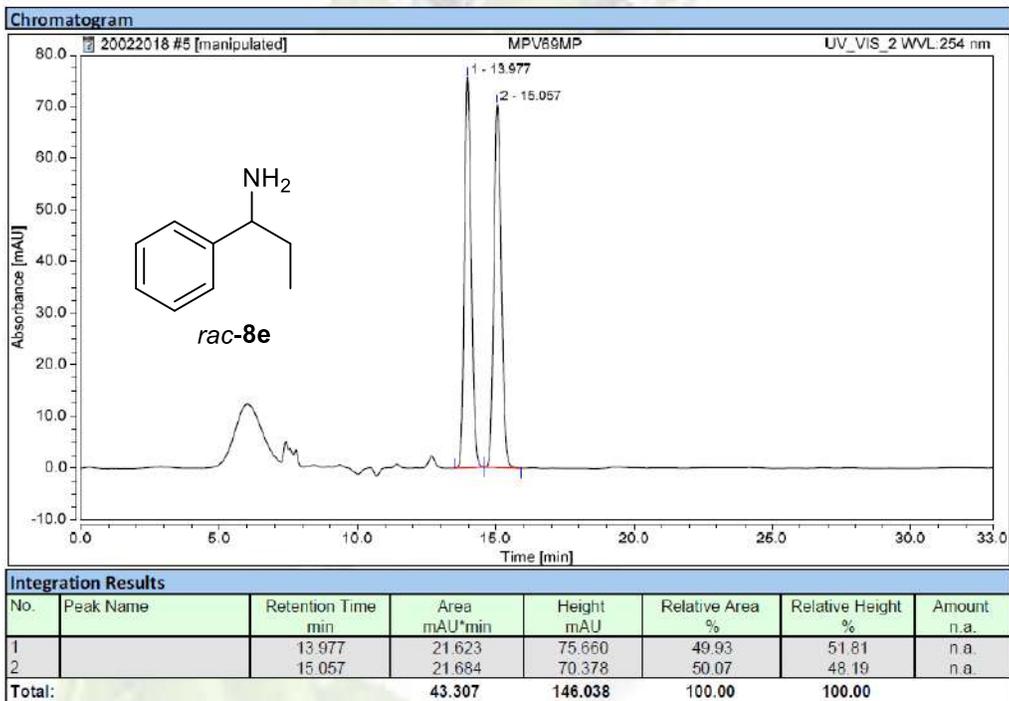


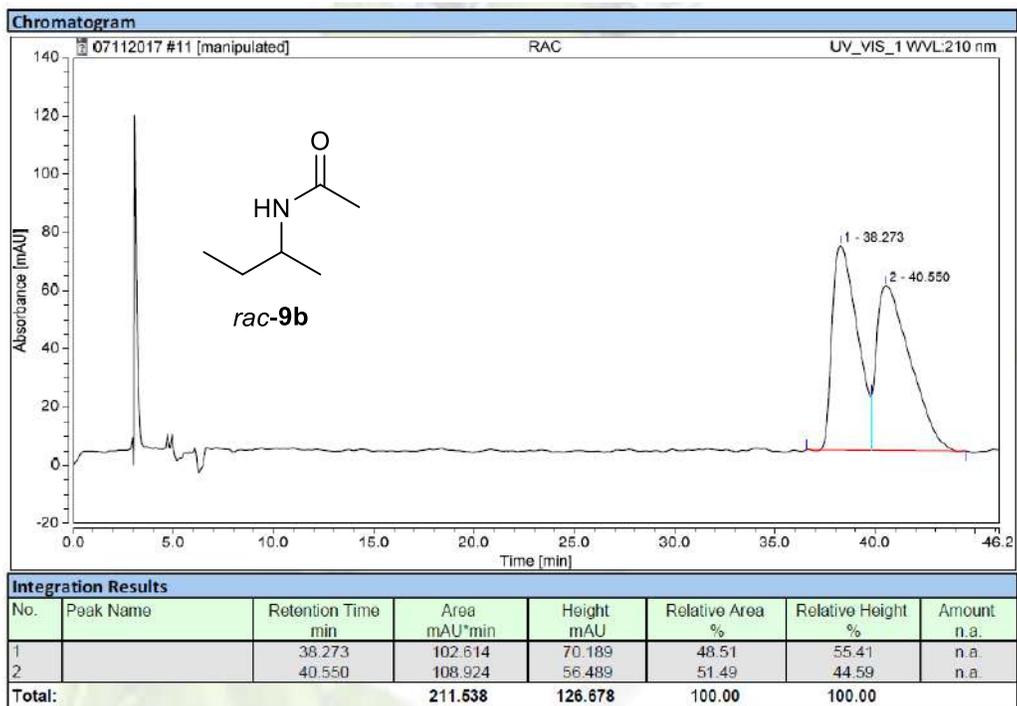
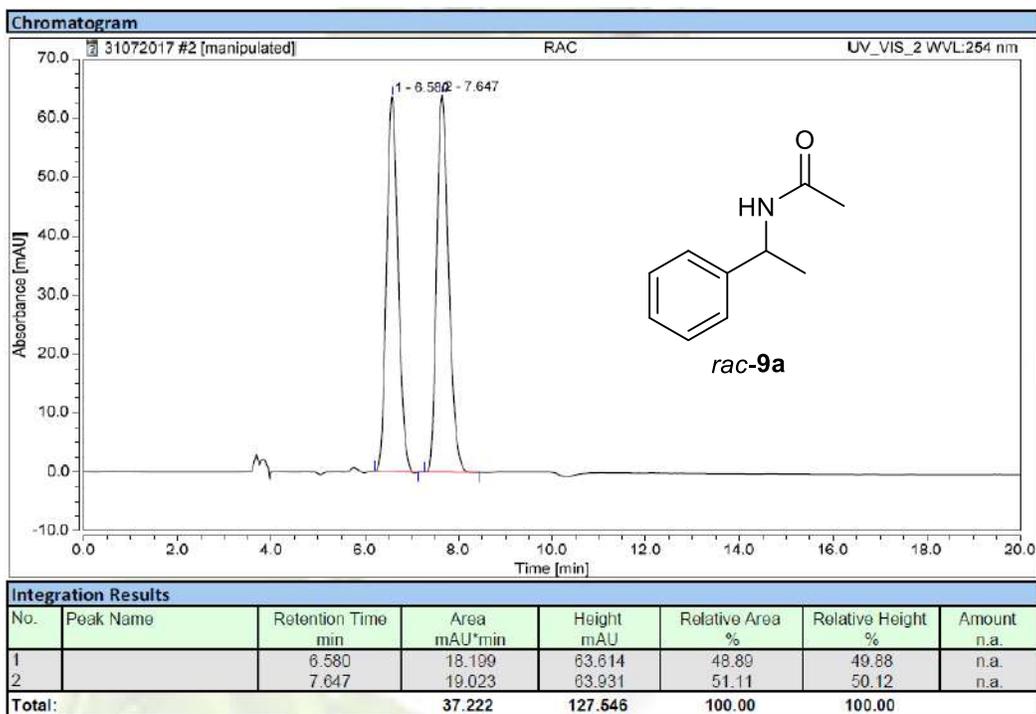


