



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 095**

51 Int. Cl.:
C12P 7/02 (2006.01)
C12P 7/04 (2006.01)
C12P 7/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **05002798 .6**
86 Fecha de presentación : **10.02.2005**
87 Número de publicación de la solicitud: **1568780**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **31.08.2005**

54 Título: **Procedimiento para la reducción enantioselectiva de compuestos cetónicos mediante enzimas.**

30 Prioridad: **12.02.2004 DE 10 2004 007 029**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

73 Titular/es: **Wacker Chemie AG.**
Hanns-Seidel-Platz 4
81737 München, DE

72 Inventor/es: **Peschko, Christian y**
Stohrer, Jürgen

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 284 095 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la reducción enantioselectiva de compuestos cetónicos mediante enzimas.

5 El presente invento se refiere a un procedimiento enzimático para la reducción enantioselectiva de compuestos cetónicos orgánicos para dar los correspondientes compuestos hidroxílicos quirales.

10 Ciertos compuestos hidroxílicos ópticamente activos son valiosos eslabones de síntesis para la preparación de importantes compuestos con efecto farmacológico y con otras valiosas propiedades. Estos compuestos, con frecuencia, se pueden preparar sólo con dificultades mediante procedimientos químicos clásicos, y las necesarias purezas ópticas para aplicaciones en el sector farmacéutico o agroquímico se pueden conseguir sólo con dificultades por esta vía. Por lo tanto, para la preparación de compuestos quirales se utilizan en grado creciente procedimientos biotecnológicos, siendo llevada a cabo la reacción estereoselectiva por microorganismos enteros o con enzimas aisladas, purificadas total o parcialmente.

15 Las deshidrogenasas, y en particular las alcohol-deshidrogenasas (ADH), son valiosos catalizadores para la obtención de productos quirales mediante una reducción estereoselectiva de compuestos cetónicos orgánicos para dar los correspondientes alcoholes quirales. Se conocen en lo esencial unas correspondientes enzimas procedentes de levaduras, hígados de caballos o *Thermoanaerobium brockii*. Estas enzimas necesitan como coenzima NADH (nicotinamida-adenina-dinucleótido) o NADPH (nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato). Otras conocidas alcohol-deshidrogenasas son por ejemplo una alcohol-deshidrogenasa específica para (*S*) procedente de *Rhodococcus erythropolis* o una alcohol-deshidrogenasa específica para (*R*) procedente del género *Lactobacillus*. Ambos tipos de enzimas tienen un amplio espectro de sustratos a base de compuestos cetónicos y presentan una alta enantioselectividad. Las alcohol-deshidrogenasas procedentes de *Lactobacillus kefir* (documento de solicitud de patente alemana DE 40 14 573 C1) y de *Lactobacillus brevis* (documento de solicitud de patente alemana DE 196 10 984 A1) son adecuadas en particular para la obtención de (*R*)-alcoholes quirales.

20 A partir del estado de la técnica se conocen procedimientos para la reducción estereoselectiva de compuestos cetónicos orgánicos para dar los correspondientes alcoholes quirales mediante alcohol-deshidrogenasas, en los cuales el compuesto cetónico se pone en contacto con agua, con una enzima, con una coenzima, así como con un agente de reducción, que se necesita para la regeneración del sistema enzimático (p.ej. documento de solicitud de patente internacional WO 9611256).

25 Una desventaja de tales procedimientos catalizados enzimáticamente son los altos costos de las enzimas, que son causados por un alto consumo específico de las enzimas. En el estado de la técnica se trabaja por lo tanto, en la mayor parte de los casos, con muy pequeñas cantidades de enzimas. Los rendimientos de espacio - tiempo, conseguidos mediante este modo de procedimiento, son en general pequeños y, a causa de los altos costos de los procesos, no experimentan ningún grado de conversión rentable ni respectivamente a gran escala técnica.

30 Así, en el documento WO 02/064579 A1 se describe un procedimiento, en el cual para la reducción de alquinonas, catalizada por ADH-LB, se utiliza por ejemplo una cantidad empleada de enzima de 0,5 unidades / ml (U/ml) y por consiguiente se consiguen unos rendimientos de espacio - tiempo de sólo aproximadamente 15 mol/m³d con un consumo de enzimas de aproximadamente 60 kU por mol de producto. Por la denominación de mol/m³d se entiende la cantidad en moles de producto que se ha obtenido en un proceso de preparación, por metro cúbico de volumen de la tanda y por día.

35 Un procedimiento descrito en el documento DE 196 10 984 A1 para la reducción de cetonas con ADH-LB consigue, con una cantidad empleada de enzima de 4,5 U/ml, un rendimiento de espacio - tiempo de 4,75 mol/m³d en el caso de un consumo de enzimas de aproximadamente 950 kU por mol de producto.

40 A causa de la solubilidad, con frecuencia insuficiente, de los sustratos orgánicos en el medio acuoso, se emplean también sistemas de dos fases, los cuales, junto a agua, contienen una fase orgánica adicional. La presencia de una fase orgánica repercute sin embargo en una extensión diversa sobre la actividad enzimática, en el sentido de desestabilizarla (M.V. Filho, T. Stillger, M. Müller, A. Liese, C. Wandrey, Angew. Chem. **2003**, 115, 3101-3104). La presencia de una fase orgánica puede conducir sin embargo también a una actividad enzimática elevada (M.V. Filho, T. Stillger, M. Müller, A. Liese, C. Wandrey, Angew. Chem. **2003**, 115, 3101-3104).

45 Los procedimientos con sistemas de dos fases presentan rendimientos de espacio - tiempo parcialmente mejorados. El consumo de enzimas es sin embargo por regla general asimismo alto. Por lo tanto, los procedimientos de este tipo se pueden emplear asimismo sólo de una manera limitada desde puntos de vista económicos y a gran escala técnica.

50 A partir del documento WO 02/086126 A2 se conoce un procedimiento para la reducción de un β -ceto-éster, catalizada por ADH-LB en un sistema de dos fases, para el que en el caso de unos rendimientos de espacio - tiempo de 200 a 350 mol/m³d se consumen entre 22,5 y 27,4 kU de enzima por cada mol de producto.

65 Por lo tanto, una misión del presente invento es la de poner a disposición un procedimiento para la preparación, catalizada enzimáticamente, de alcoholes quirales, con un alto rendimiento de espacio - tiempo, al mismo tiempo que con un bajo consumo de enzimas.

