



Departamento de Química Orgánica e Inorgánica

Máster Universitario en Química y Desarrollo Sostenible

**APLICACIONES DE LACASAS EN PROCESOS  
SELECTIVOS DE OXIDACIÓN DE  
AMINOALCOHOLES**

*Trabajo Fín de Máster*

*Julio 2013*

**Lía Martínez Montero**



**LÍA MARTÍNEZ MONTERO**, estudiante del Máster Universitario “Química y Desarrollo Sostenible”, organizado por el Centro Internacional de Postgrado de la Universidad de Oviedo

**PRESENTA**

El trabajo titulado “**Aplicaciones de lacasas en procesos selectivos de oxidación de aminoalcoholes**”, que ha sido realizado en el Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Oviedo.

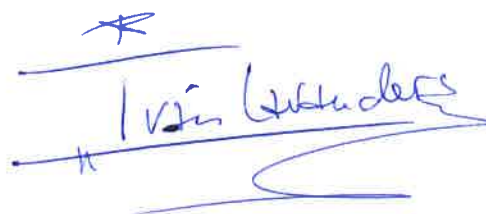
Este trabajo de investigación se ha llevado a cabo bajo la tutela de la Profesora Titular Francisca Rebolledo Vicente, y la supervisión del Profesor Titular Vicente Gotor Fernández y del Doctor Iván Lavandera García, todos ellos miembros del Departamento de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad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

Oviedo, 18 de Julio 2013

Firmado por:



Vicente Gotor Fernández



Iván Lavandera García



Lía Martínez Montero



Francisca Rebolledo Vicente



## **ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**



<b>ABTS</b>	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolidina-6-sulfónico)
<b>Ac</b>	Acetilo
<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>AcOVin</b>	Acetato de vinilo
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADH</b>	Alcohol deshidrogenasa
<b>ADH-A</b>	Alcohol deshidrogenasa de <i>Rhodococcus ruber</i>
<b>APCI</b>	Ionización química a presión atmosférica ( <i>Atmospheric pressure chemical ionization</i> )
<b>Bn</b>	Bencilo
<b>Bz</b>	Benzoílo
<b>c</b>	Cuartete
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>CAL-B</b>	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> de tipo B
<b>CAO</b>	Amino oxidasa dependiente de cobre
<b>CLEA</b>	Agregado enzimático entrecruzado ( <i>cross-linked enzyme aggregates</i> )
<b>conv</b>	Conversión
<b>Cp</b>	Ciclopentadienil
<b>d</b>	Doblete
<b>dd</b>	Doble doblete
<b>ddd</b>	Doble doblete de dobletes
<b>DEPT</b>	Aumento de distorsión por transferencia de polarización ( <i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> )
<b>DMAP</b>	<i>N,N</i> -Dimetilaminopiridina
<b>DMBQ</b>	2,6-Dimetoxi-1,4-benzoquinona

<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
<b>dt</b>	Doble triplete
<b>EC</b>	Enzyme Commission (Comisión Enzimática)
<b>ee</b>	Exceso enantiomérico
<b>EM</b>	Espectrometría de masas
<b>equiv</b>	Equivalente
<b>Et</b>	Etilo
<b>FAD</b>	Dinucléotido de adenina-flavina
<b>g</b>	Gramos
<b>GP</b>	Grupo protector
<b>h</b>	Horas
<b>HAA</b>	Ácido 3-hidroxiantranílico
<b>HBT</b>	<i>N</i> -hidroxibenzotriazol
<b>HLADH</b>	Alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo (horse liver alcohol dehydrogenase)
<b>HPI</b>	<i>N</i> -hidroxiftalimida
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficiencia
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b>kg</b>	Kilogramo
<b>LK-ADH</b>	Alcohol deshidrogenasa de <i>Lactobacillus kefir</i>
<b>LMS</b>	Sistemas mediadores de lacasas (Laccase-mediator systems)
<b>m</b>	Multiplete
<b>M</b>	Metal o Molar
<b>Me</b>	Metilo
<b>MeCN</b>	Acetonitrilo



<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mg</b>	Miligramos
<b>MHz</b>	Megahertzios
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mmol</b>	Milimol
<b>Ms</b>	Mesilo
<b><i>m/z</i></b>	Relación masa/carga
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Dinucleótido de nicotinamida-adenina
<b>NADH</b>	Dinucleótido de nicotinamida-adenina reducido
<b>NADP<sup>+</sup></b>	Dinucleótido fosfato de nicotinamida-adenina
<b>NADPH</b>	Dinucleótido fosfato de nicotinamida-adenina reducido
<b>NEt<sub>3</sub></b>	Trietilamina
<b>NHA</b>	<i>N</i> -hidroxiacetanilida
<b>nm</b>	Nanometro
<b>ox</b>	Oxidado
<b><sup>i</sup>Pr</b>	<i>iso</i> -Propilo
<b>Ph</b>	Fenil
<b>PSL-SD</b>	Lipasa de <i>Pseudomonas cepacia</i> soportada en diatomita
<b>red</b>	Reducido
<b>rdto</b>	Rendimiento
<b>R<sub>f</sub></b>	Factor de retención

## Abreviaturas y acrónimos

---

<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>s</b>	Singulete
<b>sa</b>	Singulete ancho
<b>Su (o Sub)</b>	Sustrato
<b>t</b>	Triplete
<b>T</b>	Temperatura
<b>t.a.</b>	Temperatura ambiente
<b>TBME</b>	<i>tert</i> -Butil metil éter
<b>TEMPO</b>	2,2,6,6-Tetrametilpiperidina-1-oxilo
<b>TLC</b>	Cromatografía de capa fina ( <i>Thin Layer Chromatography</i> )
<b>Tr</b>	Tritilo
<b>Ts</b>	Tosilo
<b>Tx</b>	Tipo x
<b>U</b>	Unidades
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>v/v</b>	Relación volumen/volumen
<b>VLA</b>	Ácido violúrico

## **ÍNDICE**



---

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. BIOCATÁLISIS</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1.1. El papel de la Biocatálisis en la Química Sostenible</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1.2. Los enzimas y sus distintas preparaciones como catalizadores altamente selectivos</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS ENZIMAS</b> .....	<b>10</b>
<b>1.3. ENZIMAS REDOX U OXIDORREDUCTASAS</b> .....	<b>10</b>
<b>1.3.1. Alcohol deshidrogenasas (ADHs)</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3.2. Oxigenasas</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3.3. Oxidasas</b> .....	<b>16</b>
<b>1.3.4. Lacasas</b> .....	<b>17</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>23</b>
<b>2.1. MÉTODOS DE SÍNTESIS DE LACTAMAS Y LACTONAS</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1.1. Métodos oxidativos no biocatalíticos para la síntesis de lactamas</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1.2. Métodos enzimáticos para la síntesis de lactamas</b> .....	<b>28</b>
<b>2.1.3. Métodos enzimáticos para la síntesis de lactonas</b> .....	<b>31</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>39</b>
<b>4.1. 5-AMINOPENTAN-1-OL Y DERIVADOS: SÍNTESIS Y REACTIVIDAD CON EL SISTEMA LACASA/TEMPO</b> .....	<b>42</b>
4.1.1. Reactividad del 5-aminopentan-1-ol (1).....	42
4.1.2. Síntesis química y reactividad del 5- <i>N</i> -tosilaminopentan-1-ol (6).....	43
4.1.3. Síntesis química y reactividad de la de <i>N</i> -(5-hidroxipentil)acetamida (10).....	46
4.1.4. Síntesis química y reactividad de la <i>N</i> -(5-hidroxipentil)benzamida (15).....	47
4.1.5. Síntesis química y reactividad del <i>N</i> -5-bencilaminopentan-1-ol (18).....	48
<b>4.2. 5-AMINO-3-FENILPENTAN-1-OL Y DERIVADOS: SÍNTESIS Y REACTIVIDAD CON EL SISTEMA LACASA/TEMPO</b> .....	<b>51</b>
4.2.1. Síntesis química del 5-amino-3-fenilpentan-1-ol (22) racémico.....	51
4.2.2. Síntesis química del derivado enantioenriquecido ( <i>S</i> )-22.....	54
4.2.3. Reactividad del aminoalcohol ( $\pm$ )- o ( <i>S</i> )-22 con el sistema lacasa/TEMPO.....	55
4.2.4. Síntesis de la ( <i>S</i> )- <i>N</i> -(3-fenil-5-hidroxipentil)acetamida (37).....	57
4.2.5. Síntesis química y reactividad de la ( <i>S</i> )- <i>N</i> -(3-fenil-5-hidroxipentil)benzamida (39).....	57
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>59</b>
<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>63</b>
6.1. DISOLVENTES Y REACTIVOS GENERALES.....	65
6.2. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS.....	65

6.2.1. Cromatografía en gel de sílice .....	65
6.2.2. Resonancia magnética nuclear (RMN).....	66
6.2.3. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	66
6.2.4. Espectrometría de masas (EM).....	66
6.2.5. Espectroscopia de infrarrojo (IR).....	67
6.2.6. Puntos de fusión.....	67
<b>6.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES .....</b>	<b>67</b>
6.3.1. Reacción del 5-amino-1-pentanol (1) con el sistema lacasa/TEMPO .....	67
6.3.2. Síntesis química de la <i>N</i> -(5-hidroxipentil)-4-metilbenzenosulfonilamida (6).....	68
6.3.3. Biooxidación del <i>N</i> -(5-hidroxipentil)-4-metilbenzenosulfonilamida (6) con el sistema lacasa/TEMPO.....	68
6.3.4. Biooxidación del 1-tosil-piperidin-2-ol (7) con el sistema lacasa/TEMPO .....	68
6.3.5. Síntesis química de la <i>N</i> -(5-hidroxipentil)acetamida (10).....	69
6.3.6. Biooxidación de la <i>N</i> -(5-hidroxipentil)acetamida (10) con el sistema lacasa/TEMPO .....	69
6.3.7. Síntesis química de la <i>N</i> -(5-hidroxipentil)benzamida (15).....	69
6.3.8. Biooxidación de la <i>N</i> -(5-hidroxipentil)benzamida (15) con el sistema lacasa/TEMPO .....	70
6.3.9. Síntesis química del 5-(bencilamino)pentan-1-ol (18).....	70
6.3.10. Biooxidación del 5-(bencilamin)pentan-1-ol (18) con el sistema lacasa/TEMPO .....	70
6.3.11. Síntesis química del 3-fenilpentanodioato de dietilo (24).....	71
6.3.12. Síntesis del 3-fenilpentano-1,5-diol (25).....	71
6.3.13. Síntesis química del 5-hidroxi-3-fenil-4-metilbencenosulfonato (26).....	72

6.3.14. Síntesis química del (±)-3-fenil-5-hidroxi-1-(4-metilbenceno)sulfonato (28).....	72
6.3.15. Síntesis química del (±) 3-fenil-5-(trifiloxi)pentan-1-ol (30).....	72
6.3.16. Síntesis química del (±) 5-azido-3-fenilpentan-1-ol (31).....	73
6.3.17. Síntesis química del (±)-5-amino-3-fenilpentan-1-ol (22) a partir de 31.....	73
6.3.18. Síntesis enzimática del acetato de (S)-5-hidroxi-3-fenilpentilo (32).....	73
6.3.19. Síntesis química del acetato de (R)-3-fenil-5-(tosiloxi)-pentilo (33).....	74
6.3.20. Síntesis química del acetato de (S)-5-azido-3-fenilpentilo (34).....	74
6.3.21. Síntesis química del (S)-5-amino-3-fenilpentan-1-ol (22) a partir de 34.....	74
6.3.22. Biooxidación del (±) ó (S)-5-amino-3-fenilpentan-1-ol (22) con el sistema lacasa/TEMPO.....	75
6.3.23. Reoxidación del (±) ó (S)-5-amino-3-fenilpentan-1-ol (35) con el sistema lacasa/TEMPO.....	75
6.3.24. Síntesis química de la (S)-N-(5-hidroxi-3-fenilpentil)acetamida (37).....	75
6.3.25. Síntesis química de la (S)-N-(5-hidroxi-3-fenilpentil)benzamida (39).....	76
6.3.26. Biooxidación de la (S)-N-(5-hidroxi-3-fenilpentil)benzamida (39) con el sistema lacasa/TEMPO.....	76
6.4. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	77
6.4.1. Determinación de las conversiones por CG en fase aciral.....	77
6.4.2. Determinación de los <i>ees</i> por HPLC quiral.....	77
6.5. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS.....	78
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>91</b>



## **INTRODUCCIÓN**



La Catálisis ha sido y seguirá siendo uno de los campos de estudio más activos en distintas disciplinas de la Química, dado que resulta en la mayoría de los casos una vía racional, benigna desde un punto de vista ambiental, y viable tanto económica como energéticamente para la preparación de muy diversos compuestos químicos. Así, muchas de las reacciones catalíticas utilizadas hoy en día por los químicos orgánicos sintéticos eran casi impensables sólo quince años atrás.<sup>1</sup> De acuerdo a un comunicado de la compañía química alemana BASF, más del 80% de los productos químicos elaborados en el mundo se obtienen a través de procesos catalíticos. El empleo de los catalizadores tanto heterogéneos como homogéneos se encuentra hoy en día en continua expansión. Como regla general, un catalizador práctico debe dar lugar a reacciones rápidas, altamente selectivas y susceptibles de ser escaladas. Asimismo, debido a las leyes cada vez más restrictivas con respecto al medioambiente, se ha de tener muy en cuenta la fuente de dichos catalizadores así como la de los reactivos y disolventes que forman parte del proceso químico.

Dentro de los diferentes tipos de catálisis empleados en procesos a gran escala podemos diferenciar tres grandes grupos: Metalocatálisis, Organocatálisis y Biocatálisis. En este trabajo nos centraremos en la Biocatálisis, disciplina que hace referencia al uso de enzimas aislados o a complejos multienzimáticos aplicados como catalizadores en reacciones químicas.

Los enzimas o biocatalizadores son proteínas que catalizan reacciones químicas aumentando su velocidad sin consumirse en el proceso ni desplazar el equilibrio químico del mismo. Puesto que son capaces de operar en condiciones suaves de reacción, los procesos en los que se ven implicados son poco agresivos con el medioambiente y pueden encuadrarse dentro de la denominada “Química verde”, también conocida como Química Sostenible.<sup>2</sup>

En este Trabajo Fin de Máster nos hemos propuesto emplear un tipo de enzimas como son las lacasas, con el fin de desarrollar métodos de oxidación quimioselectiva de aminoalcoholes y derivados, con el objetivo de preparar lactamas o lactonas de seis eslabones. Este tipo de enzimas no son de los más utilizados hasta la fecha aplicados a la síntesis orgánica de compuestos de interés debido a que, hasta hace pocos años, no se encontraban disponibles en casas comerciales, y debido a esto su empleo conllevaba su aislamiento principalmente de hongos. Pertenecientes al grupo de las oxidoreductasas, las lacasas (EC 1.10.3.2) son

---

<sup>1</sup> A. Mitchinson, J. Finkelstein, *Nature* **2008**, *455*, 303.

<sup>2</sup> (a) P. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301-312; (b) J. M. Clark, *Nature Chem.* **2009**, *1*, 12-13.

denominadas “*blue copper oxidases*” debido al color azulado conferido por los átomos de cobre que forman el centro activo del enzima.<sup>3</sup>

Así, se ha elaborado esta introducción donde se quiere presentar al lector de una manera resumida las características generales de la Biocatálisis. Partiendo de su perspectiva histórica, se explicará su inclusión dentro del área de la Química Sostenible y con ello sus implicaciones en síntesis orgánica, así como las tendencias actuales existentes para el diseño racional de nuevos biocatalizadores más eficientes que los que ya existen. Posteriormente nos centraremos en los distintos tipos de enzimas que existen en función del tipo de reacción general que catalizan, centrandó especial atención en las oxidorreductasas, familia dentro de la cual se encuadran las lacasas que son las principales protagonistas de este trabajo.

### 1.1. LA BIOCATÁLISIS

Como se ha comentado anteriormente, los enzimas o biocatalizadores son proteínas cuyo modo de acción suele ser muy específico, y así tradicionalmente se han clasificado en seis grandes grupos de acuerdo con el tipo de reacción que catalizan (oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas),<sup>4</sup> si bien en los últimos años se ha descubierto que algunos enzimas muestran una inusual “promiscuidad catalítica”, que se define como la capacidad de un biocatalizador para llevar a cabo procesos distintos a su función natural.<sup>5</sup>

Podríamos decir que el hombre se ha beneficiado de la Biocatálisis desde hace más de 5000 años, cuando en la antigua Mesopotamia ya se aprovechaba el uso de la  $\alpha$ -amilasa en la sacarificación del almidón utilizado en el proceso de producción de la cerveza. De la misma manera, la obtención de etanol a partir de glucosa catalizada por microorganismos como las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* o la bacteria *Zymomonas mobilis* es conocida por la humanidad desde tiempos inmemoriales, siendo la fermentación alcohólica uno de los primeros procesos conocidos en el campo de las biotransformaciones. Otros procesos catalizados por enzimas descritos en la antigüedad son, por ejemplo, la producción de queso a partir de leche que se mantenía en el estómago de oveja, o la obtención de vinagre (ácido acético) a partir de la oxidación de etanol catalizada por *Acetobacter aceti* o *Gluconobacter suboxydans*.<sup>6</sup>

---

<sup>3</sup> S. Riva, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 219-226.

<sup>4</sup> K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6<sup>a</sup> Ed., Springer, Berlin, **2011**.

<sup>5</sup> (a) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 1695-1733; (b) M. S. Humble, P. Berglund, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3391-3401; (c) K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 232-238.

<sup>6</sup> P. Raspor, D. Goranovič, *Critical Rev. Biotechnol.* **2008**, *28*, 101-124.

Pese a que este tipo de biotransformaciones han sido aprovechadas por el hombre, no es hasta entrado el siglo XIX cuando estos procesos comienzan a estudiarse desde un punto de vista científico más riguroso. Ya en el siglo XX la Biocatálisis adquiere una verdadera importancia sintética, debido al descubrimiento en 1985 de que algunas enzimas eran capaces de llevar a cabo transformaciones en medios no acuosos.<sup>7</sup> Este hallazgo supuso una auténtica revolución, ya que el empleo de disolventes orgánicos presenta grandes ventajas permitiendo, entre otras cosas, una mejor solubilidad de los compuestos orgánicos hidrofóbicos, una recuperación más sencilla de los productos finales de reacción, y el desarrollo de procesos sintéticos de deshidratación o esterificación frente a otros indeseados de hidrólisis o racemización.

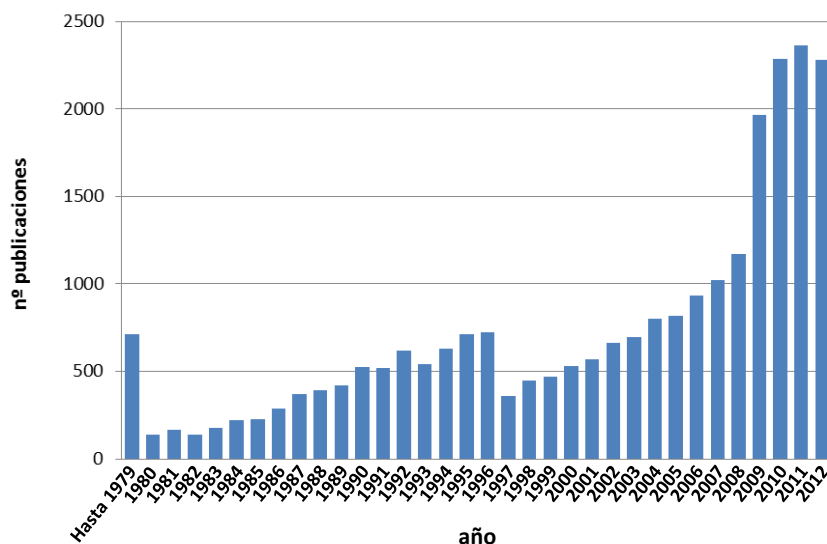
Este fenómeno respaldado por el avance exponencial que tuvo lugar a finales del siglo pasado de diferentes disciplinas como la Biología, la Bioquímica o la Ingeniería Genética, ha propiciado grandes avances en la Biocatálisis.<sup>8</sup> Además la aplicación de técnicas de ADN recombinante ha permitido modificar la cadena de aminoácidos de los enzimas, haciendo que los procesos que catalizan sean más eficientes y se puedan minimizar las limitaciones que presentan en relación a su estabilidad y selectividad.<sup>9</sup> Este hecho se ha traducido en un gran incremento en el número de publicaciones científicas de primer nivel que hacen referencia a esta disciplina, como se observa en la Figura 1, donde se representa la evolución temporal de trabajos relacionados con procesos biocatalíticos según una conocida fuente bibliográfica.

---

<sup>7</sup> A. Zaks, A. M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, 82, 3192-3196.

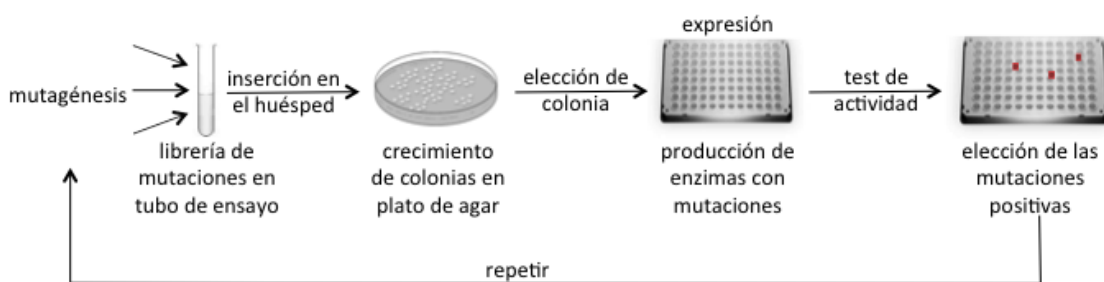
<sup>8</sup> U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, 485, 185-194.

<sup>9</sup> Algunas revisiones recientes: (a) T. Davids, M. Schmidt, D. Böttcher, U. T. Bornscheuer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, 17, 215-220; (b) U. T. Bornscheuer, *Synlett* **2013**, 24, 150-156; (c) M. B. Quin, C. Schmidt-Dannert, *ACS Catal.* **2011**, 1, 1017-1021; (d) G. A. Behrens, A. Hummel, S. K. Padhi, S. Schätzle, U. T. Bornscheuer, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 2191-2215; (e) S. Lutz, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, 21, 734-743; (f) C. Jäckl, D. Hilvert, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, 21, 753-759.



**Figura 1.** Número de publicaciones obtenidas en la base de datos Scifinder al introducir en la búsqueda el término “Biocatálisis” (<https://scifinder.cas.org/>)

Una de las técnicas más empleadas para modificar un biocatalizador es la evolución dirigida (Esquema 1),<sup>10</sup> la cual consiste en generar de forma aleatoria un conjunto extenso (librería) de enzimas modificados en uno o varios residuos de aminoácidos (mutantes) a partir de la proteína natural. Aquel biocatalizador que haya mostrado mejores propiedades vuelve a ser empleado para realizar un nuevo ciclo de mutagénesis, expresión y ensayo, el cual se repite las veces que sean necesarias hasta obtener un biocatalizador con las actividades/selectividades requeridas para el proceso en cuestión.<sup>11</sup>



**Esquema 1.** Descripción del procedimiento de mutagénesis de un enzima a través de la evolución dirigida

<sup>10</sup> (a) M. T. Reetz, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 119-190; (b) M. J. Dougherty, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2009**, *20*, 486-491.

<sup>11</sup> M. T. Reetz, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7530-7548.

### 1.1.1. El papel de la Biocatálisis en la Química Sostenible

Se define como “Química Verde” o Química Sostenible al desarrollo de productos o procesos en los que se reduce o se elimina el uso de sustancias nocivas.<sup>12</sup> En este sentido, la Biocatálisis supone una solución práctica ya que por una parte los enzimas catalizan procesos orgánicos respetuosos con el medio ambiente, generalmente bajo condiciones suaves de reacción (pH, presión o temperatura), y además son biodegradables. Por otro lado es bien conocida su elevada eficiencia catalítica, acelerando los procesos varios órdenes de magnitud en comparación con las reacciones realizadas en ausencia de enzima (reacciones control o blancos de reacción). Por último, los métodos químicos convencionales necesitan muchas veces alargar las secuencias sintéticas a través de pasos de protección y desprotección de determinados grupos funcionales, aumentando así los residuos generados, tanto en volumen como en peligrosidad, y disminuyendo la efectividad de la síntesis.

Estas limitaciones han sido en muchos casos superadas empleando biocatalizadores, los cuales pueden actuar con altos niveles de selectividad, además de poder hacerlo con una elevada eficiencia atómica.<sup>13</sup> Los enzimas pueden mostrar tres tipos de selectividad:

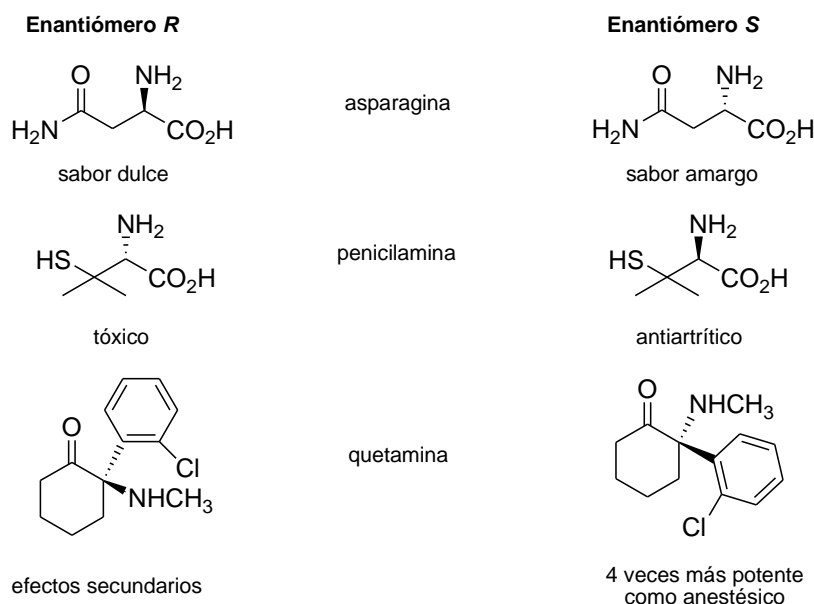
- *Quimioselectividad*: Discriminación selectiva en un sustrato dado entre dos grupos funcionales distintos pero de similar reactividad frente a una misma molécula. Este tipo de procesos evitan el empleo de etapas de protección y desprotección, y serán ampliamente estudiados en este Trabajo Fin de Máster para la oxidación selectiva de distintos aminoalcoholes empleando lacasas.
- *Regioselectividad*: Distinción entre dos grupos funcionales idénticos situados en distintas zonas de una molécula.
- *Estereoselectividad*: Transformación preferencial de un estereoisómero frente a otro(s). En el caso de que el enzima discrimine un enantiómero de su imagen especular en una mezcla racémica, se denomina enantioselectividad. Si la distinción se produce entre varios diastereoisómeros, se dice que el proceso es diastereoselectivo. También se puede romper la simetría en un compuesto proquiral generando tan solo uno de los enantiómeros del producto final a través de un proceso de asimetrización.

La importancia de la quiralidad en la Química y en la industria farmacéutica no puede pasarse por alto, ya que una pareja de enantiómeros, pese a poseer las mismas propiedades físico-químicas (tan solo difieren en el signo del ángulo de rotación específica frente a la luz

<sup>12</sup> P. J. Dunn, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1452-1461.