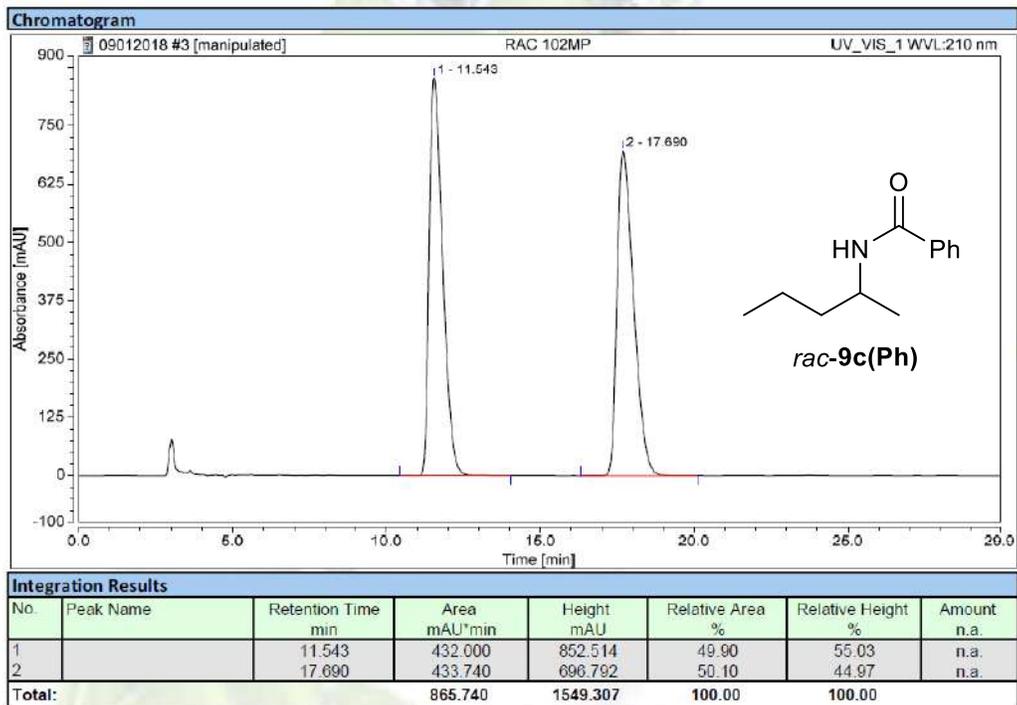
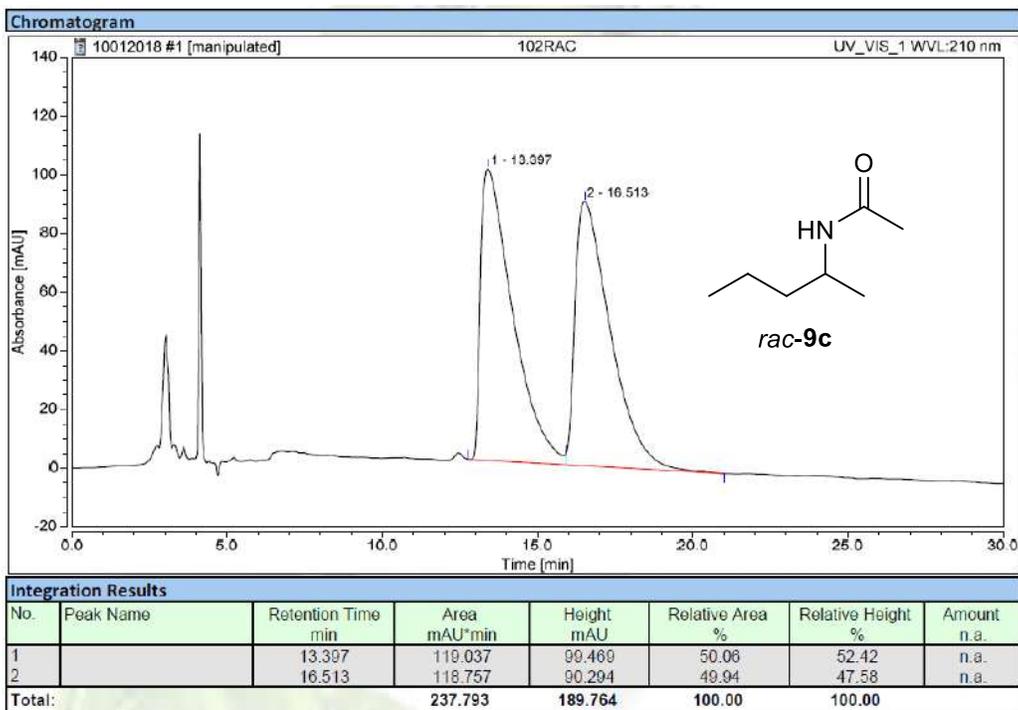