ES 2 284 095 T3

El problema planteado por esta misión se resuelve en un procedimiento para la reducción, catalizada enzimáticamente, de compuestos cetónicos mediante utilización de un medio de reacción, que contiene una alcohol-deshidrogenasa, agua, una coenzima, un agente de reducción, a partir del que, después de la reducción del compuesto cetónico en una primera etapa, los productos de reacción se extraen con un disolvente orgánico en una segunda etapa. Después de la extracción, la fase orgánica, que contiene los productos de reacción, se separa, y el medio acuoso de reacción se utiliza de nuevo, y se repite el procedimiento.

Es objeto del invento un procedimiento para la preparación de alcoholes secundarios quirales, que contiene las etapas de

a) reducción de un compuesto cetónico en un medio acuoso de reacción, que contiene agua, un agente de reducción, una alcohol-deshidrogenasa (ADH) y una coenzima bajo una presión reducida y mediante eliminación de componentes fácilmente volátiles a partir del sistema de reacción,

b) extracción del alcohol secundario formado mediante una fase adicional, que contiene un disolvente orgánico no miscible con agua, mediante formación de turbulencia y/o mezclamiento a fondo de las fases acuosas y orgánicas,

c) separación de la fase utilizada para la extracción y utilización renovada del medio acuoso de reacción en la etapa a).

El procedimiento conforme al invento se distingue por altos rendimientos de espacio – tiempo, al mismo tiempo que por un bajo consumo de enzimas, con unas purezas enantioméricas de hasta 99,9% referidas a los compuestos hidroxílicos quirales preparados, y unos rendimientos químicos de hasta >99%, referidos a la cantidad empleada del compuesto cetónico. Se evita la constante presencia de una fase de disolvente orgánico, que potencialmente desactiva a las enzimas, tal como se da el caso en los conocidos procedimientos de dos fases. Además, el procedimiento conforme al invento se puede convertir de una manera muy sencilla en cuanto a los aparatos y por consiguiente a una gran escala técnica.

La reducción propiamente dicha según la etapa a) se lleva a cabo en tal caso en un sistema acuoso, sin que esté presente al mismo tiempo, ni/o se añada, una fase adicional, que solamente sirve para la extracción y que contiene un disolvente orgánico no miscible con agua. Por consiguiente, en el procedimiento conforme al invento se prescinde de la adición deliberada de una fase de extracción orgánica, constantemente presente en el sistema.

De igual manera, no se excluye que al comienzo, o en el transcurso de la reducción, se forme una fase adicional separada de la fase acuosa (medio de reacción), la cual resulta eventualmente de una falta de miscibilidad, existente si bien sólo inicialmente, del substrato que se ha de reducir (compuesto cetónico) con el medio acuoso de reacción.

Como eductos (productos de partida) se pueden emplear en general cetonas, preferiblemente las que tienen de 3 a 40 átomos de C.

En una forma preferida de realización del procedimiento conforme al invento, se emplean cetonas proquirales de la Fórmula general (I)



realizándose que

R^1 y R^2 se seleccionan, independientemente uno de otro, entre el conjunto que contiene alquilo C_1-C_{20} , cicloalquilo C_3-C_{20} , arilo C_5-C_{20} , heteroarilo C_1-C_{20} , alqueno C_2-C_{20} , aralquilo C_5-C_{20} , alquilarilo C_5-C_{20} , o R^1 y R^2 en común pueden formar un anillo,

y R^1 y R^2 eventualmente, de manera independiente uno de otro, pueden estar sustituidos con uno o varios radicales Z, realizándose que

Z se selecciona entre el conjunto que contiene fluoro, cloro, bromo, yodo, -CN, -NO₂, -NO, -NR³OR³, -CHO, -SO₃H, -COOH o -R³ y

R³ representa hidrógeno o puede tener los significados de R¹, y

en R¹ y R² uno o varios grupos metileno, eventualmente de manera independiente unos de otros, pueden ser reemplazados por grupos Y iguales o diferentes, realizándose que

Y se selecciona entre el conjunto que contiene -CR³=CR³-, -C≡C-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)OC(O)-, -O-, -O-O-, -CR³=N-, -C(O)-NR³-, -N=N-, -NR³-NR³-, -NR³-O-, -NR³-, -P(O)(OR³)O-, -OP(O)(R³)O-, -P(R³)-, -P(O)(R³)-, -S-, -S-S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)NR³-, -S(O)(OR³)O-, -Si(R³)₂-, -Si(R³)₂O-, -Si(R³)(OR³)-, -OSi(R³)₂O-, -OSi(R³)₂- o -Si(R³)₂OSi(R³)₂-.

ES 2 284 095 T3

Radicales arilo C₅-C₂₀ o heteroarilo C₁-C₂₀ preferidos para R¹ y R² se seleccionan en particular entre el conjunto que contiene fenilo, naftilo, indolilo, benzofuranilo, tiofenilo, pirrolilo, piridinilo, imidazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, furanilo o tiazolilo.

5 Los compuestos de la Fórmula general (I) se pueden emplear por lo general también en forma de sales.

Compuestos especialmente preferidos de la Fórmula general (I) se seleccionan entre la clase de los compuestos β -ceto-ésteres, α -ceto-ésteres, γ -ceto-ésteres, β -dicetonas, γ -dicetonas, δ -dicetonas, β -halógeno-cetonas, α -halógeno-cetonas, $\alpha\alpha$ -dihalógeno-cetonas, α -alcoxi-cetonas, α -aciloxi-cetonas, β -alcoxi-cetonas, α -alquil-cetonas, alquencil-cetonas, α -dicetonas, $\alpha\alpha$ -dialcoxi-cetonas, aril-cetonas y heteroaril-cetonas.