<sup>13</sup> G. Zheng, J. Xu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *22*, 784-792.

polarizada), cuando se introducen en un entorno quiral (como son los organismos vivos), pueden desarrollar una respuesta biológica muy diferente (Figura 2).<sup>14</sup>



**Figura 2.** Diferente respuesta biológica entre dos enantiómeros en una mezcla racémica

Atendiendo a las razones expuestas previamente, y destacando la alta selectividad que presentan los biocatalizadores, podemos afirmar que el uso de enzimas en síntesis orgánica cumple con los 12 principios de la Química Sostenible, los cuales han sido recogidos de forma nemotécnica e intencionada en el término inglés **PRODUCTIVELY** (de manera productiva):<sup>15</sup>

- 1.- **Prevent wastes** (minimizar residuos).
- 2.- **Renewable materials** (utilizar materiales renovables).
- 3.- **Omit derivatization steps** (evitar pasos de protección y desprotección).
- 4.- **Degradable chemical products** (emplear productos químicos degradables).
- 5.- **Use safe synthetic methods** (minimizar la peligrosidad de las síntesis).
- 6.- **Catalytic reagents** (utilizar catalizadores).
- 7.- **Temperature, pressure ambient** (condiciones suaves de reacción).
- 8.- **In-process monitoring** (análisis en tiempo real).
- 9.- **Very few auxiliary substances** (minimizar el uso de auxiliares).

<sup>14</sup> E. Thall, *J. Chem. Educ.* **1996**, *73*, 481-484.

<sup>15</sup> (a) S. Wenda, S. Illner, A. Mell, U. Kragl, *Green Chem.* **2011**, *130*, 3007-3047; (b) N. Ran, L. Zhao, Z. Chen, J. Tao, *Green Chem.* **2008**, *10*, 361-372.



10.- E-factor, maximise feed in product [desarrollo de procesos eficaces, E-factor = Residuos (kg) / Producto (kg)].

11.- Low toxicity of chemical products (sintetizar/emplear productos de baja toxicidad).

12.- Yes, it is safe (química segura).

### **1.1.2. Los enzimas y sus distintas preparaciones como catalizadores altamente selectivos**

Los sistemas enzimáticos pueden ser empleados como células enteras o bien como enzimas aislados tras una previa purificación, haciendo posible la conversión de un compuesto químico (sustrato) en otro (producto). La elección de una forma u otra del biocatalizador depende de varios factores, como son el tipo de reacción, la necesidad de utilizar cofactores y la escala a la que se pretende realizar el proceso.<sup>16</sup>

El uso de células enteras posee como ventajas que permite desarrollar procesos baratos, las células pueden ser fácilmente eliminadas del medio de reacción mediante una simple filtración o centrifugación, permiten trabajar en medios acuosos, y debido a que poseen todos los cofactores necesarios en su metabolismo, no es necesaria la adición de ningún cofactor externo. Sin embargo, la presencia de otros tipos de enzimas en el interior de las células puede conllevar reacciones secundarias, y requerir trabajar con diluciones altas. Las reacciones se ven ralentizadas debido a problemas de difusión del sustrato entre el interior y el exterior de la célula, y además la selectividad puede verse drásticamente afectada debido a la acción de otros biocatalizadores con estereopreferencia baja u opuesta.

Gran parte de estos problemas pueden evitarse con el uso de enzimas aislados, los cuales catalizan procesos a mayores concentraciones y permiten el aislamiento de los productos finales a través de una purificación más sencilla, si bien presentan la desventaja de ser caros, debido al coste adicional del aislamiento y purificación de la proteína, y en algunos casos también debido a la necesidad de adicionar un cofactor externo junto con su sistema de regeneración. Actualmente, numerosos enzimas aislados son comercialmente accesibles, lo cual ha ocasionado un creciente interés en la industria química.

---

<sup>16</sup> C. D. Murphy, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 1949-1957.

## 1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS ENZIMAS

En la actualidad, la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular tiene clasificados unos 3700 enzimas, pero si las predicciones son correctas, más del 90% de los biocatalizadores existentes en la naturaleza están aún por descubrir. De los conocidos, sólo una pequeña proporción (~10%) son hoy en día comerciales. Ante tal cantidad de enzimas se hace necesario establecer una clasificación atendiendo al tipo de reacciones que catalizan (Tabla 1). Los enzimas se agrupan en seis grandes familias en función de la reacción que catalizan, y son descritos por un código numérico de cuatro dígitos (EC x.x.x.x) los cuales indican: (i) el tipo de reacción, (ii) el tipo de sustrato o molécula transferida, (iii) la naturaleza del cosustrato, y (iv) el número individual del enzima.

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

Clasificación	Tipo de reacción catalizada
EC 1. Oxidorreductasas	Oxidación de alcoholes y aminas, dobles enlaces o cetonas; reducción de cetonas o dobles enlaces
EC 2. Transferasas	Transferencia de grupos acilo, fosforilo, glicosilo o amino
EC 3. Hidrolasas	Hidrólisis de ésteres, péptidos, glicéridos
EC 4. Liasas	Adición de moléculas pequeñas a enlaces múltiples
EC 5. Isomerasas	Isomerización de olefinas, racemización
EC 6. Ligasas	Formación de enlaces C-O, C-N, C-S y C-P

A lo largo de este Trabajo Fin de Máster se han utilizado principalmente enzimas del tipo 1, por lo que en esta introducción se hará una descripción más detallada de las mismas.

## 1.3. ENZIMAS REDOX U OXIDORREDUCTASAS

Los biocatalizadores empleados en reacciones de tipo redox (aquellos en los que se transfieren electrones de una sustancia reductora a otra oxidante que los acepta), se pueden clasificar en tres grandes grupos como son las deshidrogenasas, las oxigenasas y las oxidasas.<sup>17</sup>

El primer grupo, las deshidrogenasas, ha sido ampliamente utilizado para llevar a cabo la reducción de grupos carbonilo y dobles enlaces carbono-carbono o carbono-heteroátomo.

---

<sup>17</sup> (a) D. Monti, G. Ottolina, G. Carrea, S. Riva, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4111-4140; (b) M. Hall, A. S. Bommarius, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4088-4110; (c) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, K. Buehler, A. Schallmeyer, B. Bühler, *Green Chem.* **2011**, *13*, 226-265; (d) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, D. Holtmann, *Green Chem.* **2011**, *13*, 2285-2313; (e) *Modern Biooxidation. Enzymes, Reactions and Applications*, Eds. R. D. Schmid, V. B. Urlacher, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.

Ofrecen la posibilidad de asimetrizar sustratos proquirales pudiéndose obtener los productos finales enantiopuros con un rendimiento máximo teórico del 100%, por lo que resultan de especial interés. Requieren siempre la presencia de un cofactor, siendo este uno de sus mayores inconvenientes por su coste económico y la necesidad de su reciclaje a lo largo del proceso enzimático.

El segundo grupo corresponde a enzimas que catalizan la incorporación directa del oxígeno molecular en una molécula orgánica, las oxigenasas. La oxigenación enzimática es un proceso particularmente interesante, ya que la oxifuncionalización directa de sustratos orgánicos sigue siendo una tarea complicada en síntesis químicas convencionales, especialmente cuando los procesos deben ser regio- y/o estereoespecíficos.

Por último se encuentran las oxidasas, grupo en el cual se engloban las lacasas, las cuales son responsables de procesos de transferencia electrónica.

### 1.3.1. Alcohol deshidrogenasas (ADHs)

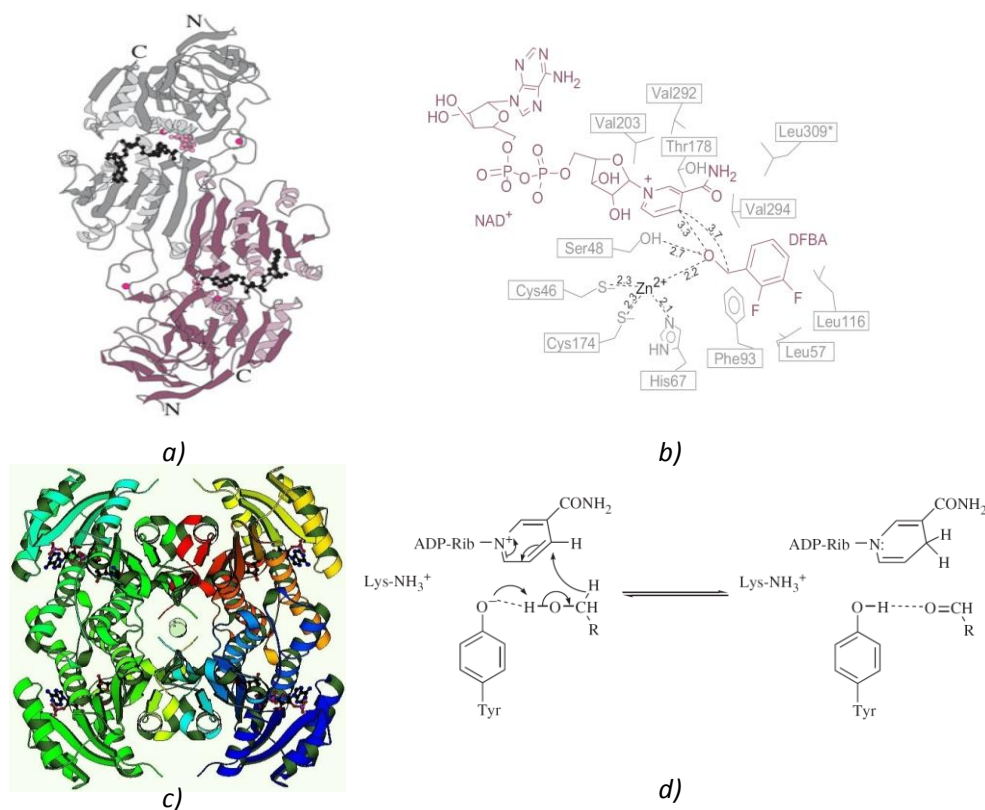
Estos enzimas, también denominados carbonil reductasas o cetoreductasas<sup>18</sup> llevan a cabo la reducción de grupos carbonilo para formar los correspondientes alcoholes debido a la cesión de un hidruro a una de las caras del enlace C=O proquiral. Asimismo, son capaces de realizar el proceso inverso de oxidación de alcoholes primarios o secundarios para formar los correspondientes derivados carbonílicos. Las ADHs que comúnmente se emplean con fines sintéticos en procesos redox pertenecen principalmente a dos tipos de familias: las ADHs de cadena media (“*medium chain ADHs*”, (Figura 3a) y las ADHs de cadena corta (“*short chain ADHs*”, Figura 3c).

Las primeras poseen en el centro activo un ión  $Zn^{2+}$  tetracoordinado por dos residuos de cisteína y uno de histidina junto con una molécula de agua (Figura 3b). Esta última es sustituida

---

<sup>18</sup> Revisiones bibliográficas recientes: (a) F. Hollmann, K. Bühler, B. Bühler, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3ª Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 1325-1438; (b) M. M. Musa, R. S. Phillips, *Catal. Sci. Technol.* **2011**, *1*, 1311-1323; (c) G. W. Huisman, J. Liang, A. Krebber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 122-129; (d) S. Buchholz, H. Gröger, en *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industry*, Ed. R. N. Patel, CRC Press, Boca Raton, **2007**, pp. 757-790; (e) S. M. A. de Wildeman, T. Sonke, H. E. Schoemaker, O. May, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1260-1266; (f) J. C. Moore, D. J. Pollard, B. Kosjek, P. N. Devine, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1412-1419; (g) K. Goldberg, K. Schroer, S. Lütz, A. Liese, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 237-248; (h) W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber, *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 125-142; (i) W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 120-126.

por el ión alcóxido resultante de la reducción del grupo carbonilo y facilita la ruptura del enlace O-H del alcohol cuando es oxidado.<sup>19</sup>



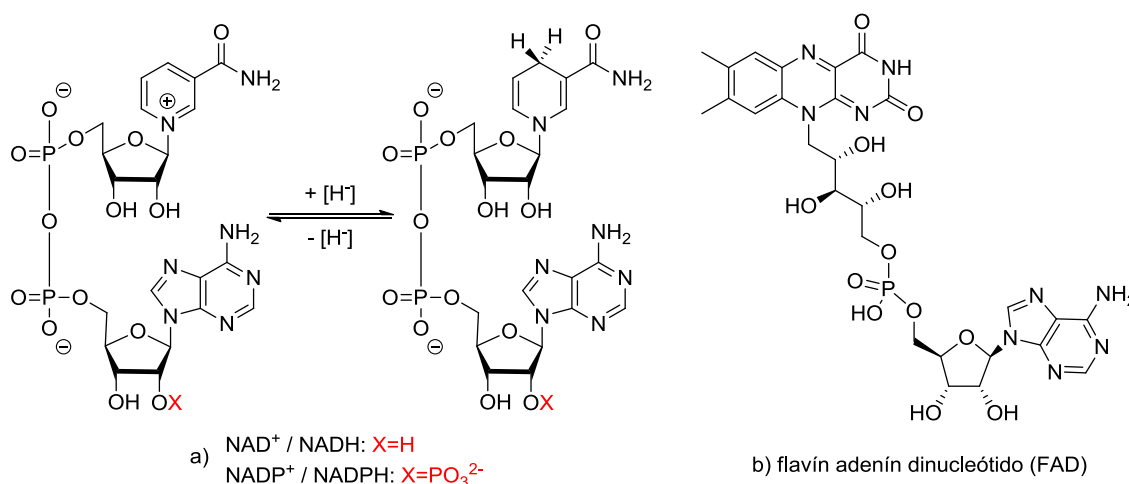
**Figura 3.** a) Representación de una ADH de cadena media (ADH de hígado de caballo): en negro se destaca el cofactor, en rosa el sustrato y en magenta los átomos de  $Zn^{2+}$ . b) Representación del sitio activo de dicha ADH, donde puede apreciarse la ubicación del cofactor, del  $Zn^{2+}$  y su esfera de coordinación, además del sustrato (2',3'-difluorofenilmetanol). c) Representación de una ADH de cadena corta (ADH de *Lactobacillus brevis*, LBADH). Puede apreciarse el homotetrámero con los dos iones  $Mg^{2+}$  en la zona central (gris) y las cuatro moléculas de cofactor (negro). d) Rol de la tirosina en el mecanismo de reacción de una ADH de cadena corta. Tomado de la referencia 19 (Figuras a, b y d) y del Protein Data Bank (PDB), estructura 1NXQ, <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1NXQ> (Figura c)

Las segundas poseen un mecanismo de acción en el cual no se encuentran implicados metales, aunque suelen estar presentes iones  $Mg^{2+}$  que estabilizan la estructura cuaternaria del enzima. Se ha demostrado que la eliminación de estos cationes da lugar a la inactivación del

<sup>19</sup> *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Eds. P. A. Frey, A. D. Hegeman, Oxford University Press, Nueva York, 2007.

biocatalizador aunque la estructura cuaternaria no se vea drásticamente modificada.<sup>20</sup> Las ADHs de cadena corta en lugar de emplear  $Zn^{2+}$  para activar el grupo carbonilo y favorecer la transferencia de hidrógeno, utilizan un residuo de tirosina que debe encontrarse en su forma ionizada (Figura 3d).

El principal inconveniente de este tipo de enzimas es la presencia necesaria de un cofactor de nicotinamida en los procesos que catalizan (Figura 4a), los cuales son agentes de transferencia de electrones tanto en su forma reducida como en la oxidada [NAD(P)H / NAD(P)<sup>+</sup>]. Especialmente el cofactor reducido resulta demasiado costoso como para poder ser utilizado en cantidades estequiométricas, además de los problemas de inhibición enzimática asociados que pueden derivarse en estos casos. Por consiguiente, la regeneración de cantidades catalíticas del cofactor mediante metodologías (cuasi)irreversibles es una manera apropiada de desplazar el equilibrio en reacciones termodinámicamente desfavorecidas hacia los productos deseados además de disminuir los costes del proceso.<sup>17b,21</sup>

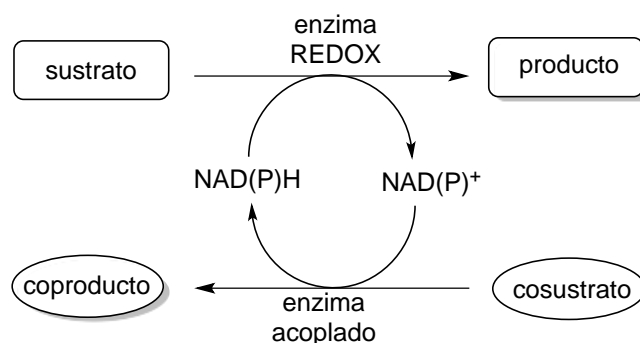


**Figura 4.** Algunos cofactores comunes en procesos redox

Probablemente la estrategia más utilizada hasta ahora para llevar a cabo el reciclaje del cofactor de nicotinamida en procesos redox es la denominada del “enzima acoplado” (“*coupled-enzyme*”), en la cual un segundo enzima cataliza una reacción muy favorecida termodinámicamente sobre un cosustrato, regenerando de nuevo el cofactor a su estado redox original (Esquema 2).

<sup>20</sup> N. H. Schlieben, K. Niefind, J. Müller, B. Riebel, W. Hummel, D. Schomburg, *J. Mol. Biol.* **2005**, *349*, 801-813.

<sup>21</sup> Revisiones bibliográficas recientes: (a) H. Wu, C. Tian, X. Song, C. Liu, D. Yang, Z. Jiang, *Green Chem.* **2013**, *15*, 1773-1789; (b) C. Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor, *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 2525-2541; (c) A. Weckbecker, H. Gröger, W. Hummel, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2010**, *120*, 195-242.



**Esquema 2.** Sistema de regeneración del cofactor utilizando un enzima acoplado

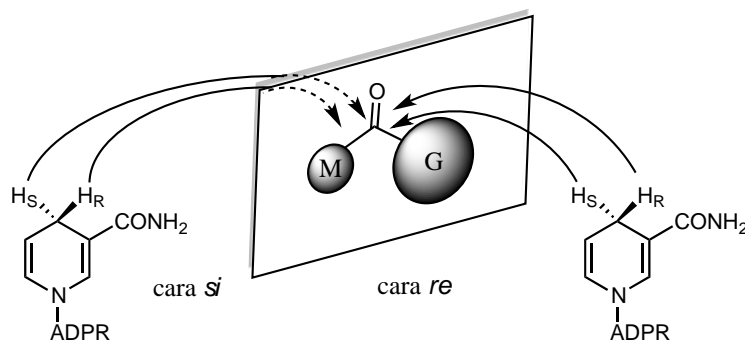
Una de las estrategias más desarrolladas ha sido la utilización de otro alcohol o derivado carbonílico como fuente de hidrógeno para reciclar el cofactor empleándose solamente un biocatalizador. Esta metodología se utiliza en procesos catalizados por ADHs y se denomina del “sustrato acoplado” (“*coupled-substrate*”).<sup>22</sup> En este caso puesto que tanto la oxidación como la reducción presentan un carácter reversible, para desplazar el equilibrio hacia la formación del producto de interés se necesita un gran exceso molar del cosustrato, con lo que se suele utilizar un derivado barato y fácilmente accesible (generalmente 2-propanol o acetona).

Una de las características más importantes de las ADHs es su gran selectividad catalizando la cesión del hidruro por una de las caras de la cetona proquiral cuando es reducida, o de abstraerlo exclusivamente a uno de los dos enantiómeros del alcohol racémico secundario cuando es oxidado. La estereoselectividad de estos enzimas con respecto a la entrada del hidruro por una de las caras de la cetona suele estar de acuerdo con lo establecido según Prelog en 1964.<sup>23</sup> Según dicho comportamiento estereoquímico las ADHs suelen seguir la llamada “*regla de Prelog*” basada en un principio empírico, en el cual se predice que estos enzimas transfieren el hidruro por la cara *re* de la cetona proquiral dando lugar preferentemente al alcohol de configuración *S* (Esquema 3).<sup>24</sup>

<sup>22</sup> J. Grunwald, B. Wirz, M. P. Scollar, A. M. Klibanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6732-6734.

<sup>23</sup> V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*, 119-130.

<sup>24</sup> El alcohol obtenido será de configuración *S* siempre que el grupo de mayor tamaño unido a la cetona presente también la prioridad siguiendo las reglas de nomenclatura de Cahn-Ingold-Prelog (CIP).



**Esquema 3.** Transferencia estereoselectiva del hidruro del NAD(P)H al carbono carbonílico de una cetona (M: sustituyente de menor tamaño; G: sustituyente de mayor tamaño)

En base a esta definición comúnmente aceptada y aplicada en el campo de la Biocatálisis, cuando la estereoquímica del alcohol resultante en una bioconversión es de configuración *S*, se dice que la ADH sigue la “regla de Prelog”, siendo la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo (HLADH)<sup>25</sup> o la alcohol deshidrogenasa de *Rhodococcus ruber* (ADH-A)<sup>26</sup> dos buenos ejemplos de este tipo de selectividad. En cambio, cuando la configuración absoluta en el carbono del alcohol obtenido es *R*, la transformación es de tipo “anti-Prelog”, como se da en el caso de la alcohol deshidrogenasa de *Lactobacillus kefir* (LK-ADH).<sup>27</sup> En este sentido, hay que señalar que existen en la bibliografía muchos más ejemplos de ADHs con selectividad del primer tipo que del segundo.

### 1.3.2. Oxigenasas

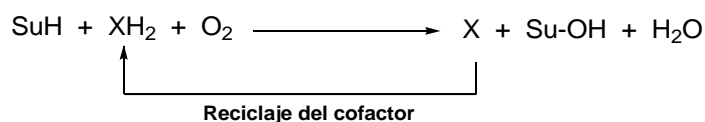
En este grupo se engloban biocatalizadores que activan al oxígeno en condiciones reductoras para su posterior inserción en compuestos orgánicos. Se clasifican en dioxigenasas y monooxigenasas según incorporen al sustrato los dos o sólo uno de los átomos del oxígeno. En el caso de las monooxigenasas, tras la incorporación de un átomo de oxígeno, el otro se convierte en agua en presencia de un donador de protones, siendo esta desprendida como subproducto de la reacción tal como se muestra en el Esquema 4.<sup>28</sup>

<sup>25</sup> T. Fukui, M. H. Zong, T. Kawamoto, A. Tanaka, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *38*, 209-213.

<sup>26</sup> K. Edegger, C. C. Gruber, T. M. Poessl, S. R. Wallner, I. Lavandera, K. Faber, F. Niehaus, J. Eck, R. Oehrlein, A. Hafner, W. Kroutil, *Chem. Commun.* **2006**, *23*, 2402-2404.

<sup>27</sup> A. Weckbecker, W. Hummel, *Biocatal. Biotransform.* **2006**, *24*, 380-389.

<sup>28</sup> (a) V. B. Urlacher, R. D. Schmid, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 156-161; (b) J. B. van Beilen, W. A. Duetz, A. Schmid, B. Witholt, *Trends. Biotechnol.* **2003**, *21*, 170-177; (c) S. G. Burton, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 543-549.



**Esquema 4.** Representación general de una reacción catalizada por una monooxigenasa. Su = sustrato;  $\text{XH}_2/\text{X}$  = Cofactor reducido/oxidado

Las monooxigenasas son capaces de catalizar una amplia variedad de procesos de oxidación como reacciones de hidroxilación de alcanos, epoxidación de alquenos e incluso la oxidación de heteroátomos o la reacción de Baeyer-Villiger.<sup>29</sup> Aunque los mecanismos de reacción de las distintas monooxigenasas existentes difieren enormemente dependiendo del subtipo, el modo de activación del oxígeno es el mismo necesitando de un grupo prostético como agente reductor unido al biocatalizador que puede ser, bien un metal de transición (hierro o cobre) o bien un cofactor orgánico (pterinas o flavinas, Figura 4b), que a su vez es generalmente regenerado por un cofactor de nicotinamida.

### 1.3.3. Oxidasas

Se caracterizan por el uso del oxígeno molecular, el cual es reducido a peróxido de hidrógeno o agua para llevar a cabo la oxidación del correspondiente sustrato. Comparadas con las deshidrogenasas, este tipo de oxidorreductasas son mucho menos abundantes en la naturaleza.<sup>30</sup> De forma general, pueden emplear un amplio número de metales y cofactores que funcionan como mediadores de la transferencia de electrones desde el sustrato orgánico hasta el aceptor electrónico final que es el oxígeno molecular. En el caso de las oxidasas dependientes de flavina, el sustrato interacciona directamente con la forma oxidada de la flavina (FAD o FMN), la cual es reducida y reoxidada con oxígeno molecular, siendo este a su vez reducido formando peróxido de hidrógeno. Las oxidasas dependientes de metales funcionan con un mecanismo distinto pero generan de la misma forma peróxido de hidrógeno o agua a partir del oxígeno molecular.<sup>31</sup>

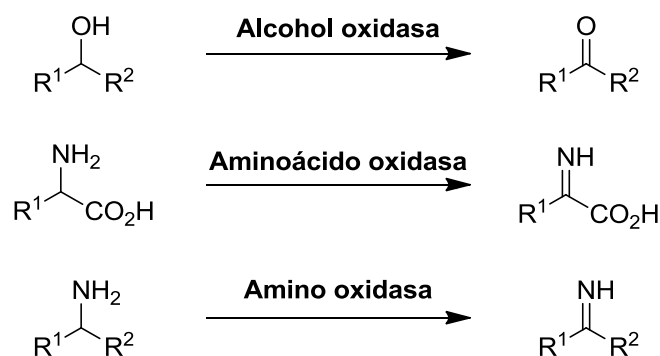
La función general de las oxidasas es la oxidación de los enlaces C-O y C-N, y se han clasificado en tres grandes grupos (Esquema 5).

<sup>29</sup> (a) G. de Gonzalo, M. W. Fraaije, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 403-415; (b) G. de Gonzalo, M. D. Mihovilovic, M. W. Fraaije, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2208-2231.

<sup>30</sup> E. W. Hellemond, N. G. H. Leferink, D. P. H. M. Heuts, M. W. Fraaije, W. J. H. van Berkel, *Adv. Appl. Microbiol.* **2006**, *60*, 17-54.

<sup>31</sup> N. J. Turner, *Chem Rev.* **2011**, *111*, 4073-4087.





**Esquema 5.** Oxidación de alcoholes, aminoácidos y aminas catalizadas por oxidasas

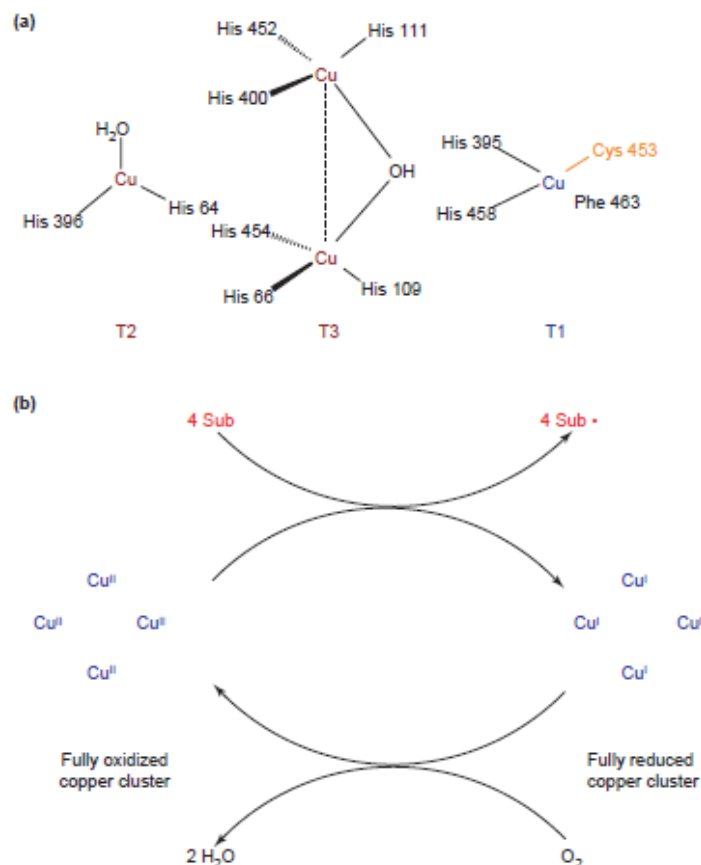
De esta forma podemos hablar de alcohol oxidasas que catalizan la oxidación de enlaces C-O, como por ejemplo las oxidasas de alcoholes alifáticos, las lactato oxidasas, las glicolato oxidasas y las galactosa oxidasas. Por otra parte se encuentran aquellas que oxidan enlaces C-N, que se pueden dividir en aminoácido oxidasas, como por ejemplo las L- o las D-aminoácido oxidasas, y en amino oxidasas como las monoamino oxidasas, las amino oxidasas dependientes de cobre, las peroxidasas, las tirosinasas y las lacasas. Ha de resaltarse que el uso de oxidasas para catalizar la oxidación de enlaces C-N a C=N es aún más interesante si cabe que la oxidación homóloga de enlaces C-O ya que evitaría el empleo de oxidantes muy agresivos los cuales suelen conllevar problemas de selectividad si la oxidación se lleva a cabo en presencia de otros grupos funcionales.