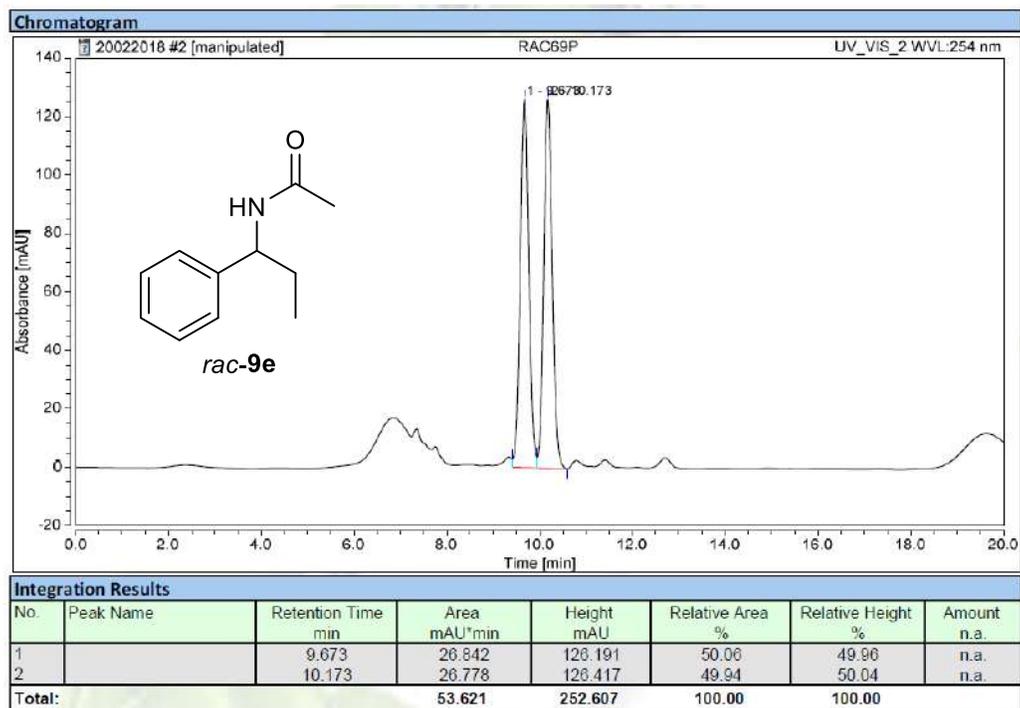
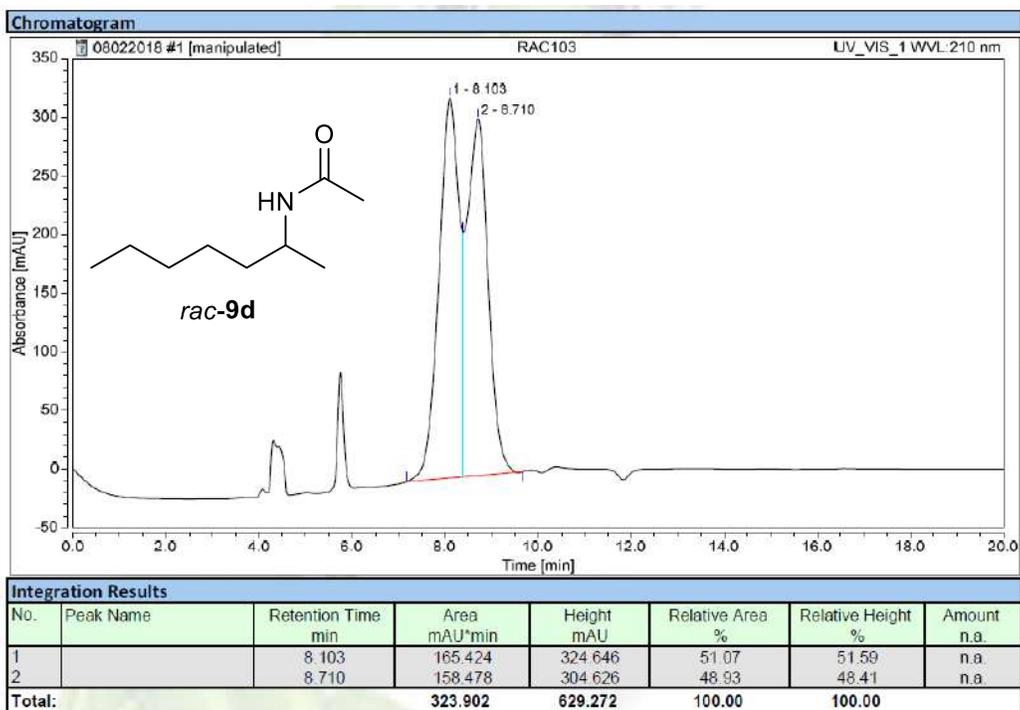


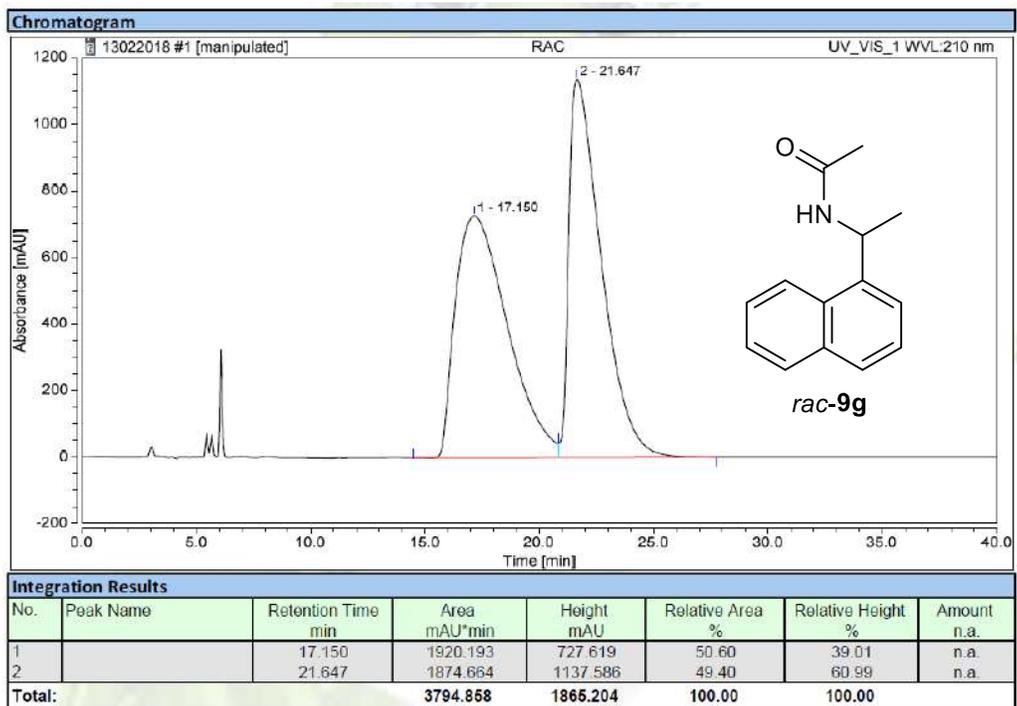
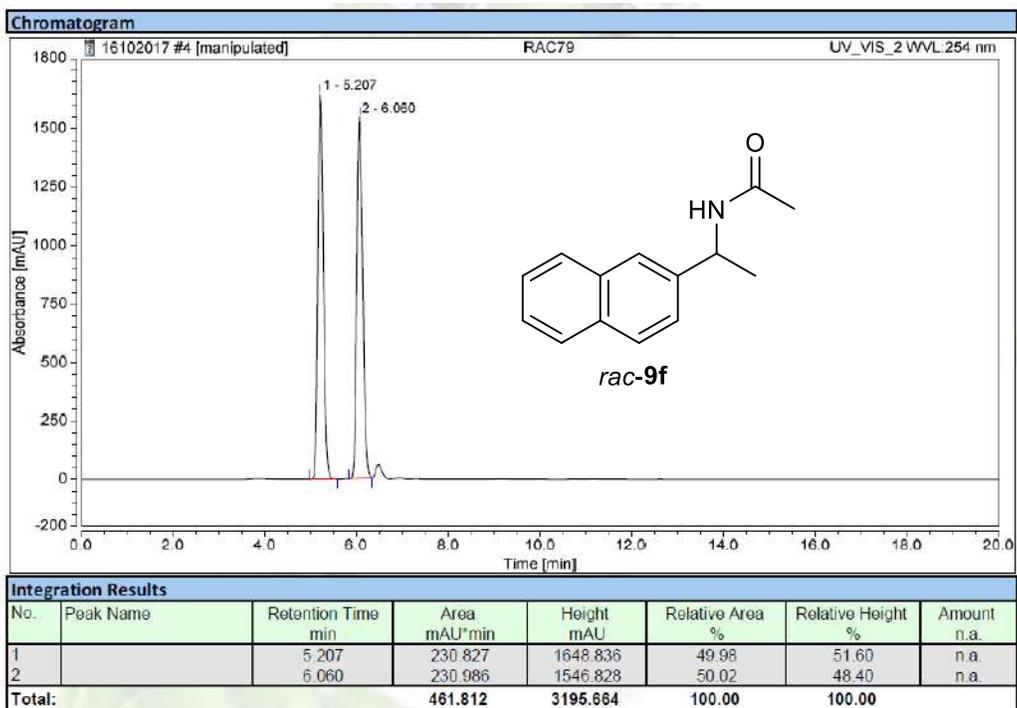