En particular, como compuestos de la Fórmula general (I), se adecuan éster metílico de ácido 3-oxo-butanoico, éster etílico de ácido 3-oxo-butanoico, éster metílico de ácido 4-cloro-3-oxo-butanoico, éster etílico de ácido 4-cloro-3-oxo-butanoico, éster metílico de ácido 3-oxo-pentanoico, éster etílico de ácido 3-oxo-pentanoico, 1-cloro-propan-2-ona, 1,1-dicloro-propan-2-ona, 3-oxo-butan-2-ona, 2,6-dimetil-hexano-3,5-diona, 2,7-dimetil-hexano-3,6-diona, 2,4-hexano-diona, 2,4-pentano-diona, éster terc.-butílico de ácido 3-oxo-butanoico, 2,5-hexano-diona, 4-trimetilsilil-3-butin-2-ona, 4-triisopropilsilil-3-butin-2-ona, 1-cloro-4-trimetilsilil-3-butin-2-ona, 1-cloro-4-triisopropilsilil-3-butin-2-ona o 1-cloro-butin-2-ona, 1-cloro-butan-3-ona, butanona, pentan-2-ona, hexan-2-ona, heptan-2-ona, octan-2-ona, 3-penten-2-ona, 1-acetoxi-propan-2-ona, ciclopent-2-en-1-ona, éster metílico de ácido 3-oxo-tetradecanoico, éster metílico de ácido 3-oxo-dodecanoico, éster etílico de ácido 2-oxo-propiónico, 1,4-dicloro-butanona, acetofenona, 3-metil-butanona, 1-benciloxi-propan-2-ona o 2-metil-ciclopentanona.

Los compuestos de la Fórmula general (I) se emplean en el procedimiento conforme al invento en una proporción de 1% a 50%, referida al volumen total de cada una de las tandas de reacción, preferiblemente de 3% a 25%, en particular de 5% a 15%.

La mezcla de reacción debería tener por lo general un valor del pH de 5 a 10, de manera preferida de 6 a 9.

La fase acuosa (medio de reacción) contiene preferiblemente un tampón, en particular un tampón de fosfato de potasio / hidrógeno-fosfato de potasio, de tris(hidroximetil)aminometano / HCl o de trietanolamina / HCl, con un valor del pH de 5 a 10, preferiblemente con un valor del pH de 6 a 9. La concentración del tampón debería ser de 5 mM a 150 mM.

Adicionalmente, la fase acuosa puede contener también iones de magnesio, por ejemplo en forma de MgCl₂, añadido en una concentración de 0,2 mM a 10 mM, de manera preferida de 0,5 mM a 2 mM, referida a la cantidad empleada de agua. Junto a esto, la fase acuosa puede contener otras sales adicionales, tales como por ejemplo NaCl, así como otros aditivos, tales como por ejemplo dimetil-sulfóxido, glicerol, glicol, etilenglicol, sorbitol, manitol o azúcares.

Como coenzima se pueden emplear por ejemplo NADP, NADPH, NAD, NADH o sus sales. La concentración de la coenzima en la fase acuosa es de manera preferida de 0,01 mM a 0,25 mM, de manera especialmente preferida de 0,02 mM a 0,1 mM.

Como agente de reducción se añade a la fase acuosa en general un alcohol secundario, de manera preferida isopropanol. La cantidad de alcohol, añadida en cada tanda, es de 1% a 60%, referida al volumen total de la tanda, de manera preferida de 1% a 50%, en particular de 1 a 30%, de manera especialmente preferida de 4% a 15%.

Como agente de reducción se pueden añadir también ácido fórmico o las sales del ácido fórmico, en particular formiato de sodio, lo que eventualmente hace necesaria la adición de sustancias adicionales tales como por ejemplo formiato-deshidrogenasa (FDH).

Apropiadas alcohol-deshidrogenasas proceden por ejemplo de levaduras, de hígados de caballos o de *Rhodococcus erythropolis*, necesitando estas enzimas NADH como coenzima, o proceden de *Thermoanaerobium spec.*, *Lactobacillus kefir* o *Lactobacillus brevis*, necesitando estas enzimas NADPH como coenzima.

La alcohol-deshidrogenasa se puede emplear en el procedimiento conforme al invento ya sea totalmente purificada o parcialmente purificada o en células que la contienen. Las células empleadas pueden presentarse en tal caso en estado nativo, permeabilizadas o lisadas.

La actividad volumétrica de la alcohol-deshidrogenasa empleada es de 100 unidades / ml (U/ml) hasta 5.000 U/ml, de manera preferida de aprox. 1.000 U/ml. En la fase acuosa, que se emplea de nuevo después de una extracción de los productos, está a disposición para la reacción en cada caso 1 kg de compuesto de la Fórmula general (I), de manera preferida de 50.000 a 700.000 U de la alcohol-deshidrogenasa (ADH). De manera especialmente preferida, la ADH se emplea en la fase acuosa con más de 15 U/ml.

La temperatura de la mezcla de reacción es de manera preferida de 0°C a 60°C, de manera especialmente preferida de 20°C a 40°C.

ES 2 284 095 T3

En el transcurso de la reacción se puede añadir una cantidad adicional del agente de reducción o del producto de partida, en particular en forma de cetonas de la Fórmula general (I).

La reacción se lleva a cabo bajo una presión reducida.

Dependiendo del tipo y de la cantidad de la alcohol-deshidrogenasa empleada y del compuesto empleado de la Fórmula general (I), el período de tiempo de reacción está entre 30 min y 50 h, de manera preferida entre 1 h y 20 h.

La extracción con la fase de extracción no miscible con agua, que contiene un disolvente orgánico, se puede efectuar en tal caso de un modo discontinuo (por tandas) o de un modo continuo. En las posibles formas de realización para la etapa de extracción, la extracción puede abarcar la extracción total (discontinua) o una parte del medio de reacción, en particular en el caso de la extracción continua.

La fase acuosa (medio de reacción), que contiene el deseado producto de reacción, se extrae con una segunda fase, que contiene un disolvente orgánico no miscible con agua, según un modo conocido por un experto en la especialidad, discontinuamente o de manera preferida continuamente. Para el procedimiento conforme al invento es suficiente también una extracción incompleta de los productos a partir de la mezcla acuosa de reacción.

De acuerdo con el procedimiento conforme al invento, en el caso de una extracción discontinua (por tandas), frente a los procedimientos de 2 fases que son conocidos a partir del estado de la técnica, una fase adicional, no miscible con el medio acuoso de reacción, que se ha obtenido por adición de un disolvente orgánico, está presente tan sólo en una segunda etapa, después de haberse efectuado la reducción, con el fin de realizar la extracción de los deseados productos de reacción.