#### 1.3.4. Lacasas

Englobadas dentro de este último grupo de enzimas oxidativas, son consideradas un tipo de amino oxidasas dependientes de cobre (CAOs) y catalizan la oxidación de aminas y alcoholes a expensas de la reducción de O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O. Se trata de oxidasas no dependientes de flavina como la mayoría dentro de este grupo. Son glicoproteínas presentes en la naturaleza en plantas, hongos, insectos<sup>32</sup> y recientemente también encontradas en células procariotas.<sup>33</sup> Su función fisiológica es diferente en los distintos microorganismos en los que se están presentes, pero en todos ellos catalizan procesos de polimerización o despolimerización. Se trata de oxidaciones monoeléctricas de sustratos, por lo general fenoles y aminas alifáticas o aromáticas.

<sup>32</sup> K. J. Kramer, M. R. Kanost, T. L. Hopkins, H. Jiang, Y. C. Zhu, R. Xu, J. L. Kerwin, F. Turecek, *Tetrahedron* **2001**, 57, 385-392.

<sup>33</sup> H. Claus, *Arch. Microbiol.* **2003**, 179, 145-150.



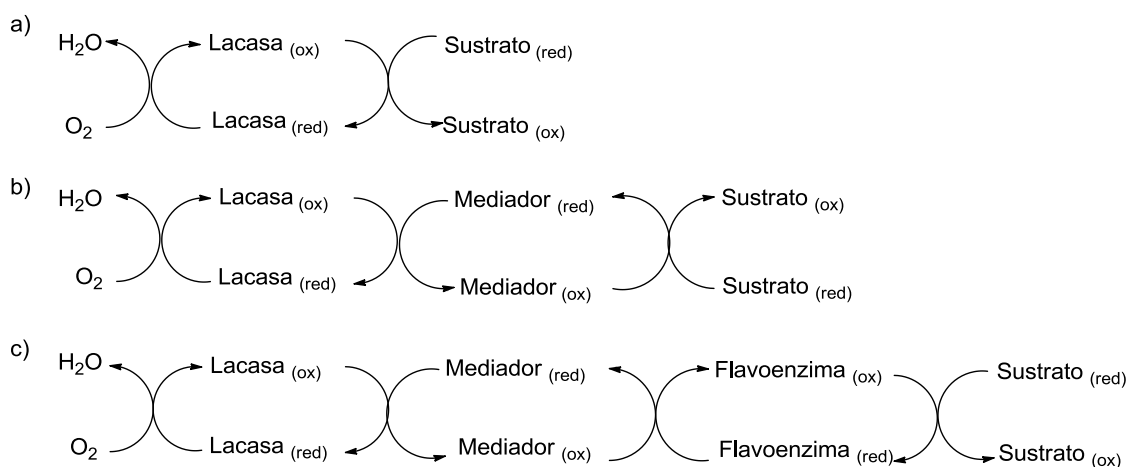
**Figura 5.** Estructura del centro activo y ciclo catalítico de las lacasas: a) Modelo para el clúster catalítico de la lacasa de *Trametes versicolor* formado por cuatro átomos de cobre. El de tipo 1 (T1) confiere el color azul característico a la proteína y es donde tiene lugar la oxidación del sustrato. Los de tipo 2 (T2) y tipo 3 (T3) forman un clúster trinuclear, y son los responsables de la reducción del oxígeno molecular y de la liberación de agua. (b) Representación esquemática del ciclo catalítico de una lacasa en el que se generan dos moléculas de agua por cada molécula de oxígeno reducida, seguida de la oxidación concomitante (en el Cu de tipo T1) de cuatro moléculas del sustrato a los correspondientes radicales. Sub = sustrato, Sub• = radical del sustrato oxidado (tomado de la referencia 3)

El proceso redox tiene lugar con la asistencia de un clúster de cuatro átomos de cobre en el centro activo del enzima, los cuales confieren el color azul de estos enzimas debido a la intensa absorción electrónica de los enlaces Cu-Cu (Figura 5a).<sup>34</sup> El proceso termina con la reducción de una molécula de oxígeno para formar dos moléculas de agua y la oxidación

<sup>34</sup> (a) K. Piontek, M. Antorini, T. Choinowski, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 37663-37669; (b) E. I. Solomon, U. M. Sundaram, T. E. Machonkin, *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2563-2605.

concomitante de cuatro moléculas del sustrato para producir cuatro radicales (Figura 5b).<sup>35</sup> Estos intermedios radicalarios pueden a su vez producir dímeros, oligómeros, o polímeros.<sup>3</sup>

Con fines sintéticos se han propuesto varios sistemas para llevar a cabo la oxidación de un sustrato de interés empleando lacasas (Esquema 6). El Esquema 6a representa el caso más simple en el cual el sustrato es oxidado directamente al correspondiente radical por la interacción directa con el clúster de cobre. Sin embargo, lo habitual es que el sustrato no sea capaz de ser oxidado por la lacasa, puesto que puede ser demasiado grande para difundir hasta el centro activo del enzima o porque tenga un potencial redox demasiado alto. Esto se ha solucionado con la adición al medio de “mediadores químicos” (LMS, “*laccase-mediator systems*”), que actúan como sustratos para la lacasa siendo oxidados a los correspondientes radicales, los cuales son capaces de interactuar con los compuestos de interés (Esquema 6b). Así, puesto que se conoce que los sustratos fisiológicos de estas oxidasas son residuos de tipo fenólico, se han utilizado análogos fácilmente accesibles para conseguir la oxidación de sustratos más variados.



**Esquema 6.** Representación de los ciclos oxidativos catalizados por lacasas, en ausencia (a) o en presencia (b y c) de mediadores químicos

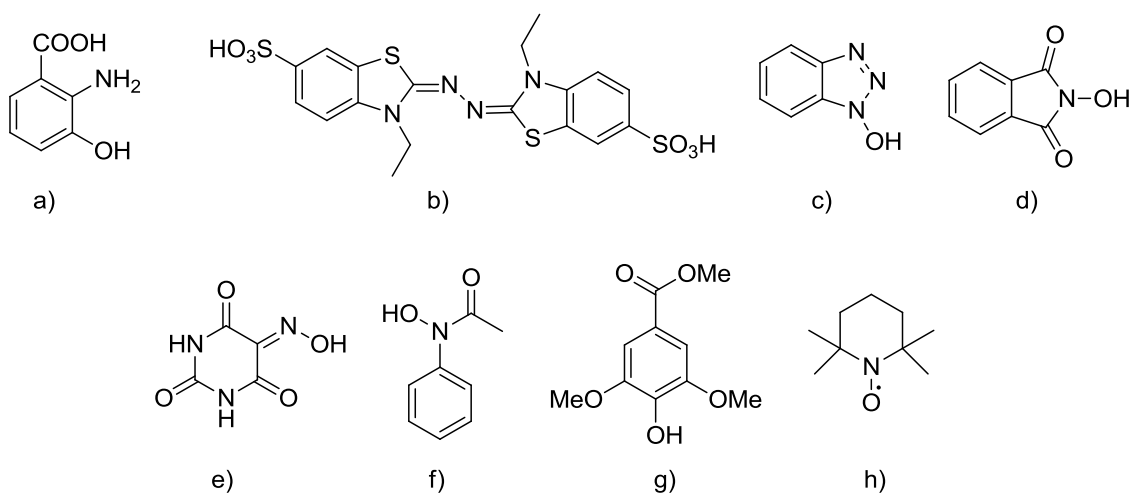
Además, existen ejemplos descritos de sistemas acoplados con lacasas como el descrito por Haltrich y colaboradores, donde el mediador oxida el cofactor flavina de una deshidrogenasa en un sistema enzimático acoplado para la regeneración in situ del FAD, y que es la encargada de realizar el proceso de oxidación deseado (Esquema 6c).<sup>36</sup>

Hasta el momento la principal aplicación industrial de las lacasas está en el campo textil, o en la industria del papel, imprenta y tinte, en la mayoría de los casos haciendo uso de un

<sup>35</sup> H. Claus, *Micron* **2004**, *35*, 93-96.

<sup>36</sup> R. Ludwig, M. Ozga, M. Zamocky, C. Peterbauer, K. D. Kulbe, D. Haltrich, *Biocatal. Biotransform.* **2004**, *22*, 97-104.

mediador químico, siguiendo el proceso detallado en el Esquema 6b. De este modo, en la producción de papel, se requiere la eliminación de la lignina de la madera, la cual puede ser catalizada por lacasas haciendo uso de un mediador químico, y que no tiene lugar en la ausencia de este. El primer mediador artificial descrito fue el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolidina-6-sulfónico (ABTS, Figura 6b) en 1990, habiéndose utilizado con éxito hasta la fecha más de un centenar de mediadores. Se ha comprobado que los mediadores más efectivos para la oxidación de la lignina son los heterociclos con grupos N-OH, especialmente el HBT (*N*-hidroxibenzotriazol, Figura 6c).<sup>37</sup>



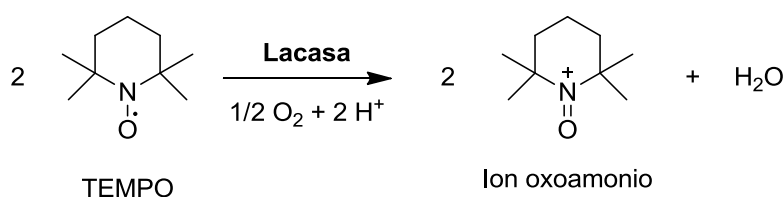
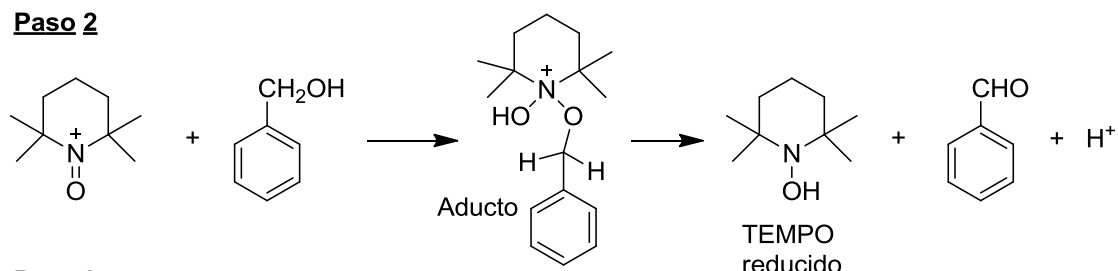
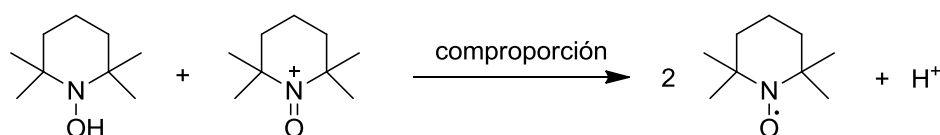
**Figura 6.** Ejemplos de mediadores químicos utilizados con lacasas. a) Ácido 3-hidroxiantranílico (HAA); b) ABTS; c) HBT; d) *N*-hidroxiftalimida; e) ácido violúrico (VLA); f) *N*-hidroxiacetanilida (NHA); g) éster metílico del ácido 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzoico (ácido siríngeo); h) 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxilo (TEMPO)

En procesos biocatalíticos se han hecho grandes avances en el empleo de las lacasas en transformaciones sintéticas, pudiendo ser aplicadas a la oxidación de alcoholes bencílicos, alílicos, propargílicos y alifáticos a los correspondientes aldehídos y cetonas, así como a la oxidación de aminas alílicas y alifáticas a las correspondientes iminas. En numerosos estudios se ha descrito que el mediador más efectivo para la mayoría de transformaciones químicas es el TEMPO (Figura 6h).<sup>3</sup>

El mecanismo propuesto para la oxidación de sustratos con el sistema lacasa/TEMPO es de tipo iónico y se ha representado a continuación para la reacción de oxidación del alcohol bencílico a benzaldehído (Esquema 7), siendo en realidad el oxidante el ión oxoamonio (el cual

<sup>37</sup> H. P. Call, H. P. I. Mucke, *J. Biotechnol.* **1997**, 53, 163-202.

funcionaría como mediador según el Esquema 6b), el cual es fácilmente generado a partir del TEMPO mediante la oxidación llevada a cabo por la lacasa (Paso 1).<sup>38</sup>

**Paso 1****Paso 2****Paso 3****Esquema 7.** Mecanismo para la oxidación del alcohol bencílico con el sistema lacasa/TEMPO

Siguiendo a esta oxidación inicial, tiene lugar un ataque nucleofílico del par de electrones libre del alcohol al ión oxoamonio formando un aducto. La desprotonación del mismo en  $\alpha$  al enlace bencílico, ya sea intra (por el N-O) o intermolecularmente (mediada por una base), genera la especie carbonílica (benzaldehído) y la forma reducida del TEMPO (Paso 2). Finalmente la comproporción entre esta forma y una molécula del ión oxoamonio regenera el TEMPO (Paso 3), completando así el ciclo catalítico.

Para otros mediadores se proponen diferentes mecanismos de transferencia de electrones, como para el ABTS, o de transferencia de un radical hidruro para los compuestos de tipo N-OH.<sup>39</sup>

En cuanto a las condiciones de reacción es conocido que, si bien las lacasas funcionan en medios acuosos como entorno natural, debido a la baja solubilidad de muchos compuestos orgánicos en agua, se han empleado con éxito mezclas bifásicas de una disolución tampón y un disolvente orgánico, condiciones que reproduciremos a lo largo de este Trabajo Fin de Máster. Además, se ha descrito con éxito el uso de cosolventes miscibles en agua, si bien la estabilidad del enzima se ve afectada por los disolventes orgánicos. Por ejemplo, la actividad de la lacasa de

<sup>38</sup> S. A. Tromp, I. Matijošytė, R. A. Sheldon, I. W. C. E. Arends, G. Mul, M. T. Kreutzer, J. A. Moulijn, S. de Vries, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 827-833.

<sup>39</sup> M. Fabbrini, C. Galli, P. Gentili, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *18*, 169-171.

*Poliporus pinsitus*, decrece sustancialmente a las 24 h cuando el enzima fue disuelto en una mezcla 1:1 de una disolución tampón con dioxano, isopropanol o acetonitrilo, aunque en presencia de etilenglicol se obtuvieron mejores resultados.<sup>40</sup>

Por último cabe destacarse, que si bien la inmovilización de los enzimas en un soporte sólido ha sido largamente estudiada con muy diversas clases de biocatalizadores,<sup>41</sup> las lacasas inmovilizadas descritas hasta la fecha presentan menores actividades, es por ello que la lacasa comercial procedente del hongo *Trametes versicolor* que vamos a utilizar a lo largo de esta investigación no se encuentra inmovilizada.

---

<sup>40</sup> F. d'Acunzo, A. M. Barreca, C. Galli, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *31*, 25-30.

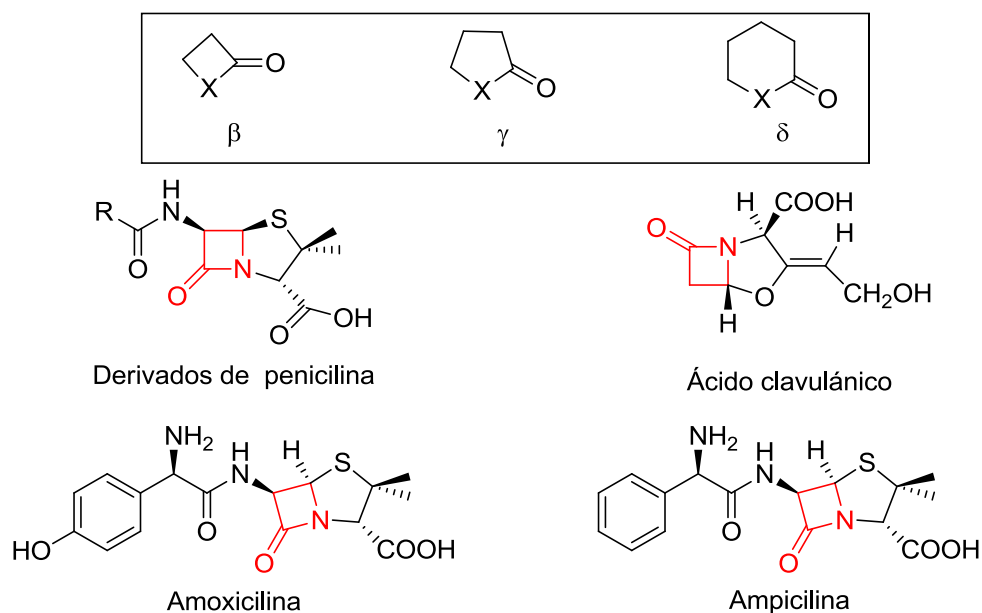
<sup>41</sup> Bibliografía reciente: (a) D. N. Tran, K. J. Balkus, *ACS Catal.* **2011**, *1*, 956-968; (b) U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 453-468; (c) R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289-1307.

## **ANTECEDENTES**





Las lactonas y las lactamas son heterociclos que presentan propiedades interesantes en Química Médica formando parte de compuestos más complejos estructuralmente con respuestas biológicas de gran interés. Estos derivados son ésteres o amidas cíclicas, diferenciándose en el número de átomos de carbono que poseen estos ciclos (parte superior de la Figura 7). Posiblemente los representantes más conocidos de estos grupos son las lactamas de 4 eslabones, o también conocidas como  $\beta$ -lactamas, las cuales dan nombre a los antibióticos betaláctámicos, englobando varias familias como pueden ser las penicilinas, las cefalosporinas y los carbapenemos (parte inferior de la Figura 7).



**Figura 7.** Ejemplos de antibióticos con la estructura de  $\beta$ -lactama coloreada en rojo. En la parte superior se indica la nomenclatura de lactonas (X= O) y lactamas (X= NH) seleccionadas en función del número de eslabones del ciclo

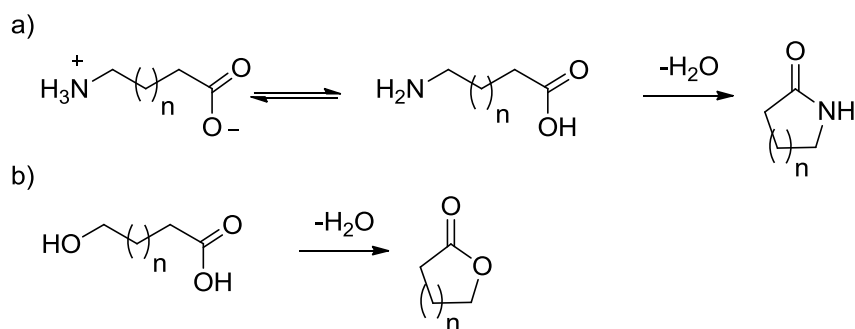
Por otro lado las lactonas de 5 o 6 eslabones como la  $\gamma$ -valerolactona o la  $\delta$ -caprolactona han demostrado ser derivados muy interesantes con aplicaciones como intermedios en la producción de biofuelos o de polímeros biodegradables.<sup>42</sup>

<sup>42</sup> (a) D. M. Alonso, S. G. Wettstein, J. A. Dumesic, *Green Chem.* **2013**, *15*, 584-595; (b) P. Azadi, R. Carrasquillo-Flores, Y. J. Pagán-Torres, E. I. Gürbüz, R. Farnood, J. A. Dumesic, *Green Chem.* **2012**, *14*, 1573-1576; (c) L.-S. Wang, H.-C. Chen, Z.-C. Xiong, X.-B. Pang, C.-D. Xiong, *Macromol. Mater. Eng.* **2010**, *295*, 381-385; (d) F. Fay, E. Renard, V. Langlois, I. Linossier, K. Vallee-Rehel, *Eur. Polym. J.* **2007**, *43*, 4800-4813.

En este Trabajo Fin de Máster nos hemos centrado en la preparación de heterociclos de 6 miembros, los cuales junto a los de cinco miembros, son los que poseen las estructuras más estables al tener una menor tensión de anillo. Para ello se estudiará en detalle la reactividad de lacasas y alcohol deshidrogenasas en la oxidación quimioselectiva de aminoalcoholes.

## 2.1. MÉTODOS DE SÍNTESIS DE LACTAMAS Y LACTONAS

El elevado interés de estos heterociclos como precursores sintéticos de numerosos compuestos con interés en Química Médica ha motivado el desarrollo de numerosos métodos de síntesis, los cuales en su mayoría están basados en una ciclación intramolecular de aminoácidos para dar lugar a las lactamas (parte superior de la Figura 8) o de hidroxiaácidos para sintetizar las lactonas (parte inferior de la Figura 8). Desafortunadamente, estas reacciones de condensación suelen tener como principales inconvenientes su baja economía atómica, la necesidad de tediosos procesos de aislamiento y la posibilidad de epimerización o racemización dependiendo del medio de reacción.<sup>43</sup>



**Esquema 8.** Síntesis de: a) lactamas por ciclación intramolecular de  $\omega$ -aminoácidos; y b) de lactonas por ciclación intramolecular de  $\omega$ -hidroxiaácidos

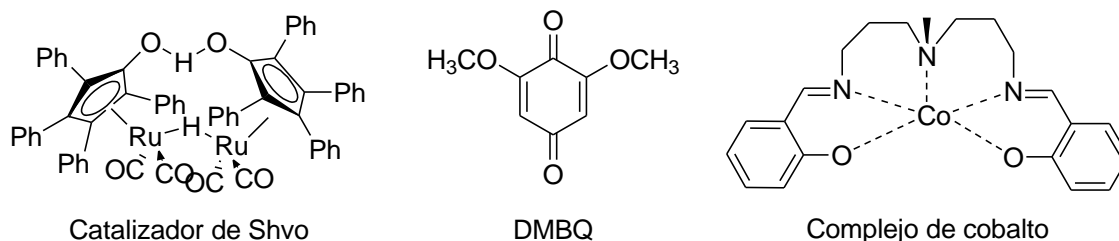
### 2.1.1. Métodos oxidativos no biocatalíticos para la síntesis de lactamas

Basados en la aproximación de oxidación selectiva que se seguirá en este trabajo, cabe destacar que este tipo de procesos han sido ya descritos empleando complejos metálicos como catalizadores.<sup>44</sup> Esta metodología presenta como ventajas una gran eficiencia atómica así como unas condiciones más suaves de reacción. Así, en un primer lugar Murahashi y Naota realizaron

<sup>43</sup> (a) E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Commun.* **2005**, 1164-1167; (b) C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852; (c) C. Nájera, *Synlett* **2002**, 1388-1403.

<sup>44</sup> (a) C. Chen, S. H. Hong, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 20-26; (b) C. Gunanathan, Y. Ben-David, D. Milstein, *Science* **2007**, *317*, 790-792.

la síntesis de lactamas con rendimientos moderados a partir de 1,4- y 1,5-aminoalcoholes por oxidación y ciclación interna empleando el complejo de rutenio  $\text{RuH}_2(\text{PPh}_3)_4$  como catalizador y como aceptor de hidrógeno la 4-fenilbut-3-en-2-ona.<sup>45</sup> Posteriormente, Fujita, Yamaguchi y colaboradores describieron la síntesis de lactamas empleando un complejo de rodio. Así, utilizando  $[\text{Cp}^*\text{RhCl}_2]_2$  y  $\text{K}_2\text{CO}_3$  en acetona, que además de disolvente actuó como aceptor de hidrógeno, se sintetizaron diversas lactamas benzofusionadas de cinco, seis, y siete miembros con buenos rendimientos.<sup>46</sup> Más recientemente, Bäckvall y colaboradores desarrollaron la oxidación de 1,4-, 1,5- y 1,6-aminoalcoholes *N*-protegidos mediada por el catalizador de Shvo, obteniendo las correspondientes lactamas de cinco, seis o siete eslabones con rendimientos entre moderados y muy altos.<sup>47</sup> El sistema catalítico permitió una transferencia electrónica desde el catalizador al oxidante (aire), aunque fue necesaria la presencia de mediadores de transferencia electrónica como la 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona (DMBQ) y un complejo de cobalto, los cuales condujeron el proceso redox (Figura 8).<sup>48</sup>



**Figura 8.** Estructuras del catalizador de Shvo y de los mediadores de transferencia electrónica utilizados para la oxidación de  $\omega$ -aminoalcoholes a las correspondientes lactamas

El mecanismo de reacción<sup>49</sup> está basado en la oxidación del correspondiente aminoalcohol **I** catalizada por el metal de transición, teniendo lugar la formación de un aminoaldehído **II**, el cual intramolecularmente cicla para generar el correspondiente hemiaminal **III** (Esquema 9). Llegados a este punto, el sistema puede evolucionar a través de dos posibles rutas:

<sup>45</sup> T. Naota, S.-I. Murahashi, *Synlett* **1991**, 693-694.

<sup>46</sup> (a) K. Fujita, Y. Takahashi, M. Owaki, K. Yamamoto, R. Yamaguchi, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2785-2788;

(b) K. Fujita, K. Yamamoto, R. Yamaguchi, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2691-2694.

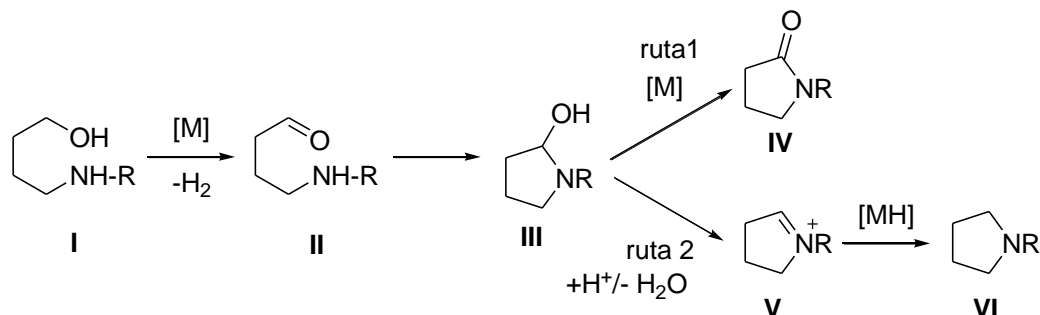
<sup>47</sup> B. P. Babu, Y. Endo, J.-E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 11524-11527.

<sup>48</sup> (a) Y. Endo, J.-E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 12596-12601; (b) J. S. M. Samec, A. H. Éll, J.-E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 2327-2334; (c) J. S. M. Samec, A. H. Éll, J.-E. Bäckvall, *Chem. Commun.* **2004**, 2748-2749; (d) G. Csizernyik, A. H. Éll, L. Fadini, B. Pugin, J.-E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1657-1662; (e) A. H. Éll, J. S. M. Samec, C. Brasse, J.-E. Bäckvall, *Chem. Commun.* **2002**, 1144-1145; (f) J. Wöltinger, J.-E. Bäckvall, A. Zsigmond, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1460-1467; (g) J.-E. Bäckvall, R. B. Hopkins, H. Grennberg, M. M. Mader, A. K. Awasthi, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5160-5166.