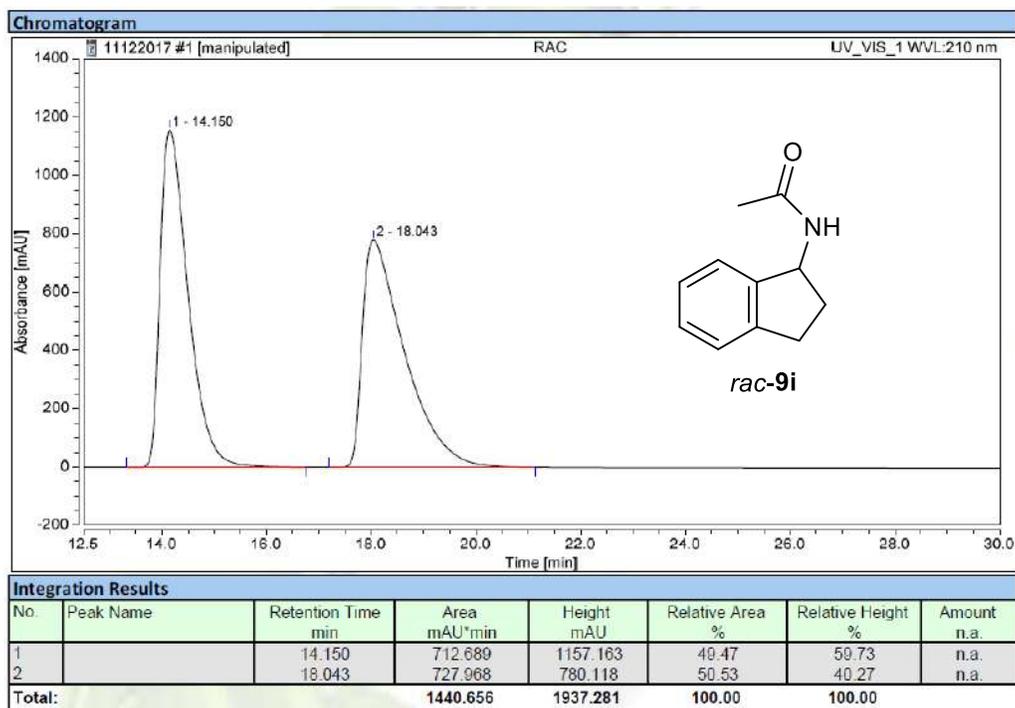
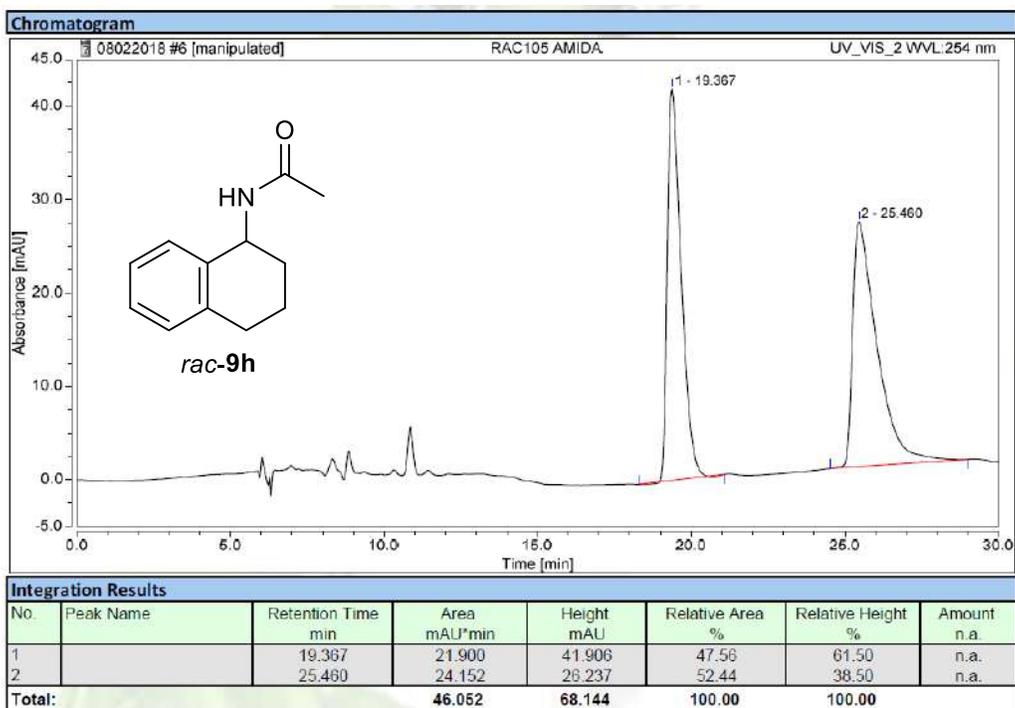