En el caso de la extracción continua de acuerdo con el procedimiento conforme al invento, el medio acuoso de reacción de uno o varios recipientes de reacción se pone en contacto, en una instalación de extracción conectada, dispuesta por separado, con la fase de extracción orgánica. Preferiblemente, se extrae solamente una parte del medio de reacción. En una forma especialmente preferida de realización, el medio de reacción se pone en contacto, en una parte separada de la instalación, con la fase de extracción en porciones y en una corriente uniforme, y se separa de nuevo (desmezcladura).

En una posible forma de realización de la extracción continua en una corriente uniforme, se utiliza una columna de extracción, en la que la fase acuosa y la fase de extracción se ponen en contacto en contracorriente en una columna vertical, preferiblemente en una columna de vidrio, que contiene platos perforados, los cuales conducen al arremolinamiento y/o al mezclamiento a fondo de las fases.

La extracción continua ha de preferirse en particular en el caso de que el procedimiento conforme al invento tenga que realizarse de un modo continuo durante un prolongado período de tiempo.

En una forma de realización especialmente preferida, en varios recipientes de reacción se lleva a cabo paralelamente la reducción en la fase acuosa de acuerdo con la etapa a) y a continuación, a partir de uno o varios de los recipientes, el medio acuoso de reacción se saca total o parcialmente y se extrae por separado del modo que arriba se ha descrito. La fase acuosa extraída a continuación se puede hacer reaccionar ulteriormente de modo inmediato, mientras que las porciones todavía no extraídas se aportan de una manera continua a la extracción y a continuación a otro recipiente distinto. De esta manera se pueden realizar varias tandas de reacción de modo desfasado en el tiempo y paralelamente en varios recipientes de reacción. De esta manera se evitan también al mismo tiempo tiempos de permanencia sin usar del medio acuoso de reacción, que contiene enzimas. Como consecuencia, solamente aquella parte del medio acuoso de reacción que atraviesa precisamente en ese momento la etapa b) (extracción), no es productiva transitoriamente.

De manera preferida, en el caso de la extracción, independientemente de que ésta se realice de una manera discontinua o continua, se pretende un tiempo de contacto lo más corto que sea posible entre una fase acuosa (medio de reacción) y una fase orgánica de extracción. Son especialmente preferidos unos tiempos de contacto entre 1 min y 60 min, en particular de 1 min a 10 min.

Como disolventes orgánicos son apropiados todos los disolventes no miscibles con agua, que pueden aislar el alcohol secundario formado a partir de la fase acuosa.

Se utilizan preferentemente disolventes orgánicos, seleccionados entre el conjunto de los ésteres y/o éteres y/o alcanos.

Se prefieren especialmente acetato de etilo, acetato de metilo, acetato de propilo, acetato de isopropilo, acetato de butilo, acetato de terc.-butilo, dietil-éter, diisopropil-éter, dibutil-éter, terc.-butil-metil-éter (MTBE), n-pentano, n-hexano y n-heptano, o sus mezclas.

De manera muy especialmente preferida, se utiliza el MTBE.

ES 2 284 095 T3

Después de la separación de la fase orgánica de extracción, ésta es tratada preferiblemente por destilación, consiguiéndose un enriquecimiento del producto de la reacción, y produciéndose la separación desde parcial hasta total de productos secundarios desde el disolvente de extracción, y éste se puede emplear de nuevo para la extracción.

5 El disolvente orgánico, tratado por destilación, se puede utilizar para el empleo repetido o respectivamente continuo en la extracción.

10 La fase acuosa, que queda después de la extracción, es mezclada, en el procedimiento conforme al invento de nuevo, con el producto de partida de la Fórmula general (I) (compuesto cetónico) y con un agente de reducción, y es incubada. En tal caso, antes de la incubación, se pueden añadir en caso necesario adicionalmente una enzima y una coenzima.

15 La reducción se lleva a cabo a presión reducida, en general a una presión de 1 mbar a < 1 bar, de manera preferida de 1 mbar a 100 mbar, de manera especialmente preferida de 30 mbar a 70 mbar, y los componentes, que en tal caso son fácilmente volátiles, se eliminan de una manera continua desde el sistema de reacción.

20 En particular, este modo de proceder es apropiado en el caso del empleo de isopropanol como agente de reducción y de la eliminación continua de los componentes fácilmente volátiles, que comprenden acetona, desde la mezcla de reacción.

De esta manera, se consigue sorprendentemente un rendimiento especialmente bueno de extracción y una posibilidad de utilización renovada de la fase de extracción.

25 Mediante purificación de la solución orgánica de reacción, que contiene el producto bruto, por ejemplo mediante una destilación fina, se obtiene el producto final deseado.

Los productos así obtenidos se distinguen típicamente por unos rendimientos > 95% y unos excesos enantioméricos (ee) > 99%.

30 El procedimiento conforme al invento hace posible el empleo renovado de un medio acuoso de reacción, que contiene enzimas, para la conversión de cetonas en alcoholes quirales. Los altos rendimientos de espacio - tiempo que se establecen y el consumo de enzimas por mol de producto, que es pequeño mediante el empleo repetido de la solución de enzimas, hacen posible la conversión barata de cetonas en alcoholes quirales mediante utilización de enzimas.

35 Además, el empleo renovado permite prescindir de una costosa extracción total del producto y en vez de ésta llevar a cabo una extracción sólo parcial, que es menos costosa. Además, de esta manera se puede disminuir drásticamente la fase acuosa que se ha de evacuar como residuo.

40 En la forma de realización especialmente preferida se garantiza además una extracción especialmente eficiente de los productos, con un pequeño consumo de disolvente de extracción.

45 Los procedimientos conocidos a partir del estado de la técnica - independientemente de que se trate de procesos de una sola fase o de dos fases - para la preparación, catalizada enzimáticamente, de alcoholes quirales partiendo de cetonas proquirales, no dan a un experto en la especialidad ningún indicio de que la separación durante el proceso entre la reducción y la extracción, combinada con una devolución de la fase acuosa, conduzca a ventajas significativas del tipo expuesto.