<sup>49</sup> A. Nova, D. Balcells, N. D. Schley, G. E. Dobereiner, R. H. Crabtree, O. Eisenstein, *Organometallics* **2010**, *29*, 6548-6558.

- Una nueva oxidación del hemiaminal **III** que genere la lactama deseada **IV**.

- Una reacción no deseada como es la deshidratación del hemiaminal **III** genera un catión de tipo iminio **V** que sufre un proceso de hidrogenación para dar lugar a la amina cíclica **VI**.



**Esquema 9.** Rutas propuestas para la obtención de la lactama o de la amina cíclica en el proceso de oxidación de los  $\omega$ -aminoalcoholes *N*-protegidos

Los autores observaron que la segunda ruta está favorecida cuando los aminoalcoholes no presentan ningún grupo protector en el resto amino, por lo que llevaron a cabo la protección del mismo con grupos electrón-atradores, obteniendo en esos casos la formación preferente de las lactamas **IV**. Como se mostrará más adelante, esta observación será tenida en consideración en la ejecución de este Trabajo Fin de Máster.

### 2.1.2. Métodos enzimáticos para la síntesis de lactamas

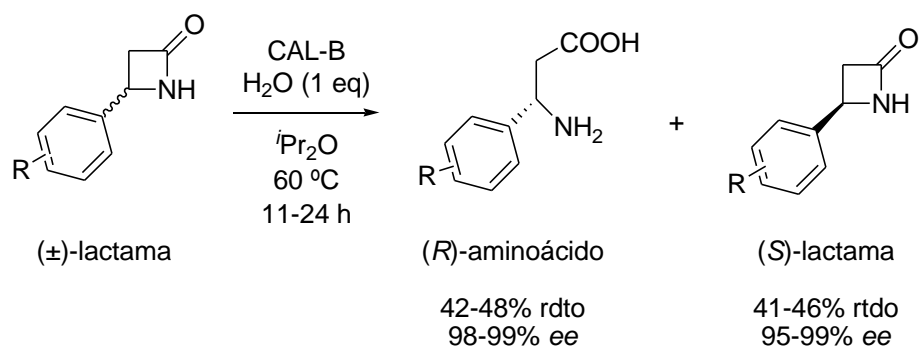
La Biocatálisis representa una herramienta muy útil para la preparación de lactamas a través del empleo de enzimas como son las hidrolasas. Así, cabe destacar que el uso de una clase de esta familia como son las lipasas, ha permitido la síntesis enantioselectiva de lactamas con gran eficacia a través de procesos de resolución clásica a partir de los correspondientes racematos. Es por ello que a continuación se describen brevemente algunos métodos de síntesis biocatalítica para la preparación de este tipo de compuestos.

Existen numerosos ejemplos de resoluciones cinéticas de lactamas y lactonas usando hidrolasas o esterasas, si bien y debido a su importancia, la resolución de  $\beta$ -lactamas racémicas ha recibido especial atención.<sup>50</sup> Así, se han descrito distintos ejemplos de resolución de mezclas racémicas, ya sea modificando directamente el grupo amida de la lactama, o bien otros grupos funcionales cercanos a la amida como puedan ser ésteres en reacciones de hidrólisis o alcoholes en reacciones de acilación. Algunos de estos ejemplos se comentan a continuación.

<sup>50</sup> E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3998-4035.

Diversas hidrolasas han llevado a cabo resoluciones de  $\beta$ -lactamas racémicas, principalmente a través de procesos de resolución de amidas empleando lipasas, las cuales manifiestan una actividad inusual de amidasa, enzimas que permiten transformar amidas en ácidos carboxílicos.<sup>51</sup> De esta manera se han conseguido obtener por un lado  $\beta$ -lactamas ópticamente activas que permanecen inalteradas, y por otro  $\beta$ -aminoácidos que son compuestos de gran importancia como profármacos ya que son productos de alto valor añadido como intermedios en la síntesis de alcaloides o agentes antitumorales entre otros.

Los primeros ejemplos de este tipo de resoluciones fueron desarrollados empleando como materiales de partida 4-aryl- $\beta$ -lactamas, obteniéndose buenas conversiones y rendimientos para la formación de los correspondientes (*R*)- $\beta$ -aminoácidos y de las (*S*)- $\beta$ -lactamas en las reacciones de hidrólisis catalizadas por la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B, Esquema 10).<sup>52</sup>



a: R= H; b: R= 4-Me; c: R= 2-Cl; d: R= 3-Cl; e: R= 4-Cl; f: R= 4-Br; g: R= 4-F

**Esquema 10.** Resolución cinética de lactamas racémicas por hidrólisis catalizada por la CAL-B y un único equivalente de H<sub>2</sub>O

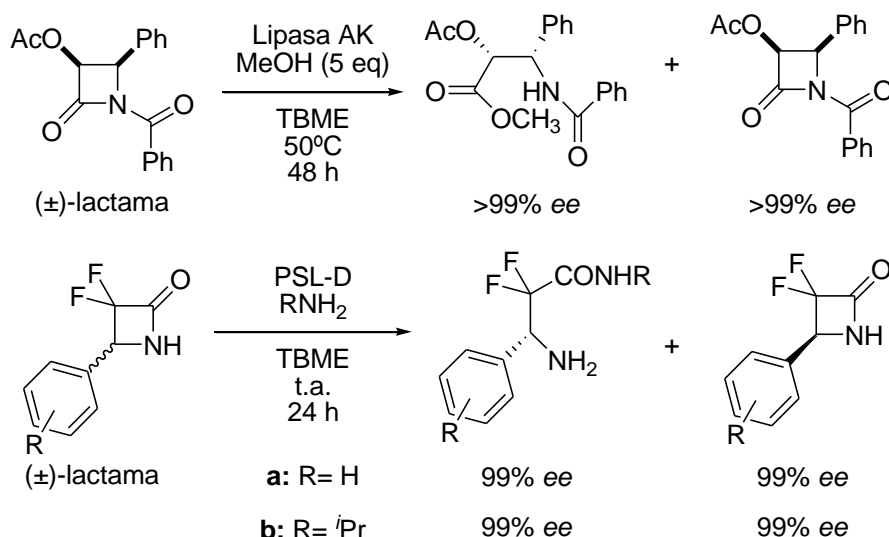
Alternativamente, si la apertura del anillo betalactámico tiene lugar empleando nucleófilos distintos al agua como son los alcoholes, amoníaco o aminas, se puede acceder a los correspondientes ésteres o amidas a través de procesos de metanólisis,<sup>53</sup> amonólisis o aminólisis,<sup>54</sup> respectivamente. Así, la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens* ha permitido catalizar de manera efectiva procesos de metanólisis, mientras que la de *Pseudomonas cepacia* soportada en diatomita (PSL-D) fue empleada exitosamente utilizando amoníaco o aminas como nucleófilos (Esquema 11).

<sup>51</sup> E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 4504-4523.

<sup>52</sup> E. Forró, T. Paál, G. Tasnádi, F. Fulop, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, 917-923.

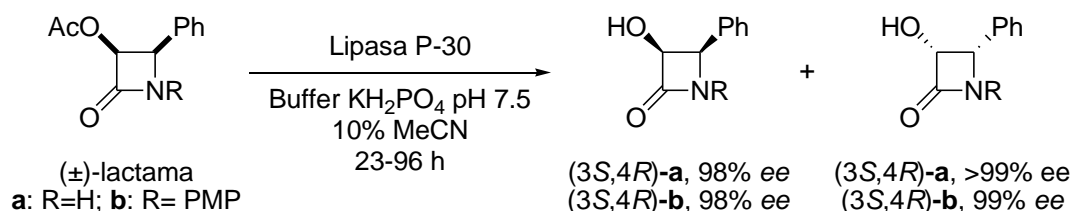
<sup>53</sup> R. Brieva, J. Z. Crich, C. J. Sih, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 1068-1075.

<sup>54</sup> X.-G. Li, M. Lahitie, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, 19, 1857-1861.



**Esquema 11.** Resolución cinética de  $\beta$ -lactamas a través de procesos de metanólisis catalizados por la lipasa AK, o de amonólisis o aminólisis empleando la PSL-D

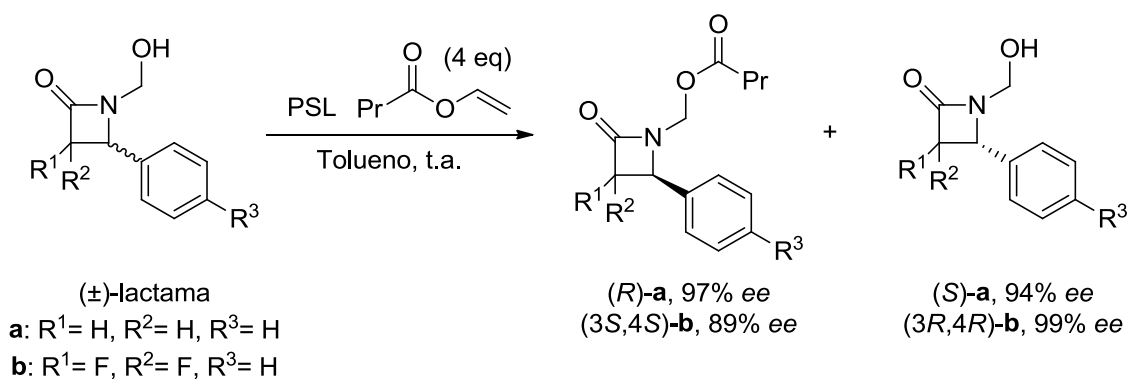
Por otro lado, a veces las modificaciones no suceden directamente sobre el grupo amida de la lactama, sino que se lleva a cabo la transformación de algún grupo funcional presente en el anillo de  $\beta$ -lactama. Así, Brieva y colaboradores realizaron procesos de resolución cinética de 3-acetoxi-4-aryl- $\beta$ -lactamas, intermedios clave en la síntesis del Taxol, a través de la hidrólisis del grupo acetato, siendo la lipasa P-30 el enzima que permitió acceder a los correspondientes alcoholes y ésteres con mejores selectividades (Esquema 12).<sup>53</sup>



**Esquema 12.** Resolución cinética de  $\beta$ -lactamas mediante la hidrólisis de un grupo acetilo unido al anillo lactámico

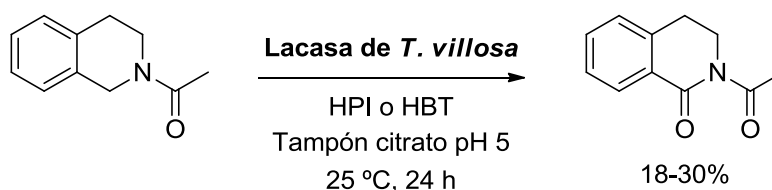
Finalmente, también se ha descrito la resolución remota de *N*-hidroximetil- $\beta$ -lactamas, donde la transformación sucede en una posición lejana al centro estereogénico, como en el caso que se muestra en el Esquema 13, donde se llevó a cabo la acilación del grupo alcohol empleando la PSL como biocatalizador y el butanoato de vinilo como donador de acilo, obteniendo las  $\beta$ -lactamas con excesos enantioméricos entre altos y excelentes.<sup>55</sup>

<sup>55</sup> (a) X.-G. Li, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2468-2472; (b) E. Forro, F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 2351-2358.



**Esquema 13.** Resolución cinética de *N*-hidroximetil-β-lactamas empleando butanoato de vinilo como donador de acilo y PSL como biocatalizador en tolueno

En cuanto al uso de lacasas aplicado a la síntesis de lactamas, existe en la bibliografía solamente un precedente descrito por Galli y colaboradores en el cual, partiendo de una amina cíclica protegida como acetamida, y utilizando la lacasa de *Trametes villosa* junto con HPI (*N*-hidroxifitalimida) o HBT, se pudo realizar la oxidación de la misma en la posición bencílica para obtener la lactama correspondiente, aunque con conversiones por debajo del 30% (Esquema 14).<sup>56</sup>



**Esquema 14.** Síntesis de una lactama por oxidación bencílica de una amina cíclica empleando la lacasa de *Trametes villosa*

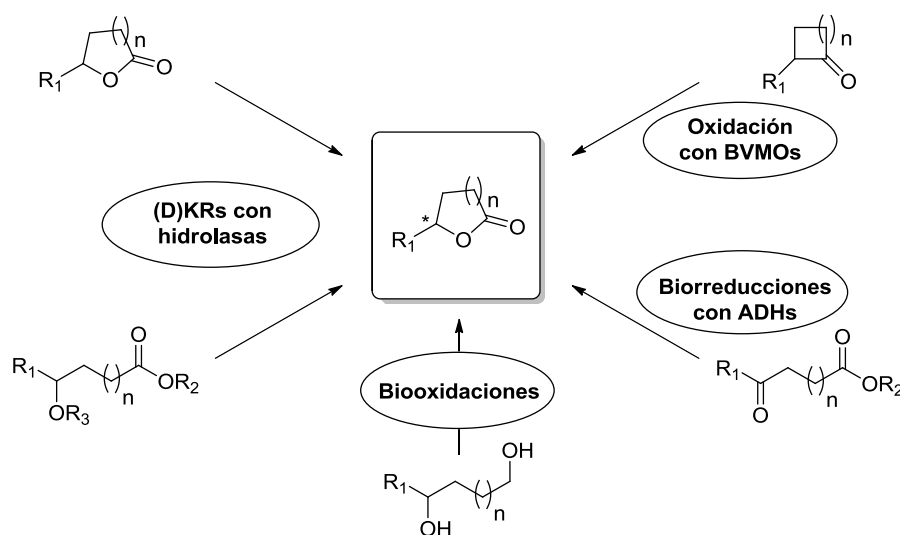
### 2.1.3. Métodos enzimáticos para la síntesis de lactonas

Puesto que la síntesis de lactonas a través de métodos químicos no biocatalíticos por oxidación de los dioles correspondientes ha sido ampliamente estudiada,<sup>48a,57</sup> centraremos la discusión en este punto en los métodos enzimáticos generales para la síntesis de lactonas, para posteriormente discutir un trabajo en el que se han aplicado lacasas para la obtención de estos derivados.

<sup>56</sup> A. Coniglio, C. Galli, P. Gentili, R. Vadalà, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *50*, 40-49.

<sup>57</sup> Ejemplos recientes: (a) K.-N. T. Tseng, J. W. Kampf, N. K. Szymczak, *Organometallics* **2013**, *32*, 2046-2049; (b) J. Zhang, E. Balaraman, G. Leitus, D. Milstein, *Organometallics* **2011**, *30*, 5716-5724; (c) J. M. Hoover, S. S. Stahl, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16901-16910; (d) T. Buntara, S. Noel, P. H. Phua, I. Melian-Cabrera, J. G. de Vries, H. J. Heeres, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7083-7087.

Un resumen de las aproximaciones enzimáticas aplicadas hasta la fecha para obtener lactonas (enantioenriquecidas) se encuentra recogido en el Esquema 15. Así, se puede mencionar la utilización de Baeyer-Villiger monooxigenasas sobre las correspondientes cetonas cíclicas,<sup>58</sup> la resolución cinética de las correspondientes lactonas racémicas<sup>59</sup> o de los hidroxiésteres precursores<sup>60</sup> catalizada por lipasas seguida de su ciclación espontánea o en medio básico. Puesto que en las resoluciones cinéticas se obtiene nada más que un 50% del producto deseado enantiopuro, se han desarrollado ejemplos en los que la resolución cinética se ha acoplado con una racemización *in situ* del hidroxiéster catalizada por un metal, y así se obtienen los compuestos precursores de las lactonas enantioenriquecidos con un rendimiento cuantitativo.<sup>61</sup> Otra manera de obtener selectivamente las lactonas con altas conversiones ha sido realizando la biorreducción con alcohol deshidrogenasas de los cetoésteres o cetoácidos proquirales seguida de una posterior ciclación.<sup>62</sup>



**Esquema 15.** Aproximaciones generales para obtener lactonas utilizando biocatalizadores

Una última aproximación consiste en la biooxidación de los correspondientes 1,4-, 1,5- o 1,6-dioles. Así, se ha empleado para este fin la alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo (HLADH), aunque las selectividades obtenidas fueron muy bajas.<sup>63</sup> En este punto hay que reseñar que las lacasas han permitido la oxidación regioselectiva de dioles conduciendo en el propio medio de reacción a las correspondientes lactonas racémicas con excelentes

<sup>58</sup> (a) J. Liu, Z. Li, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 908-911; (b) C. Szolkowy, L. D. Eltis, N. C. Bruce, G. Grogan, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1208-1217.

<sup>59</sup> J. van Buijtenen, B. A. C. van As, M. Verbruggen, L. Roumen, J. A. J. M. Vekemans, K. Pieterse, P. A. J. Hilbers, L. A. Hulshof, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7393-7398.

<sup>60</sup> A. Kamal, M. Sandbhor, A. A. Shaik, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 1575-1580.

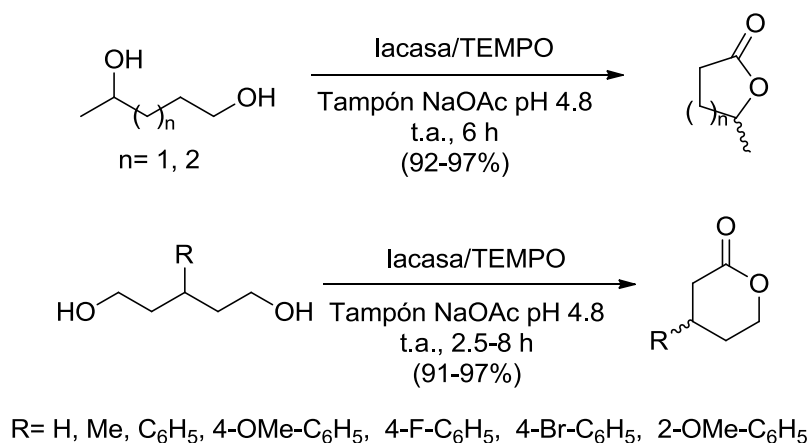
<sup>61</sup> A.-B. L. Fransson, L. Borén, O. Pàmies, J.-E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2582-2587.

<sup>62</sup> (a) T. Fischer, J. Pietruszka, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 2521-2530; (b) M. Korpak, J. Pietruszka, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 1420-1424.

<sup>63</sup> F. Boratyński, G. Kielbowicz, C. Wawrzeńczyk, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *65*, 30-36.



conversiones. Recientemente en nuestro grupo de investigación se ha puesto a punto un sistema oxidativo que se utilizará a lo largo de esta memoria, formado por la lacasa de *Trametes versicolor* y el mediador TEMPO.<sup>64</sup> Este sistema ha sido capaz de oxidar regioselectivamente alcoholes primarios en presencia de alcoholes secundarios en la misma molécula, permitiendo acceder, entre otros, a la  $\gamma$ -valerolactona y la  $\delta$ -caprolactona con un 97 y un 92% de rendimiento aislado respectivamente tras 6 horas de reacción en una disolución tampón de acetato de sodio (NaOAc) a pH 4.8 (parte superior del Esquema 16).



**Esquema 16.** Oxidación catalítica de dioles usando el sistema lacasa/TEMPO en medio acuoso para la preparación de lactonas

Además cuando el sistema lacasa/TEMPO se empleó en la oxidación de 1,5-pentanodiolos, fue posible la oxidación selectiva de uno solo de los grupos hidroxilo, que tras posterior ciclación intramolecular condujo a las correspondientes  $\delta$ -lactonas con rendimientos aislados muy altos (parte inferior del Esquema 16). Por otro lado, además de emplear la lacasa de *Trametes versicolor*, fue posible desarrollar el proceso enzimático con la lacasa de *Trametes* sp. inmovilizada como un agregado enzimático entrecruzado (*cross-linked enzyme aggregate*, CLEA) lo cual permitió acceder de una manera sencilla a las lactonas a partir de los 1,5-pentanodiolos sustituidos en la posición 3 con sustituyentes alifáticos o aromáticos con rendimientos entre el 89 y el 92%, siendo posible la reutilización del enzima sin pérdida aparente de su actividad tras tres ciclos de reacción.

Así pues, basados en los excelentes resultados mostrados por el sistema catalítico formado por la lacasa de *Trametes versicolor* y el mediador TEMPO para la síntesis selectiva de lactonas, nos hemos propuesto llevar a cabo en este Trabajo Fin de Máster la extensión de esta

<sup>64</sup> A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, S. Kanbak-Aksu, R. A. Sheldon, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, 354, 3405-3408.

metodología de oxidación a una familia de aminoalcoholes, con el fin de obtener las correspondientes lactonas o lactamas de un modo quimioselectivo.

## **OBJETIVOS**



En la introducción y en los antecedentes de este trabajo se ha puesto de manifiesto la importancia de las oxidorreductasas aplicadas en síntesis orgánica, las cuales permiten desarrollar procesos muy selectivos y medioambientalmente más benignos que otros tipos de catalizadores más convencionales.

Basados en los excelentes resultados obtenidos previamente en nuestro grupo de investigación para la oxidación de dioles empleando el sistema catalítico formado por una lacasa de *Trametes versicolor* y el TEMPO,<sup>64</sup> nos hemos planteado extender esta metodología a una familia de 1,5-aminoalcoholes, por lo que los objetivos generales de esta investigación son los siguientes:

- Diseñar un método de síntesis general para la preparación de diversos 1,5-aminoalcoholes que puedan ser sustratos adecuados para los procesos de oxidación selectiva mediados por lacasas.
- Desarrollar métodos analíticos adecuados para el seguimiento de las reacciones enzimáticas.
- Estudiar el comportamiento de lacasas en los procesos de oxidación selectiva de 1,5-aminoalcoholes, atendiendo a la distinta reactividad de los sustratos.
- Observar el efecto que tienen diferentes grupos protectores en el resto amino así como una sustitución en la posición 3 en estos procesos de oxidación.
- Dar una explicación mecanística de los resultados obtenidos para la preparación de las correspondientes lactonas y/o lactamas



## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

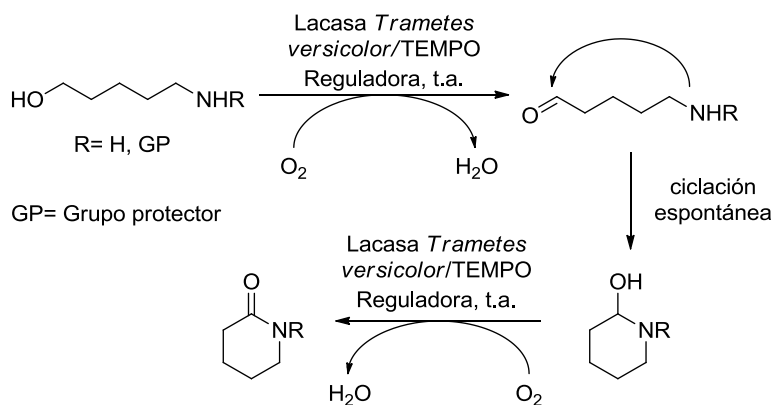




En la Introducción de este trabajo se ha puesto de manifiesto la importancia de la catálisis utilizando oxidorreductasas en síntesis orgánica, así como el interés en la preparación de lactonas y lactamas puesto que forman parte del esqueleto principal de numerosos precursores de compuestos con interés químico y farmacológico.

Como se ha comentado anteriormente nuestro grupo de investigación ha puesto a punto recientemente una metodología de oxidación selectiva de dioles empleando una lacasa comercial en combinación con TEMPO como sistema catalítico oxidante, y aprovechando la facilidad de los heterociclos de cinco y seis eslabones para ciclar intramolecularmente, se ha llevado a cabo la preparación de una serie de lactonas con rendimientos muy altos.<sup>64</sup>

En este momento hemos decidido centrarnos en el estudio de la oxidación selectiva de aminoalcoholes, y en concreto de la familia de los 1,5-aminoalcoholes los cuales generarían, en un principio, las correspondientes lactamas de seis miembros. Este proceso estaría basado en la oxidación quimioselectiva del alcohol al aldehído, formándose el correspondiente hemiaminal que por posterior oxidación daría lugar a la formación de la lactama como se detalla en el Esquema 17. Basados en las observaciones de Bäckvall y colaboradores en la oxidación quimioselectiva de aminoalcoholes,<sup>47</sup> se estudiará la influencia de la sustitución en el resto amino, puesto que estos autores pusieron de manifiesto la formación de productos secundarios cuando se emplearon aminoalcoholes con el grupo amino desprotegido.



**Esquema 17.** Mecanismo propuesto para la formación de las  $\delta$ -lactamas a partir de 1,5-aminoalcoholes empleando el sistema lacasa/TEMPO

#### 4.1. 5-AMINOPENTAN-1-OL Y DERIVADOS: SÍNTESIS Y REACTIVIDAD CON EL SISTEMA LACASA/TEMPO

Por simplicidad se comenzó este estudio de oxidación quimioselectiva con el 5-aminopentán-1-ol (**1**) como sustrato modelo ya que es un compuesto comercial y de bajo coste económico, extendiéndolo posteriormente a diferentes aminoalcoholes *N*-protegidos, los cuales habrían de ser sintetizados previamente.

##### 4.1.1. Reactividad del 5-aminopentán-1-ol (**1**)

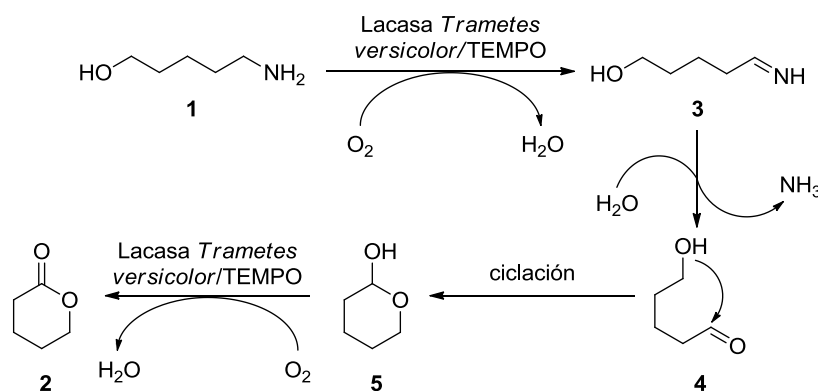
El aminoalcohol **1** se trató con el sistema formado por el TEMPO (30% mol) y la lacasa de *Trametes versicolor* en una disolución reguladora citrato 50 mM de pH 5. Inesperadamente, se observó el mismo resultado que el obtenido a partir del correspondiente 1,5-pentanodiol, formándose la  $\delta$ -valerolactona (Esquema 18).



**Esquema 18.** Tratamiento del aminoalcohol **1** con el sistema formado por la lacasa de *Trametes versicolor* y el TEMPO, a temperatura ambiente y en una disolución reguladora de citrato a pH 5

Este resultado indica que, al menos para el aminoalcohol **1**, el sistema lacasa/TEMPO empleado es capaz de realizar la oxidación quimioselectiva del grupo amino hacia la imina **3** la

cual, en medio acuoso, se hidroliza formando el correspondiente aldehído **4** (Esquema 19). Una ciclación intramolecular en el medio de reacción por ataque nucleofílico del alcohol libre genera el hemiacetal **5**, que tras una segunda oxidación daría lugar a la lactona **2**.



**Esquema 19.** Mecanismo propuesto para la formación de la  $\delta$ -valerolactona empleando el sistema lacasa/TEMPO para la oxidación quimioselectiva del 5-aminopentan-1-ol

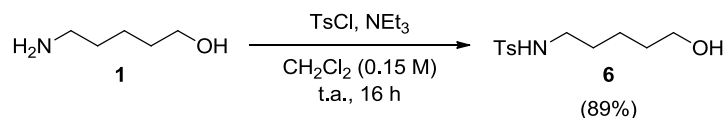
Este resultado, a pesar de no ser el esperado, es muy destacable puesto que en la literatura solamente hay dos ejemplos previos en los que se ha conseguido la oxidación de una amina en presencia de un alcohol en el medio de reacción o en la misma molécula.<sup>65</sup>

Puesto que Bäckvall y colaboradores observaron una influencia muy marcada en la oxidación de este tipo de compuestos dependiendo del grupo protector del resto amino,<sup>47</sup> decidimos realizar la síntesis de varios compuestos *N*-protegidos y emplearlos con nuestro sistema de oxidación lacasa/TEMPO.