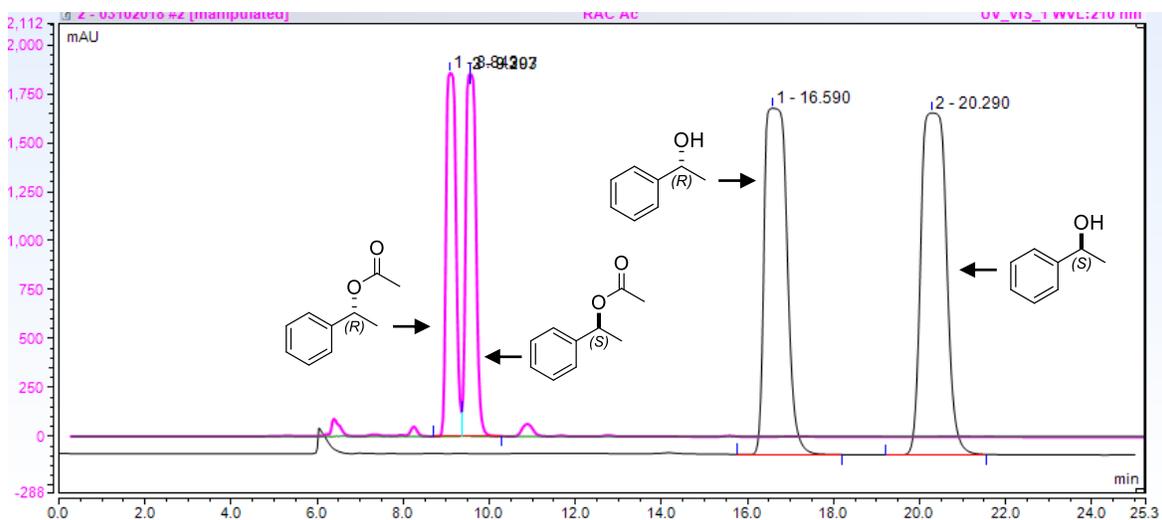
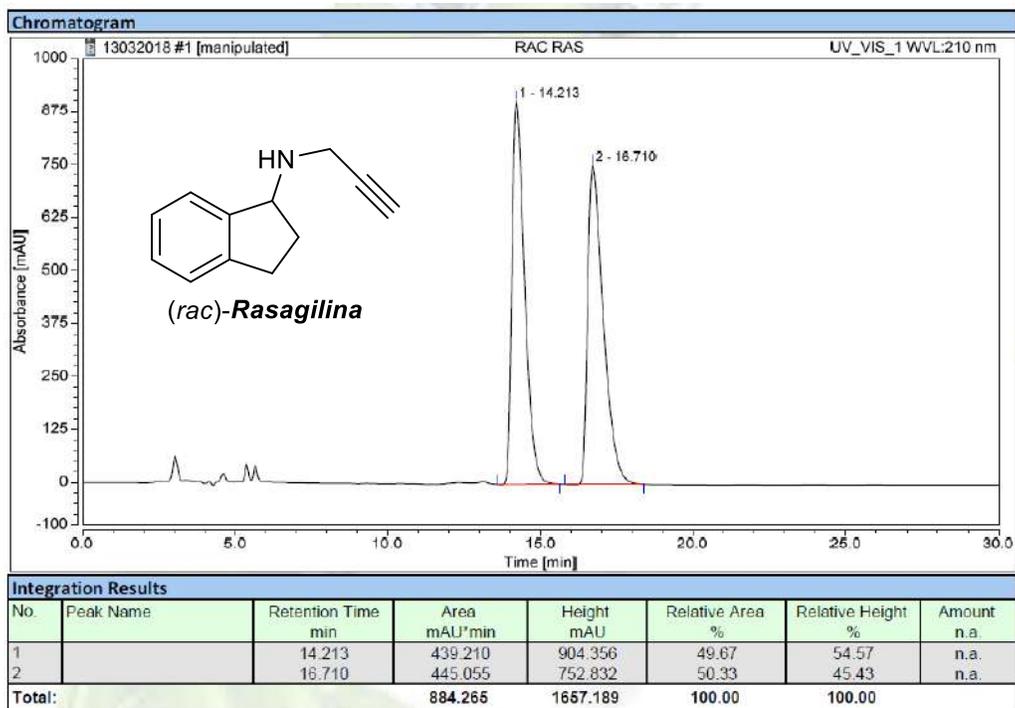


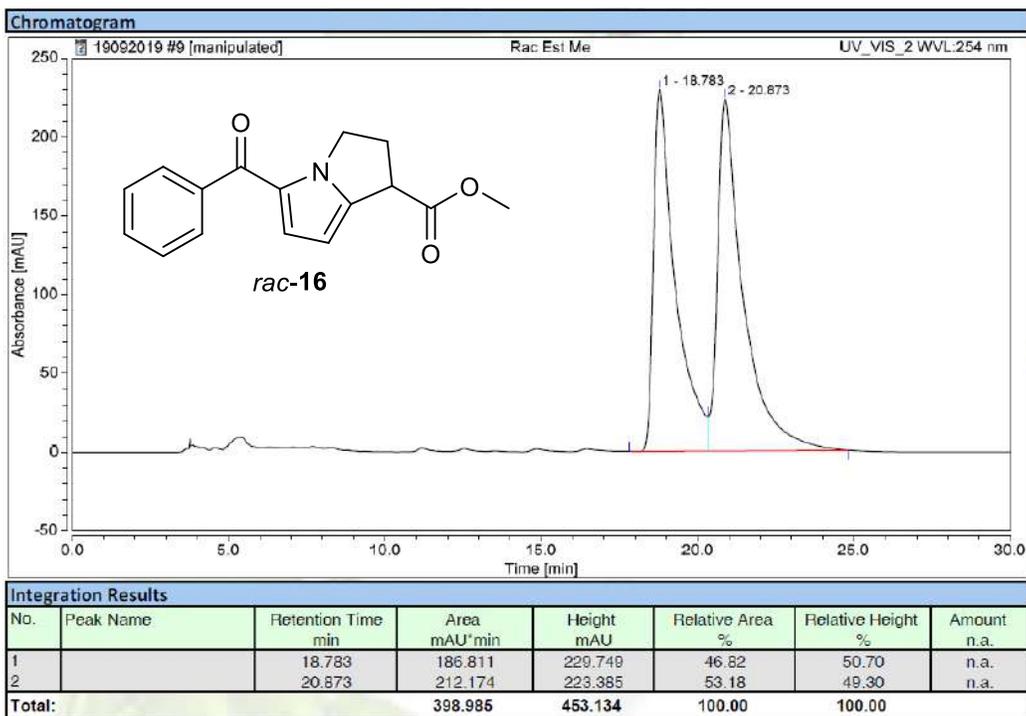
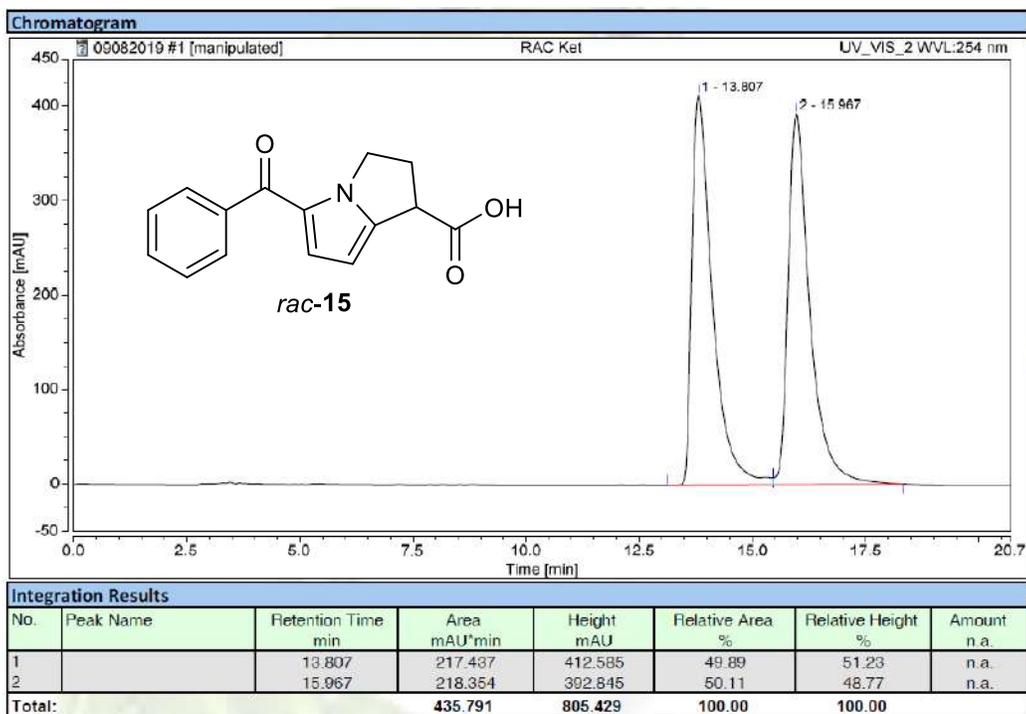