El invento es explicado mediante los siguientes Ejemplos:

50 Ejemplo 1a

Utilización del éster etílico de ácido acetoacético en una fase acuosa

55 *Realización*

60 400 ml de una solución de agua, un tampón de fosfato (50 mM), isopropanol (1,0 M), 25 U/ml de ADH-LB (extracto bruto), la sal de disodio de NADP (0,0415 mM) y el éster etílico de ácido acetoacético (0,5 M) de pH 6,5, se cargaron en un matraz de fondo redondo con una capacidad de 500 ml, provisto de un agitador magnético y de un refrigerante de reflujo, y se agitaron enérgicamente a 30°C. Después de 19 horas, la solución se extrajo 4 veces cada vez con 400 ml de metil-terc.-butil-éter (MTBE), y el producto se aisló mediante concentración por evaporación de las fases orgánicas. Mediante una espectroscopia de GC (cromatografía de gases) y de RMN (resonancia magnética nuclear) se determinó el rendimiento del (*R*)-éster etílico de ácido 3-hidroxi-butanoico en el pesaje final.

65

ES 2 284 095 T3

Resultado

- Rendimiento de producto: 190 mmol (95%)
- Rendimiento de espacio - tiempo: 25 mol/m³h

5

Ejemplo 1b

Empleo renovado de la fase acuosa extraída

10

Realización

15 La fase acuosa del Ejemplo 1a, que quedaba después de una extracción con MTBE, se mezcló con isopropanol (400 mmol) y con éster etílico de ácido acetoacético (200 mmol), y después de haber ajustado a un pH de 6,5 se cargó en un matraz de fondo redondo con una capacidad de 500 ml, provisto de un agitador magnético y de un refrigerante de reflujo, y se agitó enérgicamente a 30°C.

20 Después de 19 horas, la solución se extrajo 4 veces cada vez con 400 ml de MTBE, y el producto se aisló mediante concentración por evaporación de las fases orgánicas. Mediante una espectroscopia de GC y de RMN se determinó el rendimiento del (*R*)-éster etílico de ácido 3-hidroxi-butanoico en el pesaje final.

Resultado

- Rendimiento de producto: 190 mmol (95%)
- Rendimiento de espacio - tiempo: 25 mol/m³h

25

Ejemplo comparativo 2a

Reacción del éster etílico de ácido acetoacético en la mezcla de dos fases

30

Realización

35 200 ml de una solución de agua, un tampón de fosfato (50 mM), isopropanol (1,0 M), 25 U/ml de ADH-LB (extracto bruto), la sal de disodio de NADP (0,0415 mM) y el éster etílico de ácido acetoacético (0,5 M) de pH 6,5, se mezclaron con 200 ml de MTBE y se cargaron en un matraz de fondo redondo con una capacidad de 500 ml, provisto de un agitador magnético y de un refrigerante de reflujo, y se agitaron enérgicamente a 30°C.

40 Después de 19 horas, la fase orgánica se separó, la solución acuosa se extrajo 3 veces cada vez con 200 ml de MTBE y el producto se aisló mediante concentración por evaporación de las fases orgánicas. Mediante una espectroscopia de GC y de RMN se determinó el rendimiento del (*R*)-éster etílico de ácido 3-hidroxi-butanoico en el pesaje final.

Resultado

- Rendimiento de producto: 83 mmol (83%)
- Rendimiento de espacio - tiempo: 10,9 mol/m³h

45

Ejemplo comparativo 2b

Empleo renovado de la fase acuosa extraída

50

Realización

55 La fase acuosa del Ejemplo 2a, que quedaba después de una extracción con MTBE, se mezcló con isopropanol (200 mmol) y con el éster etílico de ácido acetoacético (100 mmol), y después de haber ajustado a un pH de 6,5, se mezcló con 200 ml de MTBE y se cargó en un matraz de fondo redondo con una capacidad de 500 ml, provisto de un agitador magnético y de un refrigerante de reflujo, y se agitó enérgicamente a 30°C.

60 Después de 19 horas, la fase orgánica se separó, la solución acuosa se extrajo 3 veces cada vez con 200 ml de MTBE y el producto se aisló mediante concentración por evaporación de la fase orgánica. Mediante una espectroscopia de GC y de RMN se determinó el rendimiento del (*R*)-éster etílico de ácido 3-hidroxi-butanoico en el pesaje final.

Resultado

- Rendimiento de producto: 85 mmol (85%)
- Rendimiento de espacio - tiempo: 11,2 mmol/m³h

65

ES 2 284 095 T3

TABLA 1

	Ejemplo 1a de 1 fase / primer empleo	Ejemplo 1b de 1 fase / empleo renovado	Ejemplo comparativo 2a de 2 fases / primer empleo	Ejemplo comparativo 2b de 2 fases / empleo renovado
Rendimiento	95 %	95 %	83 %	85 %
Rendimiento de espacio - tiempo	25 mol/m ³ h	25 mol/m ³ h	10,9 mol/m ³ h	11,2 mol/m ³ h

El sistema de una sola fase muestra, tanto en el caso del primer empleo como también en el caso del empleo renovado de la fase acuosa extraída, una mejor conversión del sustrato y un rendimiento de espacio - tiempo manifiestamente más alto que el sistema de dos fases, obtenido por adición de MTBE.

Ejemplo 3

Preparación, catalizada enzimáticamente, del (R)-éster etílico de ácido 3-hidroxi-butanoico a la escala de 100 l, mediante empleo renovado de la fase acuosa que contiene enzimas

Para la síntesis, catalizada enzimáticamente, del (R)-éster etílico de ácido 3-hidroxi-butanoico se empleó una alcohol-deshidrogenasa recombinante procedente de *Lactobacillus brevis* (= ADH-LB) como extracto bruto con una actividad volumétrica media de 1,08 kU/ml, y como coenzima se empleó la sal de disodio de β -NADP (con una pureza química de 97%).

3A. Primer empleo

TABLA 2

Sustancia	Cantidad o volumen
Agua	84 l
NaCl	0,84 kg
KOH*	aprox. 0,39 kg
Acido fosfórico (al 85 %)	0,29 l
MgCl ₂ x 6H ₂ O	17,1 g
Isopropanol	7,65 l
Acetoacetato de etilo	6,51 kg
Sal de disodio de NADP	3,27 g
ADH-LB (1,08 kU/ml)	2,3 l

* Para el ajuste de un pH de 6,5, por lo tanto no es ningún dato cuantitativo exacto.

El volumen total de la mezcla acuosa fue de aprox. 100 l.