#### 4.1.2. Síntesis química y reactividad del 5-*N*-tosilaminopentan-1-ol (**6**)

Puesto que en dicho trabajo se determinó que la protección con grupos electrón-atractores favorecía la formación de las correspondientes lactamas, se protegió quimioselectivamente el aminoalcohol **1** con un grupo tosilo (Ts) haciéndolo reaccionar con 1 equivalente de cloruro de tosilo en presencia de 1.5 equivalentes de trietilamina como base (Esquema 20), evitándose de esta manera la reacción por el grupo hidroxilo y la ditosilación en el resto amino. Así, el derivado tosilado **6** se obtuvo con un rendimiento del 89% tras una sencilla purificación por columna en gel de sílice.

<sup>65</sup> (a) S. Desjardins, G. Jacquemot, S. Canesi, *Synlett* **2012**, 1497-1500; (b) J. Srogl, S. Voltrova, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 843-845.



**Esquema 20.** Síntesis química del aminoalcohol **6** protegido con el grupo tosilo

Una vez sintetizado, se procedió a hacerlo reaccionar con el sistema lacasa/TEMPO ya descrito. Puesto que es conocido que parámetros como la temperatura, el pH del medio, la concentración, la presión de oxígeno, la presencia de un cosolvente orgánico o el tipo de reguladora pueden influir en las reacciones con lacasas, se decidió realizar una serie de pruebas con este sustrato cambiando varias condiciones a pequeña escala (Tabla 2). En todos los casos se emplearon 0.3 equivalentes de TEMPO y las reacciones duraron 18 h.

**Tabla 2.** Biooxidación con el sistema lacasa/TEMPO del aminoalcohol tosilado **6** en distintas condiciones de reacción

$$\text{TsHN}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH} \xrightarrow[\text{18 h}]{\text{Lacasa Trametes versicolor/TEMPO}} \text{Hemiaminal (7)} \xrightarrow{\text{deshidratación}} \text{Piridina (8)}$$

Entrada	T (°C)	Reguladora (pH; mL)	Cosolvente (mL)	O <sub>2</sub> <sup>a</sup>	7 (%) <sup>b</sup>
1	20	Citrato <sup>c</sup> (5; 1.95)	--	Sí	17
2	20	Tris <sup>d</sup> (6.5; 1.95)	--	Sí	4
3	20	Citrato <sup>c</sup> (5; 1.95)	TBME (1.95)	Sí	45
4	20	Tris <sup>d</sup> (6.5; 1.95)	TBME (1.95)	Sí	14
5	40	Citrato <sup>c</sup> (5; 1.95)	--	Sí	87
6	40	Tris <sup>d</sup> (6.5; 1.95)	--	Sí	4
7	40	Citrato <sup>c</sup> (3.5; 1.95)	--	Sí	12
8	40	Citrato <sup>c</sup> (5; 1.95)	TBME (2.90)	Sí	95
9	40	Citrato <sup>c</sup> (5; 0.65)	TBME (0.65)	Sí	91
10	40	Citrato <sup>c</sup> (5; 0.65)	Tolueno (0.65)	Sí	84
11	40	Citrato <sup>c</sup> (5; 1.95)	TBME (1.95)	No	13

<sup>a</sup> Sí: Se corresponde con un sistema abierto usando un globo de oxígeno para burbujear la disolución. No: Reacción llevada a cabo en un tubo sellado.

<sup>b</sup> Conversiones calculadas por <sup>1</sup>H-RMN del crudo de reacción.

<sup>c</sup> Disolución reguladora de citrato 50 mM de pH 5.

<sup>d</sup> Disolución reguladora de Tris:HCl 200 mM de pH 6.5.

En un principio se optó por emplear dos medios de reacción diferentes para ver la influencia de la reguladora y del pH. Así, se realizaron las reacciones con una reguladora citrato a pH 5 y con otra Tris:HCl a pH 6.5, a una temperatura de 20 °C burbujeadando oxígeno molecular (O<sub>2</sub>) en el medio de reacción, observándose en los espectros de los crudos de reacción de <sup>1</sup>H-RMN la formación exclusiva del hemiaminal **7** debida a la oxidación del alcohol al aldehído,

seguido posteriormente de un ataque nucleofílico de la amina protegida al grupo carbonilo. Como se puede observar en las entradas 1 y 2, se obtuvieron mejores conversiones con el tampón citrato que con la reguladora de Tris·HCl.

A continuación, se estudió el efecto de utilizar un cosolvente orgánico en el medio de reacción como el *tert*-butil metil éter (TBME), que ya ha demostrado ser compatible con este tipo de enzimas,<sup>66</sup> añadiéndolo en un 50% v/v. Así, se observó una clara mejoría en las conversiones, especialmente en el caso de la reguladora de citrato (entradas 3 y 4). Posteriormente se realizó un estudio de la temperatura, obteniéndose muy buenas conversiones a pH 5 (entrada 5), mientras que a 6.5 se recuperaron trazas del hemiaminal **7** (entrada 6), de ahí que a partir de este momento se desechara este medio de reacción. El empleo de un pH más ácido (3.5, entrada 7) produjo un descenso muy acusado de la conversión, mientras que un aumento del porcentaje del disolvente orgánico mejoró ligeramente los resultados (entrada 8) aunque se observó también una pequeña cantidad de la enamina **8** proveniente de la deshidratación del hemiaminal. Aumentar la concentración del sustrato en el medio bifásico utilizando TBME (entrada 9) o tolueno (entrada 10) mantiene los buenos resultados, siendo ligeramente mejores con el primero de ellos. Por último, se comprobó la importancia de burbujear oxígeno en el medio de reacción ya que cuando se repitió la reacción en un tubo sellado, la conversión disminuyó de manera muy acentuada (entrada 11).

Para demostrar que ambos componentes (lacasa y TEMPO) son necesarios, se realizaron las correspondientes reacciones en ausencia de uno de ellos, no observándose en ningún caso transformación alguna.

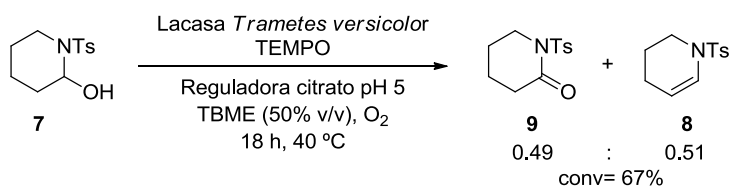
Hay que reseñar que tan sólo se obtuvieron trazas de la lactama deseada, lo que parece indicar que la segunda oxidación no tiene lugar. Para intentar favorecerla, se llevó a cabo una nueva prueba repitiendo las condiciones de la entrada 9 pero añadiendo en dos porciones la misma cantidad de lacasa y de TEMPO cada 24 h, intentando minimizar de esta manera una posible desactivación del enzima o del TEMPO. Sin embargo los resultados no fueron mejores, obteniéndose una conversión del 83%. También se observó que en estas condiciones el TBME se evaporaba con el paso del tiempo, dejando un volumen de reacción muy pequeño lo que puede afectar negativamente a la reproducibilidad del método.

Tras purificar varios crudos de reacción por cromatografía de columna se consiguió aislar el hemiaminal **7** sobre el que se reprodujeron las condiciones de la entrada 9 de la Tabla 2, intentando llevar a cabo la oxidación del mismo (Esquema 21). Sin embargo, según lo

---

<sup>66</sup> (a) P. Gavezzotti, C. Navarra, S. Caufin, B. Danieli, P. Magrone, D. Monti, S. Riva, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, 353, 2421-2430; (b) A. Intra, S. Nicotra, S. Riva, B. Danieli, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, 347, 973-977.

observado por  $^1\text{H-RMN}$  la oxidación tuvo lugar con una baja conversión, obteniéndose una mezcla del sustrato de partida **7**, la enamina **8** y la lactama final **9** en proporciones aproximadas 1:1:1.

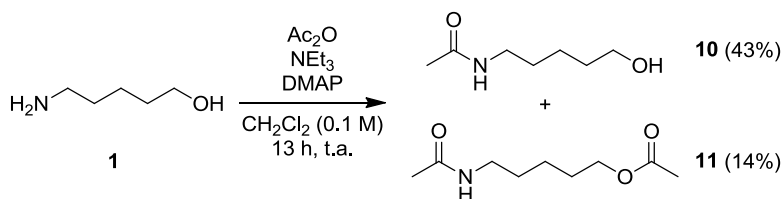


**Esquema 21.** Oxidación del hemiaminal **7** con el sistema lacasa/TEMPO

Puesto que empleando como grupo protector el resto tosilo no se obtuvieron resultados satisfactorios para formar la lactama **9**, pero ya que el primer paso de oxidación del alcohol primario y su posterior ciclación intramolecular no estaba suponiendo un problema, nos planteamos cambiar el grupo tosilo por otro de menor carácter electrón-atractor como el grupo acetilo.

#### 4.1.3. Síntesis química y reactividad de la de *N*-(5-hidroxipentil)acetamida (**10**)

Para sintetizar el derivado acetilado **10** se siguió un procedimiento típico de acetilación, haciendo reaccionar al aminoalcohol **1** con 1 equivalente de anhídrido acético utilizando un exceso de  $\text{NEt}_3$  (3 equiv.) como base en presencia de *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP) que actuó como catalizador (Esquema 22).

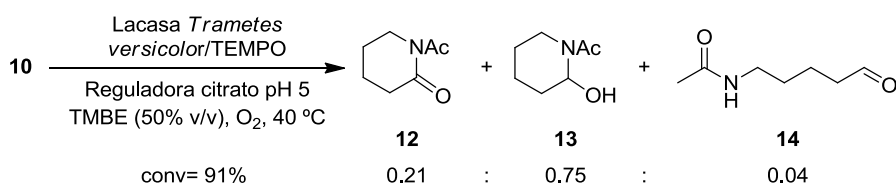


**Esquema 22.** Reacción de protección del 5-aminopentán-1-ol con el grupo acetilo

Se recuperó el compuesto **10** con un 43% de rendimiento ya que también se obtuvo como subproducto el derivado **11** diacetilado con un 14% de rendimiento, donde tanto el alcohol como el grupo amino resultaron ser acetilados. Hay que reseñar la dificultad del proceso de seguimiento y purificación de esta reacción, ya que tanto el sustrato como los productos finales no revelaban en UV.

Aplicando las condiciones optimizadas en la entrada 9 de la Tabla 2, se estudió la oxidación del compuesto **10** en presencia de la lacasa de *T. versicolor* junto con el TEMPO. Sin

embargo, una vez detenida la reacción, se llevó a cabo una extracción con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y tras posterior secado en la bomba rotatoria, se observó la total desaparición de todos los compuestos. Este hecho fue debido a la gran volatilidad de los mismos al contrario de lo que ocurría con el homólogo tosilado **6**. Para evitar este hecho se repitió todo el proceso pero extrayendo esta vez con éter dietílico ( $\text{Et}_2\text{O}$ ), y teniendo especial cuidado en la evaporación del mismo, obteniéndose esta vez la mezcla de productos representada en el Esquema 23.

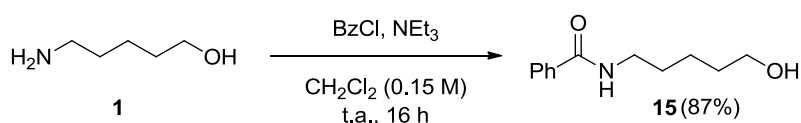


**Esquema 23.** Oxidación del aminoalcohol acetilado **10** con el sistema lacasa/TEMPO

En este caso se identificó la formación de la lactama deseada **12** a diferencia de lo que sucedía con el aminoalcohol *N*-tosilado, lo cual indica que la suposición de que un grupo con menor carácter electrón-atractor podría favorecer la formación de la lactama. De todas formas se observó que el producto mayoritario era el hemiaminal **13**, detectando también la presencia de trazas del aldehído abierto **14**. También hay que destacar que se observaba la pérdida de material después de la extracción y evaporación del disolvente debido a los problemas de volatilidad ya comentados, por lo que la fiabilidad de estos resultados es baja.

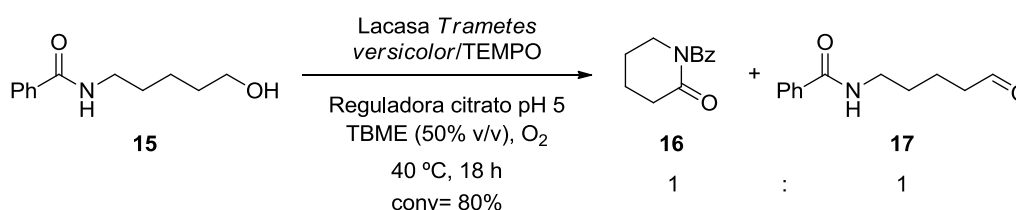
#### 4.1.4. Síntesis química y reactividad de la *N*-(5-hidroxipentil)benzamida (**15**)

Para intentar evitar los problemas de volatilidad y de detección en el UV pero manteniendo un carácter similar de electrofilia, se propuso la protección del aminoalcohol de partida con el grupo benzoílo (**15**), puesto que este nuevo grupo protector presenta un anillo aromático en su estructura, por lo que sería fácilmente detectable en la lámpara de UV. Para la síntesis de este sustrato se procedió a emplear una metodología similar a la anteriormente descrita con el derivado acetilado **10**, tratando en este caso el aminoalcohol **1** con 1 equiv. de cloruro de benzoílo en presencia de 1.5 equiv. de  $\text{NEt}_3$  como base, en diclorometano y a temperatura ambiente durante 16 h (Esquema 24).



**Esquema 24.** Síntesis química del aminoalcohol protegido con el grupo benzoílo **15**

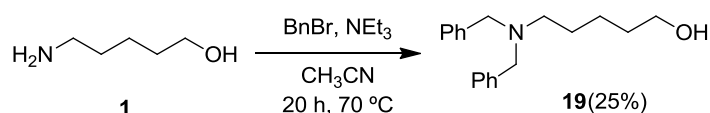
De nuevo como en los casos anteriores se utilizó el agente acilante en cantidades estequiométricas para minimizar la formación de los productos di- o triacilados. Una vez obtenido **15**, se procedió a hacerlo reaccionar con el sistema lacasa/TEMPO (Esquema 25). Como se puede observar, en este caso sí que se apreció una mejora apreciable ya que fue posible detectar una mezcla de la lactama deseada **16** y del aldehído de cadena abierta **17** en una proporción aproximada 1:1 con una conversión del 80%. En este caso el problema parece ser la ciclación de dicho aldehído y no la oxidación del intermedio hemiaminal ya que no se observó su presencia en el crudo de reacción.



**Esquema 25.** Oxidación del aminoalcohol benzoilado **15** con el sistema lacasa/TEMPO

#### 4.1.5. Síntesis química y reactividad del *N*-5-bencilaminopentan-1-ol (**18**)

Vista la excelente mejoría obtenida con los derivados acilados, nos propusimos a continuación llevar a cabo la protección de **1** con un grupo no desactivante como es el resto bencilo. Así, se hizo reaccionar **1** con un equivalente de bromuro de bencilo en presencia de  $\text{NEt}_3$  (1 equiv, Esquema 26).<sup>67</sup> Desafortunadamente en lugar de obtener el producto de monoalquilación **18** se formó exclusivamente el producto dibencilado en el grupo amino **19**.

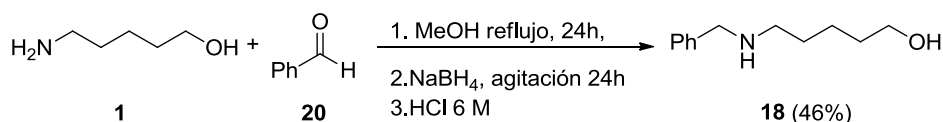


**Esquema 26.** Reacción de alquilación del aminoalcohol **1** con bromuro de bencilo

Con el fin de favorecer la formación del producto *N*-monobencilado **18**, se llevó a cabo la aminación reductiva del benzaldehído (**20**) con un pequeño defecto de **1** (0.83 equiv.) durante 24 h y bajo atmósfera inerte, formándose la imina que posteriormente fue reducida con borohidruro sódico, aislándose el producto deseado con un 47% de rendimiento tras purificación por cromatografía de columna (Esquema 27).

<sup>67</sup> C. E. Paul, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, J. Montejo-Bernardo, S. García-Granda, V. Gotor, *RSC Adv.* **2012**, 2, 6455-6463.



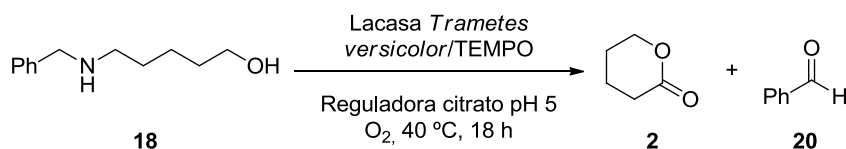


**Esquema 27.** Síntesis del compuesto **18** mediante una reacción de aminación reductiva del aminoalcohol **1** con el benzaldehído

En las mismas condiciones que empleamos anteriormente, se llevó a cabo la oxidación del aminoalcohol **18** empleando la lacasa de *Trametes versicolor* y el TEMPO en un sistema bifásico formado por una disolución reguladora de citrato de pH 5 y TBME como cosolvente (50% v/v), sin embargo solo se recuperó el producto de partida. Puesto que en este caso el derivado añadido al medio de reacción es una amina secundaria, se observó un aumento del pH de la reacción lo que desactivó el enzima, el cual trabaja a pHs ácidos preferentemente

Cabe pensar que el tampón citrato pH 5 50 mM no era suficientemente fuerte para tamponar la reacción con la amina bencilada. Es por ello que se llevó a cabo la reacción de oxidación empleando una disolución reguladora de mayor concentración como es la de Tris.HCl 200 mM de pH 6.5. Así, al concluir la reacción se observó que el pH presentaba un valor cercano a 7. Sin embargo se obtuvo una conversión muy baja, aislándose un producto final que no se pudo caracterizar.

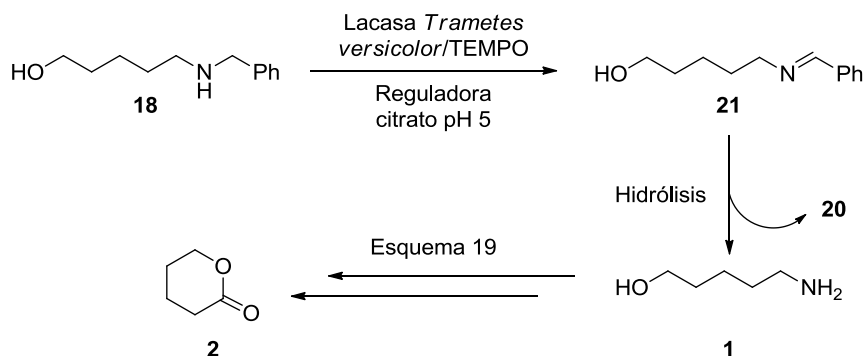
Por último se decidió añadir este sustrato a la disolución reguladora citrato pH 5 50 mM y posteriormente ajustar de nuevo el pH hasta un valor de 5, para a continuación añadir la lacasa y el TEMPO, reproduciendo las condiciones más favorables para lograr la máxima conversión observadas cuando el grupo amino no estaba protegido. En estas condiciones (Esquema 28), no se obtuvo la lactama esperada sino que se observó una mezcla del benzaldehído **20** y la  $\delta$ -valerolactona **2** con una conversión superior al 90% determinada por RMN y cromatografía de gases.



**Esquema 28.** Biooxidación del aminoalcohol bencilado **18** con el sistema lacasa/TEMPO en una reguladora citrato pH 5

Aunque esta mezcla de productos no era la esperada, este resultado se puede explicar fácilmente atendiendo a la estructura del sustrato empleado (Esquema 29). Así, puesto que estamos usando una amina secundaria, lo que ocurre en un primer lugar es la oxidación del grupo amino a la correspondiente imina en la posición bencílica formándose el compuesto **21**,

que por posterior hidrólisis genera por un lado benzaldehído (**20**) y por el otro el aminoalcohol libre **1**, el cual finalmente por posterior oxidación en presencia del sistema lacasa/TEMPO genera la  $\delta$ -valerolactona **2** como ya se mostró en el Esquema 19.



**Esquema 29.** Propuesta mecánica para la formación de la  $\delta$ -valerolactona **2** y el benzaldehído (**20**) a partir del aminoalcohol *N*-bencilado **18**

A pesar de no obtener los resultados esperados, con este experimento se demuestra que se puede conseguir la desprotección del grupo bencilo en aminas en unas condiciones suaves de reacción sin necesidad de realizar una hidrogenación o emplear medios ácidos, por lo que esta metodología podría ser usada con moléculas más complejas para la desprotección selectiva del grupo bencilo en presencia de otros grupos funcionales que pudieran ser sensibles en otras condiciones de desprotección.<sup>68</sup>

Como resumen, se puede reseñar que se ha realizado una serie de oxidaciones sobre el 5-aminopentan-1-ol y algunos derivados *N*-protegidos, observando que la naturaleza del grupo protector influye en la quimioselectividad del proceso:

1) oxidándose preferentemente el grupo amino frente al alcohol si el carácter de dicho grupo protector no es electrón-atractor;

2) mientras que en el caso de grupos que retiran carga, se observó que se oxida el alcohol, pero en presencia de un grupo sulfonilamida la oxidación del hemiaminal hacia la lactama no tiene lugar, mientras que cuando se rebaja la capacidad electrón-atractora del grupo protector como en el caso de las amidas, se detectaron mayores conversiones hacia la formación de las lactamas. Cabe destacar que con el grupo acetilo hubo problemas de volatilidad con los productos obtenidos, de ahí que se probara con el grupo benzoílo obteniendo los mejores resultados.

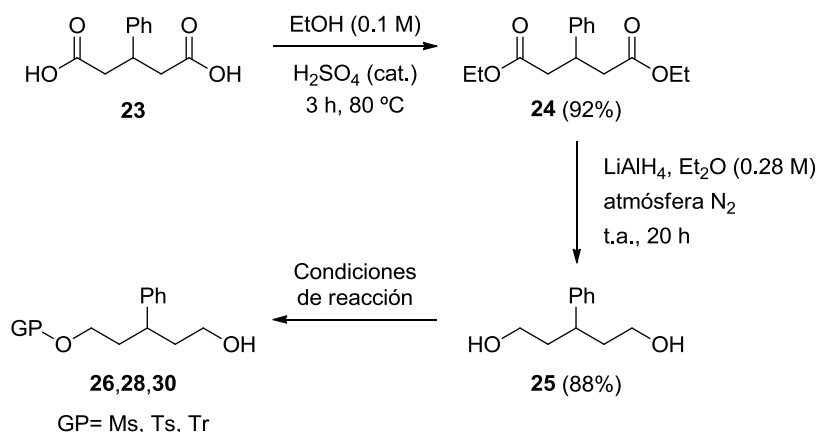
<sup>68</sup> De hecho, existe un artículo en el que cual se ha empleado un sistema de oxidación con lacasas y diversos mediadores para desproteger el grupo *p*-metoxifenilo (PMP) con una serie de aminas, ver: J. M. Verkade, L. J. C. van Hemert, P. J. L. M. Quaedflieg, H. E. Schoemaker, M. Schürmann, F. L. van Delft, F. P. J. T. Rutjes, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, 349, 1332-1336.

## 4.2. 5-AMINO-3-FENILPENTAN-1-OL Y DERIVADOS: SÍNTESIS Y REACTIVIDAD CON EL SISTEMA LACASA/TEMPO

A tenor de las tendencias observadas con los distintos grupos protectores, nuestro siguiente objetivo fue comprobar si estos resultados podían ser trasladados a otro aminoalcohol con un sustituyente en posición 3, que nos permitiera por un lado evitar los problemas de volatilidad observados con algunos de los derivados del aminoalcohol **1**, y por otro que nos permitiera detectar fácilmente (por ej., UV) todos los productos obtenidos. De esta manera se optó por realizar la síntesis del compuesto 5-amino-3-fenilpentan-1-ol (**22**).

### 4.2.1. Síntesis química del 5-amino-3-fenilpentan-1-ol (**22**) racémico

La síntesis del aminoalcohol **22** se llevó a cabo partiendo del ácido 3-fenilglutárico (**23**) y obteniendo como precursor el compuesto proquiral 3-fenilpentan-1,5-diol (**25**), cuya preparación ya había sido optimizada y descrita con anterioridad en nuestro grupo de investigación (Esquema 30), habiéndose además estudiado exitosamente su proceso de desimetrización enzimática por reacción de acilación empleando una lipasa.<sup>69</sup>



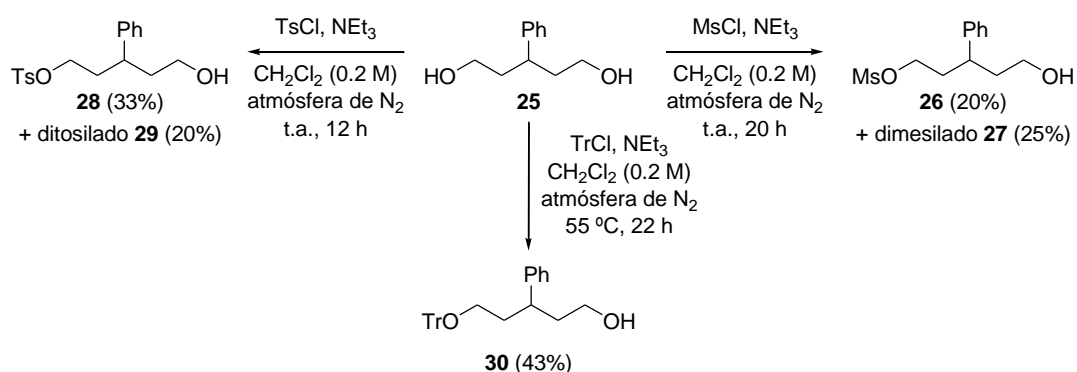
**Esquema 30.** Obtención del diol **25** a partir del diácido **23** empleando una ruta de dos etapas

Inicialmente para la síntesis del diol **25**, se llevó a cabo la esterificación del diácido **23** con etanol (EtOH) que actuó como disolvente y reactivo en presencia de una pequeña cantidad de ácido sulfúrico concentrado, catalizador ácido de este proceso. Tras 3 horas de reacción se pudo obtener el diéster **24** que fue purificado por simple evaporación del disolvente y extracción, aislando **24** con un rendimiento del 92%. Este compuesto fue reducido con hidruro

<sup>69</sup> (a) N. Ríos-Lombardía, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 811-819; (b) N. Ríos-Lombardía, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5709-5718.

de litio y aluminio ( $\text{LiAlH}_4$ ) en dietil éter dando lugar al correspondiente diol **25** con un 88% de rendimiento tras filtración de la mezcla sobre celita y purificación por columna cromatográfica.

Para intercambiar uno de los grupos alcohol por una amina en el menor número posible de etapas, se decidió derivatizar selectivamente uno de los restos hidroxilo con un grupo protector que nos permitiera introducir luego una azida en un solo paso (Esquema 31). Así, en un principio se intentó introducir un grupo tosilo (Ts) o mesilo (Ms). Para ello se hicieron las correspondientes pruebas a temperatura ambiente añadiendo 1 equivalente de cloruro de mesilo o tosilo en presencia de 2 equivalentes de trietilamina ( $\text{NEt}_3$ ).