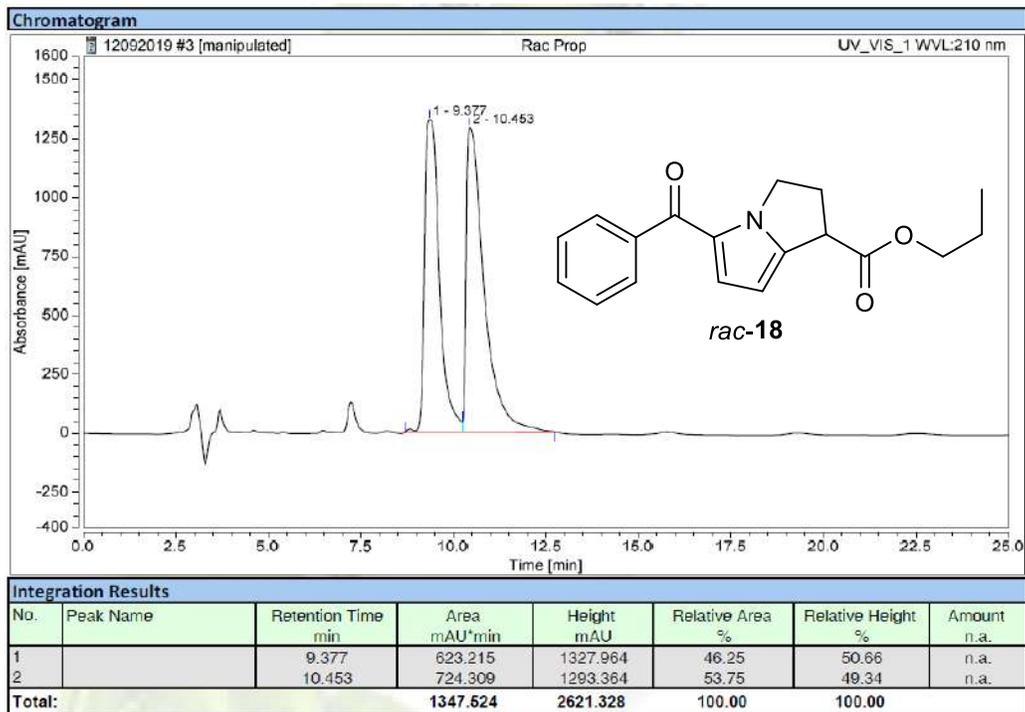
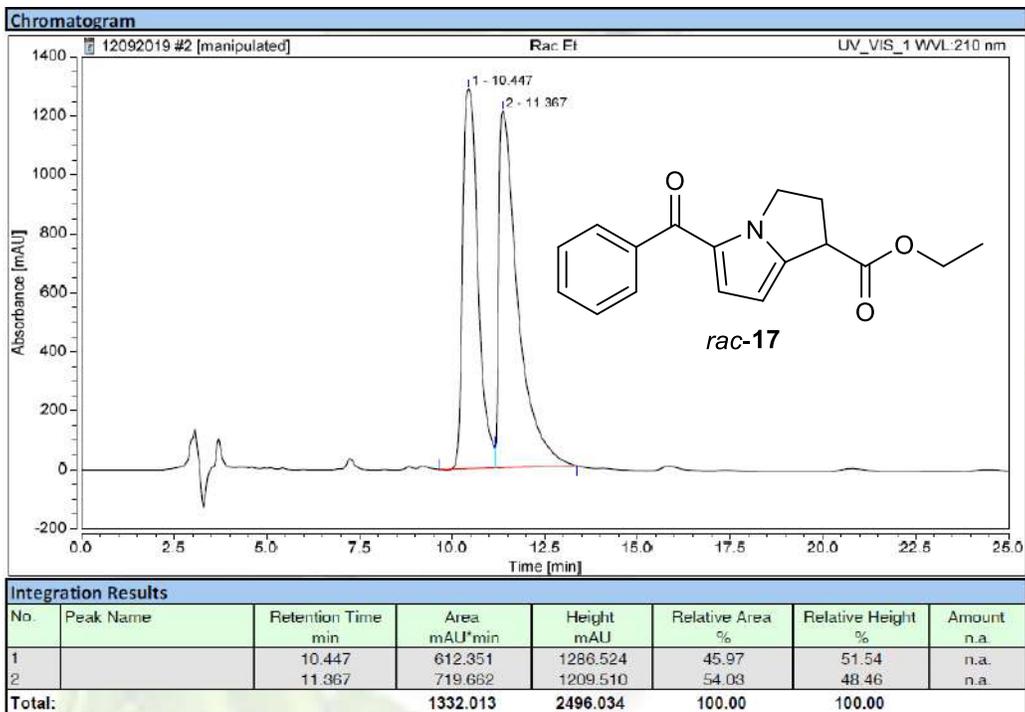