ES 2 284 095 T3

En un recipiente esmaltado con dispositivo de agitación, el valor del pH de la solución de cloruro de magnesio, cloruro de sodio, ácido fosfórico y agua se ajustó al valor de 6,5 mediante adición de KOH y a continuación se añadieron la sal de NADP y el extracto enzimático bruto. Después de haber calentado la mezcla a 30°C, se añadieron el acetoacetato de etilo y el isopropanol.

5

La mezcla se agitó durante aprox. 17 h hasta que el grado de conversión, según un análisis por GC o respectivamente RMN, era > 97%, siendo mantenida la temperatura de la mezcla entre 20 y 30°C, y siendo controlado constantemente el valor del pH.

10

La fase acuosa se extrajo continuamente en contracorriente con 400 l de terc.-butil-metil-éter (MTBE) (caudal de la fase de extracción (fase orgánica) / caudal del medio de reacción (fase acuosa) aprox. 4/1) y la fase acuosa extraída se devolvió al recipiente de reacción para su empleo renovado. La fase orgánica fue en tal caso redistilada de un modo continuo, de manera tal que el (*R*)-éster etílico de ácido 3-hidroxi-butanoico aislado permaneció totalmente en el colector de la parte inferior de la columna de destilación.

15

La separación de fases al realizar la extracción se efectuó instantánea y totalmente.

3B. Primer empleo renovado de la fase acuosa

20

La solución acuosa extraída se mezcló con 7,65 l de isopropanol y 6,51 kg de acetato de etilo. La mezcla se aumentó de concentración con un extracto bruto de ADH-LB. En este Ejemplo se aumentó de concentración generalmente con un 10% de la cantidad inicial, es decir en cada caso con aprox. 25 kU de ADH-LB. Asimismo, para el empleo renovado en este Ejemplo, se empleó generalmente cada vez un 10% de la cantidad inicial, es decir 0,327 g de la sal de disodio de NADP. El pH se ajustó, en caso necesario por adición de KOH, al valor de 6,5.

25

La realización de la reacción se efectuó de una manera análoga a la del Ejemplo 3A.

La solución acuosa se extrajo de una manera análoga a la del Ejemplo 3A con MTBE redistilado procedente del Ejemplo 3A.

30

3C. Segundo empleo renovado de la fase acuosa

La solución acuosa extraída procedente del Ejemplo 3B se aumentó de concentración de una manera análoga a la del Ejemplo 3B y se hizo reaccionar de una manera análoga a la del Ejemplo 3A.

35

Puesto que la velocidad de separación entre fases, según la experiencia, disminuye después de un empleo renovado del MTBE redistilado, esta fase de extracción, después de un tratamiento por destilación y de una separación del producto, fue desechada y reemplazada por 400 l de MTBE de nueva aportación.

40

3D. Empleos renovados tercero a quinto de la fase acuosa

La realización de las reacciones se efectuó de una manera análoga a la de los Ejemplos 3B y 3C.

La realización de las extracciones se efectuó de una manera análoga a la de los Ejemplos 3A hasta 3C.

45

Al disminuir la velocidad de separación entre fases, la fase de extracción orgánica redistilada fue reemplazada, en cada caso de una manera análoga, por MTBE de nueva aportación.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

TABLA 3

Resumen de los resultados de los Ejemplos 3A hasta 3D

Ejemplo 3	Tiempo (h)	Conversión (%)	ee
Primer empleo (3A)	17	99	>99 %
1° Empleo renovado (3B)	17	98	>99 %
2° Empleo renovado (3C)	16	97	>99 %
3° Empleo renovado (3D/1)	17	98	>99 %
4° Empleo renovado (3D/2)	17	98	>99 %
5° Empleo renovado (3D/3)	17	98	>99 %

3E. Destilación del producto bruto

Después de una separación total del MTBE y de una más amplia eliminación del isopropanol, se pudieron obtener mediante destilación fraccionada 38 kg (96%) del (*R*)- éster etílico de ácido 3-hidroxi-butanoico con una pureza química de >99% y una pureza óptica de >99% ee.

TABLA 4

Ejemplo 3		
Cantidad empleada de sustrato:		39,06 kg (300 mol)
Rendimiento:	96 %	38,02 kg (288 mol)
Rendimiento de espacio - tiempo:	28,5 mol/m ³ h	684 mol/m ³ d
Consumo de enzima:	1,25 MU	4,3 kU/mol de producto
Consumo de coenzima:	6,23 mmol	17 mg/mol de producto

ES 2 284 095 T3

Ejemplo 4

(Procedimiento conforme al invento)

- 5 *Preparación, catalizada enzimáticamente, del (R)-éster etílico de ácido 3-hidroxi-butanoico mediante empleo renovado de la fase acuosa que contiene enzimas a presión reducida*

4A. Primer empleo

- 10 Se emplearon los mismos reactivos en igual cantidad o respectivamente volumen que en el Ejemplo 3A (véase la Tabla 2).

La mezcla de reacción se preparó de una manera análoga a la del Ejemplo 3A.

- 15 Después de haber cerrado el recipiente de reacción, se ajustó en el espacio interior, por bombeo sobre la mezcla de reacción, una presión de aprox. 60 mbar. La mezcla se agitó durante aprox. 17 h hasta que el grado de conversión, según el análisis por GC o respectivamente RMN fuese >97%, siendo mantenida la temperatura de la mezcla entre 20 y 30°C y siendo controlado constantemente el valor del pH.

- 20 La solución acuosa se extrajo continuamente con 400 l de terc.-butil-metil-éter (MTBE) en contracorriente (caudal de la fase de extracción (fase orgánica) / caudal del medio de reacción (fase acuosa) aprox. 4 / 1).

- 25 La fase orgánica fue redestilada continuamente en tal caso de manera tal que el (R)-éster etílico de ácido 3-hidroxi-butanoico aislado quedó totalmente en el colector de la parte inferior de la columna de destilación. La fase acuosa extraída se devolvió para su empleo renovado en el recipiente de reacción. La separación de fases durante la extracción se efectuaba de una manera instantánea y total.