**Esquema 31.** Derivatizaciones del compuesto **25** empleando diferentes agentes químicos

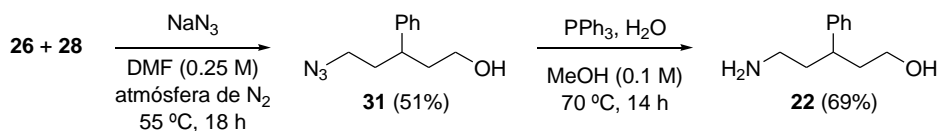
Tras purificación por columna cromatográfica, y a pesar de no emplear un exceso del cloruro de sulfonilo, se obtuvieron mezclas de los compuestos derivatizados en uno (**26** y **28**) y en los dos hidroxilos (**27** y **29**), quedando además sustrato sin reaccionar. Como se puede observar, hay una ligera mejora en el caso del tosilo puesto que este grupo es más voluminoso que el mesilo, aunque los rendimientos aislados fueron bajos. Esta reacción se repitió de nuevo añadiendo el cloruro de tosilo en varias porciones para evitar la ditosilación, pero el rendimiento aislado no mejoró (32%).

Animados por esta influencia al aumentar el tamaño del grupo protector, decidimos utilizar un agente muy voluminoso como es el tritilo para mejorar el rendimiento del proceso, si bien esta ruta requeriría de dos etapas más de síntesis (funcionalización como mesilo o tosilo del alcohol sin proteger seguida por la desprotección selectiva del grupo tritilo) para llegar al diol monoderivatizado.

Así, se procedió a la monoprotección del diol **25** empleando 1 equivalente de cloruro de tritilo en presencia de otro equivalente de trietilamina en diclorometano a reflujo (parte inferior del Esquema 31), obteniendo el producto monotritilado **30** con un rendimiento del 43% tras purificación por columna. Este rendimiento aunque mayor comparado con los procesos de tosilación o mesilación, presenta la limitación global de que son necesarias dos etapas más de

síntesis para la preparación de los derivados monomesilado o monotosilado, por lo que se decidió abandonar esta estrategia sintética. Además se observó la formación del compuesto ditritilado por lo que aumentar el número de equivalentes del cloruro de tritilo o la temperatura no serían opciones viables para la mejora de los presentes resultados.

A pesar de los bajos rendimientos obtenidos para los compuestos monofuncionalizados **26** y **28**, estos se obtuvieron en suficiente cantidad para continuar la síntesis hacia el aminoalcohol **22** (Esquema 32). Así, en un siguiente paso se llevó a cabo la reacción de sustitución nucleofílica con azida de sodio sobre la mezcla de ambos utilizando para ello 2 equivalentes de azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) en dimetilformamida (DMF) a 55 °C, obteniéndose el azidoalcohol **31** aislado con un 51% de rendimiento tras purificación por cromatografía de columna.



**Esquema 32.** Ruta sintética para la obtención del aminoalcohol **22** a partir de una mezcla de los compuestos activados **26** y **28**

En la última etapa para la obtención del aminoalcohol racémico **22** se realizó la reducción de la azida a la correspondiente amina empleando las condiciones de Staudinger. Para ello el compuesto **31** fue reducido en presencia de un pequeño exceso de trifenilfosfina (1.5 equiv.) y agua (1.5 equiv.) en metanol a 70 °C, obteniendo **22** con un rendimiento aislado del 69% tras columna cromatográfica.

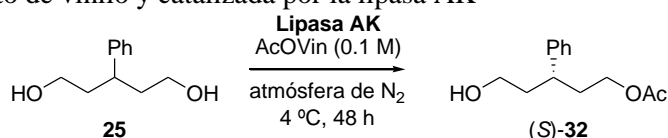
El compuesto **22** fue así obtenido a partir del diácido **23** en 5 etapas de reacción con un rendimiento global del 9.4%, siendo el principal problema la etapa de monoactivación del diol **25**, para la cual se obtuvo un rendimiento del 33% en el mejor de los casos.

Puesto que se ha demostrado que en las oxidaciones de los 1,5-dioles enantiopuros con el sistema lacasa/TEMPO el proceso de oxidación ocurre sin pérdida de la enantioselectividad,<sup>64</sup> decidimos sintetizar el aminoalcohol **22** de manera enantiopura tal como estaba descrito por nuestro grupo de investigación,<sup>69</sup> con el fin de poder obtener los correspondientes productos finales (lactonas o lactamas) enantiopuros.

## 4.2.2. Síntesis química del derivado enantioenriquecido (S)-22

Un proceso de desimetrización es aquel en el cual partiendo de un compuesto *meso* o proquiral, se elimina un elemento de simetría en el sustrato pudiéndose obtener un producto quiral con un rendimiento máximo teórico del 100%, a diferencia de las resoluciones cinéticas clásicas en las que se llega solamente a un 50% de rendimiento del producto enantiopuro. En este sentido, dentro de las metodologías enzimáticas un ejemplo clásico es la desimetrización de compuestos *meso* empleando hidrolasas mediante reacciones de acilación o hidrólisis.<sup>70</sup> En nuestro caso, a partir del diol **25** anteriormente sintetizado (Esquema 30), se realizó un estudio de acetilación enzimática con distintas lipasas sobre este sustrato para obtener, en el mejor de los casos, el compuesto monoacetilado **32** enantiopuro con un rendimiento cuantitativo. Para llevar a cabo la síntesis del aminoalcohol enantioenriquecido, como ya se explicó con anterioridad, el paso clave es la desimetrización enzimática del diol **25** empleando para ello una lipasa (Tabla 3).<sup>69</sup>

**Tabla 3.** Distintos experimentos de desimetrización enzimática del diol **25** por reacción de acilación con acetato de vinilo y catalizada por la lipasa AK



Entrada	diol <b>25</b> (g)	Rdto. aislado (%)	<i>ee</i> (%) <sup>a</sup>
1	0.05	75	>99
2	0.23	65	>99
3	1.13	56	96

<sup>a</sup> Excesos enantioméricos calculados por HPLC con la columna Chiralcel OJ-H

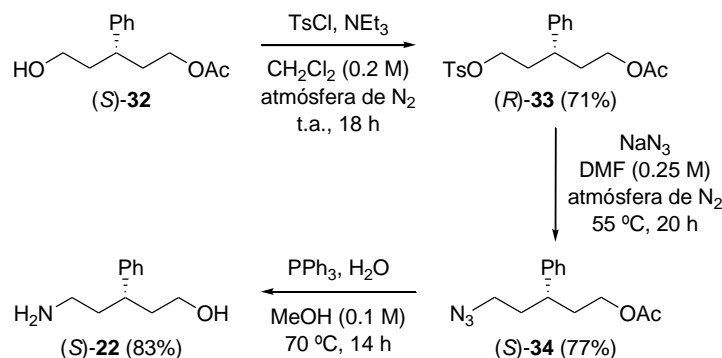
Basándonos en resultados previos en nuestro grupo de investigación se utilizó la lipasa AK en una proporción en peso 1:1 con respecto al sustrato empleando acetato de vinilo (AcOVin) como agente de acilación y disolvente, y realizando la transformación a una baja temperatura (4 °C) durante 48 h, lo que condujo a los mejores resultados en cuanto a conversiones y excesos enantioméricos a una escala de 50 mg de sustrato (entrada 1). Al escalar la reacción se observó un descenso del rendimiento de la reacción (entrada 2), tal vez debido a problemas de difusión por el método de agitación orbital empleado, ocurriendo a su vez un descenso de la pureza óptica del compuesto monoacetilado (S)-**32** (entrada 3).

Tiempos más largos de reacción mostraron la formación del compuesto diacetilado, de ahí que los rendimientos no fueran más elevados, si bien comparado con las protecciones

<sup>70</sup> (a) E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, PR110-PR180; (b) E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 313-354.

descritas anteriormente con los grupos mesilo, tosilo o tritilo, la acetilación enzimática mostró los mejores resultados.

Una vez obtenido el derivado enantioenriquecido monoprottegido con el grupo acetilo (*S*)-**32**, se llevó cabo una secuencia similar de reacciones a la ya mostrada para sintetizar el compuesto racémico (Esquema 33).



**Esquema 33.** Ruta sintética para obtener el aminoalcohol enantioenriquecido (*S*)-**22**

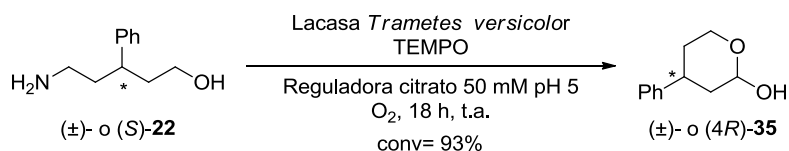
Así, en un primer paso se realizó la tosilación del grupo hidroxilo que se encontraba libre en las condiciones ya descritas (Esquema 31) obteniendo (*R*)-**33** con un rendimiento del 71% tras purificación por columna.<sup>71</sup> Lógicamente en este caso el rendimiento fue mucho mayor que para el caso del compuesto monotosilado **28** al ser solo posible la reacción de tosilación en el único grupo hidroxilo libre de la molécula. A continuación, se llevó a cabo una reacción de sustitución nucleofílica con azida de sodio sobre el grupo hidroxilo tosilado dando lugar al azidoéster (*S*)-**34** con un buen rendimiento tras cromatografía de columna. Por último, para obtener el aminoalcohol (*S*)-**22**, se emplearon las condiciones de Staudinger tal como se describió en el Esquema 32. En el propio medio de reacción tuvo lugar también la desprotección del grupo acetilo, evitándose de esta forma una última etapa de desprotección para obtener el grupo hidroxilo libre. Así, se sintetizó el compuesto (*S*)-**22** con un rendimiento aislado del 83% tras purificación por columna. En este caso se pudo acceder al compuesto (*S*)-**22** a partir del diácido **23** a través de una ruta que consta de 6 etapas de reacción con un rendimiento global del 21%.

#### 4.2.3. Reactividad del aminoalcohol ( $\pm$ )- o (*S*)-**22** con el sistema lacasa/TEMPO

Una vez obtenido el aminoalcohol **22**, tanto en su forma racémica como enantioméricamente pura, se llevó a cabo un estudio de su reactividad frente al sistema

<sup>71</sup> Nótese que hay un cambio de configuración puesto que cambia la preferencia en la nomenclatura de Cahn-Ingold-Prelog (CIP).

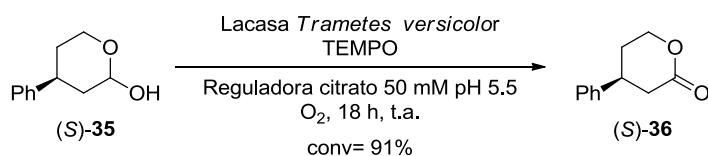
lacasa/TEMPO para observar los posibles cambios con respecto a los resultados obtenidos con el aminoalcohol comercial **1** sin sustituir en la posición 3. Para ello, se reprodujeron las condiciones empleadas con dicho sustrato (Esquema 18) disolviendo el compuesto **22** en una disolución reguladora de citrato (50 mM) a pH 5, y empleando TEMPO (30% mol) y la lacasa de *Trametes versicolor* (Esquema 34).



**Esquema 34** Oxidación del aminoalcohol racémico o enantioenriquecido **22** empleando el sistema lacasa/TEMPO

Como era de esperar, una vez más la lacasa junto con el TEMPO oxidaron quimioselectivamente a la amina frente al alcohol, formando un hidroxialdehído tras la hidrólisis de la correspondiente imina (Esquema 19). Sin embargo, al contrario de lo que ocurría con el aminoalcohol **1**, en este caso la formación de la correspondiente lactona fue muy pequeña, formándose el hemiacetal **35** de forma mayoritaria (93%), lo que parece indicar que la presencia del grupo fenilo en la posición 3 dificultó la segunda oxidación del hemiacetal a la lactona.

Para favorecer la formación de la lactona **36**, nos planteamos reoxidar de nuevo el crudo de la reacción obtenido anteriormente empleando de nuevo el sistema lacasa/TEMPO (Esquema 35). Así, empleando las mismas condiciones de reacción se comprobó tanto por  $^1\text{H}$ -RMN como por cromatografía de gases del crudo de reacción la formación mayoritaria de la lactona **36**.



**Esquema 35.** Oxidación del hemiacetal enantioenriquecido **35** empleando el sistema lacasa/TEMPO

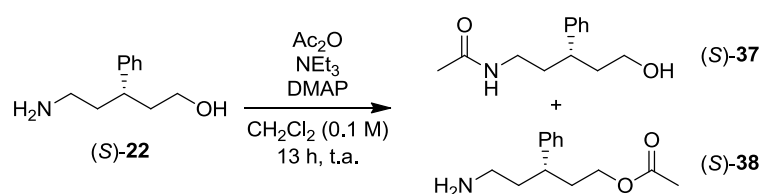
De una manera análoga a como se hizo con el aminoalcohol **1**, el siguiente paso que se propuso fue la protección del grupo amino del compuesto **22** para estudiar la reactividad de los derivados obtenidos con el sistema oxidativo desarrollado en este trabajo. Vistos los resultados anteriores y puesto que uno de nuestros objetivos era la formación biocatalizada de lactamas, se decidió evitar la protección con el grupo tosilo ya que se obtenía el hemiaminal, y con el grupo bencilo puesto que daba lugar a la oxidación de la amina.



#### 4.2.4. Síntesis de la (S)-N-(3-fenil-5-hidroxpentil)acetamida (37)

Puesto que se había obtenido el aminoalcohol **22** de configuración *S*, se propuso emplearlo como sustrato ya que así los posibles productos obtenidos en la oxidación quimioenzimática estarían enantioenriquecidos.

Por ello en un primer lugar se planteó la síntesis del derivado *N*-acetilado **37** utilizando el protocolo habitual para acetilar aminas, haciendo reaccionar (*S*)-**22** con 1 equiv. de anhídrido acético en presencia de 3 equiv. de trietilamina en diclorometano a temperatura ambiente (Esquema 36), intentándose minimizar así la formación de los compuestos *O*-, di- o triacetilados.



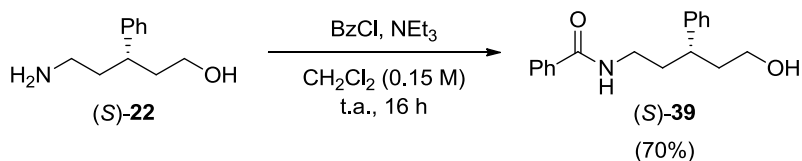
**Esquema 36.** Acetilación del aminoalcohol (*S*)-**22** empleando anhídrido acético y trietilamina

Como cabía esperar, junto con el compuesto monoacetilado **37** se detectó por  $^1\text{H}$ -RMN del crudo de reacción la presencia del derivado *O*-monoacetilado (*S*)-**38**. Tras varios intentos de separación por cromatografía de columna, se llegó a la conclusión que la migración del grupo acetilo desde la amina al alcohol se encontraba favorecida puesto que tras evaporar los disolventes en la muestra de RMN, se seguía observando una mezcla entre **37:38** con unas proporciones similares en torno a 5:1. De hecho, tras dejar varios días esta mezcla y repetir el espectro de RMN, se determinó la migración total del resto acetilo hacia el grupo hidroxilo, obteniéndose única y exclusivamente el monoéster **38**.

#### 4.2.5. Síntesis química y reactividad de la (S)-N-(3-fenil-5-hidroxpentil)benzamida (39)

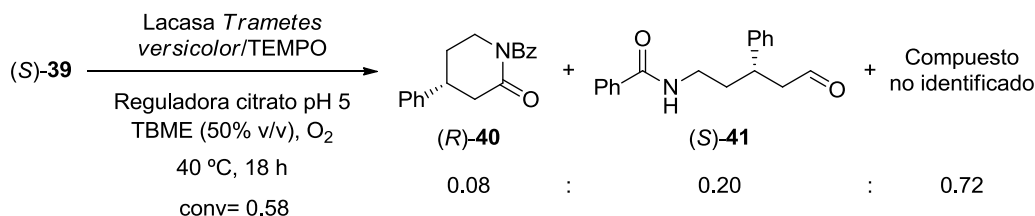
Debido a la imposibilidad de aislar adecuadamente **37** y puesto que se habían obtenido buenos resultados en la oxidación del aminoalcohol *N*-benzoilado **15**, se propuso obtener el mismo derivado partiendo del aminoalcohol (*S*)-**22**. De esta forma, utilizando las mismas condiciones ya descritas en el Esquema 24, se pudo sintetizar tras purificación por columna cromatográfica el compuesto deseado (*S*)-**39** con un 70% de rendimiento (Esquema 37). Hay que destacar que además tuvo lugar la formación minoritaria del compuesto dibenzoilado. Además, a diferencia del derivado *N*-acetilado **37**, en ningún caso se detectó la migración del

resto benzoílo hacia el grupo hidroxilo incluso tras largos tiempos de almacenamiento en disolución.



**Esquema 37.** Benzoilación del aminoalcohol (S)-22 utilizando cloruro de benzoílo y  $\text{NEt}_3$

Una vez aislado (S)-39 se usó como sustrato del sistema lacasa/TEMPO reproduciendo las condiciones que condujeron a la formación de la lactama **16** a partir del aminoalcohol *N*-protegido **15** (Esquema 25). Tratando al derivado (S)-39 con TEMPO (30% mol) y la lacasa de *Trametes versicolor* en un medio bifásico con una reguladora citrato (50 mM) a pH 5 y TBME (Esquema 38), se obtuvo una mezcla compleja de productos.



**Esquema 38.** Oxidación del aminoalcohol benzoilado **39** con el sistema lacasa/TEMPO

En este caso la conversión hacia la lactama **40** fue muy minoritaria, frente a la formación del aldehído **41** y sobre todo con respecto a un compuesto aún no identificado.

Como resumen a esta parte se puede reseñar que se ha realizado una serie de oxidaciones sobre el 5-amino-3-fenilpentan-1-ol racémico y enantioenriquecido, observando en este caso que aunque la presencia del grupo fenilo en posición 3 no varía la quimioselectividad mostrada hacia la oxidación del grupo amino frente al alcohol, se desfavorece el paso de oxidación del hemiacetal hacia la lactona. Por otro lado, con respecto al compuesto *N*-benzoilado, aunque se observa una pequeña cantidad de la lactama, aún es necesaria una mayor optimización del proceso para obtener resultados satisfactorios.

## **CONCLUSIONES**



Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación se pueden resumir en los siguientes puntos:

- Se ha llevado a cabo la síntesis de una familia de derivados del 5-aminopentan-1-ol con buenos rendimientos, los cuales se diferencian en la sustitución de la posición 3 (hidrógeno o fenilo), o bien por la presencia de distintos grupos protectores en la función amina (tosilo, acetilo, bencilo o benzoílo).
- Se han estudiado las reacciones de oxidación de estos aminoalcoholes empleando el sistema lacasa/TEMPO en medio acuoso
- Se han optimizado las condiciones de oxidación teniendo en cuenta distintos parámetros que afectan a la catálisis enzimática como la temperatura, el pH del medio o el uso de cosolventes orgánicos, entre otros.
- Se ha aplicado la cromatografía de gases (CG) quiral y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) quiral para el seguimiento de las reacciones y cálculo de conversiones y *ee* de las reacciones enzimáticas.
- Se han propuesto distintas rutas mecanísticas para explicar la formación de las correspondientes lactonas, lactamas y otros intermedios, en función del carácter electrónico de la sustitución empleada en el grupo amino.
- Teniendo como base estos resultados, se plantea ampliar este estudio a una familia de sustratos más amplia, desarrollando métodos de síntesis para una serie de 1,4-aminoalcoholes, así como el uso de otras ADHs disponibles y de conocida eficacia en la oxidación de alcoholes primarios, con la intención de comparar estos resultados con los obtenidos hasta el momento.



## **PARTE EXPERIMENTAL**





## 6.1. DISOLVENTES Y REACTIVOS GENERALES

Los reactivos químicos fueron adquiridos de distintas casas comerciales tales como Sigma-Aldrich, Acros o Fluka, y se emplearon sin purificación adicional. La lacasa de *Trametes versicolor* (13.6 U/mg) y la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens* (AK, 23.7 U/mg) fueron adquiridas.

Los disolventes empleados en las reacciones de síntesis química, diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), (*N,N*)-dimetilformamida (DMF), acetonitrilo (MeCN), dietil éter ( $\text{Et}_2\text{O}$ ) y metanol (MeOH) fueron previamente destilados bajo nitrógeno y secados con desecantes adecuados. El disolvente orgánico utilizado para las reacciones catalizadas por lacasas fue el *tert*-butil metil éter (TBME) y fue empleado sin secado previo, mientras que en el caso de la desimetrización con la lipasa AK se utilizó acetato de vinilo utilizado como disolvente y a la vez reactivo fue adquirido comercialmente. La trietilamina empleada como base en distintas reacciones fue destilada y secada empleando hidróxido de potasio.

## 6.2. TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS

### 6.2.1. Cromatografía en gel de sílice

Para la cromatografía en capa fina (TLC, del inglés *thin layer chromatography*) se han utilizado cromatofolios de gel de sílice 60 de 0.25 mm de espesor y con un indicador ultravioleta incorporado, comercializados por Merck.

Como revelador se utilizó una lámpara de ultravioleta ( $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$ ) y una disolución acuosa al 1% de  $\text{KMnO}_4$  (2 g), 5% de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (10 g) y 5% de  $\text{NaOH}$  (10 g) en 200 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , siendo todas las proporciones en peso:volumen. En algunos casos y alternativamente se empleó como revelador una disolución de *p*-anisaldehído (12 mL) en ácido sulfúrico fumante (17 mL), ácido acético (5 mL) y  $\text{MeOH}$  (450 mL). La cromatografía de columna se realizó sobre gel de sílice 60 (230-400 *mesh*) adquirida a Merck.

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

Los experimentos de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN y DEPT se realizaron en los espectrómetros Bruker AV-300 (300.13 MHz para  $^1\text{H}$  y 75.5 MHz para  $^{13}\text{C}$ ), Bruker DPX-300 (300.13 MHz para  $^1\text{H}$  y 75.5 MHz para  $^{13}\text{C}$ ), empleando en todos los casos  $\text{CDCl}_3$  como disolvente. Los valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) están referidos en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) se dan en hertzios (Hz). Para indicar la multiplicidad de las señales en los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN se emplearon las siguientes iniciales: *s* (singulete), *sa* (singulete ancho), *d* (doblete), *dd* (doble doblete), *ddd* (doble doblete de dobletes), *dt* (doble triplete), *t* (triplete), *c* (cuartete) y *m* (multiplete).

### **6.2.3. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)**

Los análisis de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se llevaron a cabo en un cromatógrafo Hewlett-Packard 1100, empleando la columna quiral Chiralcel OJ-H (25 × 4.6 mm D.I.), para la medida de los excesos enantioméricos. La detección empleada fue visible-ultravioleta empleando unas longitudes de onda de 210 y 215 nm. Como fase móvil se ha utilizado una mezcla de hexano/etanol en una proporción 90:10.

### **6.2.4. Espectrometría de masas (EM)**

Los experimentos de masas se realizaron en un espectrómetro Bruker con un equipo Hewlett-Packard 5973, empleando la técnica de ionización química a presión atmosférica (APCI<sup>+</sup>, del inglés *atmospheric-pressure chemical ionization*).

### 6.2.5. Espectroscopia de infrarrojo (IR)

Los espectros se registraron en un espectrómetro Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR usando placas de NaCl. Las bandas de tensión se indican en valores de  $\nu$  máxima y se expresan en  $\text{cm}^{-1}$ .

### 6.2.6. Puntos de fusión

Se llevaron a cabo con un aparato Gallenkamp en tubos capilares abiertos, y por tanto, sus valores no están corregidos.

## 6.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

A continuación se detallan los protocolos seguidos para la preparación de los compuestos orgánicos estudiados en este Trabajo Fin de Máster, así como a los referidos a las reacciones enzimáticas.

### 6.3.1. Reacción del 5-aminopentan-1-ol (**1**) con el sistema catalítico lacasa/TEMPO

Se disuelve el 5-aminopentan-1-ol (**1**, 16 mg, 0.155 mmol) en una disolución reguladora de citrato a pH 5 (5 mL), ajustando posteriormente el pH a un valor de 5 con HCl 3 M debido a la basicidad aportada por el grupo amino. A esta disolución se le añade TEMPO (6 mg, 0.24 equiv.) agitando magnéticamente hasta su completa disolución. A continuación se adiciona la lacasa de *Trametes versicolor* (7 mg, 16.32 U/mL) y la disolución resultante se agita vigorosamente durante 18 horas en un tubo de ensayo abierto en presencia de un globo de oxígeno. La mezcla se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 5$  mL) y se combinan las fases orgánicas que se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , evaporando posteriormente el disolvente en el rotavapor, obteniendo la  $\delta$ -valerolactona (**2**) como un aceite incoloro.

Para calcular la proporción de producto de partida y final en el crudo de reacción, se toma la fase acuosa y se lleva a pH básico con NaOH 3 N y se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $3 \times 5$  mL). Se combinan las fases orgánicas que se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , evaporando posteriormente el disolvente en el rotavapor, obteniendo el aminoalcohol **1** remanente como un aceite incoloro.

La conversión del proceso se calculó en base a la relación de mmoles de sustrato y mmoles de producto obtenidos en las dos fracciones obtenidas tras corroborar por  $^1\text{H-RMN}$  la pureza de cada una de las fracciones, alcanzándose un 95% de conversión.

### 6.3.2. Síntesis química de la *N*-(5-hidroxiptil)-4-metilbenzenosulfonilamida (**6**)

A una disolución de **1** (309.5 mg, 3 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  seco (20 mL, 0.15 M), se le añaden  $\text{NEt}_3$  seca (417.8  $\mu\text{L}$ , 4.5 mmoles) y cloruro de tosilo (571.8 mg, 3 mmoles) a 0 °C y se agita durante media hora. La mezcla resultante se deja calentar hasta temperatura ambiente y se agita durante 12 horas. Transcurrido este tiempo, se elimina el disolvente en el rotavapor y el crudo de reacción se purifica mediante columna de cromatografía en gel de sílice, empleando como eluyente un gradiente 50-75% AcOEt/hexano, obteniéndose **6** como un sólido blanco (89% rendimiento).

### 6.3.3. Biooxidación del *N*-(5-hidroxiptil)-4-metilbenzenosulfonilamida (**6**) con el sistema lacasa/TEMPO

A una disolución de **6** (15 mg, 0.058 mmol) en la correspondiente disolución reguladora, pudiendo emplear TBME como cosolvente y a la temperatura indicada en la Tabla 2 (ver página 44), se le añade TEMPO (3.33 mg, 0.3 equiv.) y se agita hasta total disolución del mismo. A continuación se adiciona la lacasa de *Trametes versicolor* (4.39 mg, 60 U) y la disolución resultante se agita vigorosamente en un tubo de ensayo abierto en presencia de un globo de oxígeno, a excepción de la entrada 11 que se hace en un tubo sellado. La mezcla se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3  $\times$  5 mL) y se combinan las fases orgánicas que se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , evaporando posteriormente el disolvente en el rotavapor, midiéndose las conversiones obtenidas mediante  $^1\text{H-RMN}$  donde se observa la formación preferente del hemiacetal de 1-tosil-piperidin-2-ol (**7**).

### 6.3.4. Biooxidación del 1-tosil-piperidin-2-ol (**7**) con el sistema lacasa/TEMPO

A una disolución del hemiacetal **7** (15 mg, 0.059 mmol) en una mezcla formada por una disolución reguladora de citrato a pH 5 (0.650 mL) y de TBME (0.650 mL), se le añade TEMPO (3.42 mg, 0.3 equiv.) agitando magnéticamente hasta su completa disolución. A continuación se adiciona la lacasa de *Trametes versicolor* (4.42 mg, 60 U) y la disolución resultante se agita vigorosamente en un tubo de ensayo abierto en presencia de un globo de oxígeno a 40 °C. La mezcla se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3  $\times$  5 mL) y se combinan las fases orgánicas

que se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, evaporando posteriormente el disolvente en el rotavapor, midiéndose las conversiones obtenidas mediante <sup>1</sup>H-RMN del crudo de reacción.