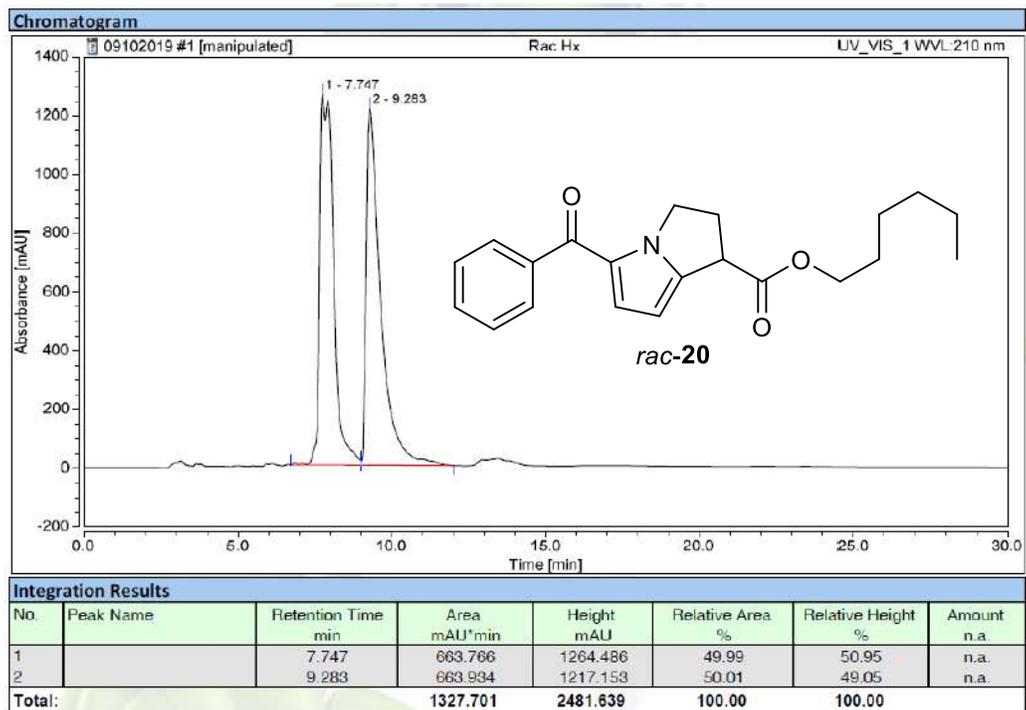
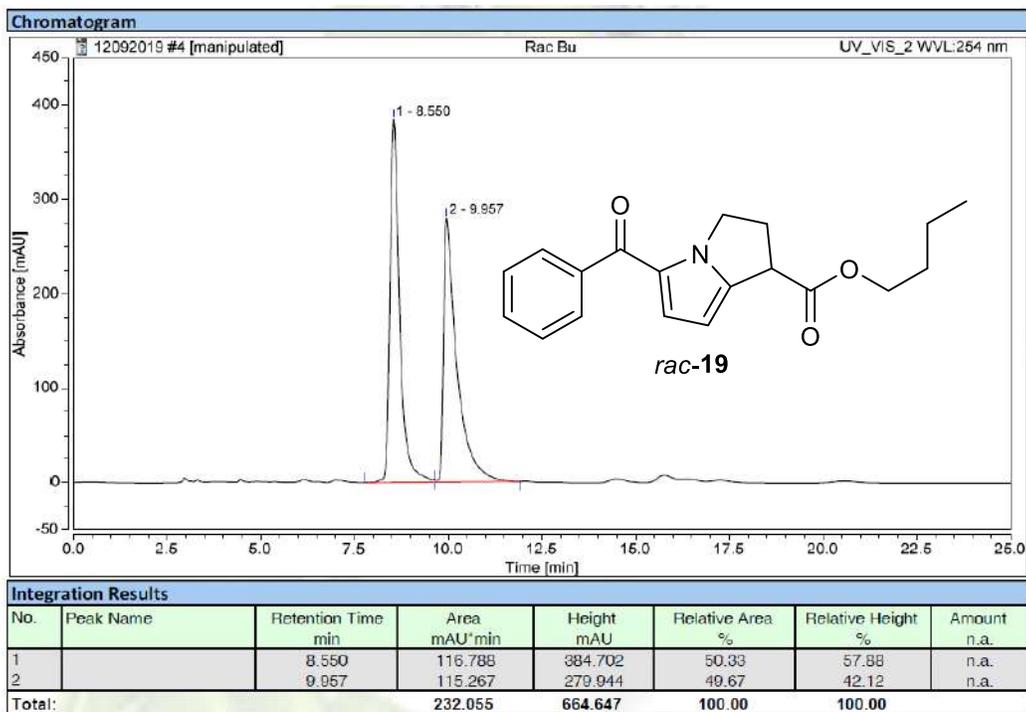






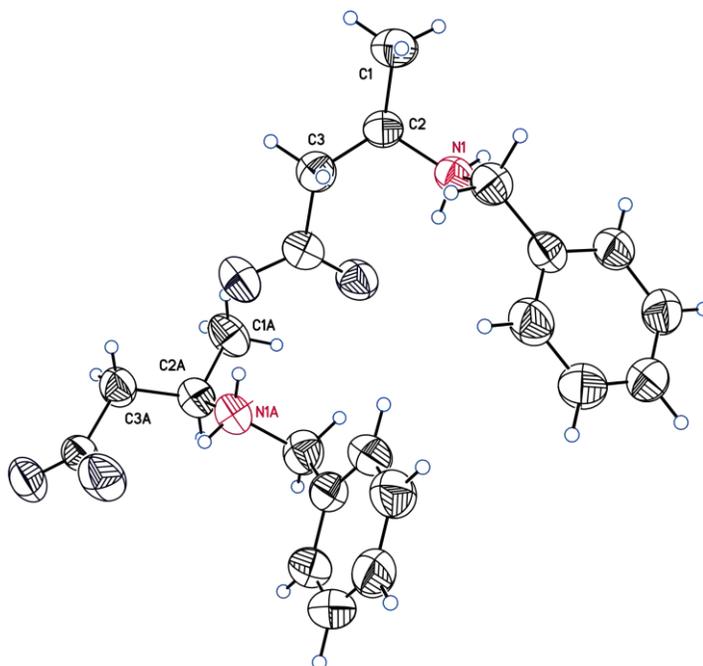






Datos cristalográficos de rayos-X para el compuesto (*R*)-**7a**.

Compuesto	(<i>R</i>)- 7a
Fórmula	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂
Peso molecular	193.24
Tamaño del cristal (mm)	0.65 x 0.32 x 0.52
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P2 ₁
<i>a</i> (Å)	9.7431 (4)
<i>b</i> (Å)	9.8931 (4)
<i>c</i> (Å)	11.3533 (5)
<i>V</i> (Å ³)	1046.50 (8)
<i>Z</i>	4
Densidad calculada (g/cm ³)	1.227
Coefficiente de absorción (mm ⁻¹)	0.68
F(000)	416.0
Longitud de onda (Å)	1.54184
Temperatura (K)	566
Intervalos de θ	4-71°
Flack	0.154 (13)
ρ min	-0.168
ρ max	0.353



Referencias.