4B. Empleo renovado de la fase acuosa

- 30 La solución acuosa extraída se mezcló con 7,65 l de isopropanol y 6,51 kg de acetato de etilo. La mezcla se aumentó de concentración con el extracto bruto de ADH-LB. En este Ejemplo se aumentó de concentración generalmente con un 10% de la cantidad inicial, es decir en cada caso con aprox. 25 kU de ADH-LB. Asimismo, para el empleo renovado en este Ejemplo se añadió generalmente cada vez un 10% de la cantidad inicial, es decir 0,327 g de sal de disodio de NADP. El pH se ajustó, en caso necesario por adición de KOH, al valor de 6,5.

- 35 La realización de la reacción se efectuó de una manera análoga a la del Ejemplo 4A. El tratamiento se efectuó de una manera análoga a la del Ejemplo 4A.

El empleo renovado de la fase acuosa se realizó de una manera análoga en total 5 veces (Ejemplo 4B/a - 4B/e).

- 40 En el caso de la realización del procedimiento conforme al invento bajo una presión reducida, el contenido en acetona del MTBE se mantiene por debajo del límite crítico, y la separación de fases al realizar las extracciones se efectuaba en cada caso de una manera instantánea y total. La fase de extracción se puede utilizar renovadamente de esta manera con cualquier frecuencia.

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

TABLA 5

Resumen de los resultados de los Ejemplos 4A y 4B/a hasta 4B/e

Ejemplo 4	Tiempo (h)	Conversión (%)	ee
Primer empleo (4A)	17	99	>99 %
1° Empleo renovado (4b/a)	17	98	>99 %
2° Empleo renovado (4B/b)	16	97	>99 %
3° Empleo renovado (4B/c)	17	98	>99 %
4° Empleo renovado (4B/d)	17	98	>99 %
5° Empleo renovado (4B/e)	17	99	>99 %

4C. Destilación del producto bruto

Después de una separación total del MTBE y de una amplia eliminación del isopropanol, se pudieron obtener, mediante destilación fraccionada, 38,4 kg (97%) del (*R*)-éster etílico de ácido 3-hidroxi-butanoico con una pureza química de >99% y una pureza óptica de >99% ee.

TABLA 6

Ejemplo 4		
Cantidad empleada de substrato:		39,06 kg (300 mol)
Rendimiento:	97 %	38,42 kg (291 mol)
Rendimiento de espacio - tiempo:	28,8 mol/m ³ h	691 mol/m ³ d
Consumo de enzimas:	1,25 MU	4,3 kU/mol de producto
Consumo de coenzima	6,23 mmol	17 mg/mol de producto

• El empleo renovado de la fase acuosa extraída proporcionó unos grados de conversión y unos excesos enantioméricos constantemente altos.

• El disolvente redistilado de extracción se pudo emplear de nuevo sin ninguna limitación.

ES 2 284 095 T3

TABLA 7

	Ejemplo 3	Ejemplo 4
Conversión de la fase acuosa a presión reducida	no	Sí
Capacidad para el empleo renovado del disolvente de extracción	2 veces	ilimitada

Ejemplo 5

Preparación, catalizada enzimáticamente, del (S)-2-hexanol en la escala de 4.000 l, mediando empleo renovado de la fase acuosa que contiene enzimas

Para la síntesis, catalizada enzimáticamente, del (S)-2-hexanol se empleó una alcohol-deshidrogenasa recombinante procedente de *Thermoanaerobium spec.* (= ADH-T) como extracto bruto con una actividad volumétrica media de 545 U/ml, y como coenzima se empleó la sal de sodio de β -NADP (pureza química 97%).

5A. Primer empleo

TABLA 8

Sustancia	Cantidad o volumen
Agua	2.960 l
NaOH*	aprox. 9,8 kg*
Acido fosfórico (al 85 %)	17,6 kg
MgCl ₂ x 6H ₂ O	600 g
Iso-propanol	800 l
2-hexanona	199,5 kg
Sal de sodio de NADP	160 g
ADH-T (545 U/ml)	22 l

* Para el ajuste de un pH de 7,0, por lo tanto no es ningún dato cuantitativo exacto

El volumen total de la mezcla acuosa fue de aprox. 4.000 l.

En un recipiente esmaltado con una capacidad de 8.000 l. provisto de un dispositivo de agitación, el valor del pH de la solución de cloruro de magnesio, ácido fosfórico y agua se ajustó, por adición de NaOH, al valor de 6,5, y a continuación se añadieron 2-hexanona, isopropanol, la sal de NADP y el extracto enzimático bruto. Después de haber ajustado el pH de 7,0 por adición de NaOH, la mezcla se calentó a 30°C.

La mezcla se agitó durante tanto tiempo hasta que el grado de conversión fuese de 74% según un análisis por GC.

ES 2 284 095 T3

La fase acuosa fue extraída dos veces con n-heptano (600 l y 400 l) y la fase acuosa extraída se devolvió al recipiente de reacción para su empleo renovado y se agitó durante varias horas bajo vacío (<100 mbar) y mediando insuflación de nitrógeno. El extracto orgánico se almacenó de modo intermedio.

5B. Empleo renovado de la fase acuosa

La solución acuosa extraída se mezcló con 573 l de isopropanol y 160 kg de 2-hexanona. El pH fue ajustado con NaOH al valor de 7,0, y la temperatura fue ajustada a 30°C.

La realización de la reacción se efectuó de una manera análoga a la del Ejemplo 5A.

La mezcla se agitó durante tanto tiempo hasta que el grado de conversión fuese de 70% según un análisis por GC.

La extracción subsiguiente se efectuó de una manera análoga a la del Ejemplo 5A.

5C. Purificación del extracto en heptano

Los extractos en heptano reunidos se concentraron después de haber sacado el agua desde el circuito y a continuación se destilaron de una manera fraccionada.

En tal caso se pudieron obtener en total 216 kg (59% del rendimiento teórico) de (S)-2-hexanol de >99% ee.

TABLAS 9+10

Resumen de los resultados de los Ejemplos 5A hasta 5C

Reacción	Conversión (%)	Ee
Primer empleo (5A)	74	>99 %
Empleo renovado (5B)	70	>99 %

Destilación (5C)	Rendimiento	% del teórico	Ee
(S)-2-hexanol	216 kg	59	>99 %

Ejemplo 6

Preparación, catalizada enzimáticamente, del (S)-2-pentanol a la escala de 3.000 l

Para la síntesis, catalizada enzimáticamente, del (S)-2-pentanol se empleó una alcohol-deshidrogenasa recombinante procedente de *Thermoanaerobium spec.* (= ADH-T) como extracto bruto con una actividad volumétrica media de 545 U/ml, y como coenzima se empleó la sal de disodio de β -NADP (pureza química 97%).