### 6.3.5. Síntesis química de la *N*-(5-hidroxiptil)acetamida (10)

A una disolución de **1** (499.3 mg, 4.84 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (49 mL), se le añade en porciones NEt<sub>3</sub> seca (2.03 mL, 14.54 mmoles), cantidades catalíticas de DMAP y por último anhídrido acético (457.6 μL, 4.84 mmol). La mezcla resultante se deja agitando durante 13 horas a temperatura ambiente. Trascurrido este tiempo, se elimina el disolvente en el rotavapor y el crudo de reacción se purifica mediante columna de cromatografía en gel de sílice, empleando una mezcla al 5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente, obteniéndose la acetamida **10** como un aceite incoloro (43% rendimiento), así como el compuesto diacetilado **11** (14% rendimiento). Cabe destacar que la ausencia de grupos aromáticos imposibilitó la identificación de los productos usando la lámpara UV, y que el revelador de KMnO<sub>4</sub> no resultó ser adecuado para esta reacción, encontrándose que el revelador de *p*-anisaldehído permitió identificar con claridad los compuestos de la mezcla de reacción.

### 6.3.6. Biooxidación de la *N*-(5-hidroxiptil)acetamida (10) con el sistema lacasa/TEMPO

A una disolución de **10** (15 mg, 0.103 mmol) en una mezcla formada por una disolución reguladora de citrato a pH 5 (0.650 mL) y de TBME (0.650 mL), se le añade TEMPO (4.84 mg, 0.3 equiv.) agitando magnéticamente hasta su completa disolución. A continuación se adiciona la lacasa de *Trametes versicolor* (5.84 mg, 79 U) y la disolución resultante se agita vigorosamente en un tubo de ensayo abierto en presencia de un globo de oxígeno a 40 °C. La mezcla se extrae con Et<sub>2</sub>O (3 × 5 mL) y se combinan las fases orgánicas que se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, evaporando posteriormente el disolvente en el rotavapor empleando un baño de agua-hielo debido a la alta volatilidad de los productos finales, midiéndose las conversiones obtenidas mediante <sup>1</sup>H-RMN del crudo de reacción.

### 6.3.7. Síntesis química de la *N*-(5-hidroxiptil)benzamida (15)

A una disolución de **1** (309.5 mg, 3 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (20 mL, 0.15 M), se le añaden NEt<sub>3</sub> seca (417.8 μL, 4.5 mmoles) y cloruro de benzoílo (421.7 mg, 3 mmoles) a 0 °C y se agita durante media hora. La mezcla resultante se deja calentar hasta temperatura ambiente y se agita durante 16 horas. Trascurrido este tiempo, se elimina el disolvente en el rotavapor y el crudo de

reacción se purifica mediante columna de cromatografía en gel de sílice, empleando como eluyente un gradiente 50-75% AcOEt/hexano, obteniéndose **15** como un aceite incoloro (87% rendimiento).

#### 6.3.8. Biooxidación de la *N*-(5-hidroxiptil)benzamida (**15**) con el sistema lacasa/TEMPO

A una disolución de **15** (16.6 mg, 0.080 mmol) en una mezcla formada por una disolución reguladora de citrato a pH 5 (2.0 mL) y de TBME (0.650 mL), se le añade TEMPO (3.75 mg, 0.3 equiv.) agitando magnéticamente hasta su completa disolución. A continuación se adiciona la lacasa de *Trametes versicolor* (4.75 mg, 65 U) y la disolución resultante se agita vigorosamente en un tubo de ensayo abierto en presencia de un globo de oxígeno a 40 °C durante 18 h. La mezcla se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 mL) y se combinan las fases orgánicas que se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, evaporando posteriormente el disolvente en el rotavapor, midiéndose las conversiones obtenidas mediante la técnica de cromatografía de gases con la columna aquiral Chiracel HP-1.

#### 6.3.9. Síntesis química del 5-(bencilamino)pentan-1-ol (**18**)

Una disolución de **1** (515.8 mg, 5 mmol) y benzaldehído (**20**, 610.7 µL, 6 mmol) en MeOH seco (10 mL), se calienta a reflujo durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se lleva a cabo la adición de borohidruro sódico (340.5 mg, 9 mmol) en pequeñas porciones durante un tiempo total de una hora. La mezcla resultante se agita durante 24 horas, tiempo tras el cual se añade HCl 6 M (3 mL) para la destrucción del hidruro en exceso, y después se filtra en celita. El MeOH se evapora en el rotavapor y la mezcla se extrae con AcOEt (3 × 15 mL), combinando posteriormente las fases orgánicas, que se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y evaporando el disolvente en el rotavapor. El crudo obtenido se purifica mediante cromatografía de columna en gel de sílice utilizando como eluyente un gradiente (100% AcOEt a 20% MeOH/AcOEt), aislando el aminoalcohol **18** como un aceite amarillento (46% rendimiento).

#### 6.3.10. Biooxidación del 5-(bencilamin)pentan-1-ol (**18**) con el sistema lacasa/TEMPO

**Protocolo 1:** A una disolución de **18** (15 mg, 0.072 mmol) en una mezcla formada por una disolución reguladora de Tris:HCl 200 mM pH 6.5 (0.645 mL) y de TBME (0.645 mL), se le ajusta el pH a 6.5 con HCl 3 M, y posteriormente se le añade TEMPO (3.64 mg, 0.3 equiv.) agitando magnéticamente hasta su completa disolución. A continuación se adiciona la lacasa de

*Trametes versicolor* (4.64 mg, 62 U) y la disolución resultante se agita vigorosamente en un tubo de ensayo abierto en presencia de un globo de oxígeno a 40 °C durante 18 h. La mezcla se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 mL) y se combinan las fases orgánicas. Posteriormente se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, evaporando posteriormente el disolvente en el rotavapor. Posteriormente se toma la fase acuosa y se lleva a pH básico con NaOH 3M, llevando una nueva extracción con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) donde se recupera el producto de partida. La conversión del proceso se calculó en base a la relación de mmoles de sustrato y mmoles de producto obtenidos en las dos fracciones obtenidas una vez corroborada su pureza por CG.

**Protocolo 2:** A una disolución de **18** (15 mg, 0.072 mmol) en una disolución reguladora de citrato 50 mM pH 5 (2.5 mL), ajustando posteriormente el pH a un valor de 5 con HCl 3 M debido a la basicidad aportada por el grupo amino, se le añade TEMPO (2.91 mg, 0.24 equiv.) agitando magnéticamente hasta su completa disolución. A continuación se adiciona la lacasa de *Trametes versicolor* (3.91 mg, 64 U) y la disolución resultante se agita vigorosamente en un tubo de ensayo abierto en presencia de un globo de oxígeno a 40 °C durante 18 h. La mezcla se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 mL) y se combinan las fases orgánicas. Luego se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, evaporando posteriormente el disolvente en el rotavapor. Posteriormente se toma la fase acuosa y se lleva a pH básico con NaOH 3M, llevando a cabo una nueva extracción con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL) donde se recupera el producto de partida. La conversión del proceso se calculó en base a la relación de mmoles de sustrato y mmoles de producto obtenidas en las dos fracciones obtenidas.

### 6.3.11. Síntesis química del 3-fenilpentanodioato de dietilo (**24**)<sup>69</sup>

Sobre una disolución del ácido 3-fenilglutárico (**23**, 999.4 mg, 4.80 mmol) en EtOH (48 mL, 0.1 M), se adiciona H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado (6 gotas) y la disolución se agita durante 3 horas a reflujo. Trascurrido este tiempo, se evapora el disolvente en el rotavapor y el crudo de reacción se purifica mediante columna cromatográfica en gel de sílice utilizando 100% AcOEt como eluyente, aislando el diéster **24** como un aceite incoloro (92% rendimiento).

### 6.3.12. Síntesis del 3-fenilpentano-1,5-diol (**25**)<sup>69</sup>

A una disolución de **24** (837.6 mg, 3.169 mmol) en Et<sub>2</sub>O seco (12 mL, 0.27 M) a 0 °C se añade cuidadosamente en 3 porciones y durante media hora LiAlH<sub>4</sub> (481 mg, 12.676 mmol) bajo atmósfera de nitrógeno. La disolución resultante se agita a temperatura ambiente durante 20 horas, tiempo tras el cual se detiene la reacción por adición de 8 mL de una disolución de NaHCO<sub>3</sub> al 5% p/v). El crudo se filtra a través de celita, y la disolución resultante se extrae con

Et<sub>2</sub>O (6 × 15 mL). Las fases orgánicas se juntan, se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el disolvente se evapora en el rotavapor. El crudo de reacción obtenido se purifica mediante columna de cromatografía en gel de sílice empleando como eluyente una mezcla 50% AcOEt/hexano, aislando el diol **25** como un aceite blanquecino (88% rendimiento).

#### **6.3.13. Síntesis química del (±)-3-fenil-5-hidroxipentil-1-metanosulfonato (26)**

En un bulbo y bajo atmósfera inerte se disuelve **25** (75.0 mg, 0.416 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (2 mL) y se añade NEt<sub>3</sub> seca (115.0 µL, 0.826 mmol). A continuación se añade cloruro de mesilo (47.7 mg, 0.416 mmol) a 0 °C y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 20 h. Transcurrido este tiempo se evapora el disolvente en el rotavapor, obteniéndose un crudo de reacción que se purifica mediante columna de cromatografía en gel de sílice empleando como eluyente una mezcla 60% AcOEt/hexano, aislando el compuesto monomesilado **28** como un aceite incoloro (20% rendimiento), así como el compuesto dimesilado **27** (25% rendimiento).

#### **6.3.14. Síntesis química del (±)-3-fenil-5-hidroxipentil-1-(4-metilbenceno)sulfonato (28)**

En un bulbo y bajo atmósfera inerte se disuelve **25** (75.0 mg, 0.416 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (2 mL) y se añade NEt<sub>3</sub> seca (115.0 µL, 0.826 mmol). A continuación se añade cloruro de tosilo (79.3 mg, 0.416 mmol) a 0 °C y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 12 h. Transcurrido este tiempo se detiene la reacción con agua (5 mL) y se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 mL). Las fases orgánicas se juntan, se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y el disolvente se evapora en el rotavapor. El crudo de reacción obtenido se purifica mediante columna de cromatografía en gel de sílice empleando como eluyente una mezcla 33% AcOEt/hexano, aislando el compuesto monotosilado **28** como un aceite (33% rendimiento), así como el compuesto ditosilado **29** (20% rendimiento).

#### **6.3.15. Síntesis química del (±)-3-fenil-5-(tritoloxi)pentan-1-ol (30)**

En un bulbo y bajo atmósfera inerte se disuelve **25** (94.0 mg, 0.522 mmoles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (2.6 mL) y se añade NEt<sub>3</sub> seca (72.7 µL, 0.522 mmol). A continuación se añade cloruro de tritilo en pequeñas porciones (145.5 mg, 0.522 mmol) a 0 °C y la reacción se agita a 40 °C durante 22 h. Transcurrido este tiempo se detiene la reacción con agua (1 mL), se evapora el disolvente en el rotavapor y el crudo de reacción obtenido se purifica mediante columna de



cromatografía en gel de sílice empleando como eluyente una mezcla 25% AcOEt/hexano, aislando el compuesto monotritilado **30** como un aceite (43% rendimiento).

#### 6.3.16. Síntesis química del ( $\pm$ )-5-azido-3-fenilpentan-1-ol (**31**)

A una disolución del producto monomesilado **26** y monotosilado **28** (0.774 mmol en total) en DMF seca (3.1 mL, 0.25 M) se añade NaN<sub>3</sub> (101.0 mg, 1.554 mmol) bajo atmósfera inerte. La suspensión resultante se agita a 55 °C durante 18 horas. Transcurrido este tiempo, la reacción se detiene adicionando agua (10 mL) y el residuo se extrae con Et<sub>2</sub>O (3 × 10 mL). Se combinan las fases orgánicas, se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se elimina el disolvente en el rotavapor. El crudo de reacción obtenido se purifica mediante columna de cromatografía en gel de sílice empleando como eluyente una mezcla 25% AcOEt/hexano, aislando el compuesto **31** como un aceite (51% rendimiento).

#### 6.3.17. Síntesis química del ( $\pm$ )-5-amino-3-fenilpentan-1-ol (**22**) a partir de **31**

A una disolución de la correspondiente azida **31** (80.1 mg, 0.390 mmol) en MeOH (3.9 mL, 0.1 M) se añade PPh<sub>3</sub> (155 mg, 0.577 mmol) agitando a temperatura ambiente hasta completa disolución de la mezcla. A continuación se añade agua destilada (10  $\mu$ L, 0.577 mmol) y se calienta la mezcla a 70 °C durante 14 horas. Transcurrido este tiempo el disolvente se evapora en el rotavapor y el crudo de reacción obtenido se purifica mediante columna de cromatografía en gel de sílice empleando como eluyente un gradiente (100% MeOH a 5% NH<sub>3</sub>/MeOH), aislando el aminoalcohol **22** como un aceite incoloro (69% rendimiento).

#### 6.3.18. Síntesis enzimática del acetato de (*S*)-5-hidroxi-3-fenilpentilo (**32**)

Una suspensión del diol **25** (50 mg, 0.227 mmol) y la lipasa AK de *Pseudomonas fluorescens* (50 mg) en acetato de vinilo (2.78 mL) se agita a 250 rpm y 4 °C bajo atmósfera de nitrógeno. La reacción se sigue tomando regularmente alícuotas hasta alcanzar una conversión completa (48 h). Transcurrido este tiempo, la enzima se filtra, se lava con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 mL) y el disolvente se evapora en el rotavapor. El crudo obtenido se purifica mediante columna de cromatografía en gel de sílice empleando como eluyente un gradiente (25-50% AcOEt/Hexano), aislando el (*S*)-mononoacetato **32** en forma enantioméricamente pura (75% rendimiento).

### 6.3.19. Síntesis química del acetato de (*R*)-3-fenil-5-(tosiloxi)-pentilo (**33**)

En un bulbo y bajo atmósfera inerte se disuelve el acetato (*S*)-**32** (148.9 mg, 0.670 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (3.3 mL, 0.2 M) y se añade NEt<sub>3</sub> seca (186.6 µL, 1.34 mmol). A continuación se añade cloruro de tosilo en pequeñas porciones (127 mg, 0.670 mmol) a 0 °C y la reacción se agita a temperatura ambiente durante 18 h. Transcurrido este tiempo se detiene la reacción con agua (3 mL) y la mezcla se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 3 mL). El crudo de reacción obtenido se purifica mediante columna de cromatografía en gel de sílice empleando como eluyente una mezcla 25% AcOEt/hexano, aislando el compuesto (*R*)-**33** como un aceite (71% rendimiento).

### 6.3.20. Síntesis química del acetato de (*S*)-5-azido-3-fenilpentilo (**34**)

A una disolución del compuesto (*R*)-**33** (176.9 mg, 0.470 mmoles) en DMF seca (1.88 mL, 0.25 M) se añade NaN<sub>3</sub> (61.1 mg, 0.940 mmol) bajo atmósfera inerte. La suspensión resultante se agita a 55 °C durante 20 horas. Transcurrido este tiempo, la reacción se detiene adicionando agua (10 mL) y el residuo se extrae con Et<sub>2</sub>O (3 × 10 mL). Se combinan las fases orgánicas, se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se elimina el disolvente en el rotavapor. El crudo de reacción obtenido se purifica mediante columna de cromatografía en gel de sílice empleando como eluyente una mezcla 10% AcOEt/hexano, aislando el compuesto (*S*)-**34** como un aceite (77% rendimiento).

### 6.3.21. Síntesis química del (*S*)-5-amino-3-fenilpentan-1-ol (**22**) a partir de **34**

A una disolución de la correspondiente azida **34** (89 mg, 0.359 mmoles) en MeOH (3.6 mL, 0.1 M) se añade PPh<sub>3</sub> (143 mg, 0.532 mmol) agitando a temperatura ambiente hasta completa disolución de la mezcla. A continuación se añade agua destilada (10 µL, 0.359 mmol) y se calienta la mezcla a 70 °C durante 14 horas. Transcurrido este tiempo el disolvente se evapora en el rotavapor y el crudo de reacción obtenido se purifica mediante columna de cromatografía en gel de sílice empleando como eluyente un gradiente (100% MeOH a 5% NH<sub>3</sub>/MeOH), aislando el aminoalcohol **22** como un aceite incoloro (83% rendimiento).

### 6.3.22. Biooxidación del (±)- ó (S)-5-amino-3-fenilpentan-1-ol (22) con el sistema lacasa/TEMPO

Se disuelve (±)- ó (S)-**22**, 15 mg, 0.0837 mmol) en una disolución reguladora de citrato 50 mM pH 5 (2.7 mL), ajustando posteriormente el pH al valor de 5 con HCl 3 M debido a la basicidad aportada por el sustrato. A esta disolución se le añade TEMPO (3.14 mg, 0.24 equiv.) agitando magnéticamente hasta su completa disolución. A continuación se adiciona la lacasa de *Trametes versicolor* (4.14 mg, 67 U/mL) y la disolución resultante se agita vigorosamente durante 18 horas en un tubo de ensayo abierto en presencia de un globo de oxígeno. La mezcla se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 mL) y se combinan las fases orgánicas que se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, evaporando posteriormente el disolvente en el rotavapor, obteniendo el hemiacetal (**35**) como aceite incoloro.

Para calcular la proporción del producto de partida y final en el crudo de reacción, se toma la fase acuosa y se lleva a pH básico con NaOH 3 N, se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 mL). Se combinan las fases orgánicas que se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, evaporando posteriormente el disolvente en el rotavapor, obteniendo el aminoalcohol **22** remanente como aceite incoloro.

La conversión del proceso se calculó en base a la relación de mmoles de sustrato y mmoles de producto obtenidos en las dos fracciones obtenidas.

### 6.3.23. Reoxidación del (±)- ó (S)-5-amino-3-fenilpentan-1-ol (35) con el sistema lacasa/TEMPO

A una disolución mayoritariamente del hemiacetal **35** (5 mg, 0.028 mmol) en una disolución reguladora de citrato 50 mM a pH 5 (2 mL), se le añade TEMPO (2.2 mg, 0.24 equiv.) agitando magnéticamente hasta su completa disolución. A continuación se adiciona la lacasa de *Trametes versicolor* (4 mg, 65 U) y la disolución resultante se agita vigorosamente en un tubo de ensayo abierto en presencia de un globo de oxígeno a 40 °C durante 18 horas. La mezcla se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 5 mL) y se combinan las fases orgánicas que se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, evaporando posteriormente el disolvente en el rotavapor, midiéndose las conversiones obtenidas mediante CG.

### 6.3.24. Síntesis química de la (S)-N-(5-hidroxi-3-fenilpentil)acetamida (37)

A una disolución de (S)-**22** (43 mg, 0.2398 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (2.3 mL), se le añade en porciones NEt<sub>3</sub> seca (100.2 µL, 0.719 mmoles), una cantidad catalítica de DMAP y por

último anhídrido acético (22.3  $\mu\text{L}$ , 0.2398 mmol). La mezcla resultante se deja agitando durante 48 horas a temperatura ambiente. Trascurrido este tiempo, se elimina el disolvente en el rotavapor y el crudo de reacción se purifica mediante columna de cromatografía en gel de sílice, empleando una mezcla al 5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como eluyente, obteniéndose la mezcla de los productos (*S*)-**37** y (*S*)-**38** como resultado de la migración del grupo acetilo que imposibilitó el correcto aislamiento del compuesto deseado.

#### 6.3.25. Síntesis química de la (*S*)-*N*-(5-hidroxi-3-fenilpentil)benzamida (**39**)

A una disolución de (*S*)-**22** (116 mg, 0.6471 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> seco (4.3 mL, 0.15 M), se le añaden NEt<sub>3</sub> seca (119  $\mu\text{L}$ , 0.860 mmoles) y cloruro de benzoílo (75.49  $\mu\text{L}$ , 0.6471 mmoles) a 0 °C y se agita durante media hora. La mezcla resultante se deja calentar hasta temperatura ambiente y se agita durante 16 horas. Trascurrido este tiempo, se elimina el disolvente en el rotavapor y el crudo de reacción se purifica mediante columna de cromatografía en gel de sílice, empleando como eluyente un gradiente 50-75% AcOEt/hexano, obteniéndose el compuesto (*S*)-**39** como un aceite incoloro (70% rendimiento).

#### 6.3.26. Biooxidación de la (*S*)-*N*-(5-hidroxi-3-fenilpentil)benzamida (**39**) con el sistema lacasa/TEMPO

A una disolución de (*S*)-**39** (15 mg, 0.053 mmol) en una mezcla formada por una disolución reguladora de citrato 50 mM pH 5 (1.32 mL) y de TBME (1.32 mL), se le añade TEMPO (2.48 mg, 0.3 equiv.) agitando magnéticamente hasta su completa disolución. A continuación se adiciona la lacasa de *Trametes versicolor* (3.48 mg, 58 U) y la disolución resultante se agita vigorosamente en un tubo de ensayo abierto en presencia de un globo de oxígeno a 40 °C durante 18 h. La mezcla se extrae con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3  $\times$  5 mL) y se combinan las fases orgánicas que se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, evaporando posteriormente el disolvente en el rotavapor, midiéndose las conversiones obtenidas mediante la técnica de cromatografía de gases con la columna aquiral Chiracel HP-1.

## 6.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

### 6.4.1. Determinación de las conversiones por CG en fase aquiral

Para las determinación de las conversiones en las reacciones de oxidación empleando el sistema catalítico lacasa/TEMPO se utilizó la columna de gases aquiral Hewlett Packard HP-1 (30 m x 0.32 mm x 0.25  $\mu$ m, 12.2 psi N<sub>2</sub>).

**Tabla 4.** Tiempos de retención medidos mediante cromatografía de gases

Compuesto	Programa <sup>a</sup>	Tiempos de retención (min)				
		PP	Hemiacetal	Lactona	Aldehído	Lactama
<b>18</b>	50/3/10/200/2	16,8	-	8,5	5,3 <sup>c</sup>	
<b>22</b>	90/0/5/180/3	14,9	4,4/10,4 <sup>b</sup>	12,1	-	-
<b>35</b>	90/0/5/180/3	-	4,4/10,4 <sup>b</sup>	12,1	-	-
<b>39</b>	100/0/10/250/5	17,1	-	-	15,1	15,9

<sup>a</sup> Programa: temperatura inicial (°C)/ tiempo (min)/ pendiente (°C/min)/ temperatura (°C)/ tiempo (min).

<sup>b</sup> Los dos tiempos de retención se corresponden con los dos diastereoisómeros del hemiacetal **35**.

<sup>c</sup> En esta ocasión el aldehído no es el correspondiente al aminoalcohol oxidado en forma abierta, sino benzaldehído que se forma al desprotegerse el grupo protector bencilo.

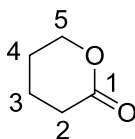
### 6.4.2. Determinación de los *ees* por HPLC quiral

Para el cálculo de los *ees* en la desimetrización del diol **25** se utilizó la columna Chiralcel OJ-H (0.46 cm x 25 cm, Daicel Chemical Ind. Ltd.), empleando un flujo de 0.8 mL/min, 30 °C y un eluyente 90:10 (*n*-hexano:EtOH), obteniéndose los siguientes tiempos de reacción:

- Diol **25**: 13.9 min
- Monoacetato (*R*)-**32**: 15.8 min
- Diacetato: 20.0 min
- Monoacetato (*S*)-**32**: 25.0 min

## 6.5. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS

### $\delta$ -Valerolactona (2)



Aceite incoloro

**Fórmula empírica:** C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 100.12 g/mol

**R<sub>f</sub>** (30% AcOEt/hexano): 0.35

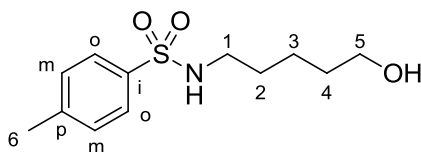
**IR** (NaCl):  $\nu$  2952, 1731, 1245, 2869, 1176 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  4.49 (*m*, 2H, H<sub>5</sub>), 2.63 (*m*, 2H, H<sub>2</sub>), 1.90 (*m*, 4H, H<sub>3</sub>+H<sub>4</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  172.1 (C, C<sub>1</sub>), 70.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>5</sub>), 30.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 23.2 (CH<sub>2</sub>, 1C, C<sub>4</sub>), 19.9 (CH<sub>2</sub>, 1C, C<sub>3</sub>)

**EM APCI<sup>+</sup>** (*m/z*): 101 [(M+H)<sup>+</sup>, 100]

***N*-(5-Hidroxipentil)-(4-metilbenzeno)sulfonamida (6)**



Sólido blanco

**Rendimiento:** 89%

**Fórmula empírica:** C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>3</sub>S

**Peso molecular:** 257.35 g/mol

**R<sub>f</sub>** (75% AcOEt/hexano): 0.56

**PF:** 55-63 °C

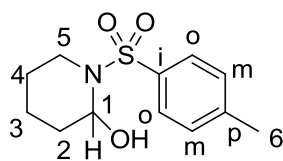
**IR** (NaCl):  $\nu$  3285, 3055, 2939, 2865, 1598, 1421, 1324, 1265, 1158 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  7.76 (*d*, 2H, *J* = 6.0 Hz, H<sub>o</sub>), 7.27 (*d*, 2H, *J* = 6.0 Hz, H<sub>m</sub>), 3.62 (*t*, 2H, *J* = 3.0 Hz, H<sub>5</sub>), 3.00 (*m*, 2H, H<sub>1</sub>), 2.49 (*s*, 3H, H<sub>6</sub>), 1.51 (*m*, 6H, H<sub>2</sub>+H<sub>3</sub>+H<sub>4</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  137.6 (C, C<sub>p</sub>), 137.2 (C, C<sub>i</sub>), 129.3 (CH, 2C, C<sub>m</sub>), 128.3 (CH, 2C, C<sub>o</sub>), 62.8 (CH<sub>2</sub>, C<sub>5</sub>), 42.8 (CH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>), 26.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 22.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>)

**EM APCI<sup>+</sup>** (*m/z*): 258 [(M+H)<sup>+</sup>, 100]

**1-Tosilpiperidin-2-ol (7)**



Aceite amarillento

**Fórmula empírica:** C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>

**Peso molecular:** 253.33 g/mol

**R<sub>f</sub>** (25% AcOEt/hexano): 0.28

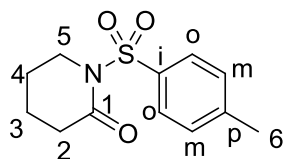
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 7.73 (*d*, 2H, *J* = 8.3 Hz, H<sub>o</sub>), 7.33 (*d*, 2H, *J* = 8.3 Hz, H<sub>m</sub>), 5.56 (*m*, 1H, H<sub>1</sub>), 3.57 (*ddd*, 1H, *J* = 12.2, 4.5, 2.5 Hz, H<sub>5</sub>), 3.11 (*ap td*, 1H, *J* = 12.2, 2.9 Hz, H<sub>5</sub>), 2.54 (*sa*, 4H, OH+H<sub>6</sub>), 1.5-1.9 (*m*, 6H, H<sub>2</sub>+H<sub>3</sub>+H<sub>4</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 143.6 (C, C<sub>i</sub>), 137.0 (C, C<sub>p</sub>), 129.8 (CH, 2C, C<sub>o</sub>), 127.3 (CH, 2C, C<sub>m</sub>), 77.1 (CH, C<sub>1</sub>), 40.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>5</sub>), 31.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 24.9 (CH<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>), 21.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>), 17.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>)

**EM APCI<sup>+</sup>** (*m/z*): 254 [(M+H)<sup>+</sup>, 100]



**1-Tosilpiperidin-2-ona (9)**



Sólido blanco

**Fórmula empírica:** C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>3</sub>

**Peso molecular:** 253.32 g/mol

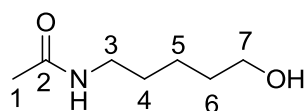
**R<sub>f</sub>** (20% AcOEt/hexano): 0.71