- 1.- Kagan, H. B.; Fiaud, J. C. "Kinetic Resolution", en *Topics in Stereochemistry*, Vol. 18, John Wiley & Sons, USA, **1988**.
- 2.- Straathof, A. J. J.; Jongejan, J. A. The enantiomeric ratio: origin, determination and prediction. *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *21*, 559-571.
- 3.- Asao, N.; Uyehara, T.; Yamamoto, Y. Lithium n-benzyltrimethylsilylamide (LSA): a new reagent for conjugate addition – enolate trapping reactions. *Tetrahedron* **1988**, *44*, 4173-4180.
- 4.- Guizzetti, S.; Benaglia, M.; Bonsignore, M.; Raimondi, L. Trichlorosilane-mediated stereoselective synthesis of β -amino esters and their conversion to highly enantiomerically enriched β -lactams. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 739-743.
- 5.- Wang, W.-B.; Roskamp, E. J. Conversion of β -amino esters to β -lactams via tin (II) amides. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9417-9420.
- 6.- Rangel, H.; Morales, M. C.; Galindo, J. M.; Castillo, E.; Zúñiga, A. O.; Juaristi, E.; Escalante, J. Structural features of *N*-benzylated- β -amino acid methyl esters essential for enantiodifferentiation by lipase B from *Candida antarctica* in hydrolytic reactions. *Tetrahedron: Asymmetry* **2015**, *26*, 325-332.
- 7.- Bonsignore, M.; Benaglia, M.; Annunziata, R.; Celentano, G. New, Readily Available Organocatalysts for the Enantioselective Reduction of α -Imino- and β -Imino esters. *Synlett* **2011**, *8*, 1085-1088.
- 8.- Gedey, S.; Liljeblad, A.; Lázár, L.; Fülöp, F.; Kanerva, L. T. Preparation of highly enantiopure β -amino esters by *Candida antarctica* lipase A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 105-110.
- 9.- Bach, K. K.; El-Seedi, H. R.; Jensen, H. M.; Nielsen, H. B.; Thomsen, I.; Torssell, K. B. G. 1,3-Dipolar cycloadditions of ethoxycarbonyl-nitrile benzylamine, EtOOC C N \leftrightarrow N-CH₂C₆H₅, and synthesis of β -amino acids. Synthesis and reactions of ethyl 2-chloro-2-ethoxyacetate and 2-chloro-2-ethoxyacetyl chloride. *Tetrahedron* **1994**, *50*, 7543-7556.
- 10.- Allegretti, M.; Berdini, V.; Cesta, M. C.; Curti, R.; Nicoli, L.; Topai, A. One-pot, new stereoselective synthesis of *endo*-tropanamine. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4257-4259.
- 11.- Dalmolen, J.; Tiemersma-Wegman, T. D.; Nieuwenhuijzen, J. W.; van der Sluis, M.; van Echten, E.; Vries, T. R.; Kaptein, B.; Broxterman, Q. B.; Kellogg, R. M. The Dutch Resolution Variant of the Classical Resolution of Racemates by Formation of Diastereomeric Salts: Family Behavior in Nucleation Inhibition. *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 5619-5624.
- 12.- Li, G.; Antilla, J. C. Highly Enantioselective Hydrogenation of Enamides Catalyzed by Chiral Phosphoric Acids. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1075-1078.
- 13.- Liu, T.-L.; Wang, C.-J.; Zhang, X. Synthesis of Chiral Aliphatic Amines through Asymmetric Hydrogenation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 8416-8419.
- 14.- Alalla, A.; Merabet-Khelassi, M.; Aribi-Zouioueche, L. Green Synthesis of Benzamides in Solvent- and Activation-Free Conditions. *Synth. Commun.* **2014**, *44*, 2364-2376.

-
- 15.- Digwal, C. S.; Yadav, U.; Ramya, P. V. S.; Sana, S.; Swain, B.; Kamal, A. Vanadium-Catalyzed Oxidative C(CO)-C(CO) Bond Cleavage for C-N Bond Formation: One-Pot Domino Transformation of 1,2-Diketones and Amidines into Imides and Amides. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 7332-7345.
- 16.- Xu, F.; Wu, Q.; Chen, X.; Lin, X.; Wu, Q. A Single Lipase-Catalysed One-Pot Protocol Combining Aminolysis Resolution and Aza-Michael Addition: An Easy and Efficient Way to Synthesize β -Amino Acid Esters. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *24*, 5393-5401.
- 17.- Tan, X.; Gao, S.; Zeng, W.; Xin, S.; Yin, Q.; Zhang, X. Asymmetric Synthesis of Chiral Primary Amines by Ruthenium-Catalyzed Direct Reductive Amination of Alkyl Aryl Ketones with Ammonium Salts and Molecular H₂. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 2024-2027.
- 18.- Kim, M.-J.; Kim, W.-H.; Han, K.; Choi, Y. K.; Park, J. Dynamic Kinetic Resolution of Primary Amines with a Recyclable Pd Nanocatalyst for Racemization. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1157-1159.
- 19.- Zhang, Y.; Dong, J.; Liu, L.; Liu, L.; Zhou, Y.; Yin, S.-F. Manganese (III) acetate catalyzed oxidative amination of benzylic C(sp³)-H bonds with nitriles. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 2897-2901.
- 20.- Tak, K. M.; Park, E. J.; Hyun, M. H. Lipase Chromatographic resolution of racemic rasagiline and its analogues on a chiral stationary phase based on (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid. *J. Separ. Sci.* **2013**, *36*, 3682-3687.
- 21.- Yamamoto, H. Y.; Steinberg, M. P.; Nelson, A. I. Kinetic Studies on the Heat Inactivation of Peroxidase in Sweet Corn. *J. Food Sci.* **1962**, *27*, 113-119.
- 22.- Ling, A. C.; Lund, D. B. Determining Kinetic Parameters for Thermal Inactivation of Heat resistant and Heat-labile Isozymes from thermal destruction curves. *J. Food Sci.* **1978**, *43*, 1307-1310.
- 23.- Hernández, J. G.; Frings, M.; Bolm, C. Mechanochemical Enzymatic Kinetic Resolution of Secondary Alcohols under Ball-Milling Conditions. *ChemCatChem* **2016**, *8*, 1769-1772.
- 24.- Doh, H.-J.; Cho, W.-J.; Yong, H.-G.; Kim, J. S.; Lee, C.-H.; Kim, D.-D. Synthesis and evaluation of Ketorolac ester prodrugs for transdermal delivery. *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 1008-1017.