ES 2 284 095 T3

6A. Primer empleo

TABLA 11

5

Sustancia	Cantidad o volumen
Agua	1.200 l
NaOH (aq., 25 % p/v) *	aprox. 10 l*
Acido fosfórico (al 85 %)	5 kg
MgCl ₂ x 6H ₂ O	183 g
Iso-propanol	1.350 l
2-Pentanona	175 kg
Sal de disodio de NADP	106 g
ADH-T (545 U/ml)	14,7 l

10

15

20

25

* Para el ajuste de un pH de 7,0, por lo tanto no es ningún dato cuantitativo exacto.

30

El volumen total de la mezcla acuosa fue de aprox. 2.700 l.

35

En un recipiente esmaltado con una capacidad de 5.000 l, provisto de un dispositivo de agitación, una solución de cloruro de magnesio, ácido fosfórico, agua y NaOH de pH 6,5 se mezcló con 2-pentanona, isopropanol, la sal de NADP y la solución del extracto enzimático bruto. A un pH de 7,0, la mezcla se calentó a 40°C.

La mezcla se agitó durante tanto tiempo hasta que el grado de conversión fuese de 66% según el análisis por GC.

40

La fase acuosa fue extraída dos veces con n-pentano (1000 l y 300 l) y la fase acuosa extraída se devolvió al recipiente de reacción para su empleo renovado, y se agitó bajo vacío (<100 mbar) y mediando insuflación de nitrógeno durante varias horas. El extracto orgánico se almacenó de un modo intermedio.

6B. Empleo renovado de la fase acuosa

45

La solución acuosa extraída se mezcló con 1.350 l de isopropanol y 175 kg de 2-pentanona. El pH se ajustó con NaOH al valor de 7,0, y la temperatura se ajustó a 40°C.

La realización de la reacción se efectuó de una manera análoga a la del Ejemplo 6A.

50

La mezcla se agitó durante tanto tiempo hasta que el grado de conversión fuese de 64% según un análisis por GC. La subsiguiente extracción se efectuó de una manera análoga a la del Ejemplo 6A.

6C. Purificación del extracto en pentano

55

Los extractos en pentano reunidos se aumentaron de concentración después de haber sacado el agua desde el circuito y a continuación se destilaron fraccionadamente.

En tal caso se pudieron obtener en total 208 kg (58% del rendimiento teórico) de (S)-2-pentanol de >99% ee.

60

65

ES 2 284 095 T3

TABLAS 12+13

Resumen de los resultados del Ejemplo 6

5

<u>Reacción</u>	Conversión (%)	ee
Primer empleo (6A)	66	>99 %
Empleo renovado (6B)	64	>99 %

10

15

<u>Destilación (6C)</u>	Rendimiento	% del teórico	Ee
(S)-2-pentanol	208 kg	58	>99 %

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de alcoholes secundarios quirales, que contiene las etapas de

a) reducción de un compuesto cetónico en un medio acuoso de reacción, que contiene agua, un agente de reducción, una alcohol-deshidrogenasa y una coenzima, bajo presión reducida y mediando eliminación de los componentes fácilmente volátiles desde el sistema de reacción,

b) extracción del alcohol secundario formado mediante una fase adicional, que contiene un disolvente orgánico no miscible con agua, mediando arremolinamiento y/o mezclamiento a fondo de las fases acuosas y orgánicas,

c) después de una desmezcladura de las fases, separación de la fase utilizada para la extracción, y utilización renovada del medio acuoso de reacción en la etapa a).

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque como agente de reducción se emplea isopropanol.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque como agente de reducción se emplea ácido fórmico o una sal del ácido fórmico.

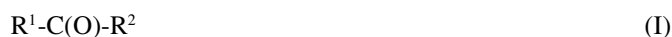
4. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la fase utilizada para la extracción es de metil-terc.-butil-éter.

5. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque el tiempo de contacto entre el medio acuoso de reacción y la fase orgánica de extracción es, en el caso de la extracción, de 1 min hasta 10 min.

6. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque se emplean alcohol-deshidrogenasas procedentes de levaduras, hígados de caballos, *Rhodococcus erythropolis*, *Thermoanaerobium spec.*, *Lactobacillus kefir* o *Lactobacillus brevis*.

7. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque como coenzimas se emplean NADP, NADPH, NAD, NADH o sus sales.

8. Procedimiento de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque como compuestos cetónicos se emplean cetonas proquirales de la Fórmula general (I)



realizándose que

R^1 y R^2 se seleccionan, independientemente uno de otro, entre el conjunto que contiene alquilo C_1-C_{20} , cicloalquilo C_3-C_{20} , arilo C_5-C_{20} , heteroarilo C_1-C_{20} , alquenilo C_2-C_{20} , aralquilo C_5-C_{20} , alquilarilo C_5-C_{20} , o R^1 y R^2 en común pueden formar un anillo,

y R^1 y R^2 eventualmente, de manera independiente uno de otro, pueden estar sustituidos con uno o varios radicales Z, realizándose que

Z se selecciona entre el conjunto que contiene fluoro, cloro, bromo, yodo, -CN, -NO₂, -NO, -NR³OR³, -CHO, -SO₃H, -COOH o -R³ y

R³ representa hidrógeno o puede tener los significados de R¹, y

en R¹ y R² uno o varios grupos metileno, eventualmente de manera independiente unos de otros, pueden ser reemplazados por grupos Y iguales o diferentes, realizándose que

Y se selecciona entre el conjunto que contiene -CR³=CR³-, -C≡C-, -C(O)-, -C(O)O-, -OC(O)-, -C(O)OC(O)-, -O-, -O-O-, -CR³=N-, -C(O)-NR³-, -N=N-, -NR³-NR³-, -NR³-O-, -NR³-, -P(O)(OR³)O-, -OP(O)(R³)O-, -P(R³)-, -P(O)(R³)-, -S-, -S-S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)NR³-, -S(O)(OR³)O-, -Si(R³)₂-, -Si(R³)₂O-, -Si(R³)(OR³)-, -OSi(R³)₂O-, -OSi(R³)₂- o -Si(R³)₂OSi(R³)₂-.