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 7.96 (*d*, 2H, *J* = 8.4 Hz, H<sub>o</sub>), 7.33 (*d*, 2H, *J* = 8.6 Hz, H<sub>m</sub>), 3.93 (*t*, 2H, *J* = 4.5 Hz, H<sub>5</sub>), 2.43 (*m*, 5H, H<sub>2</sub>+H<sub>6</sub>), 1.93 (*m*, 2H, H<sub>4</sub>), 1.80 (*m*, 2H, H<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 170.2 (C, C<sub>1</sub>), 144.7 (C, C<sub>i</sub>), 136.1 (C, C<sub>p</sub>), 129.3 (CH, 2C, C<sub>o</sub>), 128.7 (CH, 2C, C<sub>m</sub>), 46.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>5</sub>), 34.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 23.3 (CH<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>), 21.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>), 20.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>)

**EM APCI<sup>+</sup>** (*m/z*): 253 [(M)<sup>+</sup>, 100]

**N-(5-Hidroxipentil)acetamida (10)**



Aceite amarillento

**Rendimiento:** 43%

**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 145.20 g/mol

**R<sub>f</sub>** (5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.25

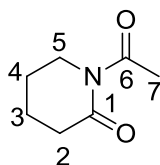
**IR** (NaCl):  $\nu$  3299, 2935, 1650, 1556, 1297, 1055 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  3.70 (*t*, 2H, *J* = 6.0 Hz, H<sub>7</sub>), 3.26 (*m*, 2H, H<sub>3</sub>), 2.71 (*s*, 3H, H<sub>1</sub>), 1.49-1.67 (*m*, 4H, H<sub>4</sub>+H<sub>6</sub>), 1.32-1.48 (*m*, 2H, H<sub>5</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  170.5 (C, C<sub>2</sub>), 62.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>7</sub>), 39.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>), 32.0 (CH<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>), 29.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>), 23.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>), 23.0 (CH<sub>2</sub>, C<sub>5</sub>)

**EM APCI<sup>+</sup>** (*m/z*): 146 [(M+H)<sup>+</sup>, 100]

**1-Acetilpiperidin-2-ona (12)**



Aceite amarillento

**Fórmula empírica:** C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 141.17 g/mol

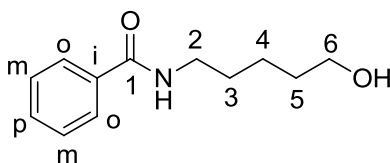
**R<sub>f</sub>** (100% AcOEt/hexano): 0.63

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 4.78 (*t*, 2H, *J* = 7.1 Hz, H<sub>5</sub>), 2.56 (*s*, 3H, H<sub>7</sub>), 2.19 (*t*, 2H, *J* = 7.1 Hz, H<sub>2</sub>), 1.73 (*m*, 2H, H<sub>4</sub>), 1.51 (*m*, 2H, H<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 174.1 (C, C<sub>6</sub>), 171.2 (C, C<sub>1</sub>), 48.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>5</sub>), 32.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 22.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>), 21.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>)

**EM APCI<sup>+</sup>** (*m/z*): 142 [(M+H)<sup>+</sup>, 100]

**N-(5-Hidroxipentil)benzamida (15)**



Aceite incoloro

**Rendimiento:** 87%

**Fórmula empírica:** C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 207.27 g/mol

**R<sub>f</sub>** (75% AcOEt/hexano): 0.21

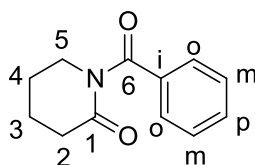
**IR** (NaCl):  $\nu$  3321, 2935, 2861, 1639, 1547, 1490, 1311 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  7.77 (*d*, 2H, *J* = 9 Hz, H<sub>o</sub>), 7.47 (*m*, 3H, H<sub>m</sub>+H<sub>p</sub>), 3.66 (*t*, 2H, *J* = 6.0 Hz, H<sub>6</sub>), 3.47 (*m*, 2H, H<sub>2</sub>), 1.63 (*m*, 4H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>), 1.46 (*m*, 2H, H<sub>4</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  167.8 (C, C<sub>1</sub>), 134.6 (C, C<sub>i</sub>), 131.3 (CH, 2C, C<sub>o</sub>), 128.5 (CH, 2C, C<sub>m</sub>), 126.9 (CH, H<sub>p</sub>), 62.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>), 39.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 32.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>5</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>), 23.2 (CH<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>)

**EM APCI<sup>+</sup>** (*m/z*): 208 [(M+H)<sup>+</sup>, 100]

**1-Benzoilpiperidin-2-ona (16)**



Sólido blanco

**Conversión:** 80%

**Fórmula empírica:** C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 203.24 g/mol

**R<sub>f</sub>** (30% AcOEt/hexano): 0.33

**PF:** 100-119 °C

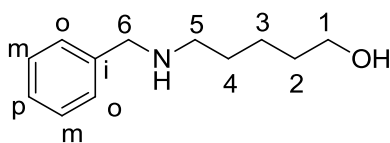
**IR** (NaCl):  $\nu$  3054, 2986, 1702, 1681, 1265 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  7.58 (*d*, 2H, *J* = 6.0 Hz, H<sub>o</sub>), 7.55 (*m*, 1H, H<sub>p</sub>), 7.41 (*m*, 2H, H<sub>m</sub>), 3.82 (*t*, 2H, *J* = 6.0 Hz, H<sub>5</sub>), 2.59 (*t*, 2H, *J* = 6.1 Hz, H<sub>2</sub>), 1.99 (*m*, 4H, H<sub>3</sub>+H<sub>4</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  174.6 (C, C<sub>6</sub>), 173.5 (C, C<sub>1</sub>), 136.2 (C, C<sub>i</sub>), 131.4 (CH, C<sub>p</sub>), 128.1 (CH, 2C, C<sub>m</sub>), 127.9 (CH, 2C, C<sub>o</sub>), 46.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>5</sub>), 34.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 22.8 (CH<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>), 21.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>)

**EM APCI<sup>+</sup>** (*m/z*): 204 [(M+H)<sup>+</sup>, 100]

**5-(Bencilamino)pentan-1-ol (18)**



Aceite amarillento

**Rendimiento:** 43%

**Fórmula empírica:** C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>NO

**Peso molecular:** 193.15 g/mol

**R<sub>f</sub>** (20% /MeOH/AcOEt): 0.18

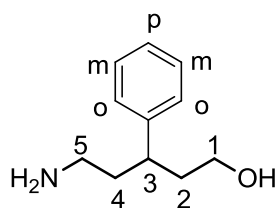
**IR** (NaCl): 3304, 2931, 2857, 1602, 1494, 1453, 1104 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 7.30 (*m*, 5H, H<sub>o</sub>+H<sub>m</sub>+H<sub>p</sub>), 3.79 (*s*, 2H, H<sub>6</sub>), 3.63 (*m*, 2H, H<sub>1</sub>), 2.63 (*t*, 2H, *J* = 6.0 Hz, H<sub>5</sub>), 1.95 (*sa*, 2H, NH+OH), 1.58 (*m*, 4H, H<sub>2</sub>+H<sub>4</sub>), 1.47 (*m*, 2H, H<sub>3</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 140.5 (C, C<sub>i</sub>), 128.8 (CH, 2C, C<sub>o</sub>), 128.5 (CH, 2C, C<sub>m</sub>), 127.3 (CH, C<sub>p</sub>), 62.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>), 54.4 (CH<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>), 49.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>5</sub>), 32.8 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 29.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>), 23.8 (CH<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>)

**EM APCI<sup>+</sup>** (*m/z*): 194 [(M+H)<sup>+</sup>, 100]

(±)-5-Amino-3-fenilpentan-1-ol (22)



Aceite incoloro

**Rendimiento:** 27%

**Fórmula empírica:** C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>NO

**Peso molecular:** 179.13 g/mol

**R<sub>f</sub>** (2% NH<sub>3</sub>/MeOH): 0.30

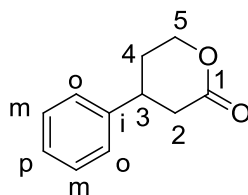
**IR** (NaCl):  $\nu$  3357, 3290, 2930, 2869, 1597, 1490, 1451, 1051, 761, 735, 703 cm<sup>-1</sup>

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz):  $\delta$  7.19-7.30 (*m*, 2H, H<sub>o</sub>), 7.05-7.18 (*m*, 3H, H<sub>m</sub>+H<sub>p</sub>), 3.41-3.58 (*m*, 2H, H<sub>1</sub>), 2.82 (*m*, 1H, H<sub>3</sub>), 2.57 (*t*, *J* = 7.2 Hz, 2H, H<sub>5</sub>), 1.73-2.05 (*m*, 4H, H<sub>2</sub>+H<sub>4</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz):  $\delta$  144.6 (C, C<sub>i</sub>), 128.2 (CH, 2C, C<sub>m</sub>), 127.3 (CH, 2C, C<sub>o</sub>), 126.0 (CH, C<sub>p</sub>), 59.6 (CH<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>), 39.5 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>+C<sub>3</sub>+C<sub>4</sub>+C<sub>5</sub>).

**EM APCI<sup>+</sup>** (*m/z*): 180 [(M+H)<sup>+</sup>, 100]

**(±)-3-Fenil-δ-valerolactona (36)**



Aceite incoloro

**Fórmula empírica:** C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 176.21 g/mol

**R<sub>f</sub>** (100% AcOEt): 0.85

**IR** (NaCl): ν 2957, 1731, 1262, 1161, 701 cm<sup>-1</sup>

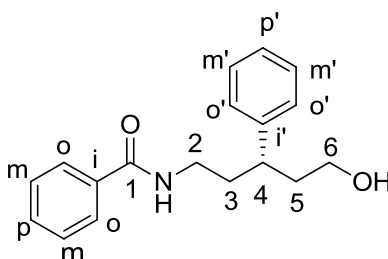
**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 7.42-7.20 (*m*, 5H, H<sub>o</sub>+H<sub>m</sub>+H<sub>p</sub>), 4.53 (*m*, 1H, H<sub>5</sub>), 4.41 (*m*, 1H, H<sub>5</sub>), 3.24 (*m*, 1H, H<sub>3</sub>), 2.95 (*dd*, 1H, *J* = 17.6, 5.6 Hz, H<sub>2</sub>), 2.65 (*dd*, 1H, *J* = 17.6, 11.8 Hz, H<sub>2</sub>), 2.08 (*m*, 2H, H<sub>4</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 171.1 (C, C<sub>i</sub>), 143.2 (CH, 2C, C<sub>m</sub>), 129.4 (CH, 2C, C<sub>o</sub>), 127.6 (CH, C<sub>p</sub>), 69.0 (CH<sub>2</sub>, C<sub>5</sub>), 37.9 (CH<sub>2</sub>+CH, 2C, C<sub>2</sub>+C<sub>3</sub>), 30.7 (CH<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>)

**EM APCI<sup>+</sup>** (*m/z*): 177 [(M+H)<sup>+</sup>, 100]



(S)-N-(5-Hidroxi-3-fenilpentil)benzamida (39)



Aceite incoloro

**Rendimiento:** 70%

**Fórmula empírica:** C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 283.36 g/mol

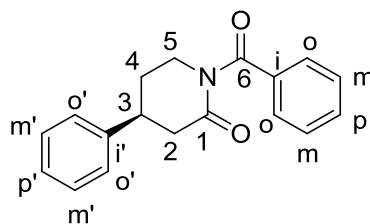
**R<sub>f</sub>** (60% AcOEt/hexano): 0.24

**<sup>1</sup>H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 7.60 (*d*, 2H, *J* = 8.1 Hz, H<sub>o</sub>), 7.33 (*d*, 2H, *J* = 6 Hz, H<sub>o'</sub>), 7.26 (*m*, 6H, H<sub>m</sub>+H<sub>m'</sub>+H<sub>p</sub>+H<sub>p'</sub>), 6.69 (*sa*, 1H, NH), 3.39 (*m*, 2H, H<sub>6</sub>), 3.24 (*m*, 2H, H<sub>2</sub>), 2.99 (*sa*, 1H, OH), 2.85 (*m*, 1H, H<sub>4</sub>), 1.85 (*m*, 4H, H<sub>3</sub>+H<sub>5</sub>)

**<sup>13</sup>C-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 75.5 MHz): δ 167.8 (C, C<sub>1</sub>), 144.7 (C, C<sub>i</sub>), 134.8 (C, C<sub>i'</sub>), 131.7 (CH, C<sub>p</sub>), 129.2 (CH, 4C, C<sub>m</sub>+C<sub>m'</sub>), 128.8 (CH, 2C, C<sub>o</sub>), 127.9 (CH, 2C, C<sub>o'</sub>), 127.1 (CH, C<sub>p</sub>), 60.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>6</sub>), 40.9 (CH<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>), 39.8 (CH<sub>2</sub>, C<sub>5</sub>), 39.1 (CH<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>), 36.6 (CH, C<sub>4</sub>)

**EM APCI<sup>+</sup>** (*m/z*): 284 [(M+H)<sup>+</sup>, 100]

**(R)-1-Benzoil-4-fenilpiperidin-2-ona (40)**



Aceite amarillento

**Fórmula empírica:** C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub>

**Peso molecular:** 279.33 g/mol

**R<sub>f</sub>** (40% AcOEt/hexano): 0.70

**H-RMN** (CDCl<sub>3</sub>, 300.13 MHz): δ 7.59 (*d*, 2H, *J* = 9.0 Hz, H<sub>o</sub>), 7.26-7.58 (*m*, 8H, H<sub>o'</sub>+H<sub>m</sub>+H<sub>m'</sub>+H<sub>p</sub>+H<sub>p'</sub>), 4.04 (*m*, 2H, H<sub>5</sub>), 3.27 (*m*, 1H, H<sub>3</sub>), 2.81 (*m*, 2H, H<sub>2</sub>), 2.37 (*m*, 2H, H<sub>4</sub>)

**EM APCI<sup>+</sup>** (*m/z*): 280 [(M+H)<sup>+</sup>, 100]

## **REFERENCIAS**



1. A. Mitchinson, J. Finkelstein, *Nature* **2008**, *455*, 303.
2. (a) P. Anastas, N. Eghbali, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 301-312; (b) J. M. Clark, *Nature Chem.* **2009**, *1*, 12-13.
3. S. Riva, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 219-226.
4. K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6<sup>a</sup> Ed., Springer, Berlin, **2011**.
5. (a) U. T. Bornscheuer, R. J. Kazlauskas, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 1695-1733; (b) M. S. Humble, P. Berglund, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3391-3401; (c) K. Hult, P. Berglund, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 232-238.
6. P. Raspor, D. Goranovič, *Critical Rev. Biotechnol.* **2008**, *28*, 101-124.
7. A. Zaks, A. M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 3192-3196.
8. U. T. Bornscheuer, G. W. Huisman, R. J. Kazlauskas, S. Lutz, J. C. Moore, K. Robins, *Nature* **2012**, *485*, 185-194.
9. Algunas revisiones recientes: (a) T. Davids, M. Schmidt, D. Böttcher, U. T. Bornscheuer, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, *17*, 215-220; (b) U. T. Bornscheuer, *Synlett* **2013**, *24*, 150-156; (c) M. B. Quin, C. Schmidt-Dannert, *ACS Catal.* **2011**, *1*, 1017-1021; (d) G. A. Behrens, A. Hummel, S. K. Padhi, S. Schätzle, U. T. Bornscheuer, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2191-2215; (e) S. Lutz, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 734-743; (f) C. Jäckl, D. Hilvert, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2010**, *21*, 753-759.
10. (a) M. T. Reetz, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 119-190; (b) M. J. Dougherty, F. H. Arnold, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2009**, *20*, 486-491.
11. M. T. Reetz, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 7530-7548.
12. P. J. Dunn, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1452-1461.
13. G. Zheng, J. Xu, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *22*, 784-792.
14. E. Thall, *J. Chem. Educ.* **1996**, *73*, 481-484.
15. (a) S. Wenda, S. Illner, A. Mell, U. Kragl, *Green Chem.* **2011**, *130*, 3007-3047; (b) N. Ran, L. Zhao, Z. Chen, J. Tao, *Green Chem.* **2008**, *10*, 361-372.

16. C. D. Murphy, *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 1949-1957.
17. (a) D. Monti, G. Ottolina, G. Carrea, S. Riva, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4111-4140; (b) M. Hall, A. S. Bommaris, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 4088-4110; (c) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, K. Buehler, A. Schallmey, B. Bühler, *Green Chem.* **2011**, *13*, 226-265; (d) F. Hollmann, I. W. C. E. Arends, D. Holtmann, *Green Chem.* **2011**, *13*, 2285-2313; (e) *Modern Biooxidation. Enzymes, Reactions and Applications*, Eds. R. D. Schmid, V. B. Urlacher, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
18. Revisiones bibliográficas recientes: (a) F. Hollmann, K. Bühler, B. Bühler, en *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Eds. K. Drauz, H. Gröger, O. May, 3<sup>a</sup> Ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2012**, pp. 1325-1438; (b) M. M. Musa, R. S. Phillips, *Catal. Sci. Technol.* **2011**, *1*, 1311-1323; (c) G. W. Huisman, J. Liang, A. Krebber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 122-129; (d) S. Buchholz, H. Gröger, en *Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industry*, Ed. R. N. Patel, CRC Press, Boca Raton, **2007**, pp. 757-790; (e) S. M. A. de Wildeman, T. Sonke, H. E. Schoemaker, O. May, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1260-1266; (f) J. C. Moore, D. J. Pollard, B. Kosjek, P. N. Devine, *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*, 1412-1419; (g) K. Goldberg, K. Schroer, S. Lütz, A. Liese, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *76*, 237-248; (h) W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber, *Adv. Synth. Catal.* **2004**, *346*, 125-142; (i) W. Kroutil, H. Mang, K. Edegger, K. Faber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 120-126.
19. *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Eds. P. A. Frey, A. D. Hegeman, Oxford University Press, Nueva York, **2007**.
20. N. H. Schlieben, K. Niefind, J. Müller, B. Riebel, W. Hummel, D. Schomburg, *J. Mol. Biol.* **2005**, *349*, 801-813.
21. Revisiones bibliográficas recientes: (a) H. Wu, C. Tian, X. Song, C. Liu, D. Yang, Z. Jiang, *Green Chem.* **2013**, *15*, 1773-1789; (b) C. Rodríguez, I. Lavandera, V. Gotor, *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 2525-2541; (c) A. Weckbecker, H. Gröger, W. Hummel, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2010**, *120*, 195-242.
22. J. Grunwald, B. Wirz, M. P. Scollar, A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6732-6734.
23. V. Prelog, *Pure Appl. Chem.* **1964**, *9*, 119-130.
24. El alcohol obtenido será de configuración *S* siempre que el grupo de mayor tamaño unido a la cetona presente también la prioridad siguiendo las reglas de nomenclatura de Cahn-Ingold-Prelog (CIP).

25. T. Fukui, M. H. Zong, T. Kawamoto, A. Tanaka, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *38*, 209-213.
26. K. Edegger, C. C. Gruber, T. M. Poessl, S. R. Wallner, I. Lavandera, K. Faber, F. Niehaus, J. Eck, R. Oehrlein, A. Hafner, W. Kroutil, *Chem. Commun.* **2006**, *23*, 2402-2404.
27. A. Weckbecker, W. Hummel, *Biocatal. Biotransform.* **2006**, *24*, 380-389.
28. (a) V. B. Urlacher, R. D. Schmid, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 156-161; (b) J. B. van Beilen, W. A. Duetz, A. Schmid, B. Witholt, *Trends. Biotechnol.* **2003**, *21*, 170-177; (c) S. G. Burton, *Trends Biotechnol.* **2003**, *21*, 543-549.
29. (a) G. de Gonzalo, M. W. Fraaije, *ChemCatChem* **2013**, *5*, 403-415; (b) G. de Gonzalo, M. D. Mihovilovic, M. W. Fraaije, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2208-2231.
30. E. W. Hellemond, N. G. H. Leferink, D. P. H. M. Heuts, M. W. Fraaije, W. J. H. van Berkel, *Adv. Appl. Microbiol.* **2006**, *60*, 17-54.
31. N. J. Turner, *Chem Rev.* **2011**, *111*, 4073-4087.
32. K. J. Kramer, M. R. Kanost, T. L. Hopkins, H. Jiang, Y. C. Zhu, R. Xu, J. L. Kerwin, F. Turecek, *Tetrahedron* **2001**, *57*, 385-392.
33. H. Claus, *Arch. Microbiol.* **2003**, *179*, 145-150.
34. (a) K. Piontek, M. Antorini, T. Choinowski, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 37663-37669; (b) E. I. Solomon, U. M. Sundaram, T. E. Machonkin, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2563-2605.
35. H. Claus, *Micron* **2004**, *35*, 93-96.
36. R. Ludwig, M. Ozga, M. Zamocky, C. Peterbauer, K. D. Kulbe, D. Haltrich, *Biocatal. Biotransform.* **2004**, *22*, 97-104.
37. H. P. Call, H. P. I. Mucke, *J. Biotechnol.* **1997**, *53*, 163-202.
38. S. A. Tromp, I. Matijošytė, R. A. Sheldon, I. W. C. E. Arends, G. Mul, M. T. Kreutzer, J. A. Moulijn, S. de Vries, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 827-833.
39. M. Fabbrini, C. Galli, P. Gentili, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *18*, 169-171.
40. F. d'Acunzo, A. M. Barreca, C. Galli, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *31*, 25-30.
41. Bibliografía reciente: (a) D. N. Tran, K. J. Balkus, *ACS Catal.* **2011**, *1*, 956-968; (b) U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 453-468; (c) R. A. Sheldon, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1289-1307.

42. (a) D. M. Alonso, S. G. Wettstein, J. A. Dumesic, *Green Chem.* **2013**, *15*, 584-595; (b) P. Azadi, R. Carrasquillo-Flores, Y. J. Pagán-Torres, E. I. Gürbüz, R. Farnood, J. A. Dumesic, *Green Chem.* **2012**, *14*, 1573-1576; (c) L.-S. Wang, H.-C. Chen, Z.-C. Xiong, X.-B. Pang, C.-D. Xiong, *Macromol. Mater. Eng.* **2010**, *295*, 381-385; (d) F. Fay, E. Renard, V. Langlois, I. Linossier, K. Vallee-Rehel, *Eur. Polym. J.* **2007**, *43*, 4800-4813.
43. (a) E. Valeur, M. Bradley, *Chem. Commun.* **2005**, 1164-1167; (b) C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852; (c) C. Nájera, *Synlett* **2002**, 1388-1403.
44. (a) C. Chen, S. H. Hong, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 20-26; (b) C. Gunanathan, Y. Ben-David, D. Milstein, *Science* **2007**, *317*, 790-792.
45. T. Naota, S.-I. Murahashi, *Synlett* **1991**, 693-694.
46. (a) K. Fujita, Y. Takahashi, M. Owaki, K. Yamamoto, R. Yamaguchi, *Org. Lett.* **2004**, *6*, 2785-2788; (b) K. Fujita, K. Yamamoto, R. Yamaguchi, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2691-2694.
47. B. P. Babu, Y. Endo, J.-E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 11524-11527.
48. (a) Y. Endo, J.-E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 12596-12601; (b) J. S. M. Samec, A. H. Éll, J.-E. Bäckvall, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 2327-2334; (c) J. S. M. Samec, A. H. Éll, J.-E. Bäckvall, *Chem. Commun.* **2004**, 2748-2749; (d) G. Csajernyik, A. H. Éll, L. Fadini, B. Pugin, J.-E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1657-1662; (e) A. H. Éll, J. S. M. Samec, C. Brasse, J.-E. Bäckvall, *Chem. Commun.* **2002**, 1144-1145; (f) J. Wöltinger, J.-E. Bäckvall, A. Zsigmond, *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1460-1467; (g) J.-E. Bäckvall, R. B. Hopkins, H. Grennberg, M. M. Mader, A. K. Awasthi, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5160-5166.
49. A. Nova, D. Balcells, N. D. Schley, G. E. Dobereiner, R. H. Crabtree, O. Eisenstein, *Organometallics* **2010**, *29*, 6548-6558.
50. E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3998-4035.
51. E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 4504-4523.
- 52.- E. Forró, T. Paál, G. Tasnádi, F. Fulop, *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348*, 917-923.
53. R. Brieva, J. Z. Crich, C. J. Sih, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1068-1075.
54. X.-G. Li, M. Lahitie, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry* **2008**, *19*, 1857-1861.
55. (a) X.-G. Li, L. T. Kanerva, *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2468-2472; (b) E. Forro, F. Fülöp, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 2351-2358.



56. A. Coniglio, C. Galli, P. Gentili, R. Vadalà, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *50*, 40-49.
57. Ejemplos recientes: (a) K.-N. T. Tseng, J. W. Kampf, N. K. Szymczak, *Organometallics* **2013**, *32*, 2046-2049; (b) J. Zhang, E. Balaraman, G. Leitus, D. Milstein, *Organometallics* **2011**, *30*, 5716-5724; (c) J. M. Hoover, S. S. Stahl, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16901-16910; (d) T. Buntara, S. Noel, P. H. Phua, I. Melian-Cabrera, J. G. de Vries, H. J. Heeres, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7083-7087.
58. (a) J. Liu, Z. Li, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 908-911; (b) C. Szolkowy, L. D. Eltis, N. C. Bruce, G. Grogan, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1208-1217.
59. J. van Buijtenen, B. A. C. van As, M. Verbruggen, L. Roumen, J. A. J. M. Vekemans, K. Pieterse, P. A. J. Hilbers, L. A. Hulshof, A. R. A. Palmans, E. W. Meijer, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7393-7398.
60. A. Kamal, M. Sandbhor, A. A. Shaik, *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 1575-1580.
61. A.-B. L. Fransson, L. Borén, O. Pàmies, J.-E. Bäckvall, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 2582-2587.
62. (a) T. Fischer, J. Pietruszka, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 2521-2530; (b) M. Korpak, J. Pietruszka, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 1420-1424.
63. F. Boratyński, G. Kiełbowicz, C. Wawrzeńczyk, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2010**, *65*, 30-36.
64. A. Díaz-Rodríguez, I. Lavandera, S. Kanbak-Aksu, R. A. Sheldon, V. Gotor, V. Gotor-Fernández, *Adv. Synth. Catal.* **2012**, *354*, 3405-3408.
65. (a) S. Desjardins, G. Jacquemot, S. Canesi, *Synlett* **2012**, 1497-1500; (b) J. Srogl, S. Voltrova, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 843-845.
66. (a) P. Gavezzotti, C. Navarra, S. Caufin, B. Danieli, P. Magrone, D. Monti, S. Riva, *Adv. Synth. Catal.* **2011**, *353*, 2421-2430; (b) A. Intra, S. Nicotra, S. Riva, B. Danieli, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 973-977.
67. C. E. Paul, V. Gotor-Fernández, I. Lavandera, J. Montejo-Bernardo, S. García-Granda, V. Gotor, *RSC Adv.* **2012**, *2*, 6455-6463.
68. De hecho, existe un artículo en el que cual se ha empleado un sistema de oxidación con lacasas y diversos mediadores para desproteger el grupo *p*-metoxifenilo (PMP) con una serie de aminas, ver: J. M. M. Verkade, L. J. C. van Hemert, P. J. L. M. Quaedflieg, H. E. Schoemaker, M. Schürmann, F. L. van Delft, F. P. J. T. Rutjes, *Adv. Synth. Catal.* **2007**, *349*, 1332-1336.

69. (a) N. Ríos-Lombardía, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 811-819; (b) N. Ríos-Lombardía, E. Busto, V. Gotor-Fernández, V. Gotor, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 5709-5718.
70. (a) E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, PR110-PR180; (b) E. García-Urdiales, I. Alfonso, V. Gotor, *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 313-354.
71. Nótese que hay un cambio de configuración puesto que cambia la preferencia en la nomenclatura de Cahn-Ingold-Prelog (CIP).